

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**“EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD COMO STARTER DE  
*Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis* PARA LA  
PRODUCCIÓN DE CERVEZA TIPO LAGER”**

Presentado por:

**KARIN TORIBIO TAMAYO**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO**

Lima- Perú

2015

## *Dedicatoria*

Dedico esta Tesis a toda mi familia. A mis padres, por estar siempre a mi lado y darme su apoyo incondicional, por todo su esfuerzo y sacrificio, por haber depositado en mí su amor y sus anhelos.

A mi esposo por su fuerza, por su amor, por ser una persona excepcional. Quien me ha brindado su apoyo y ha hecho suyo mis logros y dificultades, amigo y compañero inseparable, fuente de calma y amor en todo momento.

Gracias por haber fomentado en mí, el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida.

A todos ellos, muchas gracias de todo corazón.

*Cree en ti mismo y en lo que eres. Se consciente de que hay algo en tu interior que es más grande que cualquier obstáculo.-*

### *Agradecimientos*

De manera especial, agradezco al Dr. Víctor Meza Contreras, asesor de tesis, por sus orientaciones, consejos, motivación y paciencia, para la realización de esta tesis.

A la empresa Anpay Perú S.A. y Compañeros de trabajo, por facilitarme los medios, materiales y equipo, para la investigación y realización del presente trabajo.

Y finalmente, a mis Maestros, quienes en su labor me permitieron tener una hermosa etapa de formación profesional.

Para ellos, ¡Muchas gracias!

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	5
2.1 ORÍGENES DE LA ELABORACIÓN DE LA CERVEZA .....	5
2.2 DEFINICIÓN DE CERVEZA .....	9
2.3 CLASIFICACIÓN DE LAS CERVEZAS .....	10
2.3.1 Clasificación por su Fermentación .....	10
2.4 GENERALIDADES DE LA LEVADURA EN CERVECERÍA.....	12
2.4.1 Levaduras.....	12
2.4.2 Levaduras del género <i>Saccharomyces</i> .....	16
2.4.3 Levaduras cerveceras del tipo Ale y Lager .....	18
2.4.4 Concepto de Cultivo Puro.....	25
2.4.5 Cultivo Puro en la Industria Cervecera .....	25
2.4.6 Propagación de Cultivo Puro de Levaduras.....	26
2.4.7 Subcultivos o “Re-pitching” en las Cervecerías .....	32
2.4.8 Reproducción y Crecimiento en Levaduras .....	34
2.4.9 Metabolismo de la levadura en el mosto.....	36
2.4.10 Estabilidad de cultivos de levadura en cervecería .....	48
2.4.11 Características Industriales de la Levadura cervecera .....	52
2.4.12 Condiciones de producción inducidas en la levadura cervecera .....	54
2.6.13 Procesos anómalos que sufren las levaduras en cervecería .....	55
2.5. PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA CERVEZA TIPO LAGER .....	57
2.5.1 Ingredientes .....	57
2.5.2 Etapas .....	59
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
3.1 UBICACIÓN DE LA ETAPA EXPERIMENTAL.....	67
3.2 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA .....	67
3.2.1 Obtención de la cepa .....	67
3.2.2 Obtención y preparación del mosto a fermentar.....	67
3.3 MATERIALES Y EQUIPOS .....	68
3.3.1 Materiales.....	68
3.3.2 Medios de cultivo .....	68
3.3.3 Equipos.....	69

3.4 MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE LOS STARTER .....	69
3.4.1. Preparación de las cepas de trabajo y stock .....	72
3.4.2 Escalamiento de propagación de los Starters .....	72
3.4.3 Fermentación de lotes.....	73
3.4.4 Cerveza final.....	73
3.5 METODOLOGÍA DE ANÁLISIS .....	73
3.5.1 Determinación de la calidad del Mosto .....	73
3.5.2 Determinación de la viabilidad .....	75
3.5.3 Determinación de la vitalidad .....	77
3.5.4 Determinación de la calidad de la cerveza obtenida .....	78
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>79</b>
4.1 DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL MOSTO .....	79
4.1.1 Caracterización Físicoquímica del mosto .....	79
4.1.2 Caracterización microbiológica del mosto .....	82
4.1.3 Evaluación de la estabilidad del mosto.....	83
4.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y VIABILIDAD DE LEVADURAS EN LOS STARTER .....	84
4.2.1 Recuento y Viabilidad de los Starter por el Método N°1 (Re-pitching) .....	85
4.2.2 Recuento y Viabilidad de los Starter por el Método N° 2.....	91
4.2.3 Comparación del recuento y viabilidad entre los Método N°1 y N°2 .....	94
4.3 DETERMINACIÓN DE LA VITALIDAD DE LOS STARTER .....	97
4.3.1 Evaluación de la Vitalidad por el Método N°1 (Re-pitching).....	97
4.3.2 Evaluación de la Vitalidad por el Método N°2 .....	100
4.3.3 Comparación de los parámetros de vitalidad entre los Métodos N°1 y N°2 .....	103
4.4 VIABILIDAD Y VITALIDAD ENTRE LOS MÉTODOS N°1 Y N°2 .....	111
4.5 DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE LA CERVEZA FINAL OBTENIDA .....	112
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>115</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>116</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>117</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>123</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: CLAVES PARA EVALUAR LAS ESPECIES DEL GENERO <i>Saccharomyces</i> (TOMADO DE KURTZMAN Y FELL, 1998). .....	17
TABLA 2: CRECIMIENTO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SOBRE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO. ....	22
TABLA 3: CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	23
TABLA 4: VOLÚMENES DE PROPAGACIÓN EN LABORATORIO.....	30
TABLA 5: MECANISMO DE REGULACIÓN CATABÓLICA DEL AZÚCAR EN LA LEVADURA. ....	44
TABLA 6: RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL MOSTO. ....	80
TABLA 7: RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL MOSTO. ....	82
TABLA 8: RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL MOSTO.. ....	84
TABLA 9: RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS DE VIABILIDAD DEL CULTIVO-0, EN EL STARTER Y FERMENTACIÓN.....	85
TABLA 10: RESULTADOS DEL RECUENTO Y VIABILIDAD DEL CULTIVO-C1, EN EL STARTER Y FERMENTACIÓN. ....	87
TABLA 11: RESULTADOS DEL RECUENTO Y VIABILIDAD DEL CULTIVO-C2, EN EL STARTER Y AL FERMENTACIÓN. ....	89
TABLA 12: RESULTADOS DEL RECUENTO Y VIABILIDAD DEL CULTIVO-C3, EN EL STARTER Y FERMENTACIÓN. ....	90
TABLA 13: RESULTADOS DEL RECUENTO Y VIABILIDAD DEL CULTIVO “PRIMER MES-N1”, EN EL STARTER Y FERMENTACIÓN.. ....	92
TABLA 14: RESULTADOS DEL RECUENTO Y VIABILIDAD DEL CULTIVO “SEGUNDO MES-N2”, EN EL STARTER Y FERMENTACIÓN.. ....	93
TABLA 15: RECUENTO Y VIABILIDAD DEL CULTIVO “TERCER MES-N3”, EN EL STARTER Y FERMENTACIÓN.....	94
TABLA 16: RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VITALIDAD DEL CULTIVO-C1, EN TODAS LAS ETAPAS.....	98

TABLA 17: RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VITALIDAD DEL CULTIVO-C2, EN TODAS LAS ETAPAS.....	99
TABLA 18: RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VIABILIDAD DEL CULTIVO-C3, EN TODAS LAS ETAPAS. ....	100
TABLA 19: RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VIABILIDAD DEL PRIMER MES - N1, EN TODAS LAS ETAPAS. ....	101
TABLA 20: RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VIABILIDAD DEL PRIMER MES – N2, EN TODAS LAS ETAPAS.....	101
TABLA 21: RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VITALIDAD DEL TERCER MES-N3, EN EL STARTER Y FERMENTACIÓN. ....	103
TABLA 22: RESULTADOS FISICOQUÍMICOS DE LA CERVEZA FINAL OBTENIDA DE TODOS LOS CULTIVOS. ....	113
TABLA 23: RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS DE CERVEZA FINAL OBTENIDA DE TODOS LOS CULTIVOS. ....	114

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: CIVILIZACIÓN BABILÓNICA, BEBIENDO CERVEZA EN LA ÉPOCA 2400 ANTES DE CRISTO .....	6
FIGURA 2: DETALLE DE PRODUCCIÓN DE CERVEZA, TUMBA DE TI (SAQQARA, V DINASTÍA). ....	7
FIGURA 3: ESQUEMA DEL CICLO BIOLÓGICO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	133
FIGURA 5: MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA DE LA GEMACIÓN, EN LEVADURA DE CERVEZA (PROPORCIONADA POR KATHARINE SMART, OXFORD BROOKES UNIVERSITY). ..	1919
FIGURA 6: EJEMPLOS DE COLONIAS GIGANTES DE LEVADURA CERVECERA: (1) ALE, (2) LAGER Y (3) SILVESTRE. TODO EN AUMENTO X 10. ..	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.0</b>
FIGURA 7: TÍPICO TANQUE DE PROPAGACIÓN DE CULTIVOS PUROS DE LEVADURAS. ....	27
FIGURA 8: PREPARACIÓN DE CULTIVOS STARTERS. ....	29
FIGURA 9: BALÓN DE CARLSBERG. ....	30
FIGURA 10: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DEL FLUJO PARA LA PROPAGACIÓN EN LABORATORIO DE LEVADURA CERVECERA. ....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
FIGURA 11: CURVA DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS. ....	35
FIGURA 12: (A) UTILIZACIÓN DEL AZÚCAR RAFINOSA Y MELIBIOSA POR <i>Saccharomyces uvarum carlsbergensis</i> Y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (B) ABSORCIÓN DE MALTOSA Y MALTOTRIOSIA Y (C) ABSORCIÓN DE AZUCARES POR LA CÉLULA DE LEVADURA CERVECERA. (EN INGLÉS) .....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
FIGURA 13: (A) DIAGRAMA DE FLUJO DE ELABORACIÓN DE MALTA EN UNA MALTERÍA Y (B). DIAGRAMA DE FLUJO DE ELABORACIÓN DE CERVEZA EN UNA CERVECERÍA. ....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
FIGURA 14: ENVASADO DE CERVEZA CON SISTEMA DE LLENADO AUTOMÁTICO “SENSOMETIC VPVI” .....	65
FIGURA 15: ESQUEMA DEL MÉTODO N°1, PARA LA PRODUCCIÓN DE STARTER Y CERVEZA TIPO LAGER. ....	70

FIGURA 16: ESQUEMA DEL MÉTODO N°2, PARA LA PRODUCCIÓN DEL STARTER Y CERVEZA TIPO LAGER. ....	71
FIGURA 17: COMPARACIÓN DEL RECUENTO DE LEVADURAS EN CÁMARA DE NEUBAUER DE TODOS LOS CULTIVOS EN LA FERMENTACIÓN DE SUS RESPECTIVOS BACH. ....	96
FIGURA 18: COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE TODOS LOS CULTIVOS EN LA FERMENTACIÓN DE SUS RESPECTIVOS BACH. ....	96
FIGURA 19: CURVA DE LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL % V/V, DURANTE LA FERMENTACIÓN DE TODOS LOS STARTER EN SUS RESPECTIVOS BACH.....	106
FIGURA 20: CURVA DE LA VARIACIÓN DEL EXTRACTO APARENTE % PESO/PESO (EN GRADOS PLATO °P), DURANTE LA FERMENTACIÓN DE TODOS LOS STARTER EN SUS RESPECTIVOS BACH. ....	106
FIGURA 21: CURVA DE LA VARIACIÓN DEL GRADO DE FERMENTACIÓN APARENTE (ADF % O ATENUACIÓN APARENTE) DURANTE LA FERMENTACIÓN DE TODOS LOS STARTER EN SUS RESPECTIVOS BACH.....	107

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: DIVERSAS FORMAS DE PRESENTACIÓN DE LEVADURA COMERCIAL EN CERVECERÍA. .....	123
ANEXO 2: DOCUMENTACIÓN DE LA CEPA <i>Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis</i>	124
ANEXO 3: FOTOS DEL ESCALAMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL STARTER. ....	128
ANEXO 4: FOTOS DEL BACH DE 10 L PARA FERMENTACIÓN. ....	129
ANEXO 5: FOTOS DEL EQUIPO DE FILTRACIÓN DE LA CERVEZA FINAL. ....	130
ANEXO 6: FOTOS DEL EQUIPOS ANTON PAAR. ....	131
ANEXO 7: DOCUMENTACIÓN DE LOS DATOS FISCOQUÍMICOS DEL MOSTO. ....	132
ANEXO 8: CUADROS COMPARATIVOS DEL RECUENTO EN CÁMARA NEUBAUER Y VIABILIDAD DE TODOS LOS CULTIVOS. ....	134
ANEXO 9: CUADRO COMPLETO DE LOS PARÁMETROS DE VITALIDAD DEL MÉTODO N°1, CULTIVO-C1. ....	135
ANEXO 10: CUADRO COMPLETO DE LOS PARÁMETROS DE VITALIDAD DEL MÉTODO N°1 CULTIVO-C2. ....	136
ANEXO 11: CUADRO COMPLETO DE LOS PARÁMETROS DE VITALIDAD DEL MÉTODO N°1- CULTIVO-C3. ....	137
ANEXO 12: CUADRO COMPLETO DE LOS PARÁMETROS DE VITALIDAD DEL MÉTODO N°2- PRIMER MES-N1. ....	138
ANEXO 13: CUADRO COMPLETO DE LOS PARÁMETROS DE VITALIDAD DEL MÉTODO N°2- SEGUNDO MES-N2. ....	139
ANEXO 14: CUADRO COMPLETO DE LOS PARÁMETROS DE VITALIDAD DEL MÉTODO N°2- TERCER MES-N3. ....	140
ANEXO 15: CUADROS COMPARATIVOS DEL ALCOHOL, ATENUACIÓN APARENTE Y EXTRACTO APARENTE DE TODOS LOS CULTIVOS. ....	141
ANEXO 16: DOCUMENTACIÓN DE LOS DATOS FISCOQUÍMICOS DE LA CERVEZA FINAL OBTENIDA. ....	142

## RESUMEN

En la industria cervecera se utilizan dos formas de cultivo de levadura: el primero se basa en la *reutilización de levaduras*, conocido como “*Re-pitching*”; y el segundo es la *propagación desde un cultivo puro*. Estas dos formas de cultivos fueron representadas en los Métodos N°1 y N°2, con la finalidad de preparar un inóculo o también denominado “*Starter*”, para la producción de cerveza tipo lager a escala de laboratorio, utilizando la levadura *Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis* la evaluación y comparación de los métodos N°1 y N°2, se midió a través de la estabilidad de la levadura para producir cerveza, evaluando su viabilidad y vitalidad en las diferentes etapas de elaboración de cerveza, desde la preparación, escalamiento del *Starter*, lote de fermentación, maduración y producto final. Se concluye que el Método N°1, disminuye en un día la fase de fermentación, y que hasta el tercer *re-pitching* no hubo diferencia en el producto final, entre ambos métodos. También mediante el Método N°1, el tercer *re-pitching* presentó contaminación bacteriana y una ligera disminución de la viabilidad y vitalidad de la levadura, lo que limitaría el número de subcultivos, debido a su influencia en las características del sabor de la cerveza. Ambos métodos se complementan y su utilización dependerá del tamaño y volumen de producción de la empresa cervecera.

**Palabras Claves:** *Cerveza Tipo Lager, Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis, cultivo puro, Re-pitching, viabilidad, vitalidad.*

## ABSTRACT

In the brewing industry two forms of yeast culture is used: the first is based on the *reuse of yeast*, known as “*Re-pitching*”; and the second is the *propagation of a pure culture*. These two ways of cultures were represented in the Methods N°1 y N°2, in order to prepare an inoculum or also called “*Starter*”, for the production of lager beer on laboratory scale, using the yeast *Saccharomyces pastorianus ssp. Carlsbergensis* the evaluation and comparison of Methods N°1 y N°2, was measured through the stability of the yeast for producing beer, assessing their viability and vitality at different stages from preparing and scaling Starter, Bach fermentation, maturation to the final product. It is concluded that the method N°1, decreases in a day fermentation phase and to the third re-pitching there is not difference in the final product between the two methods. Also by Method N°1, the third re-pitching bacterial contamination introduced and it shows a slight decrease in viability and vitality of yeast, which would limit the number of subcultures, influencing the characteristics of beer flavor. Both methods are complementary and their use depends on the size and volume of production brewery.

**Key words:** *Beer type Lager, Saccharomyces pastorianus ssp. Carlsbergensis, pure culture, re-pitching, viability and vitality.*

## I. INTRODUCCIÓN

Las bebidas se han venido elaborando desde tiempos prehistóricos. La cerveza, es la bebida alcohólica más antigua, inventada y usada por la humanidad, debido a su larga historia, es considerada como un típico ejemplo de biotecnología tradicional.

Esta bebida es elaborada a partir de la fermentación de una solución de cereales, principalmente cebada, donde el almidón ha sido parcialmente hidrolizado y se le ha conferido por infusión el sabor del lúpulo. Sus principales materias primas son malta, levadura, lúpulo y agua; siendo la levadura uno de los ingredientes más importantes en su elaboración, debido a que es el responsable de los procesos metabólicos que producen etanol, dióxido de carbono y otros subproductos tales como ésteres, alcoholes superiores y ácidos, constituyendo las características sensoriales propias de la cerveza (Kunze, 2006).

Los avances científicos, tales como, los estudios de Louis Pasteur acerca del proceso de fermentación, el descubrimiento de varios tipos de levadura por parte del danés Emil Christian Hansen, y la invención de la Máquina de Refrigeración del ingeniero bávaro Carl Linde, posibilitó la producción de cerveza en todo el año con calidad estándar a niveles industriales (Moreno, 2013).

La producción de cerveza implica procesos que determinan su calidad final, como son: maceración, filtración, ebullición, fermentación y maduración. La maceración es la mezcla de malta molida con agua, llevada a distintos rangos de temperatura y tiempo hasta alcanzar la activación de las enzimas, que darán como resultado el mosto. El cual es una solución compleja de carbohidratos fermentables, aminoácidos y minerales, que sirven de sustrato para el crecimiento de las levaduras y producción de etanol (Hough, 1990).

Una de las cervezas más famosas y producidas a nivel mundial es conocida como “*Lager*” y constituye casi el 90 por ciento de la producción mundial y son las de mayor consumo. Se caracteriza por ser una cerveza dorada con aroma a lúpulo y un acabado seco, con un contenido alcohólico de cuatro a seis por ciento (Olalla Marañón, 2013).

Este tipo de cerveza fue elaborada por vez primera en Bavaria por monjes, hace unos 500 años, originalmente se guardaba la cerveza en cuevas por largos periodos a bajas temperaturas. De ahí el origen del término “*Lager*” que significa guardar o almacenar en alemán, los cerveceros alemanes tenían por costumbre dejar la cerveza producida a finales de otoño en reposo hasta la primavera. El frío de la temporada permitía que solo cierto tipo de levaduras se desarrollaran produciendo así cervezas más puras y de mejor calidad (Moreno, 2013).

Las cervezas tipos *Lager*, son elaboradas actualmente, por las levaduras del género *Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis*, esta denominación no ha tenido controversias a nivel industrial, sin embargo, desde el punto de vista genético, la clasificación presenta aún controversias en su denominación. Algunos investigadores consideran como sinónimos las especies *carlsbergensis*, *uvarum* y *pastorianus* y en otros la consideran como un híbrido de *S. bayanus* y *S. cerevisiae*, o un híbrido de *S. cerevisiae* y *S. monacensis*. Este tipo de levaduras fermentan a temperaturas bajas de 5 °C a 15 °C y al finalizar la fermentación las levaduras floculan, depositándose en el fondo del tanque de fermentación (Martínez Quesada, 2012).

El estudio de las levaduras en el proceso de elaboración de cerveza, es fundamental ya que estas son las responsables de las características propias de una cerveza, por tanto los estudios de reactivación, propagación, escalamientos sucesivos de los cultivos, fermentación y obtención del producto final, permiten conocer el comportamiento de la levadura, y saber cuál serán las características de la cerveza final. Uno de los principales objetivos en la industria cervecera es obtener un cultivo puro y este se obtiene a partir de un inóculo o starter, que implica el desarrollo de una población desde su estado de conservación hasta la suspensión de una gran biomasa de microorganismos viables y aptos para reproducirse y producir metabolitos a escala industrial (Kunze, 2006).

En las fermentaciones industriales que se realizan para la producción de cerveza, las levaduras no son desechadas después de su uso, estas se mantienen y reutilizan varias veces en un proceso llamado “*Serial Re-pitching*”, donde parte de la levadura es reutilizada para iniciar un nuevo proceso de fermentación. Estas levaduras hacia el final de la fermentación, son enfriadas hasta cero °C, provocando la floculación y sedimentación de las levaduras en la estructura cónica del fermentador, siendo las células grandes las que se depositan más rápido que las células pequeñas. Produciéndose una estratificación por edades genealógicas, en donde, las levaduras reutilizadas en las siguientes fermentaciones,

serán poblaciones con distintas características, se conoce que la selección de una población enriquecida con células vírgenes, jóvenes, o de edad avanzada, influye en el rendimiento de la fermentación (Ginovart, Portell y Silbert, 2008).

Este estudio, evaluó dos formas de cultivo de levadura, que se utilizan en las cervecerías para la producción de cerveza tipo lager, el primero se basa en la *reutilización de levaduras*, conocido como “*Re-pitching*”; y el segundo es la *propagación desde un cultivo puro*. Estas dos formas de cultivo fueron representadas en los Métodos N°1 y N°2 respectivamente, con la finalidad de preparar un inóculo o también denominado “*Starter*”, para la producción de cerveza tipo lager a escala de laboratorio, utilizando la levadura *Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis* la evaluación de la estabilidad de los *Starters*, obtenidos por los métodos N°1 y N°2, se midieron a través de su viabilidad y vitalidad durante las etapas de: preparación y escalamiento del *Starter*, lote de fermentación, maduración y producto final. Evaluándose tres cultivos consecutivos para cada método, determinándose así, la relación entre el método de cultivo y la estabilidad del *starter*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la estabilidad del *Starter*, que se obtiene por dos formas de cultivo, utilizadas en las cervecerías para la producción de cerveza tipo lager, utilizando la levadura *Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis*, a escala de laboratorio.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar la calidad del mosto, a través de la caracterización fisicoquímica, microbiológica y estabilidad.
2. Determinar la viabilidad a través de la Tinción con azul de metileno y el conteo en cámara de Neubauer.
3. Determinar la vitalidad a través de la actividad de la fermentación del starter, evaluando su extracto aparente, grado de alcohol, y grado de fermentación aparente.
4. Evaluar la calidad de la cerveza final obtenida mediante la caracterización fisicoquímica y microbiológica.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 ORÍGENES DE LA ELABORACIÓN DE LA CERVEZA

Respecto a su origen, numerosos mitos y leyendas son conocidos. Uno de ellos, establece a la cerveza un origen divino, por obra del dios egipcio Osiris, hijo del cielo y de la tierra Martínez Laínez (1996), Otra contada por Cela (1987), narraba que una leona etíope regalada por un pretendiente real de origen africano a una noble abadesa, habitante de Mesopotamia, parió una espiga de cebada en lugar de cachorros, la cual se limpió, remojó y dejó reposar, con el paso del tiempo se convirtió en malta.

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 (Martínez Laínez, 1996).

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* (Martínez Laínez, 1996).

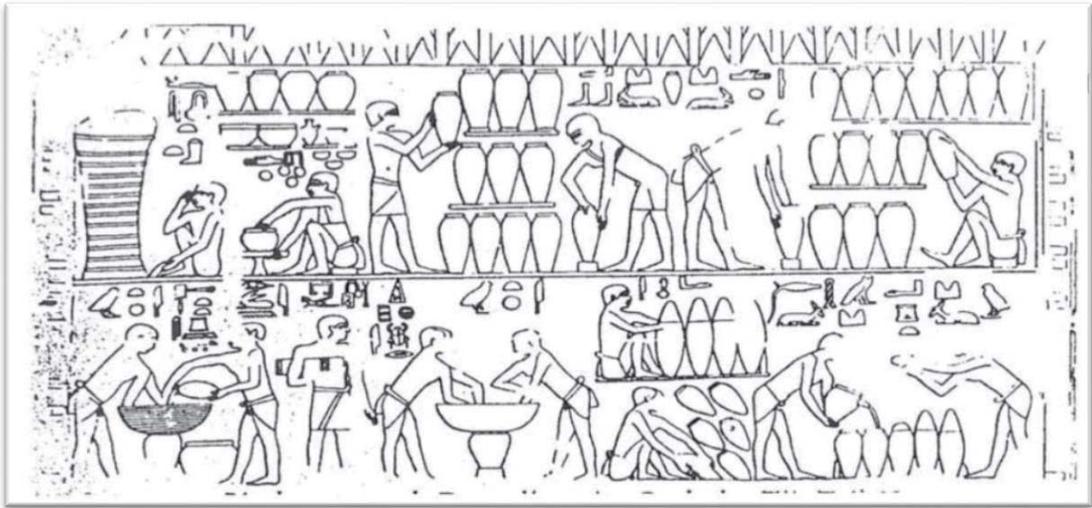
Así mismo, Hornsey (2003), afirma que lo que ahora conocemos como cerveza fue producida por primera vez por los sumerios, en el sur de Babilonia, al final del cuarto milenio antes de Cristo, donde ahora es Irán o Irak según otros autores, en la Figura 1, se aprecia una imagen de la civilización babilónica bebiendo cerveza. Otros autores como Sanchís (2004), sitúan el origen de la cerveza antes del año 6000 a.C. En cualquier caso, la cerveza fue en Mesopotamia, la bebida más popular (Molina et al., 2001).



**Figura 1: Civilización Babilónica, bebiendo cerveza en la época 2400 a.C.**  
FUENTE: (Hough, 1990, pág. 3).

Según Gutiérrez (1993), 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. Según Hornsey (2003), 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 anterioridad se dice que los comerciantes propagaron las técnicas de fabricación. Conde Escribano (2001), coincide con lo anterior afirmando “se producía a gran escala para templos y palacios, pero también a escala doméstica”, 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, como la que se muestra en la figura 2.

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 (Martínez Lainez, 1996).



**Figura 2: Detalle de producción de cerveza, tumba de Ti (Saqqara, V dinastía).**  
FUENTE: (Moreno, 2013, pág. 36).

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 (Martínez Laínez, 1996).

Según Hough (1990), la elaboración de la cerveza era considerada un arte o un misterio, y los detalles de su elaboración eran guardados por los maestros cerveceros. Hornsey (2003) afirma que 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*”.

En Múnich, las cervecerías empezaron a almacenar la cerveza en cuevas con hielo. Cuando se guardaba en un almacén (*Lagern*, 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 (Hough, 1990; Kunze, 2006).

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 (Martínez Laínez, 1996).

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. Descubre 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 (Moreno, 2013).

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 levaduras se adoptó de inmediato en todo el mundo, primero en las cervezas de tipo *Lager* y posteriormente en las de tipo *Ale* (Garibay García y López-Munguía Canales, 1993).

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. Las investigaciones 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 (Garibay García y López-Munguía Canales, 1993; Boldú Gonzales, 2011).

En el Perú, nuestros ancestros precolombinos, elaboraron una especie de cerveza de maíz “La chicha”, esta fue el centro de la actividad diaria, gastronómica y religiosa desde hace más de 2000 años. La información más antigua sobre el consumo de cerveza en el Perú, data de fines del siglo XIX, fueron inmigrantes alemanes, franceses y estadounidenses los que empezaron la historia de la cerveza en el Perú. En 1863, en Lima el alemán Federico Bindels, fundó la Cervecería Pilsen, hoy conocida como Backus. Actualmente la producción de cerveza muestra una gran innovación biotecnológica (Paan, 2014).

## **2.2 DEFINICIÓN DE CERVEZA**

En nuestro país, la NTP 213.014:2014 CERVEZA. Requisitos, define a la cerveza como la bebida resultante de un proceso de fermentación controlado, mediante levadura cervecera, de un mosto o cebada malteada o extracto de malta, sometido previamente a un proceso de cocción, adicionando lúpulo. Y según el «Reglamento Español Técnico-sanitaria para la elaboración y comercio de la cerveza y de la malta líquida» (1995), 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”.

## **2.3 CLASIFICACIÓN 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 experimentan. Por tanto, la clasificación más aceptada, es según su tipo de fermentación (Rodríguez Cárdenas, 2003).

### **2.3.1 Clasificación por su Fermentación**

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

#### **2.3.1.1 Cervezas de Fermentación Baja o tipo *Lager***

Según Comptom (1977), las levaduras de fermentación baja, fueron empleadas por primera vez en Baviera para producir las cervezas llamadas *Lager*. La palabra *Lager* deriva del vocablo alemán “*Lagern*” que significa guarda o permanencia en bodega.

Las levaduras del genero *Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis*, no suelen formar esporas, se adapta bien a la fermentación lenta a bajas temperaturas y es la preferida para elaborar cerveza tipo *Lager*. Estas levaduras fermentan a bajas temperaturas de 5 °C a 15 °C y la levadura desciende al fondo del tanque al final de la fermentación.

La fermentación se lleva a cabo en dos etapas, la primera es una fermentación a una temperatura de 10 °C a 16 °C durante siete a doce días y la segunda fermentación se da a una temperatura de 0 °C a 5 °C. En la primera fermentación se consigue la mayor parte del sabor y del aroma así como también los subproductos de fermentación. En la segunda fermentación se da el proceso de “*Lagering*” y es donde se mejora el sabor y el aroma, se satura la cerveza de CO<sub>2</sub> y se consigue un aumento de la estabilidad coloidal a bajas temperaturas. El sabor final de la cerveza dependerá mucho de la levadura utilizada y de las temperaturas en la cual fue fermentada (Rodríguez Cárdenas, 2003; Kunze, 2006). Este tipo de cervezas son ligeras y suelen ser espumosas y suaves. Se clasifican en función de su lugar de origen, siendo las más conocidas las del tipo Pils o Pilsner, Múnich, Viena y

Dortmund. Asimismo, su clasificación puede resultar de las peculiaridades de su elaboración: ahumadas, Bock, Steam, Rauchbier, de centeno, negras, de temporada, etc.

La cerveza del tipo Pilsner, es una cerveza clara, con un ligero sabor a lúpulo, contiene entre tres a seis por ciento en volumen de alcohol, y es la cerveza más consumida en el mundo. El tipo Múnich, se caracteriza por su color marrón oscuro, con mucho cuerpo y ligero sabor dulce. El contenido en alcohol varía entre el dos a cinco por ciento en volumen de alcohol y el tiempo de maduración o fermentación secundaria es de tres a cinco meses. El tipo Dortmund, es clara, con menos contenido en lúpulo que la Pilsner, pero con más cuerpo y sabor (Garibay García y López-Munguía Canales, 1993; Vogel, 1999; Hornsey, 2003; Kunze, 2006).

#### **2.3.1.2 Cervezas de fermentación alta o tipo Ale**

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, produce una fermentación más rápida, se realiza a temperaturas altas, entre los 15 °C y los 20 °C, produciendo un elevado porcentaje de alcohol y son muy aromáticas. A este tipo de fermentación, se le denomina “Alta”, debido a que las levaduras suben a la superficie del tanque al terminar la fermentación (Rodríguez Cárdenas, 2003).

La cerveza tipo Ale abarca varios tipos de cerveza, generalmente oscura pero siempre de fermentación alta, las más reconocidas son: Ale, Stout y Porter. Otra clasificación es por su lugar de origen, estas pueden ser: Altbier (Düsseldorf), Kölsch, Trapenses (elaboradas en los monasterios trapenses de Chimay, Orval, Rochefort, Westmalle, Westvleteren, Saint Sixtus y Schaapskooi, por monjes), Abadía, Ale Americana. También se clasifican según su elaboración en: Mild Ale (no amarga), Bitter Ale (amarga), Pale Ale, Indian Pale Ale, Brown Ale y Old Ale, Stout, de trigo, Bière de Garde (Garibay García & López-Munguía Canales, 1993; Hornsey, 2003; Kunze, 2006) Las de tipo Porter, son de color marrón oscuro, con mucho cuerpo y espuma compacta, ligeramente más amarga que la Ale contiene cinco por ciento en volumen de alcohol y está hecha con malta negra. El tipo Stout tiene un color muy oscuro, sabor dulce y contiene entre cinco y siete por ciento en volumen de alcohol y la fermentación tiene lugar en la botella.

### 2.3.1.3 Cervezas de fermentación espontánea

Según Kunze (2006), 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 (2011) y Kunze (2006), 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. 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.

## 2.4 GENERALIDADES DE LA LEVADURA EN CERVECERÍA

### 2.4.1 Levaduras

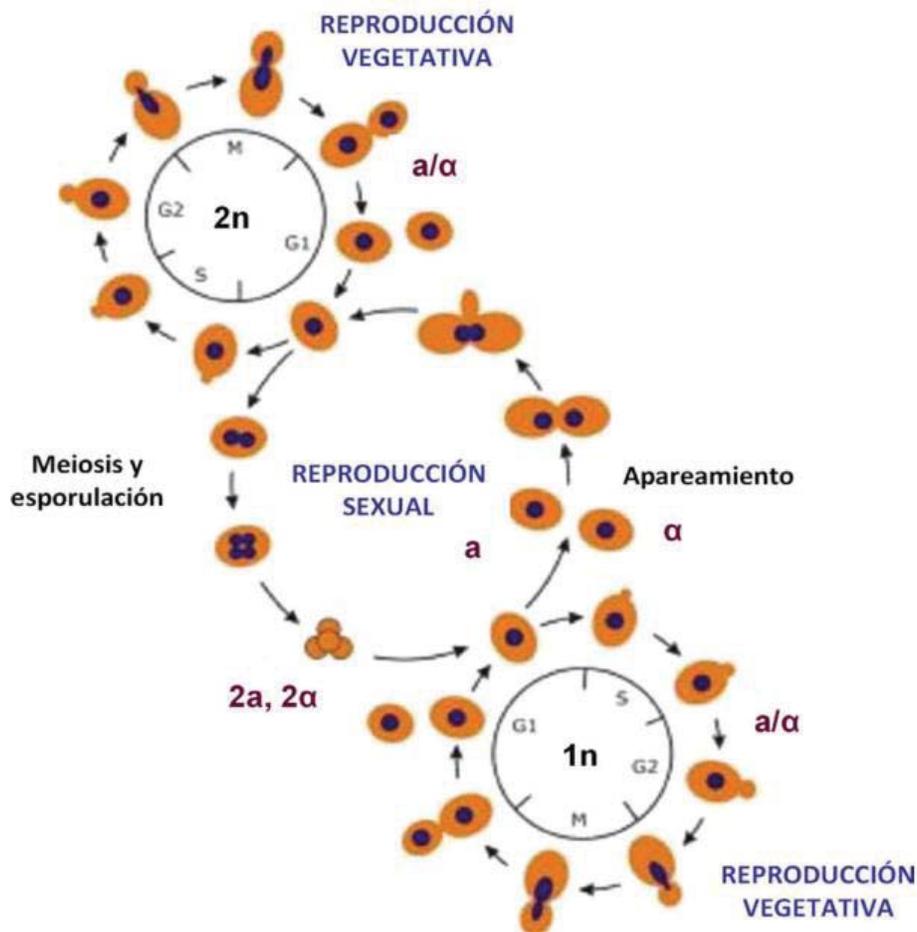
Las levaduras son hongos unicelulares, no filamentosos, con una morfología característica esférica u ovalada que se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza (Santamaria Siurana, 1997).

Hough (1990), menciona que las levaduras no pertenecen a ningún grupo de hongos y comprenden 39 géneros y 350 especies. Se identifican y clasifican, basándose en características morfológicas y fisiológicas. Entre los aspectos morfológicos considerados, se encuentra el tamaño y la forma de las células, en medios sólidos y líquidos específicos. Entre las características fisiológicas consideradas, se encuentra si puede crecer y fermentar un determinado carbohidrato y si puede o no utilizar determinadas fuentes de carbono como los nitrato.

Frazier y Westhoff (1993), denominan a las levaduras “verdaderas” si producen esporas sexuales (*Ascomicetos*). La reproducción sexual da lugar a la producción de ascosporas, desempeñando la función de asca la propia célula de la levadura. Las levaduras se denominan “falsas”, si no producen ascosporas (*Deuteromicota*). Este tipo de levaduras se reproducen por gemación multilateral.

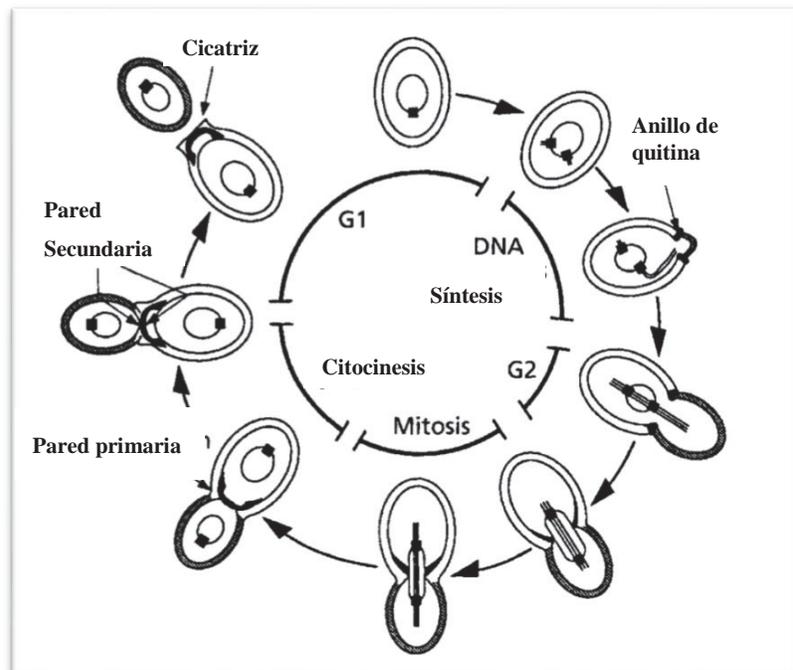
Arias López (2012), menciona que el ciclo de vida de la levadura alterna en dos fases, una haploide y otra diploide, tal como se muestra en la Figura 3. Las células haploides presentan dos posibilidades en su ciclo biológico: un ciclo de reproducción vegetativa, por el que la célula se divide para dar dos células iguales, y un ciclo sexual, en el que dos células de tipo sexual opuesto se fusionan para dar lugar a una célula diploide que entra de nuevo en un ciclo de división vegetativo.

Durante el ciclo de vida vegetativo, la levadura se divide por gemación multicelular o por gemación polar. La célula hija inicia su crecimiento formando una yema en la célula madre hasta que alcanza un tamaño similar a ésta, teniendo lugar en este momento la citoquinesis, septación y separación de las dos células. Este ciclo, se muestra en la Figura 4, y está organizado en periodos de división celular bien definidos, coordinados e irreversibles (mitosis), separados por periodos de gran actividad metabólica (interfase).



**Figura 3: Esquema del Ciclo Biológico de *Saccharomyces cerevisiae*.**  
 FUENTE: Arias López, 2012, pág. 16.

La mitosis es el proceso celular que asegura el reparto equitativo del material hereditario, duplicado durante la interfase, y culmina con la citoquinesis, responsable de la división de los orgánulos y otros componentes citoplasmáticos entre las dos células. La separación se inicia por contracción del anillo de actomiosina, dividiéndose así el citoplasma y dando lugar a dos células idénticas, cada una de ellas con su propio núcleo. El resto de procesos que tienen lugar entre dos mitosis sucesivas y que constituyen la interfase, se pueden dividir en varias etapas: (a) G1; caracterizada por el crecimiento celular y la síntesis de proteínas, momento en el que emerge la yema de la célula madre y se duplica el cuerpo polar del huso (b) S: síntesis y replicación del ADN y (3) G2 en donde inicia la preparación para la mitosis (Boulton y Quain, 2006).



**Figura 4: El ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*.**  
 FUENTE: Adaptado de Boulton y Quain, 2006, pág. 221.

En determinadas circunstancias como la falta de factores de crecimiento o sustancias nutritivas, se ha descrito la existencia de una fase llamada G0 o fase de latencia o quiescencia, que es reversible pero de duración indefinida, en la cual las células detienen su maquinaria de replicación y permanecen inalterados su masa y volumen hasta que las condiciones son adecuadas para reanudar el ciclo (Gray et al., 2004).

En cuanto al ciclo sexual, bajo las condiciones apropiadas, las levaduras pueden ser inducidas a someterse a división meiótica y producir esporas que nacen en un cuerpo fructífero, un asca. En *Saccharomyces cerevisiae*, se presenta dos tipos celulares sexualmente opuestos,  $a$  y  $\alpha$ , determinados por un par de alelos heterocigóticos: MAT $a$  y MAT $\alpha$ . Tanto las células haploides  $a$  como las  $\alpha$  expresan de forma constitutiva una feromona del mismo nombre. Las células diploides pueden reproducirse vegetativamente por gemación si el medio en el que se encuentran tiene los nutrientes apropiados para ello o pueden esporular en condiciones ambientales de limitación de nutrientes, como pueden ser la falta de nitrógeno y la ausencia de una fuente de carbono fermentable en el medio. Durante la esporulación, la célula diploide se divide por meiosis, dando lugar a cuatro células hijas haploides con una dotación cromosómica que será la mitad de la célula madre, las cuales quedan contenidas dentro de un saco denominado asca. Las ascas poseen una pared gruesa capaz de proteger a las células de las adversidades del medio ambiente durante largos periodos de tiempo. Si las condiciones del medio lo permiten, la pared del asca se degrada y se liberan los productos haploides (ascosporas), que germinarían y comenzaría un ciclo mitótico haploide, dividiéndose por gemación (Arias López, 2012).

Las cepas industriales de elaboración de cerveza son típicamente aneuploides, poliploides y normalmente no tienen un ciclo sexual, desde este punto de vista, el estado sexual de las levaduras *Saccharomyces* no es relevante para la elaboración de la cerveza. Sin embargo, el ciclo sexual de la levadura se ha utilizado ampliamente como un método para explorar el genoma (Briggs et al., 2004).

Además de lo citado anteriormente, se ha demostrado que la levadura puede presentar otros tipos de crecimiento: un crecimiento pseudohifal y un crecimiento agar invasivo. Durante muchos años se consideró que, a diferencia de los hongos denominados filamentosos, *Saccharomyces cerevisiae* era incapaz de formar hifas o filamentos y que su crecimiento vegetativo, a través de la gemación, únicamente resultaba en la formación de células individuales denominadas levaduras.

Sin embargo, se descubrió que determinadas cepas diploides en ausencia de nitrógeno eran capaces de formar pseudohifas, originándose cadenas unipolares de células (Gimeno et al., 1992). En contraste con la reproducción vegetativa por gemación, la división celular en el crecimiento pseudohifal es simétrica y, además, la célula madre e hija comienzan juntas la próxima división.

Por último, la composición celular de las células de levadura, es de aproximadamente 80 por ciento de agua. El contenido total de minerales en la levadura es de aproximadamente cinco a diez por ciento de la célula en peso seco. Esta fracción se compone de varios elementos trazas. Las clases más abundantes de macromoléculas son las proteínas de 40 a 45 por ciento de peso seco de la célula, carbohidratos de 30 a 35 por ciento, los ácidos nucleicos seis a ocho por ciento y lípidos de cuatro a cinco por ciento. La composición precisa de cada clase de macromoléculas dentro de una célula, varía en función de la condición fisiológica y fase de ciclo de crecimiento. Existe variación entre las especies de levaduras, por estas razones, no existe una composición generalizada

#### **2.4.2 Levaduras del género *Saccharomyces***

Las levaduras del género *Saccharomyces*, son sin duda las levaduras más explotadas comercialmente, contribuye a muchos de los procesos industriales. En la actualidad, el género *Saccharomyces* se divide en 14 especies. Los nombres de estas especies junto con una clave para su diferenciación se muestran en la Tabla 1 (Kurtzman y Fell, 1998).

Según Briggs et al., (2004), las relaciones entre las 14 especies del género *Saccharomyces* se han investigado intensamente. Basándose en homologías entre el ARN ribosómico y el genoma mitocondrial, llegándose a demostrar que se pueden agrupar en pequeños subgrupos.

Una de ellas es el grupo *Saccharomyces sensuo lato*, que incluyen las especies *S. dairensis*, *S. castelli*, *S. exiguus*, *S. serivazzii*, *S. unisporus* y *S. kluyveri*. Esta agrupación se considera que contienen especies que son relativamente heterogéneas. El grupo *Saccharomyces sensuo stricto* contiene a las levaduras *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. bayanus* y *S. paradoxu.*, como la nomenclatura lo indica, están íntimamente relacionadas.

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.

**Tabla 1: Claves para evaluar a las especies del genero *Saccharomyces* (Tomado de Kurtzman y Fell, 1998).**

Número	Prueba a evaluar	Resultado positivo
1	a. Máximo crecimiento a temperatura superior a 30 °C.	→3
	b. Crecimiento ausente por encima de 30 °C	→2
2	a. sacarosa, rafinosa y trehalosa fermentando	<i>S. barnettii</i>
	b. Sacarosa, rafinosa y trehalosa no fermentando.	<i>S. rosini</i>
3	a. Etilamina-HCl asimilado.	→4
	b. Etilamina-HCl no asimilado.	→6
4	a. Crecimiento en Presencia de 1000 ppm de ciclohexamida.	<i>S. unisporus</i>
	b. No hay crecimiento en la presencia de 1000 ppm ciclohexamida.	→5
5	a. Maltosa, rafinosa y etanol asimilado.	<i>S. kluyveri</i>
	b. Maltosa, rafinosa y etanol no asimilados	<i>S. spencerorum</i>
6	a. Maltosa asimilada.	→7
	b. Maltosa no asimilada	→10
7	a. Crecimiento en un medio libre de vitaminas.	<i>S. bayanus</i>
	b. No hay crecimiento en un medio libre de vitaminas	→9
8	a. D-manitol asimilado, la temperatura máxima crecimiento 37 °C o mayor.	<i>S. paradaxus</i>
	b. D-manitol no asimilada, la temperatura máxima de crecimiento de menor a 37 °C	→9
9	a. Mecanismo de transporte activo para la fructosa presente; máximo crecimiento a temperaturas menores a 34 °C	<i>S. pastorianus</i>
	b. Mecanismo de transporte activo para la fructosa no presente; máximo crecimiento a temperatura variable.	<i>S. cerevisiae</i>
10	a. Sacarosa, rafinosa y trehalosa fermentado.	<i>S. exiguus</i>
	b. Sacarosa, rafinosa y trehalosa no fermentado.	→11
11	a. Crecimiento en presencia de 1000 ppm cicloheximida.	<i>S. servazzii</i>
	b. Crecimiento en presencia de 1000 ppm cicloheximida.	→12
12	a. D-ribosa normalmente asimilada; 8-10 cromosomas 600-3000 kilobases.	<i>S. castellii</i>
	b. D-ribosa no asimilado, en su mayoría solo ascosporas, 8 cromosomas 400-2200 kilobases.	<i>S. transvaalensis</i>
	c. D-ribosa normalmente no asimilados, 7-9 cromosomas 750-3000 kilobases.	<i>S. dairiensis</i>

FUENTE: Adaptado de Briggs et al., 2004, pág. 369.

Todas las especies de levaduras del grupo *Saccharomyces sensuo stricto* con la excepción de *S. paradoxus*, son explotadas comercialmente para la producción de etanol y pan. Se piensa que estas cepas de levadura comerciales surgieron en realidad mediante procesos selectivos, que han evolucionado en ambientes industriales a través de la presión selectiva para fermentar los mostos.

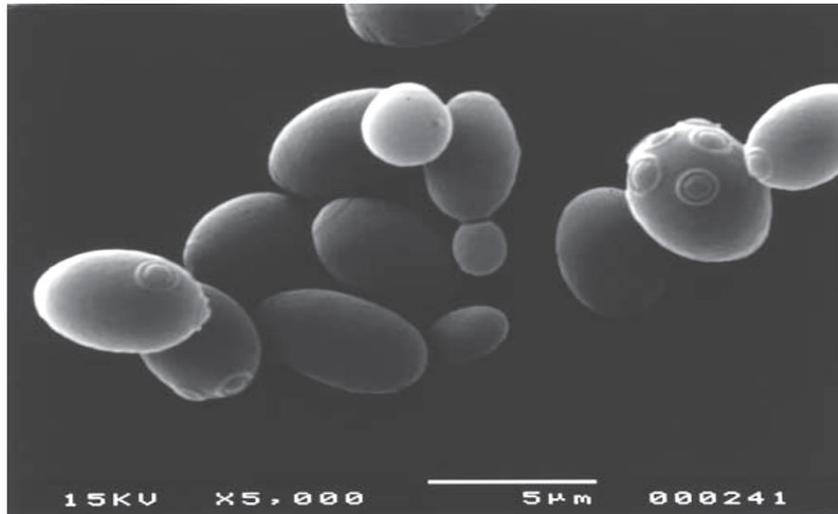
Se conoce que *S. cerevisiae*, se utiliza en la preparación de panes, así como también en la elaboración de cerveza y vinificación. Las cepas de *S. bayanus* son utilizadas exclusivamente para propósitos enológicos, mientras que *S. pastorianus*, *carlsbergensi*, son utilizadas en la fermentación de 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.

La taxonomía precisa de los hongos en general y el de *Saccharomyces* en particular es aún objeto de debate y revisión continúa.

### **2.4.3 Levaduras cerveceras del tipo *Ale* y *Lager***

Las cepas de levadura cervecera son del tipo Ascomicetos clasificados dentro del género *Saccharomyces*. En la elaboración de cerveza se utilizan principalmente dos especies de levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de cerveza tipo *Ale* o de fermentación alta y *Saccharomyces carlsbergensis* conocida también como *Saccharomyces uvarum* o *pastorianus* para la producción de cerveza tipo *Lager* o de fermentación baja (Rodríguez Cárdenas, 2003).

Según Klimovitz y Bamforth (2002), la gemación es el tipo de reproducción más importante en la levadura cervecera. En donde la célula madre produce una célula hija, que una vez alcanzado el desarrollo adecuado, se separa de la célula “madre” por estrangulación dejando una cicatriz en la pared celular, este proceso se muestra en la micrografía electrónica de levadura cervecera Figura 5.

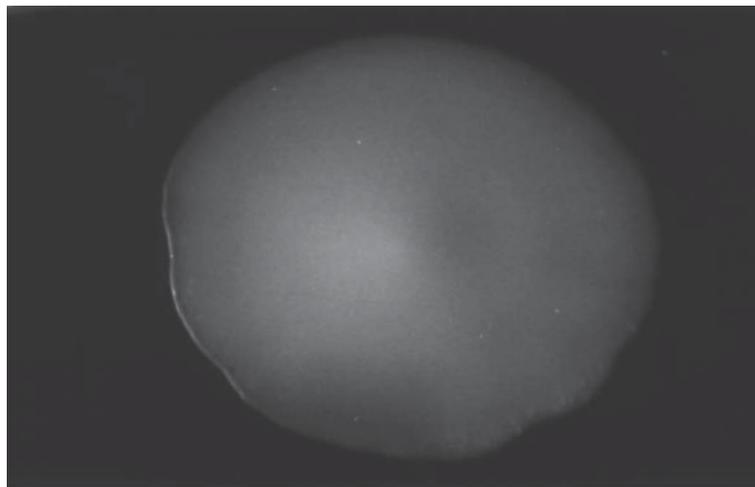
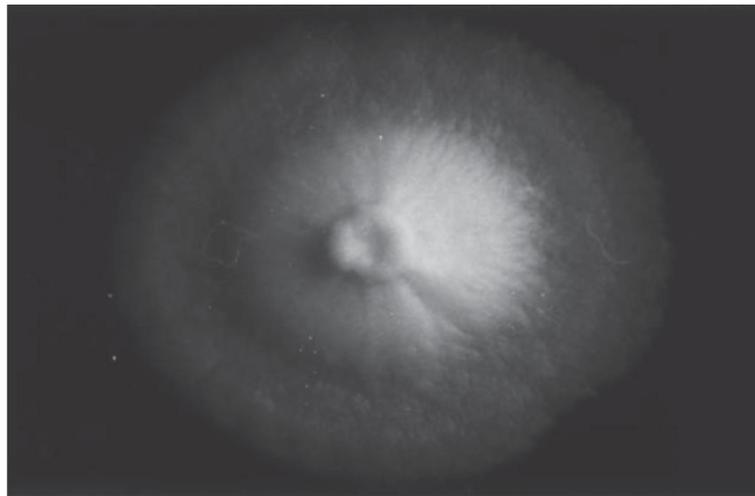
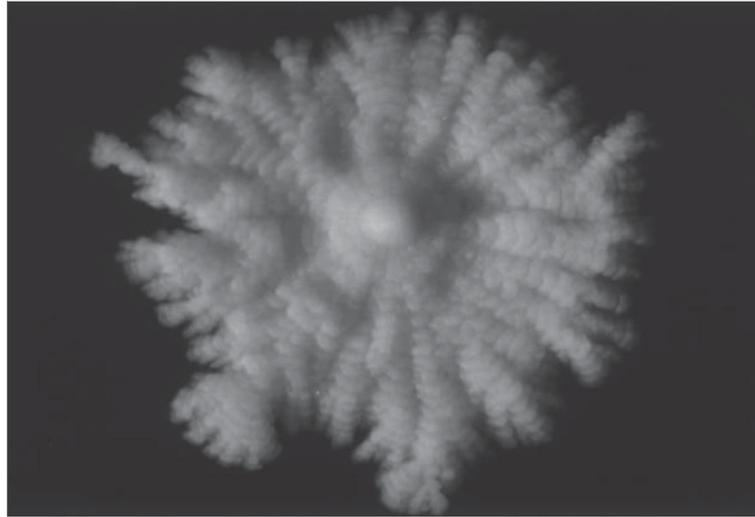


**Figura 5: Micrografía electrónica de la gemación, en levadura de cerveza (Proporcionada por Katherine Smart, Oxford Brookes University).**

FUENTE: Tomado de Boulton y Quain, 2006, pág. 241.

El tamaño de la levadura aumenta con la edad generacional. Existe una correlación entre el número de cicatrices y el tamaño de la célula. Se reportó que el volumen promedio de una célula hija virgen era de aproximadamente  $150 \mu\text{m}^3$ . Y el de una célula, que había tenido 20 rondas de generación y se acercaban al final de su vida, tenía un volumen de aproximadamente  $850 \mu\text{m}^3$ . Las células de levadura cervecera tienden a ser más grande que las cepas haploides de laboratorio. Esto es debido al hecho de que las primeras células tienden a ser poliploides, un estudio reportó el volumen medio de células haploide, diploide, triploide y tetraploide de una cepa *S. cerevisiae*, y estos fueron de 72, 111, 152 y  $289 \mu\text{m}^3$ , respectivamente (Briggs et al., 2004).

Según Boulton y Quain (2006), indican que la forma y morfología de las colonias de levaduras son altamente organizadas. El tamaño y la forma de colonias varía con la especie de levadura, naturaleza del medio de crecimiento, el agente de solidificación y las condiciones bajo las cuales las placas se incubaron. En microbiología de la cerveza, el método de aislar colonias gigantes de levadura, era el método más tradicional de caracterización de las cepas, estas se incubaban durante tres semanas a  $18^\circ\text{C}$ , y luego se diferenciaban, ejemplos de estas colonias gigantes de levadura *Ale*, *Lager* y silvestres, se muestran en la Figura 6. Este método fue utilizado con éxito en las cervecerías de todo el mundo durante muchos años. Sin embargo, el tiempo de respuesta era muy largo para obtener respuesta, actualmente esta técnica no se utiliza.



**Figura 6: Ejemplos de colonias gigantes de levadura cervecera: (1) *Ale*, (2) *Lager* y (3) *Silvestre*. Todo en aumento x 10.**

FUENTE: Boulton & Quain, 2006, págs. 176-7.

### 2.4.3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Este grupo está representado por numerosas cepas que fueron elegidos y adaptadas para fermentaciones industriales específicas. Cuentan con levadura de panadería, levaduras para producción de bebidas alcohólicas, tales como la cerveza, el vino, cepas especiales para la producción de champagne, cepas para la producción de flor de Jerez entre otras (Kurtzman y Fell, 1998).

Según Kunze (2006), 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. Según Hough (1990), esta capacidad, se debe a la estructura química de las capas exteriores de las células de levaduras.

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.

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en enología o en la elaboración de pan, pueden producir un pan o vino espléndido, pero no cervezas, estas serían inaceptables. Del mismo modo, existen muchas levaduras silvestres, que aunque taxonómicamente son *S. cerevisiae*, originan el deterioro de la cerveza, produciendo sabores y aromas desagradables.

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 (Boulton y Quain, 2006).

**Tabla 2: Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* sobre diferentes fuentes de carbono**

<b>Fuente de carbono</b>	<b>Crecimiento anaeróbico</b>	<b>Crecimiento aeróbico</b>
D-glucosa	Si	Si
D-galactosa	Variable	Variable
Metil- $\alpha$ -D-glucopiranosida	Variable	Variable
Maltosa	Variable	Variable
Sacarosa	Variable	Variable
trehalosa	Variable	Variable
Melibiosa	Variable	Variable
Lactosa	No	No
Celobiosa	No	No
Melezitosa	Variable	Variable
Rafinosa	Variable	Variable
Inulina	No	No
Almidón	No	Variable
L-sorbosa	No	No
DL-Lactato	No	Variable
Glicerol	No	Variable
D-glucosamina	No	No
D-glucitol	No	No
D-manitol	No	Variable
Ácido succínico	No	Variable
D-xylosa	No	No
Xilitol	No	No
Etanol	No	
Metanol	No	No

FUENTE: Adaptado de Boulton y Quain, 2006, pág. 169.

**Tabla 3: Clasificación Taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae***

TAXÓN	Nombre	Comentarios
<b>Reino</b>	Fungi	
<b>Filum</b>	<i>Ascomicotina</i>	Formas Teliomorfas caracterizados por la formación de ascosporas encerrados dentro ascas
<b>Sub-Filum</b>	<i>Saccharomycotina</i> ( <i>Sin. Hemiascomycotina</i> )	
<b>Clase</b>	<i>Saccharomycetos</i> ( <i>Sin. Hemiascomycetos</i> )	Ascas no están dentro de ascosporas, se desarrollan directamente de cigotos
<b>Orden</b>	<i>Saccharomicetalos</i> ( <i>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 predominantemente. Diploide o de mayor poliploidia.
<b>Especie -tipo</b>	<i>S. cerevisiae</i>	

FUENTE: Adaptado de Briggs, Boulton, Brookes y Stevens, 2004, pág. 368.

#### 2.4.2.2 *Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis*

El cultivo de levaduras *Lager*, se inició con los cerveceros bávaros, hasta la década de 1840 cuando estas fueron pasadas por contrabando a Checoslovaquia y Dinamarca. Con el aumento del comercio y los viajes, las levaduras *lager* pronto se utilizaban en todo el mundo. Por tanto, en comparación con otras levaduras de cerveza, la diversificación de las cepas *lager* es relativamente nueva (Boulton y Quain, 2006).

Emil Hansen en 1883 trabajando para la cervecería Carlsberg encontró dos cepas de fermentación baja que denominó *Saccharomyces carlsbergensis* 1 y 2. Desde el punto de vista industrial, la clasificación de esta levadura no ha tenido controversias ya que la clasificación industrial utiliza como base la asimilación y fermentación de especies químicas como claves. Sin embargo, desde el punto de vista genético, existen controversias en su denominación.

En 1931 Stelling, clasificó la cepa 1 como *Saccharomyces carlbergensis* Hansen y la segunda como *Saccharomyces carlbergensis monacensis* Dekker. La diferenciación hasta ese momento era solo morfológica. Durante los años siguientes a la publicación del mapeo genético de *Saccharomyces cerevisiae* se produce una enorme confusión entre la clasificación de estas especies. Unos investigadores consideraban como sinónimos las especies *carlbergensis*, *uvarum* y *pastorianus* y otros la consideraban como un híbrido de *Saccharomyces bayanus* y *Saccharomyces cerevisiae*, o un híbrido de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces monacensis*. Finalmente a partir del año 2000 mediante el estudio completo del genoma, empiezan a diferir y se producen acuerdos entre los especialistas. Encontrando la consistencia de la especie *uvarum* y curiosamente la procedencia de la especie *bayanus* de la hibridación de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces uvarum* (Boulton y Quain, 2006).

En el 2005, Nguyen y Gaillardin, publicaron un trabajo en el que demostraron que *S. uvarum* es una especie independiente y que *Saccharomyces bayanus* es un híbrido de *S. uvarum* y *S. cerevisiae*. En el 2006, mediante técnicas de PCR se mantuvo como especie pura tanto *S. uvarum* como *S. bayanus* y se encontraron híbridos dobles de *S. bayanus* y *S. cerevisiae*, también de *S. bayanus* y *S. uvarum* e incluso híbridos triples de *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. uvarum* (Martínez Quesada, 2012).

Las cepas de levadura *Lager*, se caracterizan por su fermentación a temperaturas bajas entre los 5 °C a 15 °C, se dividen en levaduras no floculantes y levaduras floculantes. Las células de las levaduras no floculantes, se quedan finamente distribuidas en el substrato de fermentación y descienden lentamente al final de la fermentación, las células de levaduras floculantes, se aglomeran, al final de la fermentación formando flóculos grandes que se depositan en la base (Kunze, 2006).

Según su metabolismo las cepas *lager* tienen la capacidad de utilizar el disacárido melibiosa ( $\alpha$ -D-galactosa-(1+6)- $\alpha$ -D-glucosa), genéticamente, esta capacidad es compleja implica hasta diez genes MEL, que son exclusivos de estas. Las levaduras Lager no crecen en melibiosa como tal, sino en los productos de su hidrólisis de galactosa y glucosa vía  $\alpha$ -D-galactosidasa. La actividad de la  $\alpha$ -D-galactosidasa está altamente regulada, siendo inducida por galactosa pero reprimida por glucosa.

Así mismo las levaduras del tipo *Lager* presentan una mayor afinidad por la galactosa. En cultivos aerobios las cepas *Lager* metabolizan simultáneamente la galactosa y maltosa. En la utilización del azúcar del mosto, las cepas *Lager* son capaces de utilizarla la maltotriosa, rápidamente. Así mismo estas levaduras transportan la fructosa mediante un mecanismo de *symport* del protón (Boulton y Quain, 2006, págs. 168-171).

#### **2.4.4 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 (GENMIC, 2002).

#### **2.4.5 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 (Boldú Gonzales, 2011).

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 introducida por la cervecería Carlsberg en 1883, los beneficios de usar un cultivo puro se hizo 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 (Stewart y Russell, 1998).

#### **2.4.5.1 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 (Leroy y De Vuyst, 2004).

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

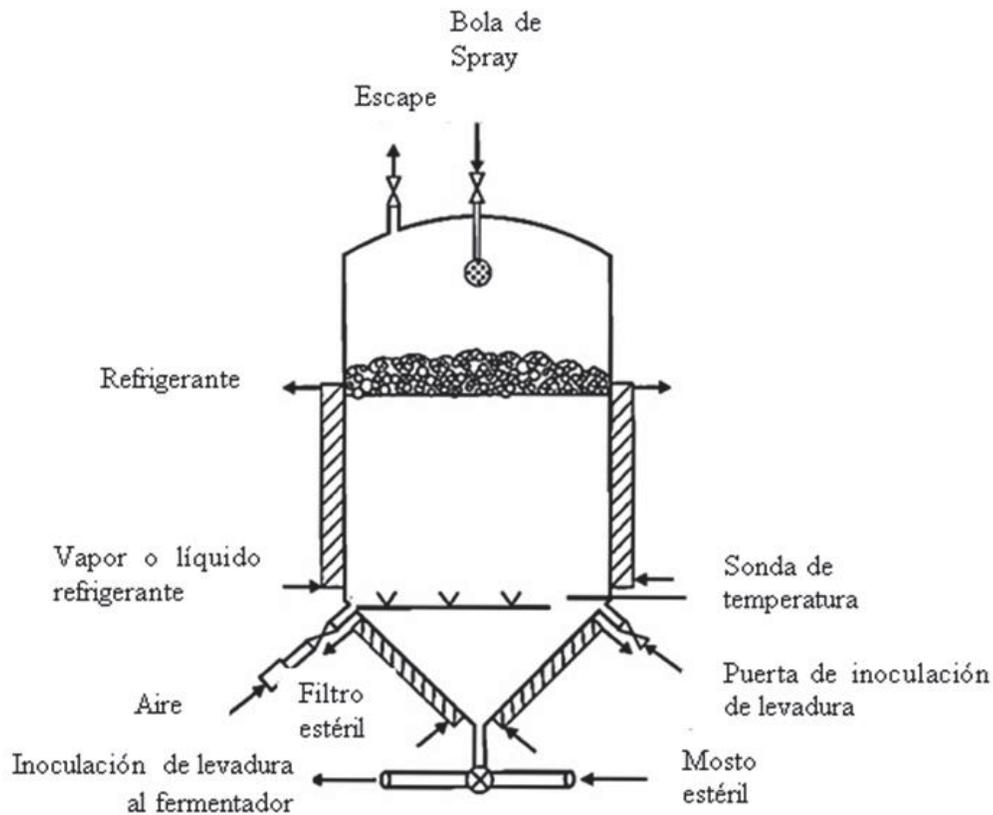
La selección de las cepas, que son cultivadas como cultivo puro de levaduras y utilizadas como cultivo starter, cumple determinados criterios, estos son esencialmente: el comportamiento de fermentación (fermentación alta o baja), el comportamiento de floculación (levaduras no floculantes y levaduras 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) (Kunze, 2006).

#### **2.4.6 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 7, 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 (Stewart y Russell, 1998).

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 (Kunze, 2006. p 439). 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 (Boldú Gonzales, 2011).



**Figura 7: Típico Tanque de Propagación de cultivos puros de levaduras.**  
FUENTE: Adaptado de Stewart y Russell, 1998, pág. 62.

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 (Stewart y Russell, 1998).

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 (Kunze, 2006).

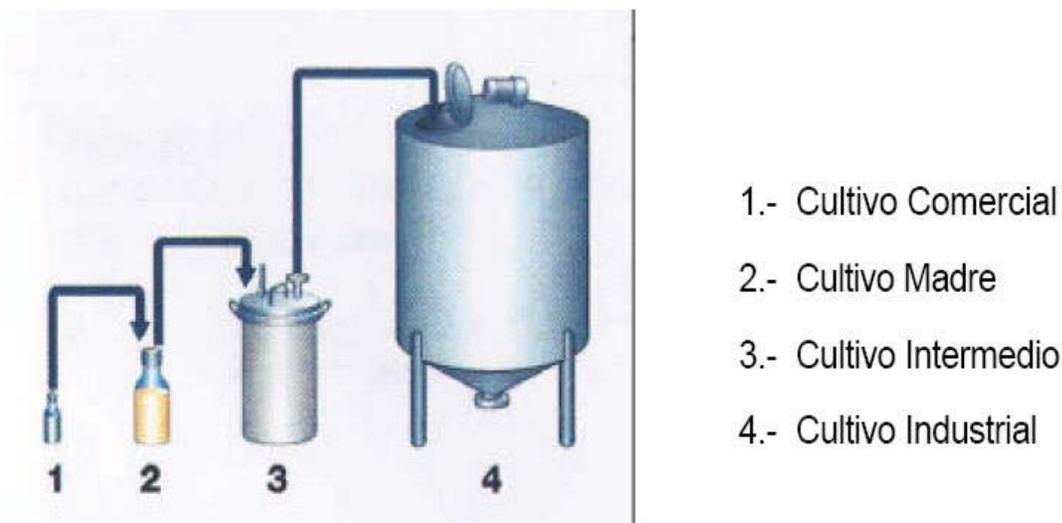
Según Kunze (2006), en la propagación de cultivo puro de levaduras se diferencia tres etapas:

- 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. Según Pascual (2014), existen cuatro tipos de levaduras utilizadas en propagación (ANEXO 1), están son:
  - (a) 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.
  - (b) 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. (c) Levaduras recuperadas: Son levaduras de una fermentación anterior recuperada y almacenada en un ambiente refrigerado. Posee un 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:** Según Cabeza Herrera (2006) y Kunze (2006), 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 solido 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 8).



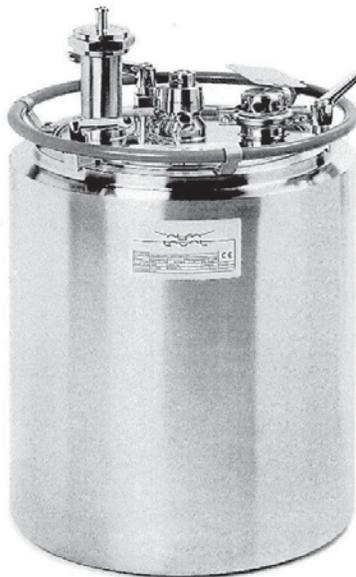
**Figura 8: Preparación de Cultivos Starters.**  
FUENTE: Cabeza Herrera, 2006, pág. 3.

Según Kunze (2006), en las cervecerías, la propagación en el laboratorio se utiliza recipientes con diferentes volúmenes, y ocurrirá por transferencia del contenido de un recipiente en alta fermentación a otro recipiente de mayor tamaño, según la Tabla 4. Transfiriéndose luego a un balón de Carlsberg (Figura 9), 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>
Tamaño de recipiente	10 ml	100 ml	1000 ml
Cantidad de mosto estéril	5 ml	50 ml	500 ml
Volumen de inoculación	-	5 ml	55 ml
<b>Contenido Total:</b>	5 ml	55 ml	555 ml

FUENTE: Adaptado de Kunze, 2006, pág. 338.



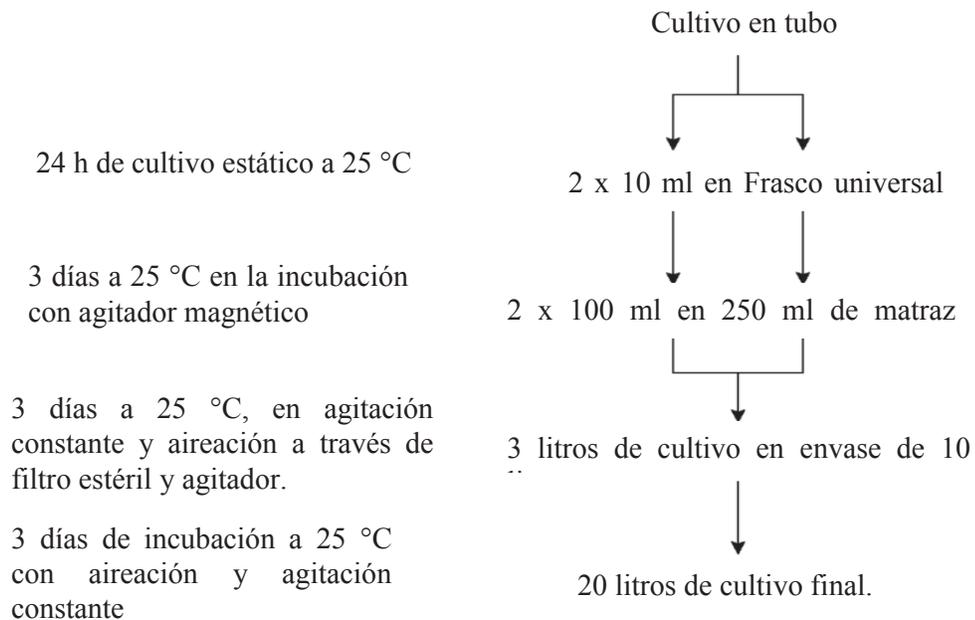
**Figura 9: Balón de Carlsberg.**

FUENTE: Tomado de Alfa Laval, 2008, pág. 3.

Según Boulton y Quain (2006), 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 10. 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.

Según Kunze (2006), 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 puede influir en el rendimiento de la fermentación, en la eficiencia del metabolismos de los azúcares fermentables, principalmente la maltosa y maltotriosa, que son los últimos en fermentar.

Según Pascual, (2014), el crecimiento de la levadura en la etapa de propagación en laboratorio está influenciada por: (a) volumen de mosto utilizado en cada paso de la propagación, (b) Densidad del mosto utilizado y (c) la concentración estimada de células de levadura antes de propagar.



**Figura 10: Flujo para la propagación en 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 contar con las instalaciones adecuadas para la propagación de levadura, que consiste en recipientes cerrados de diferentes tamaños, de acero inoxidable (Kunze, 2006). Las cervecerías modernas consideran que la levadura se debería 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 (Boulton y Quain, 2006).

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 costo de instalación, mantenimiento y de operación.

#### **2.4.7 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. (Stewart y Russell, 1998; Briggs et al., 2004; Boulton y Quain, 2006; Kunze, 2006).

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 (Briggs et al., 2004).

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 (Jazwinski, 1990 ).

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. En este sentido la condición fisiológica es importante en la regulación del flujo de carbono durante la fermentación entre la glucólisis y la gluconeogénesis. Por tanto, las reservas de hidratos de carbono acumuladas durante la fermentación proporcionan una fuente de energía principal de mantenimiento durante la fase de almacenamiento y posiblemente carbono para la síntesis de lípidos durante la fase de fermentación aerobia, cuando la utilización de carbono exógeno está limitada. También se conoce, que el *re-pitching*, está influenciado por las condiciones de estrés a la que es sometida la levadura y las respuestas de la levadura dependerán de la edad celular, del estado fisiológico y del tipo de levadura y (Boulton y Quain, 2006).

Sin embargo, en las cervecerías de acuerdo a diversos criterios establecidos por las empresas, se introducen periódicamente nuevos cultivos de levadura, que descartan a las levaduras utilizadas y da inicio a un nuevo ciclo de levaduras, esto se realiza para garantizar la identidad y pureza de la levadura, debido a que en las cervecerías hay una amenaza constante de contaminación por levaduras salvajes y bacterias de la putrefacción. La decisión de introducir un nuevo cultivo se basa en criterios microbiológicos y pruebas de rendimiento de la levadura existente. Sin embargo, estos primeros cultivos suelen ser lentos y no obtiene el sabor característico para la cerveza, aunque no hay certeza (Boulton y Quain, 2006).

Las razones de un comportamiento no ideal en las primeras fermentaciones son poco conocidas. Hammond y Wenn (1985), reportaron sobre las experiencias de una fábrica de cerveza, donde una cepa de levadura recién propagadas produjo un rendimiento de fermentación lenta durante las primeras generaciones. Esto se demostró que era debido al deterioro de la capacidad de la cepa para utilizar maltotriosa. Las causas del defecto no fueron aclarados y el efecto fue algo transitorio, y desapareció después de siete a diez generaciones. Dado que este efecto se observó solamente con una sola cepa de levadura, se sugirió que el problema no era debida a la propagación de por sí, sino era una característica de ésta levadura en particular (Boulton y Quain, 2006).

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.

#### **2.4.8 Reproducción y Crecimiento en Levaduras**

El crecimiento microbiano, es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo, originando una población. Esta población será un cultivo de microorganismos asincrónicos, ya que cada microorganismo se encuentra en un punto diferente del ciclo celular (GENMIC, 2002).

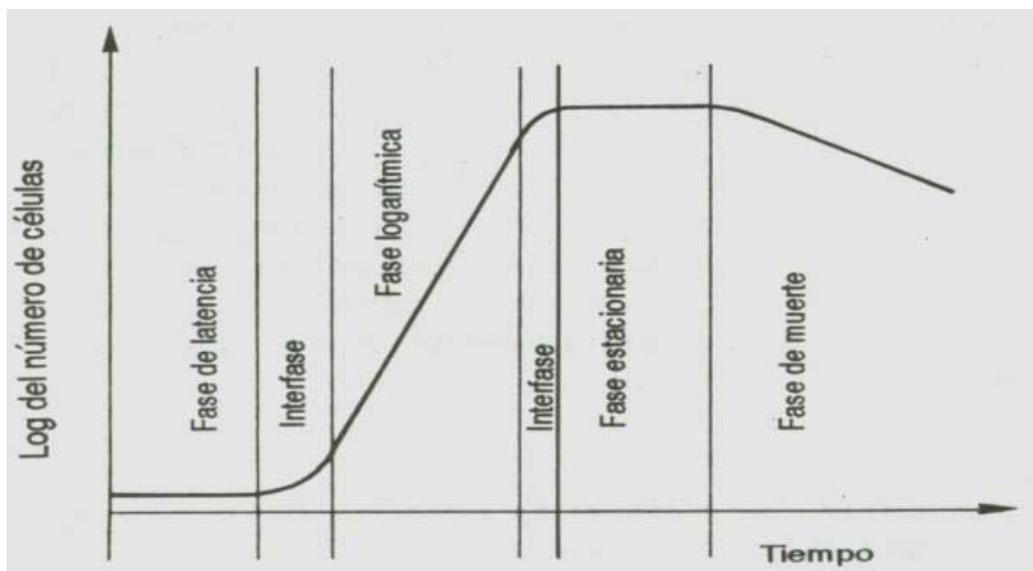
En general, se distinguen cultivos líquidos y sólidos en función de las características del medio y cultivos discontinuos y continuos en función de la disponibilidad de nutrientes en el medio. Al transferir un cultivo de microorganismo a una solución fresca de nutriente, se da inicio al ciclo vital de las levaduras, tal como sucede en la elaboración de la cerveza, cuando se agrega la levadura al mosto (Kunze, 2006).

El crecimiento de un microorganismo está condicionado a la conjunción de diferentes factores (sustancias nutritivas, factores de crecimiento), y de condiciones fisicoquímicas como la temperatura, el pH y aireación. Un microorganismo sólo crecerá en un medio de cultivo si contiene todos los nutrientes necesarios en una forma disponible y si son adecuados el resto de los factores ambientales.

En el crecimiento microbiano existe un factor muy importante conocido como factor limitativo, cuya ausencia o modificación trae como consecuencia la detención del crecimiento. Al colocar algunas células de microorganismos en un medio de cultivo conveniente, estas, se multiplicarán hasta el agotamiento de un factor limitativo, o hasta el momento en que un factor limitativo alcanza un valor crítico (Crueger y Crueger, 1993).

En el crecimiento microbiano se diferencian seis fases, que pueden trasladarse en el tiempo, estas se muestran en la Figura 11, y son:

- a. Fase de latencia, donde tiene lugar la activación del metabolismo, la duración de esta fase varía dependiendo del tipo de levadura, edad y condiciones del cultivo.
- b. Fase de aceleración o interfase, aquí aumenta progresivamente la velocidad de división.
- c. Fase de propagación logarítmica, es donde la velocidad de propagación es constante y máxima, en esta fase la levadura tiene su mayor vitalidad.
- d. Fase de interfase logarítmica, está limitada temporalmente por diferentes factores, pasando a una fase de desaceleración con velocidad de propagación decreciente.
- e. Fase estacionaria, el número de microorganismo permanece constante, y hay un equilibrio entre la cantidad de células nuevas y muertas.
- f. la última fase es la fase de muerte o declinante donde hay más células muertas que nuevas (Kunze, 2006).



**Figura 11: Curva de Crecimiento de microorganismos.**

FUENTE: Tomado de Crueger y Crueger, 1993, pág. 7.

#### **2.4.9 Metabolismo de la levadura en el mosto**

La principal característica que tienen los organismos vivos es su capacidad para organizar moléculas y reacciones químicas en estructuras específicas y en secuencias sistemáticas. Como resultado de esto el organismo vivo tiene la capacidad de hacer réplicas de sí mismo. El metabolismo comprende dos clases básicas de transformaciones químicas: los procesos de construcción o biosintéticos llamados anabolismo y los procesos de degradación, llamados catabolismo, que dan como resultado una liberación de energía.

El proceso por el cual las células degradan las moléculas orgánicas alimenticias para obtener energía recibe el nombre de respiración celular, este proceso es una reacción exergónica, donde parte de la energía contenida en las moléculas de alimento es utilizada por la célula para sintetizar ATP.

La respiración ocurre en distintas estructuras celulares. La primera de ellas es la glucólisis que ocurre en el citoplasma. La segunda etapa dependerá de la presencia o ausencia de O<sub>2</sub> en el medio, determinando en el primer caso la respiración aeróbica (ocurre en las mitocondrias: ciclo de Krebs, transporte de electrones y fosforilación oxidativa), y en el segundo caso la respiración anaeróbica (ocurre en el citoplasma: fermentación). A partir de estas reacciones se realizarán todas las biosíntesis de las biomoléculas que necesita el microorganismo para vivir y reproducirse (Tortora et al., 2007).

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.

#### **2.4.9.1 Factores que influyen en la bioquímica de la Fermentación.**

Según Boulton y Quain (2006), 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.

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 (Hough, 1990).

Según Taidi et al., (2003), 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.

Según Kunze (2006), en el mosto aromatizado con lúpulo, se encuentra la siguiente composición:

- a. Carbohidratos: disponibles como azúcares de bajo peso molecular tales como los mono, 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.
- 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 (2002), 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. Para Kunze (2006), 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.

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 desarrollará 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 (Gigliarelli, 2013).
- 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 (Suárez Lepe y Iñigo Leal, 1990).
- c. La oxigenación: Según Suárez Lepe y Iñigo Leal (1990) y Kunze (2006) 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. La 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 aumentara la tasa de crecimiento de la levadura asegurando una buena fermentación (Gigliarelli, 2013).

El genotipo de la levadura utilizada es crucial para el resultado de la fermentación. Por ejemplo, el espectro de los metabolitos que proporcionan el sabor es producido tanto por la levadura como por las condiciones establecidas durante la fermentación. Es de suma importancia la respuesta de las cepas de levadura a la conversión de azúcares y oxígeno.

Todas las cepas de levadura de cerveza han limitado la capacidad respiratoria y están sujetos a la represión catabólica por carbono. En una fermentación cervecera, independientemente de la presencia de oxígeno, el metabolismo es siempre fermentativo. Por tanto, los principales productos del catabolismo de azúcar son inevitablemente etanol y dióxido de carbono. No se produce la respiración, en el verdadero sentido de la oxidación.

Así mismo, la concentración máxima de etanol que puede ser generado durante la fermentación, también está determinada por el genotipo de la levadura. En este sentido es importante la tolerancia de la cepa al etanol y a la actividad de agua reducida. La expresión fenotípica del genotipo de la levadura, está influenciada por las prácticas de fermentación en las cervecerías, una de ellas es el *re-pitching*, que puede producir cambios en la levadura., se sabe que tienen una vida finita y se someten a un proceso de envejecimiento, las modificaciones tanto fenotípicas y genotípicas son posibles debido a los efectos del envejecimiento y la aparición de la senescencia.

#### **2.4.9.2 Metabolismo de los azúcares del mosto**

El mosto contiene azúcares, tales como la sacarosa, fructosa, glucosa, maltosa, maltotriosa, melibiosa y dextrina. Las cepas de levadura cervecera ale y lager son capaces de utilizar estos azúcares. Se conoce que las cepas de *Saccharomyces uvarum carlsbergensis* de la cerveza tipo *lager*, posee los genes *MEL*, y es capaz de producir la enzima extracelular  $\alpha$ -galactosidasa y utilizar la melibiosa, disacárido de glucosa-galactosa. En cambio, las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, cerveza tipo *Ale*, no poseen estos genes y son incapaces de utilizar este azúcar (Figura12a).

Para la utilización de estos azúcares la levadura requiere poseer mecanismos de transporte o enzimas que permitan el ingreso y la utilización de estos azúcares, se sabe que en el mosto la maltosa y maltotriosa son los azúcares más predominantes y que estos pasan intactos a través de la membrana celular, mientras que la sacarosa y dextrina son hidrolizadas por una enzimas extracelulares, y los productos de la hidrólisis son absorbidos por la célula. Se piensa que la levadura cervecera posee mecanismos independientes de

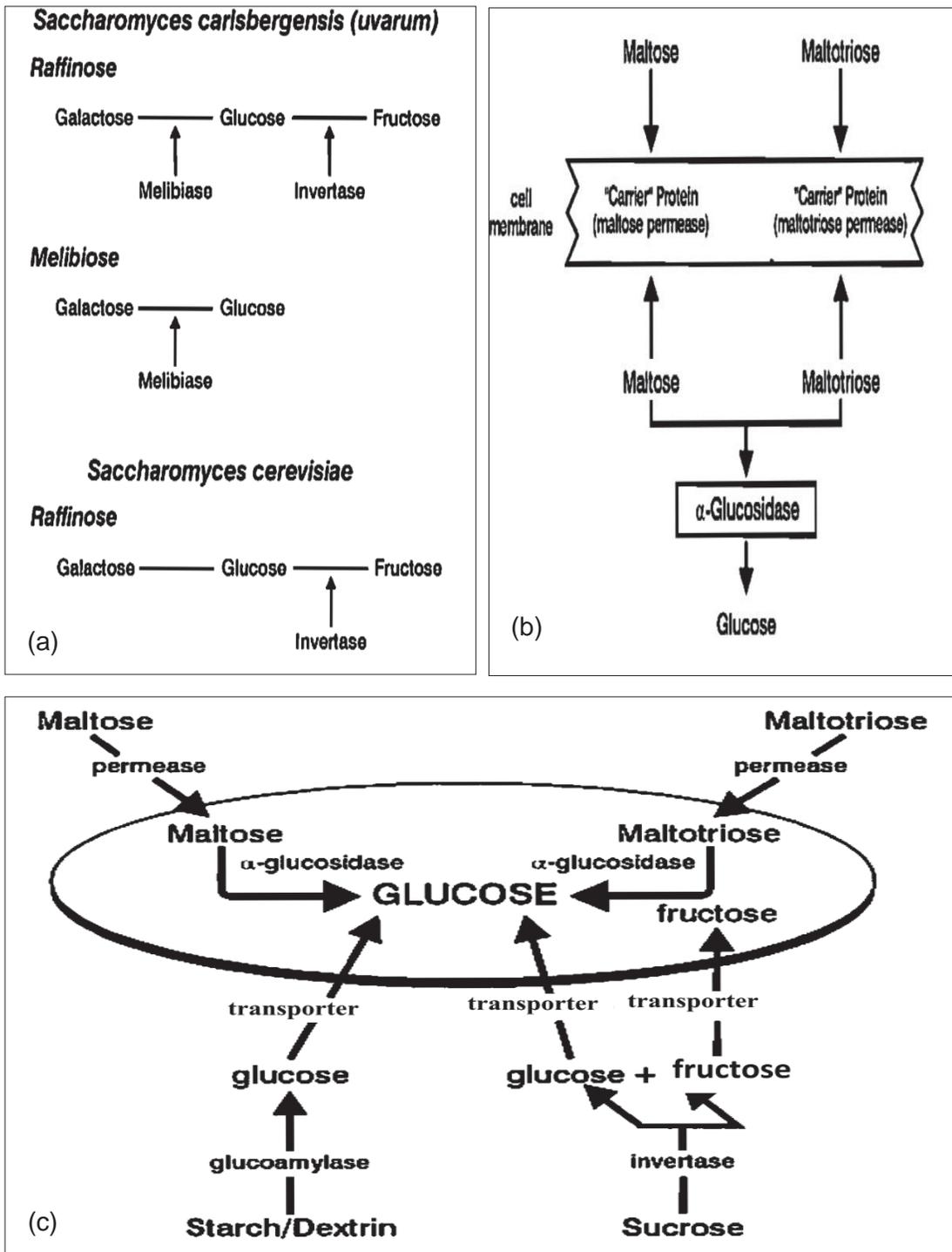
captación (maltosa y maltotriosa permeasa, Figura 12b), y que se han seleccionado cepas de *Saccharomyces*, capaces de absorber la maltosa y no ser reprimida por la glucosa, aumentando así las tasas de fermentación del mosto. La absorción de los azúcares a la célula de levadura se muestra en la Figura 12c (Stewart y Russell, 1998).

Según Briggs et al.,(2004) y Boulton y Quain (2006), el catabolismo de los azúcares proporciona a la levadura energía y carbono para realizar las vías anabólicas. Esta es una actividad esencial y en consecuencia gran parte del metabolismo total está dedicada a él. Están implicadas varias vías o rutas metabólicas. El flujo de carbono a través de las vías individuales está influenciado por el genotipo de la levadura y su expresión fenotípica está influenciada por las condiciones a las que están expuestas.

La glucólisis o la vía de Embden-Meyerhof-Parnas, es la principal vía utilizada por las levaduras cerveceras para el catabolismo de los azúcares. Opera bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas y es la ruta por la cual aproximadamente el 70 por ciento de azúcares exógenos son asimilados. En esta vía se genera ATP mediante fosforilación a nivel de sustrato. Y es importante por la generación de NADPH, y su utilización en el metabolismo de síntesis de lípidos.

La vía hexosa Monofosfato, es una ruta alternativa a la glucólisis para el metabolismo del azúcar. Se conoce que al menos dos por ciento del metabolismo de la glucosa se desvía a esta ruta glucolítica. Esta vía proporciona una ruta para la asimilación de pentosas, y es precursor de la biosíntesis de algunas vitaminas, purinas y nucleótidos de pirimidina, así como los aminoácidos aromáticos, fenilalanina, triptófano y tirosina. En el caso de la fermentación cervecera, los requisitos anabólicos son bajos, es probable que esta vía sea de pequeña importancia.

Cuando la levadura está respirando en un ambiente aeróbico, se produce el ciclo de Krebs también conocido como el ciclo del ácido tricarbóxico y la fosforilación oxidativa (también llamado cadena transferencia de electrones). Este sistema de transferencia electrónica masiva produce grandes cantidades de energía en forma de ATP. La síntesis de citrato, isocitrato y 2-oxoglutarato para ácidos nucleicos y la síntesis del aminoácido también ocurren durante el ciclo de la Krebs, estos ácidos orgánicos serán parte de la cerveza fermentada. Los sustratos adicionales que se generan del ciclo de la Krebs pueden utilizarse para suministrar sustratos adicionales para la biosíntesis.



**Figura 12:** (a) Utilización del azúcar rafinosa y melibiosa por *Saccharomyces uvarum carlsbergensis* y *Saccharomyces cerevisiae*. (b) Absorción de maltosa y maltotriosa y (c) Absorción de azúcares por la célula de levadura cervecera. (En Inglés)  
 FUENTE: Tomado de Stewart y Russell, 1998, págs. 6,30-31.

En condiciones anaeróbicas, el ciclo de Krebs puede funcionar parcialmente, pero aún no se conoce completamente. Cuando la levadura se encuentra en el estado fermentativo, NAD<sup>+</sup> se regenera utilizando un rango de aceptores de hidrógeno. Por ejemplo, las levaduras no son tolerantes a ambientes altamente ácidos, por tanto, el ácido pirúvico se convierte en dióxido de carbono y acetaldehído y finalmente en etanol. Esto sirve para dos propósitos, el cofactor NAD se regenera y se consume durante la glicólisis, y la célula de levadura se desintoxica por la conversión del ácido pirúvico en dióxido de carbono y etanol. Estas son las razones principales por las que el etanol se produce durante la fermentación. Otros aceptores de hidrógeno utilizados para restaurar la relación redox de la célula son: diacetilo, fumarato, oxaloacetato, aldehídos, etc. (Stewart y Russell, 1998).

En condiciones aerobias la levadura puede utilizar otras fuentes de carbono que no sean azúcar tales como, etanol, glicerol y lactato, bajo estas condiciones la célula debe sintetizar algunos intermediarios precursores de los metabolitos esenciales anabólicos. Este proceso se denomina gluconeogénesis, que es la ruta inversa de la glucólisis. La Glucólisis y la gluconeogénesis no ocurren simultáneamente, por tanto el flujo de carbono está regulado, uno de los controles es la presencia de glucosa exógena en una concentración menor a 0,2 mM esta suprime totalmente la gluconeogénesis. (Briggs et al., 2004).

#### **2.4.9.3 Regulación del metabolismo del azúcar por levadura**

Las levaduras aerobias obligatorias hacen uso exclusivo de las vías respiratorias y no son capaces de fermentar los azúcares. Ellos incluyen los géneros *Rhodotorula*, *Lipomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodospiridrin* y *Saccharomyces*. Las anaerobias facultativas pueden utilizar tanto las vías respiratorias y las vías fermentativas. Este grupo incluyen los géneros *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces* y *Pichia*. Las levaduras fermentativas se caracterizan por las altas tasas de metabolismo del azúcar de las cuales el diez por ciento o menos es catabolizada por la respiración, estas incluyen las levaduras del género *Saccharomyces* (todas las cepas de elaboración de la cerveza), *Brettanomyces* y *Schizosaccharomyces*. (Briggs et al., 2004).

La regulación del metabolismo del azúcar es altamente controlada. Las levaduras se pueden clasificar en función de su preferencia del catabolismo de azúcar. En la Tabla 5, se muestran los efectos fenotípicos de la regulación catabólica del azúcar de forma resumida.

El efecto Pasteur fue descubierto por Louis Pasteur hace más de cien años, en sus investigaciones acerca de los procesos de fermentación. Una observación clave de Pasteur fue que la captación de glucosa es más lenta en las células que respiran.

Esto es debido a que la respiración aeróbica produce más energía por cada molécula de glucosa (u otra fuente de carbono) en comparación con la fermentación. Se sabe que en condiciones anaeróbicas solo se forman dos moles de ATP por cada mol de glucosa mientras que en condiciones aeróbicas se forman 38 moles de ATP por mol de glucosa. La célula se ajusta pues a la efectividad en la producción de energía y esta regulación por oxígeno se denomina "Efecto Pasteur".

El Efecto Crabtree, descubierto por el bioquímico Crabtree de Herberto, es un efecto contrario al efecto Pasteur, describe el fenómeno por el cual la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en presencia de altas concentraciones externas de glucosa en un medio aerobio, la respiración se inhibe y la fermentación se produce. La vía fermentativa se utiliza en lugar del ciclo de Krebs. En *Saccharomyces cerevisiae*, una levadura sensible a la glucosa, la respiración es reprimida en presencia de una pequeña de concentración de glucosa en el medio (0,4 % p/v). Esto es independientemente de la presencia o ausencia de oxígeno molecular.

**Tabla 5: Mecanismo de regulación catabólica del azúcar en la levadura**

Mecanismo	Descripción
<b>Efecto Pasteur</b>	Inhibición de la fermentación alcohólica en presencia de oxígeno, o activación de la glicolisis por anaerobiosis.
<b>Efecto Crabtree a corto plazo</b>	Formación de etanol inmediato en medio aeróbico, seguido de transición de un medio con limitación de carbono a uno con exceso de carbono.
<b>Efecto Crabtree a largo plazo</b>	Formación de etanol en medio aeróbico, con alto porcentaje de crecimiento bajo condiciones de exceso de azúcar o limitación de azúcar.
<b>Efecto Custers</b>	Estimulación por oxígeno de la fermentación de la glucosa para la formación de etanol.
<b>Efecto Kluver</b>	Ausencia de fermentación alcohólica con determinados azúcares. Particularmente disacáridos a pesar de que la glucosa es fermentada.
<b>Inactivación y represión por catabolito de carbono</b>	Supresión del metabolismo respiratorio por concentraciones altas de azúcar.

FUENTE: Adaptado de Boulton y Quain, 2006, pág. 83.

Durante una fermentación típica en las cervecerías, el mosto contiene aproximadamente uno por ciento de glucosa, por lo que se supone que las células de levadura son reprimidas, se cree que este fenómeno pudo desarrollarse como mecanismo de la competición (debido a la naturaleza antiséptica del etanol) (Stewart y Russell, 1998).

Según Briggs et al., (2004), el efecto Crabtree a corto plazo se produce a pocos minutos de la adición de glucosa. Este fenómeno ocurre en la levadura y es acompañado por un aumento inmediato en la tasa de producción de etanol, se cree que este efecto reside en la afinidad por el piruvato deshidrogenasa y piruvato descarboxilasa. El efecto Crabtree a largo plazo describe la represión y la inactivación de las enzimas respiratorias en la levadura por la presencia de glucosa. La bioquímica de este efecto es totalmente diferente del efecto Crabtree a corto plazo. Y va acompañada por cambios en la morfología de la célula. La base molecular de esta represión catabólica de glucosa es compleja y todavía no está dilucidado.

Los efectos Kluyver y Custers, no son de interés directo para la elaboración de la cerveza, ya que no ocurren en las levaduras *Saccharomyces*. Este efecto se da en algunas levaduras que no pueden utilizar ciertos disacáridos bajo condiciones anaeróbicas, aunque si bajo condiciones aerobias. El efecto Custers, se presenta en las levaduras del género *Brettanomyces*, que aunque no es una levadura cervecera puede estar implicada en la fermentación secundaria de algunas cervezas tradicionales de fermentación en barril.

La inactivación y represión catabólica por carbono, son los mecanismos descritos anteriormente, en los que el flujo de carbono en la levadura se dirige a nivel de la enzima. Ya que la modulación de la actividad enzimática, se da en respuesta a los requisitos de la levadura por las condiciones ambientales.

La glucosa, y en menor medida, otros azúcares, ejercen efectos sobre el metabolismo de la levadura, y esto es crucial para el resultado de la fermentación cervecera. Cuando *S. cerevisiae* se cultiva en presencia de glucosa, la transcripción de muchos genes es reprimida y varias proteínas y sistemas de transporte se activan o inactivan rápidamente a nivel de post-transcripción. Estos fenómenos se denominan represión catabólica por carbono e inactivación catabólica, respectivamente. Los azúcares distintos a la glucosa también producen tales efectos, particularmente aquellos que pueden fermentarse rápidamente como la fructosa y maltosa (Boulton y Quain, 2006).

Se sabe que la represión catabólica por glucosa es de suma importancia en las fermentaciones de cervecería ya que la fase inicial es aeróbica, y la presencia de glucosa asegura que el metabolismo sea fermentativo, inclusive en las etapas posteriores en donde la señal represora no esté presente.

La presencia de glucosa en el mosto impide la utilización del azúcar predominante, maltosa. Por tanto, durante la primera fase aeróbica la represión por glucosa, previene el desarrollo de las vías respiratorias y la utilización de la maltosa. Sin embargo, este efecto es transitorio ya que la glucosa desaparece y se da inicio a la fase de anaerobiosis, en esta etapa la levadura impide su capacidad respiratoria y elimina el efecto represor de tal manera que la maltosa puede ser utilizada (Briggs et al, 2004).

#### **2.4.9.4 Metabolismo de los aminoácidos y proteínas del mosto**

Según Boulton y Quain (2006), en el mosto, la principal fuente de nitrógeno para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares nitrogenados es la variedad de aminoácidos formados a partir de la proteólisis de las proteínas de cebada. El mosto de cerveza contiene aproximadamente 19 aminoácidos, entre ellos la prolina, es el aminoácido más abundante, por lo general está presente en la cerveza entre 200 a 300 mg/l.

El patrón de utilización del nitrógeno se debe a una gama de permeasas presentes, su especificidad y los efectos de inhibición son resultado de la composición de los aminoácidos intracelulares de la levadura. El metabolismo de amino nitrógeno asimilado es dependiente de la fase de la fermentación y de la cantidad total proporcionada en el mosto.

La levadura asimila los aminoácidos del mosto eliminando el grupo amino y esqueleto de carbono, creando un medio ácido intracelular. El medio ácido generado por las transaminasas y reacciones anabólicas es el precursor de los aldehídos y alcoholes superiores que contribuyen al sabor de la cerveza. Así, la formación de alcoholes superiores está vinculada con el metabolismo del nitrógeno.

Por tanto, la composición de amino nitrógeno en el mosto tiene efectos en los resultados de la fermentación y el sabor de la cerveza. Cuando se utiliza malta como la principal fuente de extracto, la cantidad y composición de aminoácidos son tales que no se encuentran problemas. Sin embargo, al utilizar complementos o adjuntos, estos son relativamente deficientes en la concentración de amino nitrógeno (Stewart y Russell, 1998).

#### **2.4.9.5 Compuestos excretados por la levadura, que componen la cerveza**

Según Stewart y Russell (1998), 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.

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.

Los alcoholes superiores que se producen en la cerveza son: n-propanol, isobutanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol. Sin embargo, se han identificado más de 40 alcoholes. La regulación de la biosíntesis de alcoholes superiores es compleja, y pueden ser producidas como subproductos del catabolismo de los aminoácidos o del piruvato derivado del metabolismo de los carbohidratos. La ruta catabólica, implica una vía en la que el ácido ceto, producido a partir de una transaminación de aminoácidos se descarboxila para dar el aldehído correspondiente, reduciendo el alcohol a través de un deshidrogenasa. De esta manera, por ejemplo, isobutanol pueden producirse a partir de valina, 3-metil-1-butanol a partir de 2-leucina y metil- 1-butanol a partir de isoleucina. La ruta anabólica, utiliza las

mismas vías implicadas en la biosíntesis de los aminoácidos. Como en la ruta catabólica, el ceto-ácido intermedio se descarboxila y el aldehído resultante reduce al alcohol. La contribución relativa de las dos rutas varía individualmente con los alcoholes superiores.

En general, la ruta catabólica parece predominar durante la fase de crecimiento inicial cuando el nitrógeno amino exógeno es abundante. En las etapas posteriores, cuando el mosto se vuelve deficiente en nitrógeno asimilable, la ruta anabólica es probablemente la fuente principal de alcoholes superiores.

Los carbonilos (aldehídos y di-cetonas), influyen en el sabor de la cerveza, se produce como resultado del metabolismo de la levadura durante la fermentación, y se han reportado más 200 compuestos de carbonilo en la cerveza y otras bebidas alcohólicas.

Los que influyen más en el sabor son: El acetaldehído que se acumula durante el período de crecimiento activo y disminuyen en la fase estacionaria de crecimiento, el diacetilo (2,3-butanodiona) y 2,3-pentanodiona, ambos compuestos imparten un sabor "butterscotch" y aroma a la cerveza.

Los compuestos de azufre contribuyen también al sabor de la cerveza, el exceso da origen a sabores desagradables. Muchos de los compuestos de azufre presentes en la cerveza no están directamente asociados con la fermentación, pero derivan de las materias primas empleadas. Sin embargo, las concentraciones de sulfuro de hidrógeno (aroma a huevos podridos) y dióxido de azufre (aroma partido quemado) son dependientes de la actividad de la levadura. El no poder controlar adecuadamente la fermentación puede dar lugar a niveles inaceptables de estos compuestos.

#### **2.4.10 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.

Según, White et al., (2003), en las cervecerías se determina la calidad de la levadura mediante la medición de su viabilidad y/o vitalidad. Estos parámetros en los cultivos de levadura cervecera, afectan directamente el rendimiento de la fermentación y la calidad final de la cerveza.

### 2.4.10.1 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, ésta técnica permite el recuento de células viables de levaduras en cámara de Neubauer y un microscopio de luz. Esta técnica se basa en la capacidad de las células viables para reducir el tinte en su forma incolora, mientras que las células no viables son incapaces de reducir el tinte tomando un tono púrpura azul. Sin embargo esta técnica se considera un método preciso sólo cuando la viabilidad celular de las levaduras es superior al 90 por ciento, recientemente se ha cuestionado este método, por su baja reproducibilidad e inexactitud cuando es menor al 90 por ciento, por tanto, se han realizado muchas investigación, respecto a la viabilidad con otros tintes, tales como el cristal violeta, el azul de anilina, la rodamina B y la eosina Y, Sin embargo el azul de metileno sigue siendo el más empleado (Boulton y Quain, 2006, pág. 497).

Otros autores recomiendan el análisis de citometría de flujo, con tinción, ya que proporcionaría resultados altamente reproducibles (variación < 1 por ciento) en comparación con azul de metileno (seis por ciento), sin embargo, este método aún no es empleado masivamente en las cervecerías, por su alto costo (Boyd et al., 2003).

Según Stewart y Russell (1998); Boulton y Quain (2006), el método microbiológico clásico de la evaluación de la viabilidad es el recuento en placa, Sin embargo, el tiempo de respuesta no es rápido, generalmente se tarda tres días para poder observar colonias visibles y además con levaduras muy floculantes, se debe tener cuidado de utilizar este método. Otros métodos menos utilizados son: el estado metabólico basado en el Adenosín Trifosfato (ATP), este es un buen indicador de la viabilidad celular, ya que está presente en todas las células vivas y se degrada cuando las células mueren. Por último, el Método de la capacitancia, basado en la aplicación de una frecuencia de radio a una célula viable, esta se carga dentro de la membrana, y genera una capacitancia. Las células no viables son incapaces de generar esta capacitancia.

#### 2.4.10.2 Vitalidad

Según Maskell et al., (2003) 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, Stewart y Russell (1998), describen a la Vitalidad de la levadura como la medida del rendimiento de actividad o fermentación de levadura, en función de la viabilidad celular total y el estado fisiológico de la población de células viables.

Es por tanto, que en una población de células de levadura empleadas como Starter, no todas las células poseen las mismas características de vitalidad, pero todavía tienen un papel activo en la fermentación. Es probable que una célula de levadura, pierda, por cualquier razón su capacidad de reproducción, sin embargo, puede contribuir a la fermentación por la asimilación de nutrientes y la producción de compuestos aromáticos que influyen en la cerveza.

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

Las pruebas de vitalidad comúnmente empleadas son:

- 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** desarrollado por Opekarova y Sigler (1982), la prueba mide la disminución en el pH extracelular de una suspensión de células de levadura después de la adición de glucosa. Este método es útil para detectar las grandes diferencias en la actividad metabólica de la levadura, pero requiere lavado extenso de la levadura y múltiples puntos de muestra.

- 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 (Stewart y Russell, 1998).

En un estudio de White et al., (2003) 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 multi-técnica, 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.

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 evaluó 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 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 extracto aparente, es la

cantidad de sólidos solubles (azúcar fermentable que se extrae de un grano o malta) expresados en porcentajes de g/100 ml y el grado aparente de fermentación del mosto (ADF; *Apparent Degree of Fermentation*), comúnmente denominado en las cervecerías, como “Atenuación Aparente”, y es la reducción de la densidad del mosto, como resultado de la fermentación y se expresa como el porcentaje de azúcar fermentable que es convertida por la cepa de levadura a etanol y CO<sub>2</sub>.

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. No requieren ninguna preparación de la muestra o la manipulación de productos químicos peligrosos, disolventes, o reactivos. La espectroscopia NIR mide las transiciones electrónicas y vibratorias, es útil para el análisis cuantitativo de compuestos que contengan agrupaciones funcionales con hidrógenos unidos a carbonos, nitrógenos y oxígenos.

La base de esta tecnología reside en la creación de un modelo matemático que relaciona los valores espectrales (datos de absorbancia NIR) con los parámetros cuantitativos y cualitativos de interés. Una vez desarrollado este modelo, se pueden realizar estimaciones de estos parámetros a partir de sus espectros NIR, la técnica está ampliamente extendida en el mundo de la industria.

#### **2.4.11 Características Industriales de la Levadura cervecera**

Según Boldú Gonzales (2011) y Martínez Quesada (2012), en la industria 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:

- 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 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  $Ca^{2+}$  (Hough, 1990).

Durante la etapa de crecimiento estacionario se produce un mecanismo en el cual las células de levadura segregan lectina a la superficie celular y a través de estas

lectinas 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 (Boulton y Quain, 2006).

Los mecanismos físicos por medio de los cuales la levadura flocula según Klimovitz & Bamforth (2002), se debe a lo siguiente:

- a. Hidrófobicidad: la pared celular de las levaduras presenta características hidrófobas (repele el agua) lo que hace que se aglomeren. Esta propiedad está asociada a la edad de la célula.
- b. 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 fosfato.
- c. Interacción proteínas – azúcares: Las lectinas, proteínas que tiene la propiedad de “reconocer” (atraer) sacáridos como la manosa., como la pared celular de la levadura es rica tanto en lectina como en manosa se considera factible que estos compuestos se atraigan entre si uniendo a las células y produciendo la floculación. Una levadura que flocule bien facilita la separación y recolección de la levadura, disminuye tiempos de proceso y evita que pase excesiva cantidad de levadura a maduración evitando riesgos de autólisis. Por tanto se seleccionan levaduras con características de alta floculación.

#### **2.4.12 Condiciones de producción inducidas en la levadura cervecera**

Según Martínez (2012), *Saccharomyces uvarum carsbergensis* se alimenta en la naturaleza mediante una vía asimilativa, en condiciones de producción se limita el oxígeno en el medio a 8 ppm., de esta forma se produce una fuerte multiplicación hasta que el oxígeno se agota, a partir del cual se le obliga a producir alcohol por vía fermentativa hasta su límite en alcohol y ausencia de alimento, paren su actividad y flocule.

Normalmente las levaduras en la naturaleza tienen su óptimo de metabolismo a temperaturas entre los 20 °C o superiores. En condiciones de producción se obliga a cepa de levadura a vivir a temperaturas entre 2 °C a 15 °C (para cepas de cerveza tipo *lager*), para evitar la producción excesiva de ácidos superiores y alcoholes superiores que perjudican el aroma de la cerveza final, obligando al metabolismo a reducir las cetonas.

En la maduración de la cerveza, las levaduras son conservadas en condiciones extremas de temperatura llegando a ser menor a 1 °C, con la finalidad de reducir el metabolismo durante el almacenamiento, ya que la falta de alimento daría lugar a alimentarse con los productos resultantes de la autólisis de las células muertas.

En condiciones naturales las levaduras viven bajo presión atmosférica, en la producción de cerveza se somete a las levaduras a una sobrepresión, para limitar la producción de productos volátiles y disolver el anhídrido carbónico resultante del metabolismo. Este anhídrido carbónico constituye un elemento fundamental en las características organolépticas de la cerveza.

### **2.6.13 Procesos anómalos que sufren las levaduras en cervecería**

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 y un perfil de subproductos totalmente diferente que se conoce como “*petite mutant*” (Heggart et al., 1999).

- 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 “turbs” frío en el mosto, pérdida de poder respiratorio de la levadura, entre otros (Boldú Gonzales, 2011).
- 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 originan la salida de sustancias de bajo peso molecular (nucleótidos, ATP, aminoácidos e iones) y que en definitiva provocan una alteración del gradiente electroquímico de la célula con la consiguiente muerte celular (Bustamante Valdés, 2010).
- d. Infecciones 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* (Heggart *et. al*, 1999).
- 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 (Hough, 1990).

## 2.5. PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA CERVEZA TIPO LAGER

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

### 2.5.1 Ingredientes

Según Kunze (2006), en la elaboración de cerveza se requieren cuatro ingredientes básicos: malta, lúpulo, agua y levadura. Actualmente, se utilizan otros tipos de granos, para la elaboración de cerveza, denominados adjuntos.

Los principales ingredientes utilizados son:

**a. Agua:** El agua es la mayor porción de materia prima usada en la fabricación de la cerveza, sin embargo, solamente una parte de la cantidad de agua es usada directamente en la cerveza. Las características del agua de fabricación influyen en la calidad de la cerveza y deben de cumplir con las características propias de potabilidad: Sin exceso de sales, exenta de materia orgánica, microbiológicamente pura y libre de aromas y sabores extraños.

Según Ros (1980), la composición de sales del agua tiene una influencia indirecta en su acción en la regulación del pH del mosto y la cerveza, y un rango adecuado está entre 5,0 y 6,0. Un pH muy elevado es desfavorable para reacciones importantes como la sacarificación, la coagulación de proteínas durante la ebullición, el amargor es más astringente por mayor extracción de taninos (polifenoles). Por esto, muchas veces el agua es tratada para lograr bajar el pH mediante la adición de sulfato de calcio.

**b. Malta:** La malta, se obtiene a partir de granos de cebada, sometidos a germinación y deshidratación, tostado en condiciones tecnológicas adecuadas. El proceso de malteado es imprescindible ya que la cebada no se puede utilizar directamente en la producción de cerveza, al no tener desarrollado el sistema enzimático encargado de transformar el almidón en azúcares. Este proceso se realiza en las malterías o en las mismas instalaciones de la cervecera. La malta contiene las enzimas necesarias para hidrolizar los hidratos de carbono necesario para la obtención del mosto y es la materia prima fundamental en la fabricación de la cerveza (Kunze, 2006).

**c. Lúpulo:** El lúpulo se obtiene a partir de los conos maduros de la flor femenina de la planta *Humulus lupulus* una planta trepadora de la familia cannabis, este se agrega al mosto como extracto o productos secados en dosis que varían en función del sabor y aroma final deseados para la cerveza (Garibay García y López-Munguía Canales, 1993).

Según Boldú Gonzales (2011), desde el punto de vista cervecero, la composición del lúpulo es muy importante para la calidad de la cerveza y está dada por:

(a) Sustancias amargas, son el 18,5 por ciento de la composición del lúpulo, y son los compuestos químicos denominados alfa-ácidos y beta-ácidos, que a su vez están formados por distintos compuestos. De estas dos fracciones forman parte las humulonas, que al isomerizarse mediante ebullición o por álcalis, forman isohumulonas, sustancias que confieren el carácter amargo a la cerveza. 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. (b) Los aceites son el 0,5 por ciento de la composición del lúpulo, y esta fracción la componen más de 200 compuestos. Son producidos por las brácteas y son responsables del aroma. Son volátiles y durante la ebullición se eliminan las más hidrosolubles. (c) Los polifenoles son el 3,5 por ciento de la composición del lúpulo. (d) La fracción proteica o compuestos nitrogenados en el lúpulo varía de un 12 a 20 por ciento y aproximadamente de un 30 a 50 por ciento queda en el mosto. (e) Sustancias inorgánicas, 8 por ciento de la composición del lúpulo.

**d. Levadura:** 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 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 (Kunze, 2006).

**e. Adjuntos:** Son granos de cereales de maíz, arroz, trigo, cebada, azúcar, azúcar de maíz, avena, quinua, entre otros, que se pueden añadir a la malta para aumentar su contenido en almidón y porcentaje de azúcares fermentables. Se añaden en menor o mayor cantidad dependiendo de la calidad de la malta y de las características del tipo de cerveza que se desea obtener.

## 2.5.2 Etapas

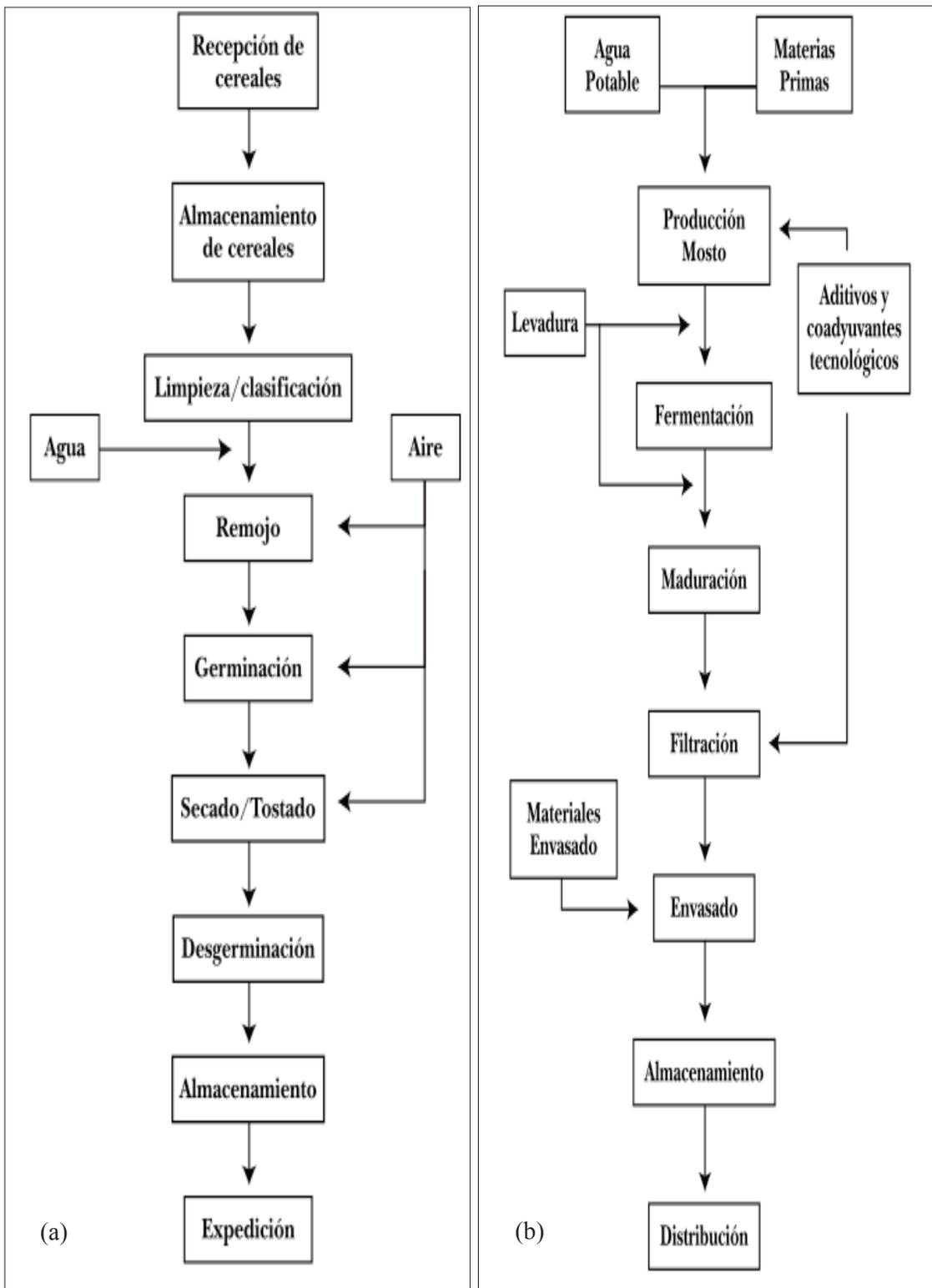
Según el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) y Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), 1999, el flujo de elaboración de malta en una maltería y de la elaboración cerveza en una fábrica se muestran en la Figura 13.

### 2.5.2.1 Elaboración de malta

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, la malta. Básicamente es la germinación controlada de un cereal, seguida por la interrupción de este proceso natural, secando el grano por medio de calor. Durante la producción de malta son muchos los parámetros que deben ser controlados, variaciones de estos parámetros logran las llamadas maltas especiales, necesarias para la elaboración de distintos tipos de cervezas, por sus colores y sabores característicos además de cuerpo, palatabilidad, estabilidad de espuma, entre otras cualidades (Gigliarelli, 2013).

Según Kunze (2006) el proceso, consta de los siguientes pasos:

- a. Recepción:** El cereal llega a las instalaciones de las malterías 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 como tallos, madera, metal, piedras, otros granos o granos partidos, etc.
- b. Remojo:** Para poder activar las enzimas útiles para el malteado es necesario hidratar el grano llevando su humedad a un 35 a 46 por ciento. Para hidratar la cebada se la remoja por inmersión en agua a unos 15 °C, cuando la humedad es adecuada comienza el proceso germinativo y la demanda de oxígeno aumenta así como la emisión de dióxido de carbono. 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 puede durar entre dos y tres días. Aquí la correcta ventilación evita las altas concentraciones de CO<sub>2</sub>.



**Figura 13: (a) diagrama de flujo de elaboración de malta en una Maltería y (b). Diagrama de flujo de elaboración de cerveza en una cervecería.**

FUENTE: IICA & AECI, 1999; pág. 17 y 24.

- c. Germinación:** El embrión comienza su desarrollo hacia el final de la etapa de descanso y necesitará nutrientes para seguir creciendo. Estos se encuentran en el endospermo. Las proteínas se descomponen en aminoácidos, las paredes de las células de almidón en beta-glucanos de bajo peso molecular y parte del almidón (sólo ocho a diez por ciento) en azúcares más simples. A este proceso se lo conoce como "Modificación" o "Desagregación". La modificación continuará luego cuando el maestro cervecero utilice la malta en el proceso de maceración que reactiva la conversión enzimática transformando el resto del almidón soluble en los azúcares simples que servirán de alimento para las levaduras durante la fermentación.

Según Vincent et al., (2006), las proteasas hidrolizan las proteínas de la malta, dando como resultado la formación de péptidos y aminoácidos, que más adelante, durante la fermentación servirán como nutrientes para la levadura. Las  $\beta$ -glucanasas hidrolizan los glucanos presentes en la cebada; la degradación de estos polímeros es importante para disminuir la viscosidad del mosto. La  $\beta$ -amilasa hidroliza la amilosa y la amilopectina originando maltosa y dextrinas. Las amilasas que se activan entre 60 y 70 °C hidrolizan los enlaces  $\alpha$  (1-4) de la amilosa y la amilopectina en diferentes puntos del polímero.

- d. Secado:** Una vez que la modificación dentro del grano sea 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 de secado para maltas tipo lager son de 55 a 70 °C y de 60 a 95 °C para maltas tipo ale. Finalmente se realiza la fragmentación de los granos tostados para obtener la malta en polvo (Varnam y Sutherland, 1997).
- e. Desbrotado:** Finalizado el horneado la malta se pasa a través de una máquina que extraerá todas las raicillas 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 proteínico que es más alto por peso que el de la cebada original. La malta entonces se pone en el almacén por un período especificado antes de ser analizada y posteriormente enviada al cliente.

### 2.5.2.2 Elaboración del mosto

La producción del mosto, según Food Science And Technology (2006), consiste de las siguientes etapas:

**a. Molienda:** Si bien el primer proceso en la producción de cerveza es el malteado, cuando hablamos de la elaboración de un lote podemos decir que la molienda es el primer paso a realizar. En todas las cervecerías industriales y microcervecerías se comienza con este proceso. La importancia de la molienda radica en que de 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.

El proceso reduce el endospermo a partículas más pequeñas tratando de mantener la cáscara intacta. Cuanto más chico se parta 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 granos a una serie de descansos a diferentes temperaturas, que deberán ser sostenidos durante un tiempo específico. Estas tres variables (relación agua/grano, tiempo y temperatura) se determinan al momento de planear una receta y varían dependiendo de los ingredientes usados, de los métodos de elaboración y del perfil que el maestro cervecero quiera darle a su cerveza. 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. Cada una, logra su máxima acción a una temperatura y a un pH determinado, valores que llamamos óptimos. Las enzimas que se activan o se generan durante el malteo se encargarán luego de la acidificación del mosto, de la degradación de proteínas y fundamentalmente de la conversión del almidón en azúcares más simples que puedan ser utilizados por las levaduras.

**c. Cocimiento:** Es el proceso de exponer al mosto a una fuente de calor hasta que alcance una ebullición constante y se mantiene bajo estas condiciones por 60 y 120 minutos. Lo que se busca en esta etapa es la remoción de compuestos volátiles indeseados, la isomerización de los ácidos del lúpulo, la desnaturalización y floculación de proteínas, la esterilización, la inactivación enzimática, la concentración del mosto, y además es aquí donde se definen el color y algunos sabores y aromas específicos.

Antes de pasar al fermentador se deben separar del mosto lo que se conoce como “*Trub*” que son flóculos formado por proteínas/polifenoles, materiales ricos en lípidos, componentes insolubles del lúpulo, etc., que coagulan durante el cocimiento. Inmediatamente después de esto, se enfría el mosto en el menor tiempo posible hasta llevarlo a la temperatura adecuada de inoculación.

Durante el enfriado comienza la formación de otro tipo de materia insoluble (*trubs* fríos) que continuará aún durante la fermentación. Al separar los *trubs* se eliminan sustancias indeseables, amargas; se mejora la estabilidad física y la eficiencia de extracto, sin embargo, muchos cerveceros permiten que el *trub* permanezca en el fermentador, porque se ha demostrado que produce fermentaciones más vigorosas, gracias a los nutrientes que se concentran en él. Una vez clarificado y enfriado el mosto está listo para pasar al fermentador.

Según Bamforth (2003), el mosto influye directamente en la calidad de la cerveza, a través de sus componentes en el producto, ya que determina el color, la claridad, la espuma, la seguridad, la salubridad y algunos aspectos clave del sabor, además tiene impacto en el rendimiento de la levadura. Las fuentes de variabilidad en la composición del mosto puede deberse a las variaciones en la composición del agua, del grano para moler y de condiciones de las salas de cocción. El primero se regula con mayor facilidad, a través de tratamientos de agua para cumplir los protocolos, el resto se debe cumplir según las recetas y normas establecidas para las moliendas, el malteado y cocimiento. Ya que en esta parte el mosto adquiriera las condiciones para servir como nutriente a la levadura.

El mosto adquiere su color durante la fase de maceración y hervido en el cocimiento, siendo el resultado de una combinación de varios factores. Entre ellos la reacción de caramelización y Maillard (también conocida como glucosilación o glicación no enzimática de proteínas).

La caramelización en sí es otro conjunto de reacciones producidas por efecto del calor que ocurre cuando los azúcares son calentados sobre su punto de fusión, donde, en condiciones ácidas, condensaciones, arreglos y ciclaciones de aldosas y cetosas originan furfural y otros compuestos aromáticos (Barreiro y Sandoval, 2006).

Este proceso se basa en un conjunto complejo de reacciones químicas que se producen entre las proteínas (grupo amino [-NH<sub>2</sub>]) y los azúcares reductores (grupo carbonilo [-CO]). Durante este proceso los azúcares como la maltosa y la glucosa se combinan con los aminoácidos, que en su mayoría provienen de la malta y en menor medida de los lúpulos, reaccionando y formando melanoidina, compuesto responsable del oscurecimiento del mosto (Kunze, 2006).

En la reacción de Maillard se distinguen tres etapas: inicialmente se produce la asociación del azúcar con la proteína, formando un compuesto denominado base de Schiff; la estructura de este compuesto se reordena hacia una forma más estable, denominada producto de Amadori. Este posteriormente sufre una serie de complejas transformaciones que conducen a la formación de compuestos generalmente coloreados y/o fluorescentes (Mardones Ortega, 2012).

### 2.5.2.3 Fermentación y maduración

Según Kunze (2006), una vez obtenido el mosto, este es aireado de manera estéril, e inoculado con de levadura para que inicie la fermentación. En la elaboración industrial de la cerveza se diferencian dos tipos de fermentación: fermentación alta, en la elaboración de cerveza tipo “Ale” y fermentación baja, en la elaboración de cerveza tipo “Lager”. Estas fermentaciones operan bajo condiciones de cepas, tiempo y temperatura diferentes, sin embargo en ambas tipos se lleva a cabo en dos etapas; la fermentación y maduración.

Para la elaboración de la cerveza tipo *Lager*, se consideran las siguientes etapas:

**a. Fermentación Primaria:** La fermentación primaria se inicia cuando las levaduras son introducidas en el mosto aireado, esta cerveza se denomina “Cerveza verde”. En la fermentación primaria se dan las siguiente etapas:

La fase de adaptación o 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:** En la fermentación secundaria, se da lugar la fase de fermentación y sedimentación, estas siguen rápidamente a 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 suspensión, permitiéndose la dispersión y el contacto máximo con el mosto, esta fase provoca el aumento del contenido de alcohol y el agotamiento de los azúcares y nutrientes, que origina que la levadura comience a flocular y sedimentar en el fondo del fermentador, proceso conocido como fase de sedimentación (cervezas tipo *Lager*) en esta etapa se produce la maduración del aroma y sabor de la cerveza.
- c. Maduración o “Lagering” de la cerveza:** La etapa de maduración se lleva a cabo cuando se ha alcanzado el extracto final deseable, los tanques se enfrían a temperaturas de refrigeración de -1 °C 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 y al velo producido por las micelas coloidales y las proteínas. Durante el tiempo de maduración estas precipitan y se depositan en el fondo del tanque, originándose la clarificación, en la última fase de la guarda, esto favorece la filtración de la cerveza y la estabilidad coloidal de la misma. Otra de las finalidades de la maduración tradicional es lograr la carbonatación de la cerveza hasta alcanzar los niveles de anhídrido carbónico deseados en el producto final.

#### 2.5.2.4 Filtración, envasado y almacenamiento

Según Kunze (2006), 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, viene el proceso de carbonatación que consiste en una inyección de gas carbónico cuyo contenido es el necesario para que la cerveza produzca una buena formación de espuma. La cerveza saliente de los filtros y carbonatada, se recibe en los tanques de almacenamiento, para su posterior envasado.

El envasado se realiza bajo las mejores condiciones asépticas posibles, con la menor agitación para eliminar la pérdida de gas carbónico, sin aumento de temperatura y sin inyección de aire (Figura 14).

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. La pasteurización se lleva a cabo a 60 °C durante un corto tiempo, con el objeto de eliminar residuos de levadura que pueden haber pasado en la filtración y finalmente es envasada y paletizado para su despacho.



**Figura 14: Envasado de cerveza con sistema de llenado automático “*Sensometric Vpvi*”**  
FUENTE: Tomado de Hans, 2009, pág. 295.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 UBICACIÓN DE LA ETAPA EXPERIMENTAL**

La investigación se desarrolló en la planta Cervecera ANPAY Perú S.A, ubicada en la Av. Chacra Cerro N° 325, Comas. La parte experimental y los análisis se realizaron en el Laboratorio de control de calidad de la misma empresa entre los meses de febrero a octubre del año 2013.

#### **3.2 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

##### **3.2.1 Obtención de la cepa**

La cepa utilizada fue la TUM 34/70 Lote N°:1212-29 *Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis*, levadura de fermentación baja para la elaboración de cerveza, proveniente de la Universidad Técnica de Múnich, del Centro de Investigación Weihenstephan para la elaboración de cerveza y calidad de los alimentos, Alemania., conservada en el laboratorio de control de calidad de la planta Cervecera ANPAY Perú S.A.(ANEXO 2).

##### **3.2.2 Obtención y preparación del mosto a fermentar**

Se utilizó parte del mosto elaborado en la planta Cervecera ANPAY Perú S.A, proveniente de un cocimiento de malta, lúpulo y maíz, realizado el día 06 de marzo del 2013(N°8) para la producción de cerveza. El mosto frío fue recolectado separando el “*Trub*”, y midiendo las cantidades necesarias a utilizar en los *starters* y lotes de fermentación. Todas las muestras fueron esterilizadas a 121 °C por 15 minutos, se esterilizó el mismo día de producido el mosto, para evitar posibles contaminaciones y que el grado de atenuación de la muestra baje, no por la levadura si no por alguna contaminación exterior, de esta manera todas las muestras fueron homogéneas. Al finalizar, las muestras se almacenaron en una cámara de frío a 0 °C hasta su respectivo uso.

### **3.3 MATERIALES Y EQUIPOS**

#### **3.3.1 Materiales**

Los materiales utilizados en la etapa experimental fueron los siguientes:

- Tubos de ensayo con tapa rosca de 16 x 150 mm.
- Gradilla de plástico.
- Algodón
- Guantes descartables estériles, mascarillas descartables, gorras descartables.
- Rollo de papel aluminio
- Asa de siembra estéril.
- Agua destilada estéril.
- Alcohol de 70 ° y 96 °.
- Matraz Erlenmeyer de 100 ml, 250 ml, 1l estéril.
- Imanes de 5 cm x 1 cm.
- Termómetro.
- Cámara de conteo de Neubauer
- Micropipetas de 200 ul. y 1000 ul.
- Puntas de Tips estériles, para micropipeta.
- Gotero con azul de metileno
- Frascos estériles de 500ml.
- Placas descartables estériles.
- Jarra anaeróbica de 2.5 L
- Tiras de anerotest.
- Sobres de Anaerocult A
- Sobres de Anaerocult C
- Filtro de Membrana Millipore de 0.45 um.
- Tubos de centrifuga, capacidad de 25 ml.

#### **3.3.2 Medios de cultivo**

- Agar Lysina.
- Agar NBB o Agar Bier

- Agar kristal Violet
- Agar M.R.S- Man, Rogosa y Sharpe
- Agar Mosto.
- Agar Plate count.
- Agar Cromocult para coliformes.

### 3.3.3 Equipos

- Refrigeradora de 2 a 4 °C
- Autoclave Vertical.
- 2 Agitadores Magnéticos Marca IKA C-MAG HS7.
- Cabina de Flujo Laminar
- Mechero Bunsen con conexión a gas.
- Microscopio Óptico Marca Olympus CX31
- Espectrofotómetro, Marca Spectrumlab 752s *uvvis spectrophptometer*.
- Estufa de Incubación a 37 °C, 45 °C.
- Horno de Esterilización a 181 °C.
- Equipo Alcolyzer Pluz Beer - Anton Paar.
- Equipo pH-Meter, Marca Crison BASIC 2.
- Refractómetro, Atago 5000α
- Centrifuga, Marca Hettich Zentrifugen, Modelo Rotofix 32<sup>a</sup>.

### 3.4 MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE LOS STARTER

La presente tesis tiene como objetivo, evaluar dos formas de cultivo de levaduras, el “*Re-pitching*”; y la *propagación desde un cultivo puro*, utilizadas comúnmente en la elaboración de cerveza tipo *lager*, estas dos formas de cultivo, fueron representadas en los Métodos N°1 y N°2, y esquematizadas en las Figuras 15 y 16. Estos métodos de preparación de los *Starters*, escalamiento y producción de cerveza, están basados en condiciones reales de una planta cervecera, desde el inicio en laboratorio hasta la producción de cerveza en planta, para esta última fase se acondiciono un recipiente para darle las condiciones deseadas. Se evaluó la estabilidad de los “*Starter*” obtenidos con los cultivos, durante tres cultivos consecutivos, midiendo su viabilidad y vitalidad de levaduras para producir cerveza.

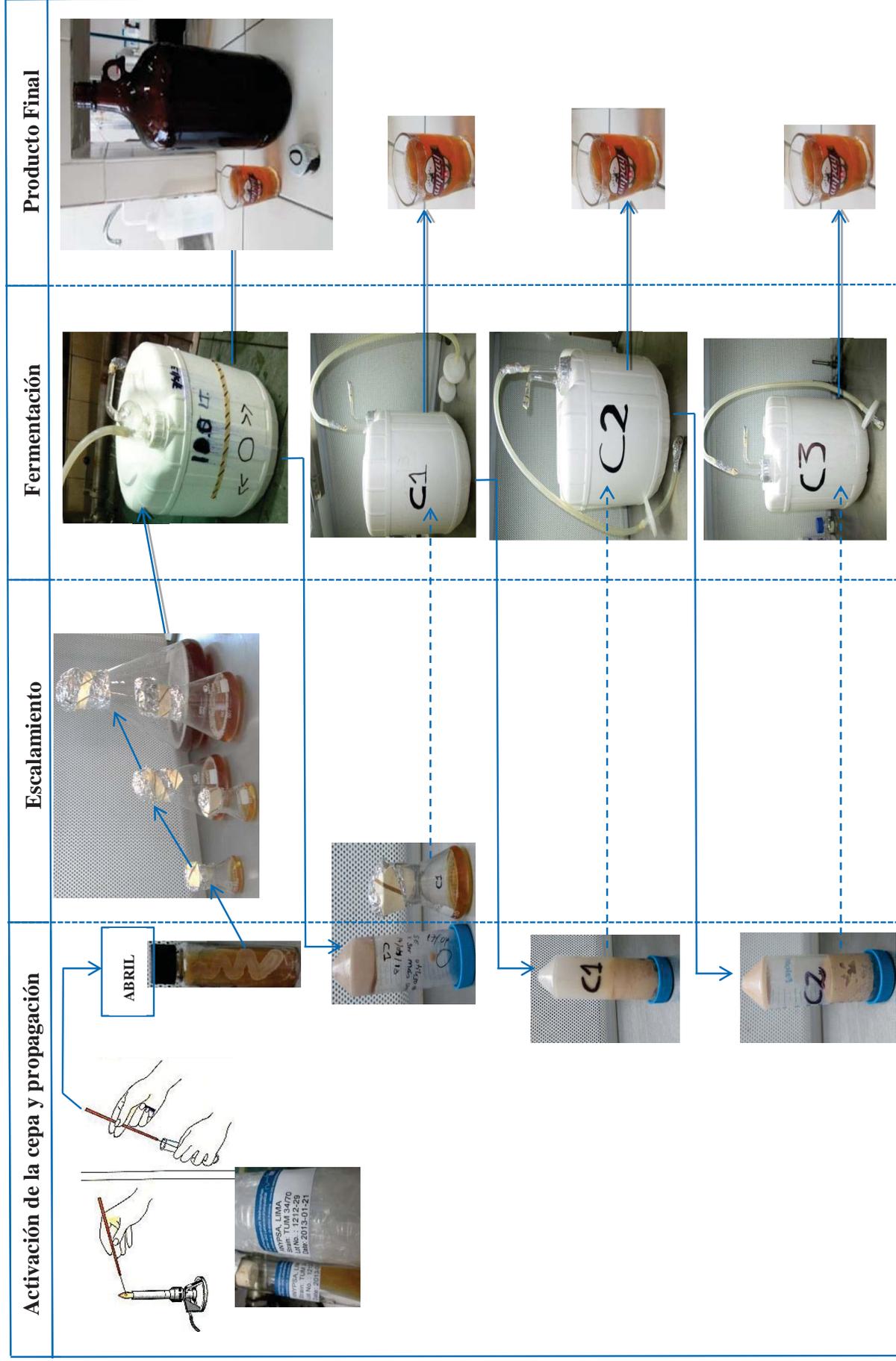


Figura 15: Esquema del Método N°1, para la producción de *Starter* y cerveza tipo Lager.

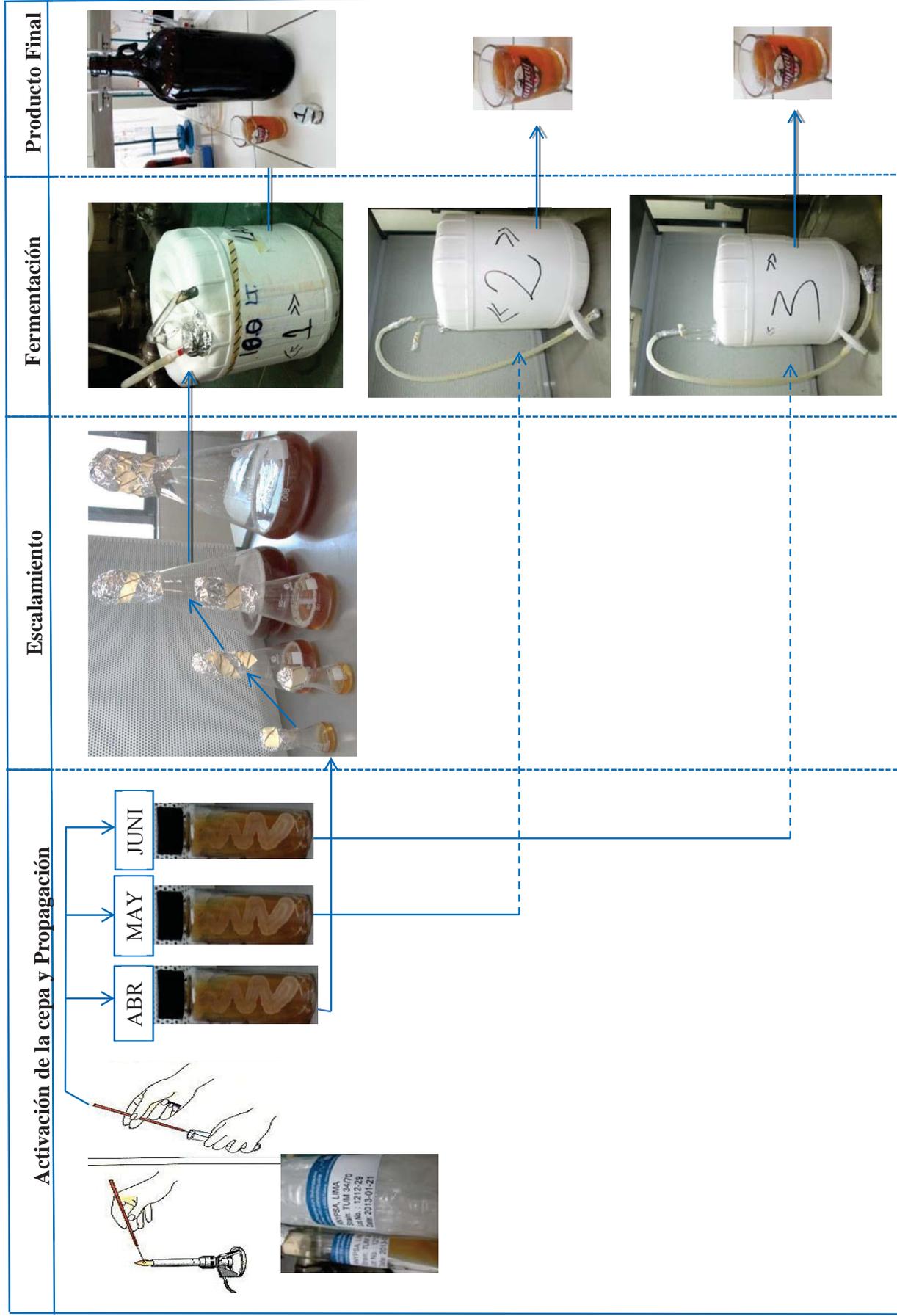


Figura 16: Esquema del Método N° 2, para la producción del Starter y cerveza tipo Lager.

### **3.4.1. Preparación de las cepas de trabajo y stock**

Las cepas de trabajo, se prepararán a partir de la cepa madre o comercial, TUM 34/70 Lote N°:1212-29 *Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis*, proveniente de Alemania.

Se realizó repiques sucesivos en tubos inclinados con agar mosto, bajo condiciones estériles, con la finalidad de reactivar la cepa, los tubos obtenidos fueron incubados a 20 °C por siete días, de los quince tubos sembrados se escogieron cinco, los que mostraron un mejor desarrollo morfológico de las colonias, de estas se tomaron dos para iniciar los *Starters*, con ambos métodos. Uno primer tubo dio inicio al método N°1 y el otro dio inicio al método N°2, el resto de tubos fue conservado en refrigeración a una temperatura de 2 °C a 4 °C, para su uso en los posteriores meses, con el método N°2, a estos tubos se le denomina cepa stock.

### **3.4.2 Escalamiento de propagación de los Starters**

En este trabajo, el escalamiento de propagación, se realizó a partir de la cepa de trabajo, con volúmenes crecientes de mosto estéril de 10 ml, 100 ml y 1 L, preparados en matraces (Fotos en el ANEXO 3).

En el método N°1, el escalamiento se inició a partir de la cepa de trabajo, del cual se tomaron dos asadas, y se colocaron en el matraz de 10 ml, este se llevó a agitación constante (100 rpm) por un día a temperatura ambiente. Para luego ser transvasado al matraz de 100 ml, y agitado por dos días a temperatura ambiente, finalmente se transvasó al matraz de un litro bajo las mismas condiciones anteriores. Terminado así la fase de preparación del starter, luego este estárter se utilizó para la fermentación del lote denominado “0”, al finalizar la fermentación primaria, se separarán las levaduras que sedimentarán en el fondo del fermentador y se centrifugarán a 1500 rpm por 15 minutos, este nuevo inóculo fue conservado a 2 °C a 4 °C, por un máximo de 12 horas, para posteriormente iniciar un nuevo escalamiento y fermentación del siguiente lote.

En el método N°2 el *Starter* obtenido fue utilizado para la fermentación del lote denominado “N 1”. Los lotes siguientes fueron obtenidos con el mismo proceso de escalamiento, y cepa de trabajo correspondiente.

### **3.4.3 Fermentación de lotes**

El lote de fermentación constó de diez litros de mosto estéril, en un recipiente cilíndrico de veinte litros de capacidad, que se acondicionó el ingreso de aire estéril con filtro de membrana Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ , se colocó un tubo de salida de  $\text{CO}_2$ , y se mantuvo en agitación constante (Fotos en el ANEXO 4).

La fermentación se llevó a cabo por siete días a 15 °C, en ambiente controlado de la sala de propagación de levaduras de la empresa Anpay Perú S.A. finalizado estos días, se decantó el contenido a un recipiente ámbar estéril de cinco litros de capacidad. Para el método N°1, las levaduras sedimentadas en el fondo del fermentador se recogieron y se utilizaron para una nueva propagación, volviéndose a iniciar con esta nueva cepa toda la preparación del nuevo inóculo o *starter*. Para el método N°2, las levaduras sedimentadas fueron descartadas.

La maduración se llevó a cabo por 15 días a una temperatura de 0 a 2 °C, en cámara de refrigeración de la sala de levaduras de la empresa Anpay Perú S.A.

### **3.4.4 Cerveza final**

Al finalizar la etapa de maduración, la cerveza obtenida fue filtrada con tierra diatomea y se analizaron sus características fisicoquímicas y microbiológicas (Fotos en el ANEXO 5).

## **3.5 METODOLOGÍA DE ANÁLISIS**

### **3.5.1 Determinación de la calidad del Mosto**

El mosto utilizado para preparar todos los *Starters* y los Bach de fermentación provinieron del cocimiento N°8-2013 de la empresa Anpay Perú S.A. Este se elaboró con, malta, maíz, lúpulo en extracto, lúpulo en pellets y cloruro de calcio. La calidad de este mosto se evaluó con respecto a la norma interna de control de calidad de la empresa Anpay, y fue determinada por la caracterización fisicoquímica, microbiológica y estabilidad del mosto.

### 3.5.1.1 Caracterización fisicoquímica

La caracterización fisicoquímica se realizó en el mosto proveniente del cocimiento y en el mosto esterilizado en autoclave. La esterilización en autoclave se realizó a una temperatura de 121,5 °C y a una presión de 1 kg/cm<sup>2</sup>, por 15 minutos, tiempo requerido para la destrucción de la mayoría de bacterias.

Los datos de la caracterización fisicoquímica del mosto, será proporcionada por el área de fisicoquímica de control de calidad, de la empresa Anpay Perú S.A. los análisis, fueron realizados según los métodos analíticos de MEBAK (1999). Los análisis realizados fueron de: Extracto original (grados plato, ° P ), pH, color (°SRM), amargo (U.A), sulfatos (ppm), calcio (ppm), cloruros (ppm), prueba de yodo, acidez (% de ácido láctico), polifenoles (ppm), porcentaje de alcohol, azúcares reductores, y F.A.N (Nitrógeno amino libre).

### 3.5.1.2 Caracterización microbiológica

La caracterización microbiológica se realizó en la muestra del mosto esterilizado por autoclave y mosto recolectado. En la caracterización microbiológica se determinó la presencia de mohos, bacterias mesófilas aerobias, *Pediococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, levaduras silvestres no *Saccharomyces* y levaduras silvestres tipo *Saccharomyces* según el método de recuento en placa Según ICMSF (2000).

**a. Método de recuento en placa:** La población microbiana se determina por el recuento de las colonias sembradas por vertido en placa de una muestra. El procedimiento consiste en tomar 1 ml de la muestra y adicionar en placas Petri estériles, por duplicado. Posteriormente, se agrega de 12 a 15 ml de agar fundido a 45 °C, el agar utilizado será según el tipo de microorganismo a determinar. Estas placas se colocan de forma invertida en la incubadora, a una temperatura de incubación que dependerá del medio de cultivo y del microorganismo a determinar.

El medio de cultivo utilizado y las condiciones de incubación se detallan a continuación:

- Determinación de bacterias Mesófilas aerobias viables: se utilizó agar Plate Count (PC) temperado a 45 °C, las muestras se incubaron a 27 °C, por dos días en condiciones de aerobiosis.

- Determinación de *Pediococcus sp*: se utilizó agar Nocive Brewers Bacteria (NBB-A) temperado a 45 °C, las muestras se incubaron a 37 °C, por cuatro días en condiciones de anaerobiosis (MEBAK, 2000).
- Determinación de *Lactobacillus sp.*: se utilizó agar Manitol-Rogosa-Sharpe (MRS) temperado a 45 °C, las muestras se incubaron a 37 °C, por cuatro días en condiciones micro aeróbicas con cinco por ciento de CO<sub>2</sub>, esta condición se consiguió colocando un sobre de Anaerocult C, en una jarra de anaerobiosis junto a las placas (MEBAK, 2000).
- Determinación de levaduras y Mohos: se utilizó agar Mosto, temperado a 45 °C, las muestras se incubaron por cinco días en condiciones aeróbicas a 25 °C (MEBAK, 2000).
- Determinación de levaduras silvestres no *Saccharomyces sp.*: se utilizó Agar Lysina, temperado a 45 °C, las muestras se incubaron por cinco días en condiciones de aerobiosis a 25 °C (MEBAK, 2000).
- Determinación de levaduras silvestres tipo *Saccharomyces sp.*: se utilizó Agar Cristal Violeta temperado a 45 °C, las muestras se incubaron por cinco días en condiciones aeróbicas a 25 °C (MEBAK, 2000).

### 3.5.1.3 Análisis de la estabilidad del Mosto

Para determinar la estabilidad del mosto de cerveza, se utilizó la metodología descrita en el MEBAK (1999), el procedimiento consistió en recolectar en forma aséptica una muestra de mosto frío proveniente del cocimiento, en una botella de vidrio estéril con cerrado hermético. Esta botella se incubó por cinco días en estufa a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C, al quinto día se destapo la botella y se examinó visualmente detectando presencia de gas, turbidez, sedimentos, cambio de olor y color. El resultado se expresó como negativo o positivo.

### 3.5.2 Determinación de la viabilidad

La viabilidad fue determinada por el recuento en cámara de Neubauer, utilizándose el método de tinción de azul de metileno para determinar el porcentaje de viabilidad y células muertas.

- a. **Recuento en cámara de Neubauer:** Se prepararon las muestras, hasta una dilución de 1:10, la cámara de Neubauer se limpió con alcohol y se dejó secar antes de su uso. El procedimiento de análisis consistió en tomar 1 ml de la muestra, que se diluyó y homogenizó, para luego colocarlo sobre la cámara de Neubauer de manera uniforme, evitando la formación de burbujas, el recuento se realizó en el microscopio con aumento de 100 a 500X, los resultados se expresaron en millones de células de levadura por mililitro. Para el cálculo se utilizó la siguiente fórmula (MEBAK, 2000).

$$\text{Concentración (Levaduras/ml)} = \text{Lev. Total} \times F \times 10^4$$

Donde;

Concentración = Concentración de levaduras por mililitro de muestra.

Lev. Total = Número total de levaduras en los 25 cuadrantes del área demarcada.

F = factor de dilución.

- b. **Tinción con azul de metileno:** Este tinte es un colorante catiónico, Cloruro de metilonina, 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 (Gonzales Juarez, 2000).

El procedimiento, se realizó tomando un tubo de ensayo con 9 ml. de agua destilada estéril en donde se agregó 1 ml de la muestra a analizar, agregándose unas gotas de azul de metileno diluida al 1%, se homogenizó y se esperó unos minutos antes de colocar la suspensión en la cámara de conteo Neubauer y llevarlo al microscopio.

Se determinó el número total de células presentes vivas y muertas, las células vivas son las que no absorben el colorante, y se vieron transparentes. Las células muertas son las que absorben el colorante y se tiñeron de azul. Se realizó una lista de células vivas y muertas y a partir de aquí se calculó el porcentaje de viabilidad a través de la siguiente ecuación (MEBAK, 2000).

$$\% \text{ Muertas} = \frac{\text{Concentración de células teñidas}}{(\text{Concentración de levaduras} + \text{Concentración de células teñidas})} \times 100$$

$$\% \text{ Viabilidad} = 100 - \% \text{ Muertas}$$

Donde;

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  $10^4$ .

% Muertas = porcentaje de células muertas en la muestra tomada.

% Viabilidad = porcentaje de células vivas en la muestra tomada.

### 3.5.3 Determinación de la vitalidad

Se determinará a través de la actividad de la fermentación y/o capacidad fermentativa que tendrá el *Starter*, con los análisis del grado de fermentación, extracto original, extracto aparente y grado de alcohol. La determinación se realizó a través del equipo *Alcolyzer Beer*, que se encuentra en el laboratorio de control de calidad (ANEXO 6).

La determinación de todos estos parámetros se realizarán de manera diaria y en forma aséptica, al finalizar el escalamiento, durante el proceso de fermentación y al finalizar la maduración.

Los análisis se realizaron según el procedimiento propuesto por Anton Paar (2010) y MEBAK (2000):

- a. Las muestras de mosto en fermentación, fueron filtradas a través de un filtro watman # 41 con tierra de diatomeas. A La muestra obtenida, se le introdujo la manguera de conexión del equipo para proceder a la medición.
- b. El equipo se estabiliza a 20 °C, para luego inyectar la muestra (en el caso de formación de burbuja, la muestra se elimina y se toma una nueva muestra, hasta quedar estable en el equipo).
- c. En el *display* del equipo aparece la densidad (g/ml) de la muestra, esta se registró y se introdujo en la otra pantalla del equipo *Alcolyzer*.
- d. Finalmente en el *display* de la pantalla aparecerá los siguientes datos: Grado de alcohol % v/v, extracto original, extracto aparente, extracto real, porcentaje de fermentación o ADF (Atenuación aparente de fermentación), densidad y peso específico de la muestra, todos los datos se registran

### 3.5.4 Determinación de la calidad de la cerveza obtenida

La determinación de la calidad de la cerveza final obtenida en los dos métodos de preparación del *Starter*, se realizó mediante la caracterización fisicoquímica y microbiológica de la cerveza final. Un buen starter debe de producir una cerveza con un perfil equilibrado sensorial sin aromas inapropiados.

#### 3.5.4.1 Caracterización fisicoquímica

La caracterización fisicoquímica de la cerveza, fue proporcionada por los análisis, del área de fisicoquímica de la empresa Anpay Perú S.A., tuvo como datos los resultados del análisis de extracto original (Grados plato), pH, amargor (U.A) y porcentaje de alcohol, según los métodos analíticos para cerveza (MEBAK, 1999).

#### 3.5.4.2 Caracterización microbiológica

La caracterización microbiológica de la cerveza final obtenida, fue determinado por la identificación de la presencia de mohos, bacterias mesófilas aerobias, *Pediococcus sp.* *Lactobacillus sp.*, levaduras silvestres no *Saccharomyces* y levaduras silvestres tipo *Saccharomyces* según el método de filtración por membrana.

**a. Método de filtración por membrana:** La técnica de filtración por membrana se basa en hacer pasar la muestra a través de un filtro de membrana microporosa, en cuya superficie quedan retenidos los microorganismos. Se utilizaron membranas con un tamaño de poro de 0.45 micras (ICMSF, 2000). El procedimiento consistió en tomar con una pinza los filtros de membrana estéril y colocarlos sobre el sistema de filtración de membrana. Posteriormente se agrega 100 ml de muestra sobre el embudo, se enciende la bomba de vacío hasta que pase todo el contenido. Finalmente los filtros de membrana se retiran con pinzas estériles y se coloca sobre la placa con agar. Estas placas fueron incubadas a temperatura adecuada según los medios de cultivo a utilizar.

Los medios de cultivo y condiciones de incubación utilizados se realizaron según MEBAK (2000), y son los mismos que se utilizaron en el método de recuento en placa, anteriormente mencionados.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL MOSTO**

A continuación se muestra los resultados de la caracterización fisicoquímica, microbiológica y estabilidad.

#### **4.1.1 Caracterización Fisicoquímica del mosto**

Los datos fisicoquímicos del mosto, fueron proporcionados por el área de Fisicoquímica de control de Calidad de la empresa Anpay Perú (ANEXO 7) y se muestran en la Tabla 6.

Se comparó y evaluó el mosto proveniente del cocimiento y también el mosto luego de la esterilización por autoclave. Los parámetros fisicoquímicos de calidad del mosto nos indican, si el mosto tuvo una buena elaboración y cumplió con los tiempos y reposos del cocimiento, así como también la calidad de los insumos utilizado, especialmente de la calidad de malta.

En todos los ensayos se utilizó un solo mosto proveniente de un cocimiento, para evitar la variación en la composición del mosto de lote a lote, ya que diversos estudios como el de Taidi et al.,( 2003) indican que la composición del mosto afecta la fisiología de la levadura y que debido a la variabilidad de los mostos es difícil el estudio de su comportamiento.

Según la Norma de control de calidad, todos los parámetros deben de ser considerados en conjunto y no individualmente, La interpretación de la hoja técnica, indica que el mosto antes y después de la esterilización por autoclave cumple con los estándares de calidad, y se considera un mosto con características óptimas para la producción de una buena cerveza.

Para determinar si existe alguna diferencia entre el mosto esterilizado y no esterilizado, se realizó el análisis estadístico de la prueba de Mann Whitney para muestras pareadas, y se obtuvo un p-valúe de 1, lo que indica que no hay diferencias significativas, entre ambos mostos.

**Tabla 6: Resultados de la caracterización fisicoquímica del mosto**

Parámetros	Unidades	Mosto	Mosto después de Esterilización
Ext. Original	°P	14,93	15,01
pH	-	5,58	5,15
Color	SRM	3,7	6,5
Amargo	U.A.	27,4	28,9
Sulfatos	ppm	92	91
Calcio	ppm	36	35
Cloruros	ppm	262	260
Reacción al yodo	-	Negativo.	Negativo.
Acidez	% Ac. Láctico	0,22	0,27
Polifenoles	ppm	207	205
Azúcares reductores	%	9,7	9,0
F.A.N.	ppm	232	230

Sin embargo, el color esta fuera de norma para una cerveza tipo lager, caracterizada por ser de color dorado y claro, la norma para color es menor a 4 SRM, y el color del mosto después de la esterilización es de 6,5 SRM, esto nos da una idea del color que tendrá nuestra cerveza final, en este caso se obtendrá una cerveza de color cobrizo caramelo.

Para la producción del starter la variación de color no representaría un problema, pero para una producción comercial en donde se necesita mantener un mismo color entre Bach y Bach, se suelen utilizar agentes colorantes, entre otras técnicas, para mantener un color uniforme en todas las producciones.

La esterilización en autoclave provoco un cambio de color en el mosto debido a la sobre exposición al calor. El proceso de esterilización provoco que se dieran nuevamente las reacciones de Maillard y caramelización, por la alta temperatura a la que fue expuesta, estas reacciones se pueden reflejar indirectamente en los datos de azúcares reductores que bajo de 9,7 por ciento a 9,0 por ciento, indicando que estos azúcares se convirtieron en otro compuesto.

Hammond (2000), menciona que los componentes claves del mosto son los que influyen en la fisiología de la levadura tales como: Gravedad, espectro de azúcar (Azúcares fermentables), nitrógeno amino libre (FAN), lípidos, iones inorgánicos, pH, vitaminas, modificadores de superficie, oxígeno, precursores de sabor. Por tanto una óptima calidad del mosto, permitirá un medio rico de nutrientes para la levadura y obtener una cerveza de calidad.

Además, otro indicativo de la calidad del mosto es la densidad, ya que este influirá en el resultado de la fermentación ya que si el mosto fuera macerado a una temperatura demasiado baja, produciría un mosto más fermentable de lo requerido, y podría producir fermentación con rangos de atenuación muy bajos, por el contrario si se ha macerado a una temperatura demasiado elevada, producen más azúcares no fermentables de cadena larga (malas temperaturas en el cocimiento del mosto, y puede provocar procesos de atenuación demasiado altas, y provocar un parón de la fermentación. Esto se produce por no inocular suficiente levadura viable, por no oxigenar el mosto adecuadamente o por fermentar a una temperatura demasiado baja.

Con respecto a los valores de extracto original, pH, F.A.N. “Free Amino Nitrogen” o nitrógeno amino libre, estos se encuentran dentro de norma. Según Kunze., (2006), valores de pH fuera del rango de 5,2 a 5,7 pueden afectar la fermentación, se sabe que las levaduras crecen preferentemente con valores ácidos de pH y en la fermentación alcohólica, el pH varía normalmente entre un mínimo de 2.8 y un máximo de 3.8.

Según Suárez Lepe y Iñigo Leal., (1990), 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, como también, pueden alterar la composición de la membrana celular.

Por otro lado, el extracto original, se asocia con las proteínas totales, bajos valores de extracto, por ejemplo menores a 9 °P, pueden implicar menores cantidades de sustancias formadoras de espuma y de aminoácidos que son alimento para las levaduras. De igual manera, las proteínas solubles contribuyen a darle cuerpo a la cerveza, aunque niveles excesivos de la misma pueden contribuir a la formación de turbidez.

Según Kunze., (2006), en la práctica los valores de F.A.N constituye la fracción de aminoácidos, resultantes de la degradación de proteínas de alto peso molecular, que las levaduras utilizan como alimento, en la fase inicial del proceso fermentativo. Los valores obtenidos de 230 ppm, indican una buena concentración, adecuada para iniciar la fermentación, valores menos a 150 ppm, pueden provocar deficiencia en el crecimiento de la levadura.

#### 4.1.2 Caracterización microbiológica del mosto

Se comparó y evaluó la calidad microbiológica del mosto proveniente del cocimiento y también del mosto luego de la esterilización por autoclave, según el método de recuento en placa y con diluciones logarítmicas, los resultados se muestran en la Tabla 7.

En los análisis microbiológicos, se determinó que el mosto sin esterilizar tuvo 15 ufc/ml para bacterias aerobias mesófilas viables, y en el recuento de levaduras en el medio de cultivo con agar mosto presentó 2 ufc/ml, indicando presencia de levaduras.

**Tabla 7: Resultados de la caracterización microbiológica del mosto**

<b>Análisis microbiológicos</b>	<b>Unidades</b>	<b>Mosto después del cocimiento</b>	<b>Mosto después de Esterilizar</b>
<i>Bacterias aerobias mesófilas viables</i>	ufc/ml	15	<1
<i>Pediococcus sp.</i>	ufc/ml	<1	<1
<i>Lactobacillus sp.</i>	ufc/ml	<1	<1
<i>Levaduras y Mohos</i>	ufc/ml	2	<1
<i>levaduras silvestres no Saccharomyces</i>	ufc/ml	<1	<1
<i>levaduras silvestres tipo Saccharomyces</i>	ufc/ml	<1	<1

\* En el género *Pediococcus sp.* Incluye a *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus inopinatus*.

\*\* En el género *Lactobacillus sp.* Incluye a *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus brevisimiles*, *Lactobacillus frigidus*.

Los resultados microbiológicos, indican que no hay presencia de *Pediococcus* y *Lactobacillus*, estos resultaron ser menor a 1 ufc/ml, lo cual indicaría una buena calidad de mosto. Hough., (1990), menciona que son las bacterias ácido láctico, las que representan una contaminación grave para la cerveza, ya que producen cantidades importantes de metabolitos indeseables, entre los que el precursor del diacetilo, responsable del aroma a mantequilla. Y que según Hornsey., (2003), estas bacterias, pueden crecer bajo condiciones de bajo contenido de oxígeno (microaerófilas), siendo también tolerantes al alcohol y bajo pH y son menos sensibles a los iso- $\alpha$ -ácidos del lúpulo que la mayor parte de las bacterias Gram (+).

Los valores obtenidos en el mosto sin esterilizar, se considera de acuerdo a la norma interna de control de calidad de la empresa Anpay, como fuera de norma, ya que el mosto debe ser totalmente estéril, es probable que la contaminación inicial pudo deberse a una contaminación ambiental durante el trasvase a los contenedores del mosto, así como también de la misma área, o a la activación de endosporas de *Bacillus*.

Por tanto, se corrobora la necesidad de realizar una esterilización post cocimiento, que permita eliminar cualquier tipo de contaminación que altere la producción del *starter*, ya que el objetivo del *starter* es proporcionar un cultivo puro de levaduras. Los análisis microbiológicos del mosto después de ser esterilizado, indican que este mosto tiene una óptima calidad microbiológica, que permitirá obtener un cultivo *starter* puro, libre de cualquier contaminación.

A nivel industrial el mosto proveniente del cocimiento pasa a un área llamada “Sala de Propagación” en donde el mosto es llevado al reactor denominado “Propagador” y se somete a un proceso de esterilización que consiste en una ebullición a 100 °C por una hora, luego enfriado y conservado en la sala a una temperatura de 5 °C hasta su inoculación con el *starter*.

#### **4.1.3 Evaluación de la estabilidad del mosto**

Se determinó la estabilidad del mosto proveniente del cocimiento, este mosto no fue sometido a ningún tratamiento de esterilización y fue tomado directamente del cocimiento.

La evaluación de la estabilidad, predice de manera indirecta la calidad del mosto, ya que es sometido a condiciones críticas de temperatura, que en condiciones normales no se produciría (MEBAK, 1999).

Los resultados de la evaluación se muestran en la Tabla 8. El mosto muestra un cambio en el olor, color y turbidez. El olor cambió del característico a uno de fermentación. Según los resultados microbiológicos estos cambios pueden deberse a la contaminación bacteriana existente, que proliferó debido a las condiciones de temperatura favorable.

Esta prueba indica de manera rápida si el mosto presenta contaminación y si la elaboración de cerveza puede verse afectada. Por tanto se ratifica nuevamente que el proceso de esterilización del mosto, para la producción del starter, es imprescindible y que se debe de mantener estéril, para así poder obtener una cerveza de calidad.

**Tabla 8: Resultados de la evaluación de la Estabilidad del Mosto**

<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>	<b>Interpretación</b>
Presencia de gas	-	Aceptable
Turbidez	+	No Aceptable
Cambio de olor	+	No Aceptable
Cambio de color	+	Aceptable
Sedimentos	-	Aceptable

#### **4.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y VIABILIDAD DE LEVADURAS EN LOS STARTER**

Para este trabajo la viabilidad, se evaluó según el método de recuento en cámara de Neubauer y tinción con azul de metileno, además se realizó el recuento en placa, sin embargo, este último no se muestran los datos, debido a que todos los resultados obtenidos con el método de tinción con azul de metileno, fueron superior al 90 por ciento de viabilidad, indicando confiabilidad en los resultados, así mismo este método se realizó por triplicado.

Se determinó la viabilidad de los Starters, al finalizar la propagación de cada *starter* y durante la fermentación de sus respectivos Bach. La fase de fermentación, se consideró terminada cuando se alcanzó el recuento máximo de levaduras y los datos del extracto aparente se mantienen constantes o con poca variación por dos días consecutivos.

Se consideró para el escalamiento del starter y para el Bach de fermentación, un recuento de levadura que varió en el rango de un mínimo de  $8 \times 10^7$  lev/ml a un máximo de  $15 \times 10^7$  lev/ml, como indicador para realizar el transvase en el escalamiento y como indicador para cortar el aire, durante la fase de preparación para la fermentación, según la norma interna de control de calidad de la empresa Anpay, donde esta concentración de levaduras es la óptima para una cerveza tipo *lager* y con la levadura *Saccharomyces pastorianus ssp.carlsbergensis*.

#### 4.2.1 Recuento y Viabilidad de los Starter por el Método N°1 (*Re-pitching*)

Para evaluar el “*Re-pitching*” a través del método N°1, se tuvo que realizar primero un “Cultivo-0”, denominado así ya que las levaduras que se recuperaron al finalizar la fermentación fueron utilizadas para iniciar un primer starter, denominado “Cultivo - C1”, este proceso se repitió hasta obtener el “Cultivo-C2” y el “Cultivo-C3”. Los resultados de la evaluación fueron los siguientes:

##### 4.2.1.1 Evaluación del recuento y viabilidad del “Cultivo – 0”

Los resultados de la evaluación del recuento y viabilidad al starter “Cultivo – 0”, según el método N°1 al finalizar el escalamiento y durante la fermentación así como también los datos de alcohol, extracto aparente y porcentaje de fermentación se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9: Resultados de los parámetros de Viabilidad del Cultivo-0, en el Starter y fermentación**

Parámetros	Unidades	STARTER (1 L)	BACH DE FERMENTACIÓN (Días)						
			0	1	2	3	4	5	6
Temperatura	°C	25	12	12	12	12	12	12	5
Recuento en cámara de Neubauer	$\times 10^7$ lev/ml	120,00	-	1,30	4,90	9,00	11,30	18,00	4,30
Viabilidad	%	98,5	-	99,00	98,50	99,00	98,70	99,00	99,00
Alcohol	% v/v	5,42	0,01	0,98	1,38	2,77	4,95	5,04	5,41
Extracto Aparente	% v/p (°P)	3,68	13,9	12,1	11,35	8,97	4,69	3,68	3,55
ADF	%	78,27	0,11	12,49	17,91	41,01	72,34	73,2	76,84

Al finalizar el escalamiento, por el Método N°1, se obtuvo el starter del “Cultivo – 0”, este mostro un porcentaje de viabilidad del 98,50 por ciento. La viabilidad en los días de fermentación al igual que en el starter fue superior a este valor. Según la norma interna de control de calidad, la viabilidad debe ser superior al 95 por ciento, lo cual indicaría una óptima viabilidad de las levaduras. De manera similar lo indican Kunze (2006) y Mebak (1999).

El recuento en cámara de Neubauer mostro una concentración óptima de levaduras, en el quinto día de fermentación, obteniéndose  $11.3 \times 10^7$  Lev/ml, presento también 4,95 % v/v de alcohol 3,68 % v/p de extracto aparente un 72,34 %, de porcentaje de fermentación. Al día siguiente, el recuento fue de  $18 \times 10^7$  Lev/ml, y los valores de alcohol, extracto aparente y porcentaje de fermentación, presentaron poca variación, esto es indicador de que las condiciones dentro del mosto están alcanzando el límite como sustrato para que la levadura se siga reproduciendo.

En las cervecerías, cuando se observan estos valores se procede a enfriar lentamente el mosto hasta una temperatura de 0 °C, con la finalidad de que las levaduras precipiten en la base del fermentador y se recuperen para que sigan con la fermentación de otros mostos. Por tanto se procedió a enfriar el Bach, bajando la temperatura de la cámara de propagación, en el séptimo día de fermentación, se recuperaron y procesaron para utilizarlo como la nueva cepa de trabajo, que inició un nuevo starter “Cultivo - C1” .La cerveza verde obtenida fue descartada. La finalidad del “Cultivo-0”, fue obtener levaduras recuperadas, que iniciara un nuevo cultivo con futuras características óptimas de producción.

#### **4.2.1.2 Evaluación del recuento y viabilidad del “Cultivo - C1”**

En las cervecerías el proceso de recuperación o *Re-pitching*, pasa directamente a otro Bach para que continúe la fermentación, es decir el cultivo-0, pudo haber pasado directamente a la fase de fermentación de un nuevo Bach, sin embargo, en este trabajo se desea evaluar la capacidad de estas levaduras para iniciar un nuevo Starter y su fermentación, por tanto se inició con el “Cultivo -0” el Starter y fermentación del “Cultivo-C1”.

Los resultados de la evaluación del recuento y viabilidad del starter “Cultivo-C1”, se muestra en la Tabla 10. Se observó que el crecimiento de las levaduras en el escalamiento de los Starters fue más rápido en horas a comparación del escalamiento del Cultivo-0, sin embargo se esperó a que las levaduras cumplieran los dos días de escalamiento. Es probable que este rápido crecimiento pudiera deberse a que las levaduras se adaptaron más rápido al medio de cultivo.

**Tabla 10: Resultados del recuento y viabilidad del Cultivo-C1, en el starter y fermentación.**

Tiempo (Días)	Etapas	Temperatura (°C)	Recuento cámara Neubauer (lev/ml)	Viabilidad (%)
1	Cultivo-0 en 10 ml	25	-	-
2		25	13 x 10 <sup>7</sup>	99,50
3	100 ml	25	-	-
4		25	15 x 10 <sup>7</sup>	99,00
5	1 L STARTER	25	-	-
6		25	<b>13 x 10<sup>7</sup></b>	<b>99,00</b>
0	FERMENTACIÓN Bach de 10 L	12	-	99,00
1		12	3,2 x 10 <sup>7</sup>	98,50
2		12	11 x 10 <sup>7</sup>	98,20
3		12	15 x 10 <sup>7</sup>	97,50
4		12	17,9 x 10 <sup>7</sup>	97,50
5		5	<b>8,3 x 10<sup>7</sup></b>	<b>97,50</b>

Según Briggs et al., (2004) mencionan que durante las diferentes fases, la levadura está expuesta a una serie de tensiones y estas han desarrollado diversas estrategias metabólicas para minimizar los efectos nocivos de muchas tensiones. Además, las células de levadura en el *re-pitching* están en la fase estacionario (G0) y el Traslado a un nuevo mosto induce un cambio relativamente sincronizado a la fase G y el progreso del START. En las primeras horas no hay ningún cambio en el número de células o extracto aparente en el mosto. Sin embargo, el volumen celular se incrementa en aproximadamente un 20 por ciento y la biomasa cae por un porcentaje similar. Durante este tiempo la síntesis de esteroides se lleva a cabo a expensas del glucógeno celular y oxígeno molecular. Al cabo de seis horas de la inoculación, todas las células han pasado a la fase S.

También Hulse (2003), confirmó que el momento óptimo para transferir la levadura de una fase de propagación a otro, es en la última etapa logarítmica de crecimiento, antes del inicio de la fase estacionaria. Esto nos indicaría que el metabolismo de las levaduras es relativamente versátil y adaptable a una variedad de condiciones.

El starter del Cultivo- C1, mostró una viabilidad de 99,0 por ciento y una concentración final de levaduras de  $13 \times 10^7$  Lev/ml, indicando una condición óptima de las levaduras.

Durante la fase de fermentación del “Cultivo-C1”, la concentración de levaduras mostró también un rápido crecimiento, así mismo, el extracto aparente tuvo una rápida caída, provocando que en el quinto día de iniciada la fermentación se tome la decisión de cortar esta fase un día antes, enfriándolo a 5 °C. La concentración de  $17,9 \times 10^7$  lev/ml, en el quinto día, indica una alta sobre población, que en términos de producción de cerveza no se requiere, el objetivo del crecimiento de las levaduras es producir una cantidad determinada de levaduras que garanticen obtener los olores y sabores característicos de una cerveza y no la levadura en sí.

Zepf et al.,(2001) afirmaron que el principio primordial para utilizar una levadura debe ser la de producir un cultivo óptimo que muestre una buena fermentación posterior, y no uno basado en el aumento de levaduras en el menor tiempo posible.

El porcentaje de viabilidad se mantuvo constante durante la fermentación con una leve disminución en los últimos días. Probablemente se debió a la alta concentración de levaduras. En el día décimo segundo se paró la fermentación y se pasó a la fase de maduración. Las levaduras sedimentadas se recolectaron y procesaron para ser utilizadas como la nueva cepa de trabajo que dará origen al *starter* denominado “Cultivo-C2”.

#### **4.2.1.3 Evaluación del recuento y viabilidad del “Cultivo - C2”**

Los resultados de la evaluación del recuento y viabilidad del starter “Cultivo-C2”, se muestran en la Tabla 11. El Starter del “Cultivo-C2”, presentó una ligera disminución de la viabilidad, siendo ésta de 97,50 por ciento, el recuento de levaduras por cámara de Neubauer fue de lev/ml o  $13,8 \times 10^7$  lev/ml, al igual que en el *Starter* del “Cultivo-C1”, el crecimiento de las levaduras en el escalamiento fue rápido.

Durante la fermentación del “Cultivo–C2”, el porcentaje de la viabilidad disminuyó, siendo 96,50 por ciento, el menor valor obtenido. La concentración de levaduras, aumentó rápidamente en la fermentación llegando un máximo de  $19,2 \times 10^7$  lev/ml, en el quinto día de fermentación, en comparación con el Cultivo – C1, esta población fue mayor. Por tanto se decidió parar la fermentación y pasar a la fase de maduración. Las levaduras sedimentadas se recolectaron y procesaron para ser utilizadas como la nueva cepa de trabajo que dio origen al *starter* denominado “C3”.

**Tabla 11: Resultados del recuento y viabilidad del Cultivo-C2, en el Starter y la Fermentación.**

Tiempo (Días)	Etapas	Temperatura (°C)	Recuento cámara Neubauer (lev/ml)	Viabilidad (%)
1	Cultivo-C1 10 ml	25	-	-
2		25	$12,4 \times 10^7$	97,2
3	100 ml	25	-	-
4		25	$13,5 \times 10^7$	96,9
5	1 L STARTER	25	-	-
6		25	<b><math>13,8 \times 10^7</math></b>	<b>97,5</b>
0	FERMENTACIÓN Bach de 10 L	12	-	96,5
1		12	$3,4 \times 10^7$	96,5
2		12	$9,2 \times 10^7$	96,8
3		12	$13,9 \times 10^7$	96,8
4		12	$19,2 \times 10^7$	96,5
5		5	$6,8 \times 10^7$	97,0

#### 4.2.1.3 Evaluación del recuento y viabilidad del “Cultivo - C3”

Los resultados de la evaluación del recuento y viabilidad del starter “Cultivo–C3”, se muestran en la Tabla 12. La viabilidad del *Starter* del Cultivo-C3”, fue de 92,80 por ciento, en comparación con los anteriores cultivos, este presentó una notable disminución de la viabilidad, por debajo del 95 por ciento de viabilidad, establecida como óptimo para control de calidad, sin embargo es superior al 80 por ciento, y que según Kunze, no afectaría el rendimiento de la levadura. El recuento de levaduras por cámara de Neubauer fue de  $12,0 \times 10^7$  Lev/ml. Se considera este valor dentro de los parámetros.

Durante la fermentación del Cultivo- C3”, el porcentaje de la viabilidad disminuyó, llegando hasta un 88,8 por ciento, el recuento máximo de levaduras alcanzo una concentración de  $14,5 \times 10^7$  lev/ml, en el quinto día de iniciada la fermentación. La disminución de la viabilidad, y el aumento de las células muertas, puede deberse a que las levaduras podrían estar degenerándose, así como también es probable que exista contaminación.

**Tabla 12: Resultados del recuento y viabilidad del Cultivo-C3, en el Starter y fermentación.**

Tiempo (Días)	Etapas	Temperatura (°C)	Recuento cámara Neubauer (lev/ml)	Viabilidad (%)
1	Cultivo- C2 10 ml	25	-	-
2		25	$8,3 \times 10^7$	93,7
3	100 ml	25	-	-
4		25	$12,8 \times 10^7$	95,0
5	1 L STARTER	25	-	-
6		25	<b><math>12,0 \times 10^7</math></b>	<b>92,8</b>
0	FERMENTACIÓN Bach de 10 L	12	-	95,0
1		12	$0,3 \times 10^7$	93,8
2		12	$8,2 \times 10^7$	96,5
3		12	$12,4 \times 10^7$	88,8
4		12	$14,5 \times 10^7$	88,8
5		5	$6,1 \times 10^7$	89,0

Según Jenkins et al., (2003), observaron que las series prolongadas de reutilización de la levadura, da lugar a una modificación progresiva en la capacidad de floculación y viabilidad. Debido a que durante la series de *Re-pitching*, la biomasa de levadura está expuesta repetidamente a intensos períodos de estrés, en donde una población de levadura es transferida del ciclo celular, a la fase estacionaria en condiciones de estrés y que esta debe de volver otra vez al ciclo celular. La repetición constante de esta condición provocaría en las células de levadura daños irreversibles que se comienzan a mostrar en alguna modificación de su condición fisiológica. Se sugiere que estas modificaciones son resultado de la activación de los genes de respuesta de estrés global y que es dependiente de la cepa.

Briggs et al.,(2004), mencionan que en las series de fermentación prolongada, las características de la levadura en la producción pueden cambiar debido a la inestabilidad genética. Y que comúnmente en la cerveza, las levaduras pueden presentar fermentaciones anormales debido a los mutantes “Petites”, que son levaduras que carecen de la capacidad funcional de las mitocondrias.

Según Beitia Samudio (2011), en su estudio sobre la influencia de subcultivos de *Saccharomyces cerevisiae* en el desarrollo de una fermentación alcohólica. Evaluó la degeneración de la levadura en cuatro subcultivos, considerando la degeneración como el deterioro gradual de su desempeño como cepa cervecera, que afecta el curso de la fermentación, pudiendo presentar fermentaciones tardías y la prolongación gradual del tiempo de fermentación. El concluyo que no se presenta degeneración al reutilizar la levadura en cuatro subcultivos y que el nivel de producción de alcohol se mantiene estable entre el primer cultivo y el quinto cultivo.

La disminución de la viabilidad, pudo deberse a muchos factores, sin embargo, estos deben de evaluarse conjuntamente con los de vitalidad y producto final, para ver cómo influyen en conjunto. En el décimo segundo día se pasó a la fase de maduración y las levaduras sedimentadas fueron desechadas.

#### **4.2.2 Recuento y Viabilidad de los Starter por el Método N° 2**

El método N°2, evalúa la técnica del uso de nuevos cultivos puros para la elaboración de cerveza. El primer mes correspondió en abril, con el cual se inició el starter denominado “Primer mes - N1”. Para el segundo mes en mayo, se inició el *starter* denominado “Segundo mes - N2”, y finalmente en junio se inició el *starter* denominado “Tercer mes - N3”.

##### **4.2.2.1 Evaluación del recuento y viabilidad del “Primer mes - N1”**

Los resultados de la evaluación del recuento y viabilidad del *starter* “Primer mes - N1”, se muestran en la Tabla 13. El *Starter* del “Primer mes - N1”, presentó una viabilidad de 98,50 por ciento, el recuento de levaduras por cámara de Neubauer fue de  $12,5 \times 10^7$  lev/ml. El Bach de fermentación con este *starter* alcanzó su óptima concentración el quinto día de iniciada la fermentación con  $11 \times 10^7$  Lev/ml, al sexto día alcanzó el máximo

de concentración con  $19,2 \times 10^7$  lev/ml, esta concentración fue indicativo para bajar la temperatura, para que las levaduras vayan precipitando y pasar a la fase de maduración.

La viabilidad durante la fase de fermentación fue superior al 98,50 por ciento. Se considera este valor alto y óptimo para la producción de cerveza. En el décimo tercer día se pasó a la fase de maduración y las levaduras sedimentadas fueron desechadas.

**Tabla 13: Resultados del recuento y viabilidad del cultivo “Primer mes-N1”, en el Starter y fermentación.**

Tiempo (Días)	Etapas	Temperatura (°C)	Recuento cámara Neubauer (lev/ml)	Viabilidad (%)
1	Cepa Trabajo 10 ml	25	-	-
2		25	$12,9 \times 10^7$	99,5
3	100 ml	25	-	-
4		25	$12,9 \times 10^7$	99,5
5	1 L STARTER	25	-	-
6		25	<b><math>12,5 \times 10^7</math></b>	<b>98,5</b>
0	FERMENTACIÓN Bach de 10 L	12	-	99,0
1		12	$1,1 \times 10^7$	98,8
2		12	$4,4 \times 10^7$	99,0
3		12	$8,5 \times 10^7$	98,5
4		12	$11,0 \times 10^7$	99,0
5		12	$19,2 \times 10^7$	98,5
6		5	$5,2 \times 10^7$	98,7

#### 4.2.2.2 Evaluación del recuento y viabilidad del “Segundo mes – N2”

Los resultados de la evaluación del recuento y viabilidad del starter “Segundo mes – N2”, se muestran en la Tabla 14.

El *Starter* del “Segundo mes – N2”, presentó una viabilidad de 99,50 por ciento, el recuento de levaduras por cámara de Neubauer fue de  $12,1 \times 10^7$  lev/ml. El Bach de fermentación con este starter alcanzó su óptima concentración el quinto día de iniciada la fermentación con  $10,8 \times 10^7$  Lev/ml, al sexto día alcanzo el máximo de concentración con  $17,8 \times 10^7$  lev/ml, esta concentración fue indicativo para bajar la temperatura, para que las levaduras vayan precipitando y pasar a la fase de maduración.

Al igual que en el cultivo del Primer mes-N1, La viabilidad durante la fase de fermentación fue superior al 98,50 por ciento. En el décimo tercer día se pasó a la fase de maduración y las levaduras sedimentadas se desecharon.

**Tabla 14: Resultados del recuento y viabilidad del cultivo “Segundo mes-N2”, en el starter y fermentación**

Tiempo (Días)	Etapas	Temperatura ( °C)	Recuento cámara Neubauer (lev/ml)	Viabilidad (%)
1	Cepa Trabajo 10 ml	25	-	-
2		25	12,7 x 10 <sup>7</sup>	99,0
3	100 ml	25	-	-
4		25	11,7 x 10 <sup>7</sup>	99,5
5	1 L STARTER	25	-	-
6		25	12,1 x 10 <sup>7</sup>	99,5
0	FERMENTACIÓN Bach de 10 L	12	-	99,0
1		12	0,9 x 10 <sup>7</sup>	98,5
2		12	3,4 x 10 <sup>7</sup>	99,0
3		12	6,4 x 10 <sup>7</sup>	98,5
4		12	10,8 x 10 <sup>7</sup>	99,0
5		12	17,8 x 10 <sup>7</sup>	98,5
6		5	3,6 x 10 <sup>7</sup>	98,7

#### 4.2.2.2 Evaluación del recuento y viabilidad del “Tercer mes – N3”

Los resultados de la evaluación del recuento y viabilidad del *starter* “Tercer mes – N3”, se muestran en la Tabla 15. El *Starter* del “Tercer mes – N3”, presentó una viabilidad de 98,50 por ciento, el recuento de levaduras por cámara de Neubauer fue de 12,0 x 10<sup>7</sup> lev/ml. El Bach de fermentación con este starter alcanzó su óptima concentración el quinto día de iniciada la fermentación con 10,6 x 10<sup>7</sup> Lev/ml, al sexto día alcanzó el máximo de concentración con 16,6 x 10<sup>7</sup> lev/ml, esta concentración fue indicativo para bajar la temperatura, para que las levaduras vayan precipitando y pasar a la fase de maduración.

Al igual que en el cultivo del Primer mes-N1 y Segundo mes – N2, La viabilidad durante la fase de fermentación fue superior al 98,50 por ciento. En el décimo tercer se pasó a la fase de maduración y las levaduras sedimentadas se desecharon

**Tabla 15: Recuento y viabilidad del cultivo “Tercer mes-N3”, en el starter y fermentación**

Tiempo (Días)	Etapas	Temperatura (°C)	Recuento cámara Neubauer (lev/ml)	Viabilidad (%)
1	Cepa Trabajo 10 ml	25	-	-
2		25	12,0 x 10 <sup>7</sup>	99,5
3	100 ml	25	-	-
4		25	11,8 x 10 <sup>7</sup>	99,5
5	1 L STARTER	25	-	-
6		25	12,0 x 10 <sup>7</sup>	98,5
0	FERMENTACIÓN Bach de 10 L	12	-	99,0
1		12	1,0 x 10 <sup>7</sup>	98,5
2		12	3,7 x 10 <sup>7</sup>	98,5
3		12	8,2 x 10 <sup>7</sup>	98,5
4		12	10,6 x 10 <sup>7</sup>	98,5
5		12	16,6 x 10 <sup>7</sup>	98,5
6		5	4,2 x 10 <sup>7</sup>	98,5

#### 4.2.3 Comparación del recuento y viabilidad entre los Método N°1 y N°2

Al finalizar el *starter*, se comparó entre ambos métodos su viabilidad y recuento de levaduras. Se realizó la prueba de U-Mann Whitney, para muestras independientes, al aplicar esta prueba no se encontró diferencias significativas entre los dos métodos ( $p > 0,05$ ), para las variables de recuento y viabilidad. El *starter* del Cultivo- C2, del Método N°1 alcanzó valores máximos en los parámetros de recuento en comparación con los demás Starters, este fue de  $13,8 \times 10^7$  lev/ml, y su viabilidad fue de 97,50 por ciento. Si bien el recuento fue alto, el porcentaje de viabilidad presentó una ligera disminución.

Para el starter del Método N°1, en el Cultivo-C3, el recuento fue de  $12,0 \times 10^7$  lev/ml y su viabilidad fue de 92,80 por ciento, en este cultivo se observó la menor viabilidad, en comparación con todos los cultivos. Además se observó que el Método N°1 presentó mayor recuento en comparación con el Método N°2, pero su viabilidad fue disminuyendo gradualmente en cada cultivo, aunque esta disminución no fue significativa y no estuvo fuera de rango. En comparación con el Método N°1, el método N°2, presentó una mayor viabilidad, y su recuento se mantuvo constante en todos los cultivos.

Según estos valores, de viabilidad y recuento, todos los *Starters*, presentarían una buena fermentación en el posterior Bach y no tendría que haber alguna diferencia en la fermentación, además esto se sustenta con el resultado del análisis estadístico, ya que no hay diferencia significativa entre ambos métodos para las variables de recuento y viabilidad.

No obstante, durante la fermentación con los *Starters*, se observó diferencia en los días 3 y 4 de la fermentación. Por tanto, para evaluar si existe alguna diferencia significativa en estos días para las variables de recuento y viabilidad según los métodos N°1 y 2, Se aplicó primero la prueba de normalidad de muestras, dando como resultado que ambos métodos presentan una distribución normal con un ( $p > 0,05$ ). Luego se aplicó la prueba T, en donde se utilizó la corrección de *Satterwait*, para varianzas no homogéneas, con un nivel de significancia del cinco por ciento. Obteniéndose que para el día 3 y día 4 de fermentación, hay diferencia significativa, para la variable de recuento entre los métodos N°1 y N°2 y la variable de viabilidad no presentó diferencia significativa.

Tal como se muestra en la figura 17 (datos en el ANEXO 8), existe una clara diferencia en el recuento de levaduras, para los días 3 y 4 de fermentación. Con el método N°1, en el día 4, se alcanza el valor máximo de recuento, sin embargo, con el Método N°2, en el día 5, recién se alcanzan estos valores.

En cuanto a la viabilidad de levaduras, estas se mantienen constante en todos los cultivos, durante la fase de fermentación, tal como se muestra en la Figura 18 (datos en el ANEXO 8), con la excepción que en el Método N°1 - Cultivo C3, hubo una ligera disminución de la viabilidad, pero, esta no fue significativa. La viabilidad en todos los cultivos fue superior al 89 por ciento, para ambos métodos.

En la producción de cerveza tipo *lager*, el recuento máximo de levaduras en la fermentación, junto con otros parámetros de vitalidad, nos indica que se debe de comenzar a disminuir la temperatura para que se pase a la fase de maduración, es por eso que el día 5, de fermentación con el Método N°1, se comienza a bajar la temperatura y a disminuir el recuento, debido a que las levaduras se asientan, en la base del fermentador.

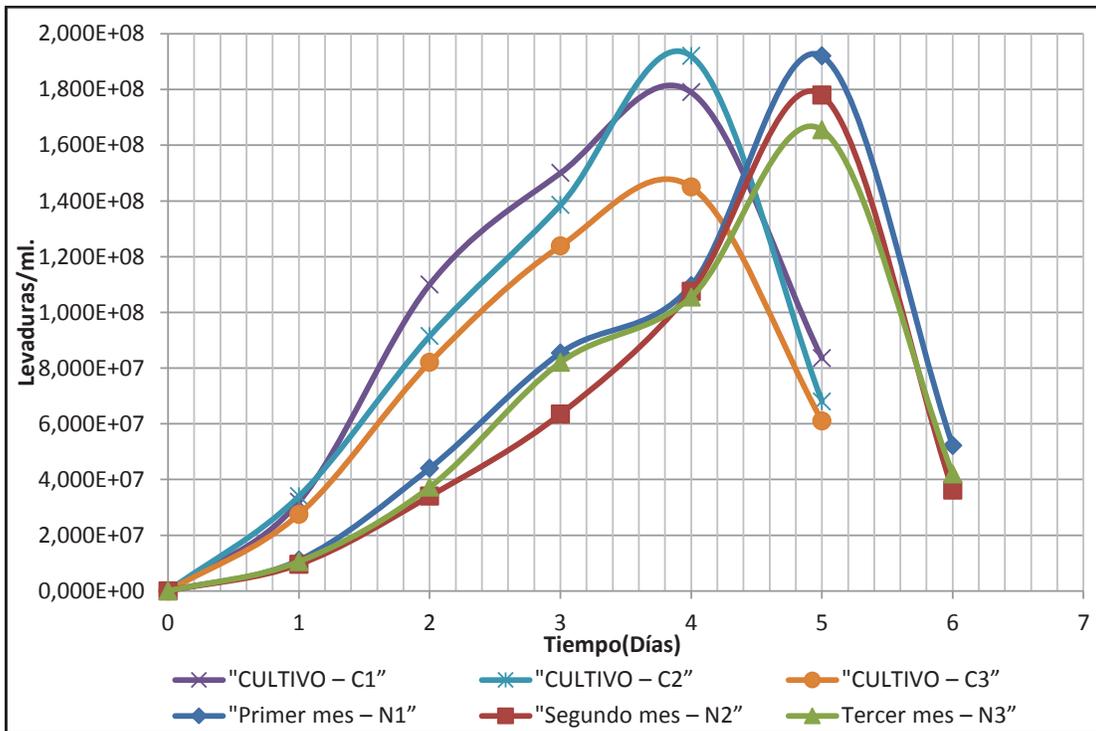


Figura 7: Comparación del recuento de levaduras en cámara de Neubauer de todos los cultivos en la fermentación de sus respectivos Bach.

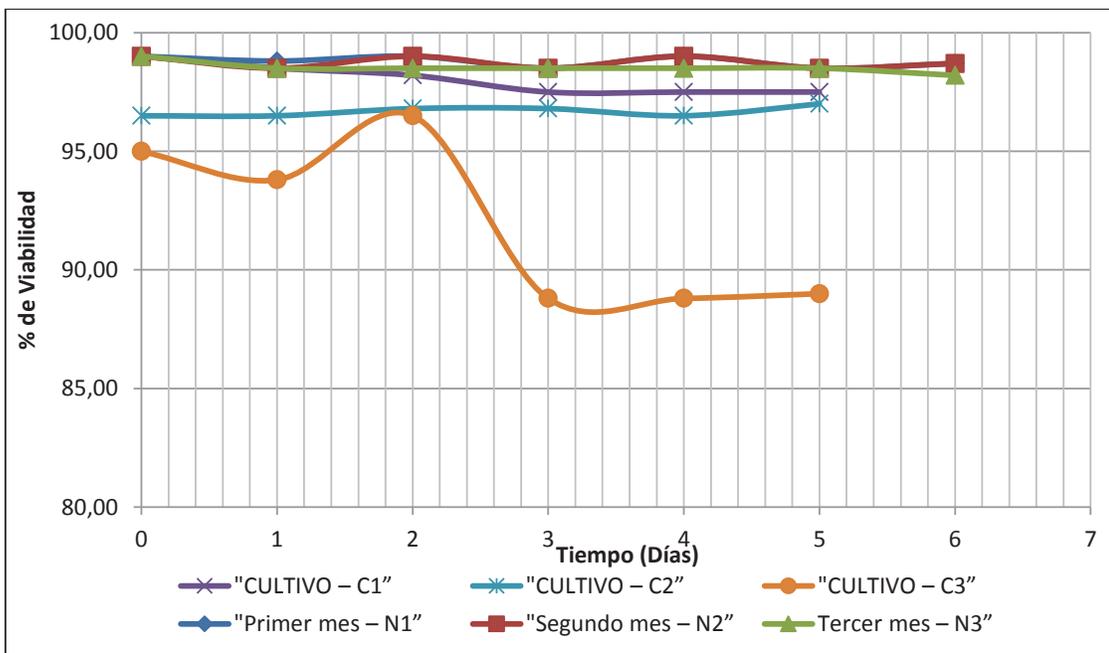


Figura 8: Comparación del porcentaje de viabilidad de todos los cultivos en la fermentación de sus respectivos Bach.

## 4.3 DETERMINACIÓN DE LA VITALIDAD DE LOS STARTER

### 4.3.1 Evaluación de la Vitalidad por el Método N°1 (*Re-pitching*)

Para evaluar el método N°1- *Re-pitching*, se tuvo que realizar primero un “Cultivo-0”, (Tabla 9). Este dio origen al Starters, denominado “Cultivo - C1”, a su vez este cultivo dio origen al “Cultivo-C2” y por ultimo este dio origen al “Cultivo-C3”. La vitalidad de los *Starters* por el método N°1, se evaluó según su capacidad de fermentación de cada starter, los resultados de la evaluación fueron los siguientes:

#### 4.3.1.1 Evaluación de la Vitalidad del "Cultivo - C1"

La evaluación de la vitalidad por el Método N°1- "Cultivo-C1", al finalizar el escalamiento, durante la fermentación y al finalizar la maduración, se muestra en la Tabla 16 (Tabla completa en ANEXO 9), los datos finales de alcohol, extracto aparente y ADF, mostrados en la Tabla 16., para el starter, indicarían un buen desarrollo de la levadura y por ende una buena fermentación posterior.

Las cepas de levadura tienden atenuar en el rango de 65 a 80 por ciento y la atenuación aparente de una cepa de levadura puede variar dependiendo de los tipos de azúcares presentes en el mosto. Los resultados mostraron el del *starter*, "Cultivo – C1" presentó un porcentaje de ADF de 79,79 por ciento, considerado como alto y óptimo y según Kunze., (2006), la atenuación aparente se clasifica según los porcentajes de ADF, como bajo con 65 a 70 por ciento, medio 71 a 75 por ciento y alto 76 a 80 por ciento. Considerando estos valores, como alto.

La fase de fermentación se dio a una temperatura de 12 °C, este Bach se aireó por 24 horas, luego se cortó el aire para que entre a la fase de fermentación, aquí se observó que en el cuarto día de iniciada la fermentación, el alcohol alcanzó un 6,30 por ciento de v/v, el extracto aparente bajo hasta 3,67 por ciento de p/p y el grado de fermentación o atenuación aparente llegó hasta el 81,38 por ciento. En el quinto día de fermentación, estos valores, permanecieron casi constante, se procedió a parar la fermentación, ya que llegó al punto más alto de fermentación, y que pasado este punto, es muy probable que la levadura se estrese y muera por falta de nutrientes y/o condiciones de stress, es por eso que se baja la temperatura lentamente hasta llegar a 0 °C, y pasar a la fase de maduración, esta práctica es propia de las cervecerías que producen cerveza tipo *lager*.

Al finalizar la fase de maduración, en donde se acentúan los sabores, se obtuvo en el alcohol un 6,03 por ciento de v/v, el extracto aparente bajo hasta 2,96 por ciento de p/p y el grado de fermentación o atenuación aparente llegó hasta el 83,78 por ciento. Lo que indicaría un óptimo *starter* que produjo buenas condiciones de fermentación y parámetros dentro de los establecidos como óptimo según la norma de control de calidad de la empresa Anpay Perú.

**Tabla 16: Resultados de la evaluación de los parámetros de Vitalidad del Cultivo-C1, en todas las etapas.**

Días	ETAPA	Temperatura ( °C)	Alcohol ( % v/v )	Extracto Aparente ( % p/p )	ADF ( % )
Final del Escalamiento	STARTER	25	5,75	3,25	79,79
0	FERMENTACIÓN	12	0,00	13,90	0,11
1		12	2,24	9,70	32,04
2		12	4,63	5,29	63,38
3		12	6,30	3,67	81,38
4		12	6,09	3,01	82,27
5		5	6,14	2,99	83,82
15 Días	MADURACIÓN	0	6,03	2,96	83,78

#### 4.3.1.2 Evaluación de la Vitalidad del "Cultivo - C2"

La evaluación de la vitalidad por el Método N°1- "Cultivo-C2", al finalizar el escalamiento, durante la fermentación y al finalizar la maduración, se muestra reducida en la Tabla 17 (Tabla completa en ANEXO 10). Los resultados obtenidos para el *Starter* fueron de 5,68 por ciento de v/v en Alcohol, 3,30 por ciento de p/p en extracto aparente y el grado de fermentación o atenuación aparente fue de 79,28 por ciento. Lo cual indicaría también un buen desarrollo de la levadura y fermentación. En la fase de fermentación, al igual que en el Cultivo-C1, los máximos valores se dieron en el cuarto y quinto día. Alcanzando un 5,96 por ciento de v/v en alcohol, el extracto aparente bajo hasta 2,89 por ciento de p/p, y el grado de fermentación o atenuación aparente llegó hasta el 81,61 por ciento.

Al finalizar la fase de maduración, los parámetros de fermentación no presentaron mayor variación, esto es debido a que en la fase de maduración, se da la acentuación de los sabores y olores característicos de la cerveza, así como también la estabilización y clarificación de la cerveza.

Los resultados obtenidos indicarían que el starter del Cultivo-C2, produjo buenas condiciones de fermentación y valores óptimos, que se encuentran dentro de los parámetros de la norma de control de calidad de la empresa Anpay Perú.

**Tabla 17: Resultados de la evaluación de los parámetros de vitalidad del Cultivo-C2, en todas las etapas.**

Días	ETAPA	Temperatura (°C)	Alcohol (% v/v)	Extracto Aparente (% p/p)	ADF (%)
Final del Escalamiento	STARTER	25	5,68	3,30	79,28
0	FERMENTACIÓN	12	0,00	13,90	0,11
1		12	2,22	8,80	31,93
2		12	5,02	4,56	60,12
3		12	5,91	3,02	80,23
4		12	5,96	2,89	81,61
5		5	5,97	2,88	81,65
15 Días	MADURACIÓN	0	5,96	2,82	81,95

#### 4.3.1.2 Evaluación de la Vitalidad del "Cultivo - C3"

La evaluación de la vitalidad por el Método N°1- "Cultivo-C3", al finalizar el escalamiento, durante la fermentación y al finalizar la maduración, se muestra reducida en la Tabla 18 (Tabla completa en ANEXO 11).

Los resultados obtenidos para el Starter fue de 5,41 por ciento de v/v en alcohol, 3,78 por ciento en p/p de extracto aparente y el grado de fermentación o atenuación aparente fue de 78,40 por ciento, este valor se considera alto y también indicaría un buen desarrollo de las levaduras y fermentación. En la fase de fermentación, al igual que en el Cultivo-C1 y Cultivo- C2, los máximos valores se dieron en el cuarto y quinto día. Alcanzando un 5,69 por ciento de v/v en alcohol, el extracto aparente bajo hasta 3,30 por ciento en p/p y el grado de fermentación o atenuación aparente llegó hasta el 78,05 por ciento.

Estos valores al final de la maduración no presentaron mayor variación. Los resultados obtenidos indicarían que el starter del Cultivo-C3, produjo buenas condiciones de fermentación y valores óptimos, sin embargo, a comparación de los Cultivo-C1 y Cultivo-C2 presentó una ligera disminución.

**Tabla 18: Resultados de la evaluación de los parámetros de viabilidad del Cultivo-C3, en todas las etapas.**

Días	ETAPA	Temperatura (°C)	Alcohol (% v/v)	Extracto Aparente (% p/p)	ADF (%)
Final del Escalamiento	STARTER	25	5,41	3,78	78,40
0	FERMENTACIÓN	12	0,00	13,89	0,12
1		12	1,44	9,65	20,46
2		12	3,73	6,98	52,49
3		12	5,66	3,33	77,65
4		12	5,69	3,30	78,05
5		5	5,71	3,28	78,14
15 Días	MADURACIÓN	0	5,41	3,25	78,40

### 4.3.2 Evaluación de la Vitalidad por el Método N°2

#### 4.3.2.1 Evaluación de la Vitalidad del "Primer mes – N1"

La evaluación de la vitalidad por el Método N°2 - "Primer mes – N1", al finalizar el escalamiento, durante la fermentación y al finalizar la maduración, se muestra en la Tabla 19 (Tabla completa en ANEXO12).

Los resultados obtenidos para el Starter fue de 5,45 por ciento de v/v en Alcohol, 3,68 por ciento en p/p de extracto aparente y el grado de fermentación o atenuación aparente fue de 79,17 por ciento, este valor se considera alto e indicaría un buen desarrollo posterior de las levaduras y fermentación. En la fase de fermentación, a diferencia del Método N°1, este presentó un día más de fermentación, y los valores máximos se alcanzaron en el quinto y sexto día de fermentación. Los resultados fueron de 5,14 por ciento de v/v en alcohol, el extracto aparente bajo hasta 4,07 por ciento de p/p y el grado de fermentación o atenuación aparente llegó hasta el 75,20 por ciento.

Los valores al final de la maduración fueron de 5,34 por ciento de v/v en alcohol, el extracto aparente fue de 3,67 por ciento de p/p y el grado de fermentación o atenuación aparente llegó hasta el 77,66 por ciento. Los resultados obtenidos indicarían que el *starter* del Cultivo "Primer mes-1", produjo buenas condiciones de fermentación y valores dentro de los parámetros óptimos.

**Tabla 19: Resultados de la evaluación de los parámetros de viabilidad del Primer mes - N1, en todas las etapas.**

Días	ETAPA	Temperatura (°C)	Alcohol (% v/v)	Extracto Aparente (% p/p)	ADF (%)
Final del Escalamiento	STARTER	25	5,45	3,68	79,17
0		12	0,01	13,90	0,12
1		12	0,96	12,10	13,29
2		12	1,36	11,35	18,81
3	FERMENTACIÓN	12	2,67	8,87	40,91
4		12	4,93	4,59	71,34
5		12	5,14	4,07	75,20
6		5	5,44	3,55	76,84
15 Días	MADURACIÓN	0	5,34	3,67	77,66

#### 4.3.2.1 Evaluación de la Vitalidad del "Segundo mes – N2"

La evaluación de la vitalidad por el Método N°2 - "Segundo mes – N2", al finalizar el escalamiento, durante la fermentación y al finalizar la maduración, se muestra en la Tabla 20 (Tabla completa en ANEXO 13).

Los resultados obtenidos para el *Starter* fue de 5,43 por ciento de v/v en alcohol 3,78 por ciento en p/p de extracto aparente y el grado de fermentación o atenuación aparente fue de 78,71 por ciento, este valor se considera alto e indicaría un buen desarrollo posterior de las levaduras y fermentación.

En la fase de fermentación, los valores máximos se alcanzaron en el quinto y sexto día de fermentación. Los resultados fueron de 5,34 por ciento de v/v en alcohol, el extracto aparente bajo hasta 3,78 por ciento en p/p y el grado de fermentación o atenuación aparente llegó hasta el 77,90 por ciento.

Estos valores al final de la maduración no presentaron mayor variación. Los resultados obtenidos indicarían que el starter del “Segundo mes – N2”, produjo buenas condiciones de fermentación y valores dentro de los parámetros óptimos.

**Tabla 20: Resultados de la evaluación de los parámetros de viabilidad del Segundo mes – N2, en todas las etapas.**

Días	ETAPA	Temperatura (°C)	Alcohol (% v/v)	Extracto Aparente (% p/p)	ADF (%)
Final del Escalamiento	STARTER	25	5,43	3,78	78,71
0		12	0,00	13,90	0,11
1		12	1,06	12,50	13,28
2		12	1,52	11,07	19,56
3	FERMENTACIÓN	12	2,24	9,70	39,04
4		12	5,16	4,12	75,55
5		12	5,34	3,78	77,90
6		5	5,35	3,75	77,96
15 Días	MADURACIÓN	0	5,36	3,97	75,57

#### 4.3.2.1 Evaluación de la Vitalidad del "Tercer mes – N3"

La evaluación de la vitalidad por el Método N°2, "Tercer mes–N3" al finalizar el escalamiento, durante la fermentación y al finalizar la maduración, se muestra reducida en la Tabla 21, (Tabla completa en ANEXO 14).

Los resultados obtenidos para el *Starter* fue de 5,43 por ciento de v/v en Alcohol 3,82 por ciento en p/p de extracto aparente y el grado de fermentación o atenuación aparente fue de 78,16 por ciento, este valor se considera alto e indicaría un buen desarrollo posterior de las levaduras y fermentación.

En la fase de fermentación, los valores máximos se alcanzaron en el quinto y sexto día, al igual que en los cultivo del Primer mes–N1 y Segundo Mes-N2. Los resultados fueron de 5,10 por ciento de v/v en alcohol, el extracto aparente bajo hasta 4,06 por ciento en p/p y el grado de fermentación o atenuación aparente llegó hasta el 73,08 por ciento. Este valor se considera como “Medio”, para el grado de fermentación. Sin embargo, este valor aún indicaría un buen grado de atenuación.

Al final de la maduración los resultados fueron de: 5,31 por ciento de v/v en alcohol, el extracto aparente fue de 3,88 por ciento de p/p y el grado de fermentación o atenuación aparente llegó hasta el 76,32 por ciento. Lo cual indicaría que el *starter*, produjo buenas condiciones de fermentación y valores dentro de los parámetros óptimos.

**Tabla 21: Resultados de la evaluación de los parámetros de vitalidad del Tercer mes-N3, en el starter y fermentación.**

Días	ETAPA	Temperatura (°C)	Alcohol (% v/v)	Extracto Aparente (% w/w)	ADF (%)
Final del Escalamiento	STARTER	25	5,43	3,82	78,16
0	FERMENTACIÓN	12	0,00	13,89	0,12
1		12	0,96	11,55	12,62
2		12	1,34	11,42	18,69
3		12	2,67	6,63	38,81
4		12	4,79	4,92	70,50
5		12	5,10	4,06	73,08
6		5	5,41	3,98	74,71
15 Días	MADURACIÓN	0	5,31	3,88	76,32

#### 4.3.3 Comparación de los parámetros de vitalidad entre los Métodos N°1 y N°2

Al finalizar el *starter*, se comparó entre ambos métodos su vitalidad, según los parámetros de Alcohol, Extracto aparente y ADF (porcentaje de fermentación aparente). Se realizó la prueba de U-Mann Whitney, para muestras independientes, al aplicar esta prueba no se encontró diferencias significativas entre los dos métodos ( $p > 0,05$ ) para las variables de Alcohol, Extracto aparente y ADF.

El *starter* del Cultivo- C1, del Método N°1 alcanzó valores máximos en los parámetros de vitalidad en comparación con los demás *Starters*, el Alcohol llegó hasta 5,75 por ciento de v/v, el extracto aparente bajo hasta 3,25 por ciento en p/p, y para el grado de atenuación o ADF del mostro, fue de 79,79 por ciento. Si bien estos valores no son significativamente altos en comparación con el resto de los *Starters*, estos valores sólo se alcanzaron con el *starter* del Cultivo-C1. Para los demás *Starters* el alcohol producido en promedio fue de  $5,43 \pm 0,02$  por ciento de v/v, el Extracto aparente bajo hasta un promedio de  $3,78 \pm 0,1$ , y

para el porcentaje de ADF, fue en promedio  $78,8 \pm 0,5$  por ciento. Según estos valores, los parámetros de vitalidad, indicarían que todos los Starters, presentarían una buena fermentación en el posterior Bach y que no habría diferencia significativa en cuanto a la fermentación, a excepción de una ligera variación para el *Starter* del Cultivo-C1, que presentaría mejores características.

No obstante en la fase de fermentación se observó una acentuada diferencia entre ambos métodos, en todos los cultivos, para los Días 2 y 3 de fermentación. Se aplicó la prueba de normalidad de muestras y Prueba T, para el día 3 de fermentación entre ambos métodos. El resultado fue que ambos métodos presentan una distribución normal ( $p > 0,05$ ).

La prueba T, con la corrección de *Satterwait*, para varianzas no homogéneas, con un nivel de significancia del 5 por ciento, indico que existe diferencia significativa, para la variable de alcohol, extracto aparente y ADF, entre los métodos N°1 y N°2.

La diferencia en el día 3 de fermentación con el Método N°1, acelero la fase fermentación, iniciando la fase de maduración en el Día-5. Con el Método N°2 la fermentación finalizo en el Día-6. Este día menos de fermentación con el Método N°1, se debió a que todos los parámetros de vitalidad llegaron en el Día -5, al óptimo. Por tanto, era necesario pasar a la siguiente fase, ya que sus valores indicaban, que se debía dar inicio a la maduración. Estas diferencias se observan en las Figuras 19, 20 y 21 (datos mostrados ANEXO 15).

Para el grado de alcohol, en el Dia-2 de fermentación por el método N°1, alcanzo valores muy altos en comparación con el Método N°2, tal como se muestra en la Figura 19., esta diferencia se mantuvo en los tres cultivos, para el Cultivo- C1 y Primer mes-N1, fue 4.63 por ciento de v/v y 1,36 por ciento de v/v., para el segundo Cultivo- C2 y Segundo mes-N2, fue 5,02 y 1,52 por ciento de v/v y para el último Cultivo-C3 y Tercer mes-N3, fue de 3,73 y 1,34 por ciento de v/v respectivamente. En el Día-3, fue para los cultivo C1 y N1, 6,30 y 2,67 por ciento de v/v., para los cultivo C2 y N2, fue 5,91 y 2,24 por ciento de v/v y para el último cultivo C3 y N3, fue de 5,66 y 2,67 por ciento de v/v, respectivamente.

La comparación del extracto aparente durante la fermentación, al igual que para el alcohol, en el Día -2 de fermentación por el método N°1, bajo rápidamente en comparación con el Método N°2, tal como se muestra en la Figura 20., esta diferencia se mantuvo en los tres cultivos, siendo el cultivo C2, el que bajo más. El cultivo C1 y N1, bajo hasta 5,29 por ciento de p/p y 11,35 por ciento de v/v, para el segundo cultivo C2 y N2, fue de 4,56 y

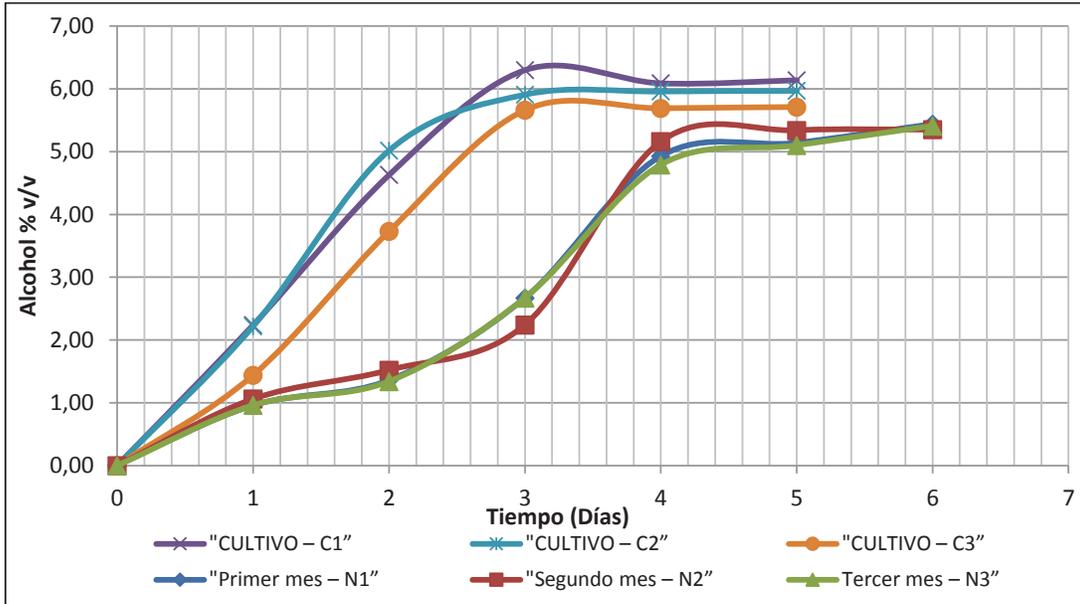
11,07 por ciento de p/p, para el ultimo cultivo C3 y N3, fue de 6,98 y 11,42 por ciento de v/v respectivamente. En el Día-3, fue para los cultivo C1 y N1, 3,67 por ciento de p/p y 8,87 por ciento de v/v, para los cultivo C2 y N2, fue de 3,02 y 9,70 por ciento de p/p, y para el cultivo C3 y N3, fue de 3,33 y 6,63 por ciento de v/v respectivamente.

La evaluación del grado de fermentación aparente - ADF % o atenuación aparente, muestra una clara diferencia entre ambos métodos, para el Día-2 de fermentación. Con el método N°1 el cultivo C1 fue de 63,38 por ciento, y con el método N°2, el cultivo N1 fue de 18,81 por ciento, lo que indicaría que el grado de fermentación fue el triple con el método N°1, esta diferencia se mantuvo en los todos los cultivos, tal como se muestra en la Figura 21, Para el cultivo C2 y N2 fue de 60,12 y 19,56 por ciento y el cultivo C3 y N3 fue 52,49 y 18,69 por ciento, respectivamente. En el Día-3 de fermentación el grado de atenuación por el Método N°1, fue el doble que el Método N°2, observándose que el cultivo C1 y N1 fue de 81,38 y 40,91 por ciento, para el cultivo C2 y N2 fue de 80,23 y 39,04 por ciento y para el cultivo C3 y N3 fue de 77,65 y 38,81 por ciento respectivamente.

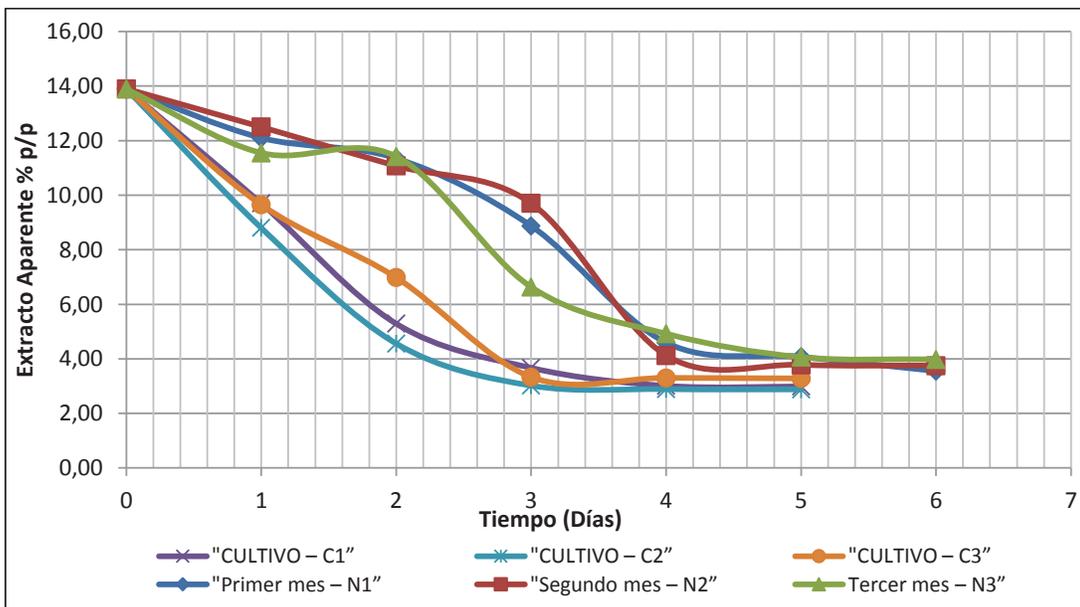
Se sabe que el grado de atenuación de una cerveza determina muchas de sus propiedades finales. Éstas incluyen el cuerpo de la cerveza, la sensación en boca y el contenido en alcohol. Una cerveza con una atenuación aparente muy alta será muy seca tras la fermentación. Una cerveza de estas características será más ligera de cuerpo y sensación en boca y tendrá más alcohol que una cerveza con menor atenuación, además una buena cerveza, debe de salir al mercado con la menor cantidad de residuos fermentables, es decir con un extracto aparente bajo, a fin de asegurar una estabilidad biológica en el tiempo.

La diferencia entre ambos métodos en los días 2 y 3 de fermentación, en los tres parámetros de vitalidad, puede deberse a varios factores, entre ellos la edad de la levadura, la fisiología de la levadura, y a los factores de estrés al cual se expone la levadura durante la fermentación.

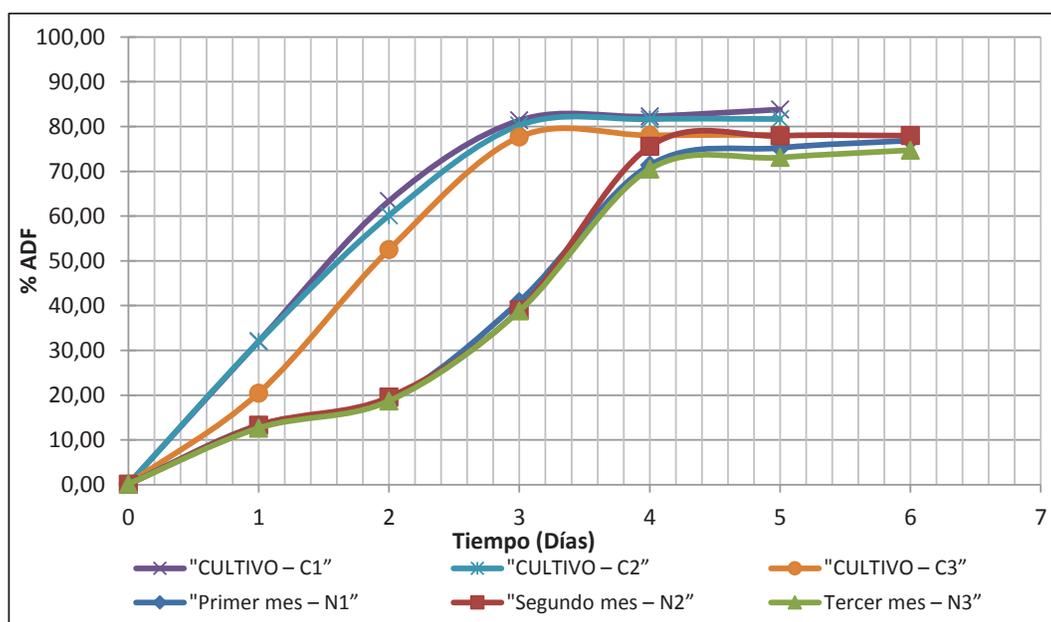
Deans et al.,(1997), estudiaron las implicaciones del envejecimiento de las células de levadura en la fermentación, en una cervecería, sus estudios se basaron en las levaduras de un fermentador de 2000 hl, fraccionado en 5 fracciones de hl. Cada fracción se caracterizó por su edad, en sus observaciones encontró que el rendimiento de la fermentación en las fracciones con edades mezcladas y fracciones jóvenes de levaduras fermentan con mayor rapidez y atenúan más que las fracciones de levadura antiguas.



**Figura 9: Curva de la producción de Alcohol % v/v, durante la fermentación de todos los starter en sus respectivos Bach.**



**Figura 10: Curva de la variación del Extracto aparente % p/p (en grados plato °P), durante la fermentación de todos los starter en sus respectivos Bach.**



**Figura 11: Curva de la variación del grado de fermentación aparente (% ADF o atenuación aparente) durante la fermentación de todos los starter en sus respectivos Bach.**

Posteriormente Powell et al., (2003), en su estudio sobre el impacto de la edad celular de la levadura en la fermentación, atenuación y floculación. Comprobaron el efecto de la edad celular en el rendimiento de la fermentación, en este estudio se sincronizó la edad de las poblaciones de una cepa lager, mediante sedimentación en gradientes de sacarosa. Analizándose la capacidad de utilizar los azúcares fermentables y la capacidad de flocular durante la fermentación. En sus evaluaciones se utilizó una porción de levaduras extraídas del recipiente de fermentación y se reutilizadas en una serie de *Re-pitching*. Lo que se observó fue que los cultivos de levadura que contenían solo células vírgenes, tenían grados de asimilación de azúcares más lento en comparación con todas las demás poblaciones, y que el cultivo que contenía sólo células envejecidas, presentaba un ritmo más rápido de fermentación en comparación con la población estándar, es decir aquellas que tenían células vírgenes y envejecidas. Sin embargo, no se observó que la gravedad final (parámetro relacionado con el extracto aparente) de la cerveza producida fuera significativamente diferente entre los cultivos. Esto indicó que cada población de células fue igualmente capaz de utilizar los azúcares fermentables del mosto, y que la tasa de absorción de azúcares se relaciona directamente con la edad celular.

Este autor menciona que las células de *Saccharomyces cerevisiae* deben cumplir ciertos requisitos antes de dar inicio al ciclo celular, y que las células vírgenes no cumplen estos requisitos iniciales, uno de ellos es lograr un tamaño específico, que permita la asimilación de los nutrientes, además indica que en las células vírgenes, para dar inicio a una fase G1, necesita más tiempo y/o se retrasa, en comparación con cultivos que tienen levaduras envejecidas, por tanto las células con cultivos mixtos y/o envejecidos son capaces de dividirse rápidamente, reduciendo así el tiempo de fermentación.

En consecuencia, esto podría indicar que en el Método N°1, en donde, las levaduras fueron tomadas de un *Re-pitching*, los cultivos tendrían levaduras con diferentes edades, por tanto en los días 2 y 3, la fermentación se aceleró, en cambio con el Método N°2, las levaduras partían de un cultivo nuevo y que además esta se encontraba en estado de almacenamiento, por tanto es probable que en los primeros días, la fase de adaptación y crecimiento se retarde.

Sin embargo, con ambos métodos y para los tres primeros cultivos, los valores finales en todos los parámetros de vitalidad fueron similares. Es por eso que muchos autores sugieren utilizar cultivos más selectivos con edades mixtas o células jóvenes, ya que afecta significativamente el rendimiento de una fermentación.

Si bien la edad de la levadura, influye en la fermentación, la transición de una vida sana y activa a una célula muerta incorpora muchas etapas intermedias de deterioro (procesos de envejecimiento, senescencia y muerte), por tanto diversos estados fisiológicos asociados con una alteración gradual de muchos procesos metabólicos.

Por tanto la condición fisiológica de la levadura es conocida por influir en la fermentación, así mismo, el estado fisiológico del cultivo junto con las condiciones ambientales influyen también en los patrones posteriores de crecimiento.

Se han realizado relativamente pocos estudios sobre el impacto de los *re-pitching* en serie, y la fisiología de la célula de levadura *lager*, principalmente debido a las variaciones de lote a lote, en la composición del mosto, en un estudio de Jenkins et al., (2003), sobre el rendimiento del *re-pitching* en la fermentación, observaron que los cultivos expuestos a una serie extensa de *re-pitching*, presentaba modificaciones progresivas en la capacidad de floculación y vitalidad-viabilidad. No se conocen las razones de estas modificaciones, sin embargo, se debería al *re-pitching* repetitivo, ya que produciría condiciones de stress a la

levadura, ocasionando daños irreversibles, además de la propensión a formar mutantes deficientes, todo esto daría lugar a fermentaciones aberrantes, de pobre crecimiento o fase lag extendida, disminución de las tasas de atenuación y rendimiento pobre de floculación, por tanto se cree que el aumento del número de generaciones, conduce a un deterioro progresivo en el estado fisiológico.

También Boulton y Quain (2006), mencionan que en los cultivos con series de fermentación prolongada, las características de la levadura en producción, pueden cambiar debido a la inestabilidad genética. Formándose los *Petite* mutantes, y que son muy comunes en las levaduras de cerveza.

Así mismo, las condiciones ambientales del cultivo, inducen varios factores de stress a la levadura, influyendo en el rendimiento de fermentación, una de estas es el alcohol, se sabe que tiene el mayor impacto en el rendimiento de la levadura, mediante la inhibición de crecimiento celular y la viabilidad, causando cambios en las vías metabólicas, en la función y estructura celular.

En un estudio sobre el impacto del estrés del etanol en la fisiología de la levadura, desarrollado por Lentini et al., (2003), indicaron que el grado de tolerancia al etanol exhibida por una célula de levadura determina su idoneidad para la fermentación, que la vitalidad y viabilidad de la levadura en condiciones de estrés disminuye, que las características fisiológicas de estrés celular por etanol se muestran a nivel molecular por la inducción de genes de respuesta al estrés, relacionados con cambios en las proteínas de la pared celular, y que la utilización de células de levadura estresadas haría que el rendimiento de la fermentación sea variable (por ejemplo paradas de fermentación o tasas más lentas para alcanzar el valor de la atenuación final deseado) y los perfiles de sabor de la cerveza (es decir, sabores deseables variables tales como ésteres o niveles más altos de sabores no deseables, tales como diacetilo y sulfuro de hidrógeno).

Otra condición de stress para la levadura es la presión osmótica, en un estudio desarrollado por White et al.,(2003), sobre la respuesta al estrés osmótico de las cepas de levadura cervecera *Ale* y *Lager*. Indicaron que cuando se realiza la transferencia de un cultivo a otro, es decir el *Re-pitching*, el proceso genera una fuente potencial de estrés osmótico, que se exagera con el uso de mostos de alta gravedad.

Concluyeron que la respuesta al stress es dependiente del estado fisiológico de las células, y que las células en fase estacionaria muestran mayor resistencia al stress, en comparación con las células en fase exponencial, y que muchas características fisiológicas de la levadura de cerveza son dependientes de la cepa.

También durante el proceso de elaboración de la cerveza, como consecuencia de las condiciones de propagación de levadura, de almacenamiento y de fermentación, la levadura es expuesta a condiciones de estrés oxidativo.

En un estudio sobre las respuestas de la levadura al stress oxidativo desarrollado por Martin et al., (2003), concluyeron que la tolerancia de las cepas de levadura de cerveza al estrés del peróxido de hidrógeno exógeno era dependiente de la tensión y la fase de crecimiento exhibido por la población de células y que las cepas *Lager*, parecía ser más resistente que las cepas ale, aunque la razón no es conocida.

Por lo tanto, de las observaciones y estudios realizados, se deduce que el tipo de cepa utilizada, la fase de crecimiento en la que se encuentra la levadura y por tanto la fisiología de esta, influyen en el comportamiento de la levadura en la fermentación.

Terminado el proceso de fermentación se pasó a la fase de maduración, en donde las levaduras sedimentadas se separaron y la cerveza verde fue transvasada a un recipiente ámbar y conservada en cámara de frío a 0 °C por 15 días.

Los resultados del análisis de la cerveza final se muestran en las Tablas 16 a la 21. Se realizó la prueba de distribución normal y la prueba T para muestras independientes, con la corrección de *Satterwait*, para varianzas no homogéneas para un nivel de significancia del 5 por ciento. Indicando que No existen diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), para la variables de alcohol, extracto aparente y ADF, entre los métodos N°1 y N°2, en la fase de maduración.

#### 4.4 VIABILIDAD Y VITALIDAD ENTRE LOS MÉTODOS N°1 y N°2

Según Pardo et al., (2009), en su estudio manifestaron que la viabilidad y la vitalidad de la levadura son parámetros independientes. Cualquier condición o situación que represente un estrés para la levadura (congelación, hiper-osmolaridad, falta de nutrientes, presencia de metabolitos tóxicos, etc.) parece afectar la vitalidad de ésta, sin que necesariamente se produzca una disminución de la viabilidad celular.

White et al., (2003), mencionan que la viabilidad y la vitalidad de los cultivos de la levadura cervecera afectan directamente el rendimiento de fermentación y la calidad final de la cerveza. Y que en este proceso la levadura está sujeta a una serie de factores de estrés durante el manejo de la cervecería.

En este trabajo no se observó una relación directa entre la viabilidad y la vitalidad, sin embargo, tampoco se les puede considerar independientes entre sí, ya que ambos factores obtuvieron máximos valores entre los días 4 y 5 de fermentación, no obstante, se debería investigar más sobre la relación entre estos dos factores. Así mismo, estos parámetros son en conjunto importantes debido a la enorme influencia que tienen en la toma de decisiones sobre los cultivos de levadura en la producción de cerveza.

Los resultados de viabilidad en ambos métodos fue alto, el recuento en cámara Neubauer sirvió como base para determinar la viabilidad del cultivo, sin embargo, este parámetro indica el número de población que debe de tener un cultivo para iniciar una fermentación, ya que en las cervecerías el rango oscila entre 9 a 12 x 10<sup>7</sup> lev/ml, para una cepa de cerveza tipo *lager*, por tanto la viabilidad se mantuvo constante y óptima durante todos los cultivos.

El recuento de levaduras indicó el día en el que el cultivo debió pasar a la siguiente fase, para el método N°1, fue en día 4, y para el método N°2, fue en el día -5. La vitalidad, en los días 2 y 3, por el método N°1, mostro una marcada aceleración de la fermentación a comparación con del método N°2, sin embargo, en los días 4 y 5 los valores se asemejaron.

#### 4.5 DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE LA CERVEZA FINAL OBTENIDA

A la cerveza final obtenida de los Bach de fermentación, se analizó los parámetros fisicoquímicos de temperatura, extracto aparente, pH, amargor y alcohol, estos resultados fueron proporcionados por el área de fisicoquímica de la Empresa Anpay Perú S.A (ANEXO 16), y se muestran en la Tabla 22.

Se realizó la prueba de distribución normal y la prueba T para muestras independientes, con la corrección de *Satterwait*, para varianzas no homogéneas para un nivel de significancia del 5 por ciento. Para evaluar si existe diferencia significativa, entre los métodos N°1 Y N°2, en los resultados fisicoquímicos de la cerveza final obtenida. Estas pruebas indicaron que las muestras tienen una distribución normal y que No existen diferencia significativa ( $p > 0,05$ ), para las variables de temperatura, extracto aparente, pH, amargo y alcohol, en los resultados fisicoquímicos. Por tanto, no hay diferencia significativa entre ambos métodos, para la cerveza final obtenida.

La cerveza obtenida en todos los cultivos fue de color cobrizo, esto se debió al mosto utilizado ya que fue autoclavado, la cerveza tipo *lager* es de color dorado claro, este color podría obtenerse si se agregan aditivos, tales como el “Termamil” utilizado en la industria cervecera, pero en este estudio la cerveza obtenida, fue una cerveza concentrada sin ningún tratamiento, es decir no se filtró con tierra diatomea, como normalmente se haría en las cervecerías, si no que al ser a nivel de laboratorio se realizó una filtración rápida con filtro watman N°45, obteniéndose los siguientes resultados mostrados en la Tabla 22.

Se observó que con el Método N°1 se alcanzó un mayor grado de fermentación, mostrándose en los datos del extracto aparente, siendo menor que con el Método N°2.

Normalmente en las cervecerías la cerveza concentrada se diluye, por un factor para llegar al extracto final requerido, esta es una característica que organolépticamente se denomina como “el cuerpo de la cerveza”, los valores en ambos métodos si bien se diferencian, estos por un factor de conversión pueden diluirse y llegar a los parámetros óptimos de calidad de una cerveza tipo *lager*.

El alcohol fue ligeramente mayor con el método N°1, pero al igual que el extracto aparente, en una empresa cervecera, durante la fase de filtración de la elaboración de la cerveza este se corrige para llegar a los valores establecidos como óptimos.

**Tabla 22: Resultados Físicoquímicos de la cerveza final obtenida de todos los cultivos.**

Análisis Físicoquímicos	Unidades	Cultivo C1	Cultivo C2	Cultivo C3	Primer mes-N1	Segundo mes-N2	Tercer mes-N3
Temperatura	° C	0,7	0,9	0,7	0,8	0,7	0,9
Extracto Aparente	° Plato (% p/p)	2,96	2,82	3,25	3,67	3,97	3,88
pH	-	3,92	3,95	4,01	4,07	4,04	4,11
Amargo	U.A	18,6	18,7	18,1	18,1	18,2	18,2
Alcohol	% v/v	6,03	5,96	5,41	5,34	5,36	5,31

Los resultados de los análisis microbiológicos se muestran en la Tabla 23, se observó presencia de bacterias aerobias mesófilas y levaduras silvestres del tipo *Saccharomyces*, en los cultivos del Método N°1, es probable que esta contaminación pudiera deberse a la manipulación que se le dio a la levadura, para transferirla de un cultivo a otro o durante el procedimiento de recuperación de la levadura, sin embargo, esta contaminación no alteró los parámetros de viabilidad y vitalidad, aunque organolépticamente presentó una ligera diferencia. Se observó que por el Método N°2, la cerveza final obtenida no presentó contaminación, aunque hubo presencia de levaduras, es posible que pudiera deberse a que haya quedado levaduras provenientes de la fermentación.

La contaminación presente en el Cultivo C2 y C3, del método N°1, limitaría el uso de este método, si bien los datos de viabilidad y vitalidad se encuentran dentro de los óptimos de aceptación, al haber presencia de contaminación por bacterias, el metabolismo de estas alteraría el sabor y olor de la cerveza final, aun cuando se pudiera continuar por muchos subcultivos más o *re-pitching*, es necesario, evitar la contaminación para poder seguir evaluando sus características organolépticas, de viabilidad y vitalidad.

En una empresa cervecera se decide reemplazar un *re-pitching*, por un cultivo puro nuevo, cuando presentan contaminación o algún parámetro salió fuera de norma. Por tanto ambos métodos N°1 Y N°2, se complementan para la producción de cerveza.

**Tabla 23: Resultados Microbiológicos de cerveza final obtenida de todos los cultivos.**

<b>Análisis Microbiológicos</b>	<b>Unidades</b>	<b>Cultivo C1</b>	<b>Cultivo C2</b>	<b>Cultivo C3</b>	<b>Primer mes N1</b>	<b>Segundo mes N2</b>	<b>Tercer mes N3</b>
<i>Bacterias Aerobias mesófilas viables</i>	ufc/100ml	11	21	28	< 1	< 1	< 1
<i>Pediococcus sp. *</i>	ufc/100ml	< 1	< 1	1	< 1	< 1	< 1
<i>Lactobacillus sp. **</i>	ufc/100ml	< 1	2	4	< 1	< 1	< 1
<b>levaduras</b>	ufc/100ml	11	10	11	8	7	10
<b>levaduras silvestres tipo <i>Saccharomyces</i></b>	ufc/100ml	4	4	8	< 1	< 1	< 1
<b>Levaduras silvestres no <i>Saccharomyces</i></b>	ufc/100ml	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

\*El género *Pediococcus sp.* incluye a *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus inopinatus*.(Medio de cultivo NBB)

\*\*El género *Lactobacillus sp.* incluye a *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus brevisimiles*, *Lactobacillus frigidus*, *Lactobacillus casei*.(Medio de cultivo MRS)

Tomando en consideración lo expuesto anteriormente, la industria cervecera podría utilizar los subcultivos o *re-pitching* como método rápido de fermentación, ya que estas levaduras se encuentran adaptadas al medio y condiciones ambientales, se recortarían los días de escalamiento en laboratorio y adaptación del cultivo, por ende se reducirían costos de producción, tales como energía, frío, mano de obra, costos generados por la compra de nuevas cepas de levadura, etc. además que aceleraría los días en los que se obtiene la cerveza, si una empresa con amplia demanda en el mercado desea acelerar su producción, el método N°1 le permitirá, una producción constante sin paradas, ahorrando en tiempo y costos, sin embargo va perdiendo cualidades y debe de ser retirada del proceso de producción industrial. Una empresa con poca demanda como suelen ser las microcerveceras o pequeñas empresas caseras, deberían de utilizar el método N°2, ya que sería un costo mayor el mantener las levaduras y conservarlas si no van a ser utilizadas en el momento, además que por el tiempo de almacenamiento podrían contaminarse, por tanto un nuevo cultivo sería lo indicado. Se concluye que ambos métodos son buenos para la producción de cerveza, el utilizar uno u otro dependerá de la necesidad de la empresa.

## V. CONCLUSIONES

1. Se concluye que la viabilidad y vitalidad de las levaduras hasta el tercer cultivo y *re-pitching*, no está influenciada por el método de cultivo, y que la estabilidad de los *Starter* de levadura, se mantiene óptima durante todos los cultivos. Se observó que con el método N°1, la fase de fermentación se vio reducida en un día, y este margen se mantuvo en todos los cultivos, además presentó una ligera mejora en las características de viabilidad y vitalidad, mientras que con el método N°2, los parámetros de viabilidad y vitalidad en todos los cultivos se mantuvieron casi constantes entre ellos. Por tanto se concluye que con ambos métodos se obtiene una cerveza con buenas características.
2. La calidad del mosto utilizado en la preparación del *starter*, y posterior elaboración de cerveza. Fue de características óptimas, según los resultados de la caracterización fisicoquímica y microbiológica, así como también de su estabilidad.
3. El método de cultivo “*Re- pitching*”, no afecta la viabilidad y vitalidad de las levaduras, sin embargo en los análisis microbiológicos, la presencia de contaminación, indicaría que este método, tiene un límite de reutilización, y que es necesario reemplazar a la levadura por un nuevo cultivo. Ya que un exceso de *re-pitching* puede provocar mutación de las cepas, disminución de la tasa de fermentación e incremento en la edad promedio de la levadura, todo esto reduciría el vigor del cultivo de levaduras y perdería características de calidad establecidas, con posibles cambios organolépticos en las posteriores fermentaciones.
4. La industria cervecera podría utilizar los subcultivos o “*Re- pitching*”, como método rápido de fermentación, ya que estas levaduras se encuentran adaptadas al medio disminuyendo así días y costos de producción, sin embargo esto depende la condición de la levadura.

## VI. RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos, y como continuación del trabajo iniciado, es necesario realizar otros ensayos, tales como:

Realizar un estudio sobre la influencia del incremento de los subcultivos o *re-pitching* en la levadura *Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis.*, a partir de la quinta fermentación (cuarto Sub-cultivo), siguiendo con las mismas condiciones establecidas en esta investigación.

Investigar la influencia del *re-pitching* en la levadura *Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis.*, durante una fermentación alcohólica, utilizando condiciones de cultivo industrial, es decir en la industria cervecera.

Realizar un estudio en forma paralela sobre la influencia del *re-pitching* en la levadura *Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis.*, tomando como inóculo levadura en fase estacionaria temprana y fase estacionaria tardía. Evaluando su vitalidad y viabilidad.

Investigar la influencia del *re-pitching* y cultivo puro, con otra metodología de vitalidad, para establecer la mejor metodología.

Realizar estudios para establecer la metodología idónea para la evaluación de la viabilidad y vitalidad, que puedan ser aplicados a la empresa cervecera, y sean de respuesta inmediata y que permita apoyar la toma de decisiones.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFA LAVAL. (2008). Technical documentation for Carlsberg Flask 10 to 33,3 L. Scandi Brew®. Soborg, Dinamarca: Alfa laval Copenhagen A/S.
- ANTON PAAR. (2010). Instruction Manual- Alcoalyzer Plus Beer: Beer Analyzing System. Graz, Austria: Anton Paar.
- ARIAS, P. (2012). Tesis Doctoral: Análisis genómico de la integridad celular en *Saccharomyces cerevisiae*. Obtenido de UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID: <http://eprints.ucm.es/15170/1/T33738.pdf>
- BAMFORTH, C. (2003). Wort Composition and Beer Quality. En K. SMART (Ed.), *Brewing Yeast Fermentation Performance* (Segunda ed., págs. 77-84). Oxford, UK.: Blackwell Science.
- BARREIRO, J. A., Y SANDOVAL B., A. J. (2006). Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas . Caracas, Venezuela.: Equinoccio.
- BEITIA, J. L. (2011). Influencia del subcultivo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en el desarrollo de una fermentación alcohólica. Tesis grado. Ing Produccion Agroindustrial. Bogota, d.c.: Universidad De La Sabana.
- BOLDÚ, A. (2011). Projecte d'una planta de fabricació de la cervesa. Obtenido de Universitat Politècnica de Catalunya : <http://hdl.handle.net/2099.1/10060>
- BOULTON, C., Y QUAIN, D. (2006). *Brewing Yeast and Fermentation*. Oxford, UK.: Blackwell Science Ltd.
- BOYD T., et al.,(2003). Comparison of the methylene blue assay with a new flow-cytometric method for determining yeast viability in a brewery. En K. SMART (Ed.), *Fermentation Performance* (Second ed., págs. 174-179). Oxford, UK: Blackwell Science.
- BRIGGS et al., (2004). *Brewing Science and practice*. Cambridge, England.: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.

- BUSTAMANTE, L. (2010). Sistema Killer de levaduras. Obtenido de Universidad de Talca, Chile: Escuela de Tecnología Médica.: [http:// dspace. utalca.cl/handle/1950/8636](http://dspace. utalca.cl/handle/1950/8636)
- CABEZA, E. A. (2006). Cultivos Estárter: Seguridad, funcionalidad y propiedades tecnológicas. Simposio Regional de Microbiología. (págs. 1-8). Barranquilla, Colombia: Universidad de Pamplona.
- CELA, C. (1987). Loa del noble arte de beber cerveza. 21° Congreso Internacional de la European Brewery Convention. Madrid: Asociación Nacional de Cerveza.
- COMPTOM, J. (1977). El cervecero en la Práctica. Madison, Wisconsin.: Asociacion de Maestros cerveceros de las Américas.
- CONDE, M. et al., (2001). La cerveza en el Egipto Antiguo: Procesos de fabricacion y variedades. La cerveza en la Antigüedad (págs. 39-62). Sevilla: Fundación Cruzcampo.
- CRUEGER, W., Y CRUEGER, A. (1993). Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. (P. Liras Padín, Trad.) Zaragoza, España: Acribia.
- DEANS, K., et al., (1997). Effects of cone cropping and serial re-pitch on the distribution of cell ages in brewery yeast. Proceedings of the 26th Congress of the European Brewery Convention, (págs. 469-476 ). Maastricht.
- FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY 157 . (2006). Handbook of Brewing, Second Edition. (F. G. Priest, & S. G. Graham, Edits.) Boca Raton, FL, USA.: Taylor & Francis Group, LLC.
- FRAZIER, W. C., Y WESTHOFF, D. C. (1993). Capítulo 2: Microorganismos importantes. Microbiología de los Alimentos (M. R. Vergés, Trad., Cuarta ed., págs. 41-49). Zaragoza, España: Acribia.
- GARIBAY, M. et al., (1993). Capítulo 8: Bebidas Alcoholicas no destiladas. Biotecnología Alimentaria (págs. 263-311). México D.F.: Limusa S.A.
- GENMIC. (2002). Microbiología General. Tema 2: Cultivo de microorganismos. Obtenido de Genetics And Microbiology Research Group: University of Navarre, Pamplona, Spain: <http://www.unavarra.es/genmic/microgral/Tema%2002.-%20Cultivo%20de%20microorganismos.pdf>
- GIGLIARELLI, P. (01 de Setiembre de 2013). Fermentación. Obtenido de Revista MASH. Ciencia Cervecera.: <http://www.revistamash.com.ar/detalle.php?id=379>
- GIMENO, C. et al., (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell*, 68(6):1077-90.

- GINOVART, M. et al., (2008). Reutilización de Levaduras en fermentaciones de la Cerveza: Simulaciones por ordenador. II Congreso Iberoamericano sobre seguridad Alimentaria, V Congreso Español de Ingeniería de Alimentos (págs. 1-6). Barcelona, España.: CIMNE.
- GONZALES, M. G. (2000). Maestría. Microbiología Industrial: Efecto de diferentes iones metálicos sobre la viabilidad de dos variedades de *Saccharomyces cerevisiae* previamente sometidas al estrés químico. Monterrey, N.L. México: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- GRAY, J. et al., (2004). "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , 68: 187-206.
- GUTIÉRREZ, E. (1993). La Cerveza. (T. C. González, Ed.) Madrid.
- HAMMOND, J. (2000). Yeast growth and nutrition. En *Brewing Yeast Fermentation Performance* (págs. 77–85). Oxford, UK: Blackwell Science.
- HANS, M. (2009). *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. Germany: Wiley-VCH.
- HEGGART, H. et al., (1999). Factors Affecting Yeast Viability and Vitality Characteristics: A Review. *Master Brewers Association of the Americas*, 36(4), 383-406.
- HORNSEY, I. (2003). *Elaboración de cerveza: Microbiología, Bioquímica y Tecnología*. Zaragoza: Acribia.
- HOUGH, J. S. (1990). *Biología de la cerveza y de la malta*. (J. B. Gonzales, Trad.) Zaragoza, España: Acribia.
- HULSE, G. (2003). Yeast Propagation. En K. SMART, *Brewing Yeast Fermentation Performance* (págs. 251-256). Oxford, UK: Blackwell Science.
- ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (2000). *Microorganismos de los Alimentos 1: Su significado y métodos de Enumeración*. (2 ed.). Zaragoza, España.: Acribia.
- IICA, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura y Agencia Española De Cooperación Internacional. (1999). *Guía para la Aplicación de Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos en el sector Cervecerero*. San José, C.R: IICA.
- JAZWINSKI, S. (1990 ). Ageing and senescence of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 4, 337–343.

- JENKINS, C. et al., (2003). Serial repitching fermentation performance and functional biomarkers. En K. A. SMART (Ed.), *Brewing Yeast Fermentation Performance* (Segunda ed., págs. 257-265). Oxford, UK: Blackwell Science.
- KLIMOVITZ, R. Y BAMFORTH, C. (2002). *El cervecero en la práctica: un manual para la industria cervecera*. (Tercera ed.). Master Brewers Association of the Americas.
- KUNZE, W. (2006). *Tecnología para Cerveceros y Malteros* (Primera ed.). (C. Bauer, Trad.) España: VLB Berlín.
- KURTZMAN, C. P. Y Fell, J. W. (1998). *The Yeasts, A Taxonomic Study* (Cuarta ed.). Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- LENTINI, A. et al., (2003). The impact of ethanol stress on yeast physiology. En K. A. SMART (Ed.), *Brewing Yeast Fermentation Performance* (Segunda ed., págs. 25-37). Oxford, UK : Blackwell Science.
- LEROY, F. Y De VUYST, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, Volume 15, Number 2, 67-78.
- MARDONES, N. F. (2012). Tesis Grado Biotecnología: Evaluación del uso de Maltas Caramelo En La Elaboración De Cervezas. Santiago, Chile.: Universidad de Chile.
- MARTIN, V., QUAIN, D. Y SMART, K. (2003). Brewing yeast oxidative stress responses: impact of brewery handling. En K. A. SMART (Ed.), *Brewing Yeast Fermentation Performance* (Segunda ed., págs. 61-72). Oxford, UK: Blackwell Science.
- MARTÍNEZ LAÍNEZ, F. (1996). *La Cerveza en España*. Madrid: Cerveceros de España.
- MARTÍNEZ QUESADA, M. (Abril-Junio de 2012). Hongos domésticos: *Saccharomyces uvarum*. *Micobotánica-Jaén AÑO VII N° 2*: <http://www.micobotanicajaen.com/Revista/Articulos/MMartinezQ/HongosDomesticos/SaccharomycesUvarum.html>.
- MASKELL, D. et al., (2003). Chronological and replicative lifespan in lager brewing yeast. En K. A. SMART (Ed.), *Brewing Yeast Fermentation Performance* (Segunda ed., págs. 281-290). Oxford, UK: Blackwell Science 2003.
- MEBAK, Recopilación de Métodos Técnicos Cerveceros de la Comisión de Análisis de Europa Central. (1999). *Métodos de Análisis Cerveceros, Tomo II*. (ALAFACE, Trad.) Caracas, Venezuela.
- MEBAK, Recopilación de Métodos Técnicos Cerveceros de la Comisión de Análisis de Europa Central. (2000). *Metodos de analisis cerveceros, Tomo III*. (ALAFACE, Trad.) Caracas, Venezuela.

- MOLINA, M. et al., (2001). La Cerveza en la Antigüedad. Sevilla: Fundacion Cruzcampo.
- MORENO, A. (2013). Historia de la cerveza y su introduccion en España. Cerveza Y Malta, N°197(1), 35-40.
- NTP 213.014:2014 CERVEZA. Requisitos (2014). Lima, Peru: CNB-INDECOPI.
- OLALLA, J. (2013). El peso del Sector cervecero en la economía Española. Cerveza Y Malta, N°198(2), 9-18.
- OPEKAROVA, M. y SIGLER, K. (1982). Acidification power: indicator of metabolic activity and autolytic changes in *Saccharomyces cerevisiae*. Folia Microbiol:27,395-403.
- PAAN, C. ( 24 de Abril de 2014). La llegada de la cerveza al Perú: 151 años de historia. El comercio. <http://elcomercio.pe/economia/negocios/llegada-cerveza-al-peru-151-anos-historia-noticia-1724738>.
- PARDO, S. et al., (2009). Estudios de la viabilidad y la vitalidad frente al congelado de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*: efecto del preacondicionamiento fisiológico. Revista Iberoamericana de Micología, 26(2), 155-160.
- PASCUAL, G. (Marzo de 2014). Calculadora de inóculo y propagación de levadura. Recuperado el 30 de Junio de 2014, de Descubriendo Cervezas: [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)
- POWELL, C. et al., (2003). The impact of yeast cell age on fermentation, attenuation and flocculation. En K. A. SMART (Ed.), *Brewing Yeast Fermentation Performance* (Segunda ed., págs. 272-279). Oxford, UK: Blackwell Science.
- RAMÍREZ MERA, V. et al., (2006). Elección del Método para la Obtención de Mosto de Calidad Cervecera. VIII Congreso Nacional de Ciencia de Alimentos y IV Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Monterrey, Nuevo León.
- RODRÍGUEZ, H. A. (2003). Determinación de Parámetros Físico-Químicos para la Caracterización de Cerveza Tipo Lager Elaborada por Compañía Cervecera Kunstmann S.A. Tesis grado. Lic Ingeniero de alimentos. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile.
- ROS, J. L. (1980). Estabilidad coloidal de la cerveza. Pamplona, España: Laboratorio Industrial de Bioquímica S.A.
- ROSS, R. et al., (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology.*, 79(1-2), 3-16.
- SANCHÍS, V. (2004). Aspectos tecnológicos y nutritivos de la cerveza. *Avances en ciencia y Tecnología de los alimentos*, 65-72.

- SANTAMARIA, M. et al., (1997). Los Hongos. *Biología y Botánica* (págs. 99-103). Valencia: Universidad Politecnica de Valencia.
- STEWART, G. Y RUSSELL, I. (1998). *Yeast Management. Brewing Science & Technology: Brewer's Yeast* (págs. 62-72). London, England.: The Institute of Brewing And Distilling.
- SUÁREZ LEPE, J. A. Y IÑIGO LEAL, B. (1990). *Microbiología enológica: fundamentos de vinificación*. Mundi-Prensa.
- TAIDI, B. et al., (2003). Wort Substitutes and Yeast Nutrition. En K. SMART (Ed.), *Brewing Yeast Fermentation Performance* (Segunda ed., págs. 86-95). Blackwell Science.
- TORTORA, G. J. et al., (2007). Capitulo 5: Metabolismo microbiano. *Introducción a la Microbiología* (págs. 115-130). Madrid,España: Médica Panamericana S.A.
- VARNAM, A. H. Y SUTHERLAND, J. P. (1997). *Bebidas alcohólicas: Cerveza. Bebidas. Tecnología, Química y Microbiología.* (págs. 307-373.). Zaragoza, España.: Acribia.
- VINCENT, V. et al., (2006). *Química industrial orgánica*. España: Universidad Politécnica de valencia.
- VOGEL, W. (1999). *Elaboración casera de la cerveza. Elaboracion de cerveza* (págs. 15-19). Zaragoza,España: Acribia.
- WHITE, L. et al., (2003). Comparison of yeast viability/vitality methods and their relationship to fermentation performance. En K. A. SMART (Ed.), *Brewing Yeast Fermentation Performance* (Segunda ed., págs. 138-147). Oxford, UK: Blackwell Science.
- WHITE, P. et al., (2003). The osmotic stress response of ale and lager brewing yeast strains. En K. A. SMART (Ed.), *Brewing Yeast Fermentation Performance* (Segunda ed., págs. 46-59). Oxford, UK: Blackwell Science.
- ZEPF, M. et al., (2001). Control of parameters in aerobic yeast propagation. *Brauwelt International*, 128–132.
- (1995). *Reglamento Tecnico-sanitaria para la elaboracion y comercio de la cerveza y de la malta liquida*. España: Real Decreto 53/1995 de 20 de enero,BOE nº 34 .

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1: Diversas formas de presentación de levadura comercial para cervecería



## ANEXO 2: Documentación de la cepa *Saccharomyces pastorianus* ssp. *carlsbergensis*



Technische Universität München

Technische Universität München  
Forschungszentrum Weihenstephan f. Brau- und Lebensmittelqualität  
Alle Akademie 3, 85354 Freising-Weihenstephan, Germany

ANYPSA PERU S.A.  
Department of Quality Assurance  
RUC: 20106793621  
Autopista Trapiche Chillón SL 69 A  
Los Huertos de Tungasuca Carabaylo  
Lima / Peru

Forschungszentrum  
Weihenstephan für Brau-  
und Lebensmittelqualität

Leitung:  
Dr. Fritz Jacob

Alle Akademie 3  
85354 Freising-Weihenstephan  
Germany

Tel +49.8161.71.3331  
Fax +49.8161.71.4181

blq@wzw.tum.de  
www.blq-weihenstephan.de

Weihenstephan, 2013-01-21

### Summary of accomplished quality assurance

Strain: TUM 34/70 Lot No.: 1212-29 / -30  
*Saccharomyces pastorianus* ssp. *carlsbergensis*  
Yeast type: bottom fermenting brewing yeast  
Period of quality assurance: 2013-01-11 – 2013-01-21

examination	description	result
examination under microscope	visual detection of microorganisms	n.d.
37 °C Test*	detection of TF Sacch. and wild yeast strains	n.d.
NBB-Bouillon*	detection of beer spoilage organisms	n.d.
yeast water*	detection of bacteria in secondary flora	n.d.
PCR <i>Saccharomyces</i> yeast (BF)	detection of BF yeast based on PCR	positive
PCR <i>Saccharomyces</i> yeast (TF)	detection of TF yeast based on PCR	negative
PCR Screening	PCR screening of beer spoilage organisms	n.d.

#### abbreviations:

n.d. = not detectable; BF = bottom fermenting; TF = Top fermenting;  
PCR = Polymerase-Chain-Reaction; \* = control of culture of origin

37 °C Test = Bottom-fermenting brewing yeast strains are incapable of growth at a temperature of 37 °C. However the majority of wild yeast species and top-fermenting yeast strains can grow at this temperature. If an universal growth medium for yeast such as wort, YPG, YGC or YM is inoculated with bottom-fermenting yeast and incubated at 37 °C, any contamination with top fermenting wild yeast or top-fermenting culture yeast can be detected.

YM + CuSO<sub>4</sub> = Brewing yeast cannot grow in a nutrient medium if the concentration of copper sulfate (CuSO<sub>4</sub>) exceeds 200 ppm. The growth of most wild yeasts is not inhibited at this concentration. Therefore, the addition of CuSO<sub>4</sub> at 200 ppm to an universal growth medium of yeast (e.g. YM) can serve as a means for detecting wild yeast contaminations in top- and bottom-fermenting brewing yeast samples.

NBB-Broth = *Pediococcus* sp., *Lactobacillus* sp. and gram-negative beer spoilage bacteria can be detected using NBB nutrient broth under anaerobic conditions. For this test, a drop or a swab sample of the yeast is placed in a tube containing NBB broth.

Yeast Water = Pure yeast cultures should not harbor any other microorganisms (e.g. wort bacteria, indicator flora). Yeast infusion broth is suitable as a medium for the detection of bacteria in background flora typically found with brewing yeast. Samples of brewing yeast placed in yeast infusion broth should exhibit no bacterial growth. This test is performed as part of the quality control for pure cultures, so that they are certain to be absolutely free from contaminants.

PCR (Polymerase-Chain-Reaction) = Analysis method in conjunction with conventional tests with culture media, so that conclusive information about the purity of sample is available just 2-4 hours after it is collected. Analysis methods offer rapid and reliable analysis not only for determining the correct identity of yeast samples, but are also used to test for trace contaminations with beer spoilage bacteria or cross-contaminations with the "wrong" type of brewing yeast (e.g. bottom-fermenting yeast with top-fermenting yeast or vice-versa).

Yeast cultures are analysed in the accredited microbiological laboratory of the Research Center Weihenstephan.



Consulting and service partner for breweries, malthouses, non-alcoholic beverage producers, as well as the food industry and suppliers.



Technische Universität München

Technische Universität München  
Forschungszentrum Weihenstephan f. Brau- und Lebensmittelqualität  
Alte Akademie 3, 85354 Freising-Weihenstephan, Germany

ANYPSA PERU S.A.  
RUC: 20106793621  
Autopista Trapiche Chillón SL 69 A  
Los Huertos de Tungasuca Carabayllo  
Lima / Peru

Forschungszentrum  
Weihenstephan für Brau-  
und Lebensmittelqualität

Direktor:  
Prof. Dr. Dr. Harun Parlar

Techn. Leitung:  
Dr. Fritz Jacob

Alte Akademie 3  
85354 Freising-Weihenstephan  
Germany

Tel +49.8161.71.3331  
Fax +49.8161.71.4181

blq @ wzv.tum.de  
www.blq-weihenstephan.de

Weihenstephan, 2013-01-21

**CERTIFICATE and CHARACTERISATION OF THE BREWING  
YEAST STRAIN TUM 34/70  
Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis**

**1. Yeast strain characterisation:**

Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis strain TUM 34/70 :

*Yeast-Type:* Bottom-fermenting flocculating brewing yeast (lager type)

*Cell morphology:*

- spherical, globose or ellipsoidal, single or in budding pairs,
- lipids or vacuoles mostly visible in older cells (via microscope)
- cell diameter (mother cell): 8-12 µm

*Colony morphology on Wort-Agar:*

- round, partially corrugated, partially semi-rough with smooth edges
- slightly raised/ raised
- white to cream and opaque (some patterns of slight yellow/ brown shades can occur on older colonies)

*Appropriate growth media:*

- Wort-Agar / Liquid Wort
- Potato-Extract-Infusion-Agar
- YM-Agar/ YM-broth
- YPD-Agar/ YPD broth
- other universal yeast media

*Fermentation spectrum* (important fermentable sugars):

Glucose, Fructose, Galactose, Maltose, Maltotriose, Melibiose, Raffinose, Sucrose.



Reg.-Nr.: DAP-PL-3480 00

Die Akkreditierung gilt nur auf die in der Urkunde aufgeführten Verfahren. Die in den zitierten Normen und Richtlinien angegebenen Messunsicherheiten werden eingehalten. Die Prüfergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die Prüfgegenstände. Der Prüfbericht darf ohne die Genehmigung des Forschungszentrums Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität nicht auszugsweise vervielfältigt werden.

Non-degenerated (or enzymatically non-digested) starch or dextrans are not fermentable.

*Assimilation of selected nitrogen compounds:*

No assimilation by TUM 34/70 of the nitrogen compounds nitrate, nitrite, ethylamine and L-lysine

**2. Confirmation about Non-GMO (Non-Genetically Modified Organism)**

The yeast strain TUM 34/70 deriving from the Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität is a natural yeast strain and is not genetically modified. The yeast strain is a selected brewing yeast isolate used by many international breweries and brewing research centres. The natural fermentation and propagation characteristics are appreciated by the mentioned institutions. This strain does not contain following modifications:

- Gene/genes from other organisms
- Gene-encoding plasmids
- Transferred Resistance genes (for e. g. resistance against antibiotics or antimycotics)
- Modifications by classical or recombinant genetic methods

**3. Information about the absence/presence of metals, heavy metals and radionuclids in the yeast culture**

The yeast cultures of the strain TUM 34/70 do not contain the elements Pb, Cd, Hg, As, Sn, and Al and they are free from radionuclids. Periodic measurements of these parameters are performed.

The elements Cu, Zn, and Fe are present in traces in each yeast culture, because they are natural ingredients of the cell and essential for the metabolic flux and the enzyme apparatus of each cell. Therefore these elements are of great importance for the health and the good physiological condition of a brewing yeast culture.

**4. Recommended storage:**

Upon receipt of the yeast culture the yeast culture should be stored at 2 °C to 8 °C.

This document has been established electronically and is valid without signature.



Die Akkreditierung gilt nur auf die in der Urkunde aufgeführten Verfahren. Die in den zitierten Normen und Richtlinien angegebenen Messunsicherheiten werden eingehalten. Die Prüfergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die Prüfgegenstände. Der Prüfbericht darf ohne die Genehmigung des Forschungszentrums Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität nicht auszugsweise vervielfältigt werden.



Technische Universität München

Technische Universität München  
Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität  
Alte Akademie 3, 85354 Freising-Weihenstephan, Germany

ANYPSA PERU S.A.  
RUC: 20106793621  
Autopista Trapiche Chillón SL 69 A  
Los Huertos de Tungasuca Carabaylo  
Lima / Peru

Forschungszentrum  
Weihenstephan für Brau-  
und Lebensmittelqualität

Leitung:  
Dr. Fritz Jacob

Alte Akademie 3  
85354 Freising-Weihenstephan  
Germany

Tel +49.8161.71.3331  
Fax +49.8161.71.4181

blq@wzw.tum.de  
www.blq-weihenstephan.de

Forschungszentrum Weihenstephan  
für Brau- und Lebensmittelqualität  
Technische Universität München  
D-85354 Freising

Weihenstephan, 2013-01-21

### CONFIRMATION OF ORIGIN AND PURITY

The yeast strains distributed by the Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität (FZW BLQ) derive from its collection of microorganisms. The FZW BLQ performs all production steps (wort/substrate preparation, aeration, inoculation, cultivation / cell propagation, sterile filling and packaging) of all distributed yeast cultures that are provided by the FZW BLQ. All substrates that are used for the growth of the yeast culture conform to the German purity law for beer production.

The Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität confirms that the distributed yeast strains fulfil following conditions:

- The yeast strains are pure cultures containing no contaminations
- The yeast strains are not manipulated by genetic engineering
- The brewing yeast strains do not contain unspecific genes or unspecific properties.

The FZW BLQ is accredited by DIN EN ISO / IEC 17025:2005 and guarantees that the delivered pure culture yeast, strain no. TUM 34/70 is a pure culture yeast for beer fermentation. The yeast culture does not contain any harmful or poisonous substances.

In summary the delivered good is a pure natural brewing yeast culture pure and which is not manipulated (e. g. genetically) in any way.

### MICRBIOLOGICAL/HYGIENIC CERTIFICATE

The FZW BLQ is accredited by DIN EN ISO / IEC 17025:2005 and the microbiological lab of the FZW BLQ ensures that no beer-spoiling microorganisms are part of the pure yeast cultures. Ongoing quality control procedures (on special microbiological culture media) of the yeast cultures ensure the quality and the purity of the yeast cultures. All three brewing yeast culture types (liquid culture, agar slant, cotton wool tube culture) are microbiologically pure and do not contain any beer-spoiling microorganisms. The FZW BLQ ensures best hygienic conditions and a precise and complete quality control and traceable documentation of all production steps according to our lab guidelines. The labs of the FZW BLQ that perform these procedures are accredited by DIN EN ISO / IEC 17025:2005.

Yeast cultures are analysed in the accredited microbiological laboratory of the Research Center Weihenstephan.



This document has been established electronically and is valid without signature.

Consulting and service partner for breweries, malthouses, non-alcoholic beverage producers, as well as the food industry and suppliers.

**ANEXO 3: Fotos del Escalamiento para la preparación del Starter**



**ANEXO 4: Fotos del Bach de 10 L para fermentación**



**ANEXO 5: Fotos del equipo de filtración de la cerveza final**



## ANEXO 6: Fotos del Equipos Anton Paar



## ANEXO 7: Documentación de los datos fisicoquímicos del Mosto

	<b>CONTROL DE PROCESOS</b>	 
<b>ANALISIS DE COCIMIENTOS</b>		Código: F-42 Versión: 01 Fecha: 23/08/12

Viernes, 08 de Marzo del 2013

ANPAY PERU S.A.

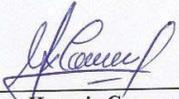
Fecha y hora de muestra : Mie 06.03.13/20:00 y Jue 07.03.13/15:00 hrs.  
Fecha y hora de análisis : Jue 07.03.13/09:00 y 16:00 hrs.

	<u>Nº 07</u>	<u>Nº 08</u>	<u>Unidades</u>
• Ext. Original calien. :	13.39	14.93	°P
• pH caliente :	5.47	5.58	
• Ext. Original Frío :	13.31	14.93	°P
• pH frío :	5.51	5.58	
• Color :	2.9	3.7	SRM
• Amargo :	20.5	27.4	U.A.
• Sulfatos :	104	92	ppm
• Calcio :	35	36	ppm
• Cloruros :	186	262	ppm
• Reacción al yodo :	Neg.	Neg.	
• Acidez :	0.19	0.22	% Ac. Láctico
• Polifenoles :	187	207	ppm
• Azúcares reductores:	8.8	9.7	%
• F.A.N. :	232	232	ppm
• Atenuación Límite :	2.69	3.00	°P
• Tanque destino :	Tex-5	Tex-5	
• Volumen total :	230	210	HL

**NOTA:**

- Levadura 1K-Nueva.
- En el Cocimiento Nº 07 se realizó análisis de amargo al mosto caliente dando 3.3 U.A.

Atte.

  
**Ing. Juan Honorio Carrera Sánchez**  
Dpto. Aseg. y Control de Calidad  
PLANTA CERVEZA ANPAY



	<b><u>CONTROL DE PROCESOS</u></b>	
<b>ANALISIS DE COCIMIENTOS</b>		Código: F-42 Versión: 01 Fecha: 23/08/12

Lunes, 11 de Marzo del 2013

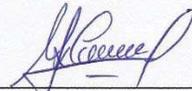
ANPAY PERU S.A.

	<b>Mosto N° 08</b>	<b>Unidades</b>
	<b>Después de esterilización</b>	
• Ext. Original. Frío :	15.01	°P
• pH frío :	5.15	
• Color :	6.5	SRM
• Amargo :	28.9	U.A.
• Sulfatos :	91	ppm
• Calcio :	35	ppm
• Cloruros :	262	ppm
• Reacción al yodo :	Neg.	
• Acidez :	0.27	% Ac. Láctico
• Polifenoles :	207	ppm
• Azúcares reductores:	9.7	%
• F.A.N. :	232	ppm

**NOTA:**

- Solicitud de Blga. Karin Toribio.
- Color fuera de Norma.

Atte.



**Ing. Juan Honorio Carrera Sánchez**  
**Dpto. Aseg. y Control de Calidad**  
**PLANTA CERVEZA ANPAY**

**ANEXO 55: Cuadros comparativos del recuento en cámara Neubauer y viabilidad de todos los cultivos**

**Cuadro comparativo del Recuento en cámara de Neubauer (levaduras /ml), en todos los cultivos de la fermentación en su respectivo Bach.**

Días	Cultivo C1	Cultivo C2	Cultivo C3	Primer mes N1	Segundo mes N2	Tercer mes N3
<b>0</b>	-	-	-	-	-	-
<b>1</b>	3,2 x 10 <sup>7</sup>	3,4 x 10 <sup>7</sup>	2,7 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>	0,9 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>7</sup>
<b>2</b>	11,0 x 10 <sup>7</sup>	9,2 x 10 <sup>7</sup>	12,1 x 10 <sup>7</sup>	4,4 x 10 <sup>7</sup>	3,4 x 10 <sup>7</sup>	3,7 x 10 <sup>7</sup>
<b>3</b>	15,0 x 10 <sup>7</sup>	13,8 x 10 <sup>7</sup>	12,1 x 10 <sup>7</sup>	8,5 x 10 <sup>7</sup>	6,3 x 10 <sup>7</sup>	8,2 x 10 <sup>7</sup>
<b>4</b>	17,9 x 10 <sup>7</sup>	19,2 x 10 <sup>7</sup>	14,5 x 10 <sup>7</sup>	10,9 x 10 <sup>7</sup>	10,7 x 10 <sup>7</sup>	10,5 x 10 <sup>7</sup>
<b>5</b>	8,4 x 10 <sup>7</sup>	6,8 x 10 <sup>7</sup>	6,1 x 10 <sup>7</sup>	19,2 x 10 <sup>7</sup>	17,8 x 10 <sup>7</sup>	16,5 x 10 <sup>7</sup>
<b>6</b>	-	-	-	5,2 x 10 <sup>7</sup>	3,6 x 10 <sup>7</sup>	4,2 x 10 <sup>7</sup>

**Cuadro comparativo de la Viabilidad (%), de todos los cultivos en la fermentación de su respectivo Bach.**

Días	Cultivo C1	Cultivo C2	Cultivo C3	Primer mes N1	Segundo mes N2	Tercer mes N3
<b>0</b>	99,00	96,50	95,00	99,00	99,00	99,00
<b>1</b>	98,50	96,50	93,80	98,80	98,50	98,50
<b>2</b>	98,20	96,80	96,50	99,00	99,00	98,50
<b>3</b>	97,50	96,80	88,80	98,50	98,50	98,50
<b>4</b>	97,50	96,50	88,80	99,00	99,00	98,50
<b>5</b>	<b>97,50</b>	97,00	89,00	98,50	98,50	98,50
<b>6</b>				98,70	98,70	98,20

ANEXO 56: Cuadro completo de los parámetros de vitalidad del Método N°1, Cultivo-C1

CUADRO DE LA VITALIDAD DEL MÉTODO N°1- "CULTIVO – C1"

Días	ETAPA	Temperatura ( °C)	Densidad	Peso específico	alcohol % v/v	Extracto Original % p/p	Extracto Aparente % p/p	Extracto real % p/p	Alcohol % p/p	ADF %
<b>Final del Escalamient</b>	<b>STARTER</b>	25	1,00871	1,1052	5,75	13,90	3,25	5,30	4,75	79,79
<b>0</b>		12	1,05217	1,05417	0,00	13,90	13,90	13,89	0,00	0,11
<b>1</b>		12	1,03279	1,03464	2,24	13,81	9,70	10,51	1,71	32,04
<b>2</b>		12	1,01759	1,01942	4,63	13,85	5,29	6,69	3,59	63,38
<b>3</b>	<b>FERMENTACIÓN</b>	12	1,00819	1,01001	6,30	13,88	3,67	4,95	4,72	81,38
<b>4</b>		12	1,00501	1,00619	6,09	13,89	3,01	4,82	4,78	82,27
<b>5</b>		5	1,00594	1,00712	6,14	13,88	2,99	4,65	4,83	83,82
<b>15 Días</b>	<b>MADURACIÓN</b>	0	1,00581	1,00762	6,03	13,87	2,96	4,60	4,73	83,78

**ANEXO 57: Cuadro completo de los parámetros de vitalidad del método N°1- Cultivo 2**

**CUADRO DE LA VITALIDAD DEL MÉTODO N°1- "CULTIVO – C2"**

Días	ETAPA	Temperatura ( °C)	Densidad	Peso específico	alcohol % v/v	Extracto Original % p/p	Extracto Aparente % p/p	Extracto real % p/p	Alcohol % p/p	ADF %
<b>Final del Escalamient 0</b>	STARTER	25	1,00898	1,0108	5,68	13,89	3,30	5,33	4,45	79,28
<b>0</b>		12	1,05217	1,05417	0,00	13,90	13,90	13,89	0,00	0,11
<b>1</b>		12	1,03277	1,03463	2,22	13,88	8,80	10,60	1,70	31,93
<b>2</b>		12	1,01446	1,01629	5,02	13,86	4,56	6,35	3,90	60,12
<b>3</b>	FERMENTACIÓN	12	1,00875	1,01057	5,91	13,80	3,02	5,76	4,62	80,23
<b>4</b>		12	1,00659	1,00777	5,96	13,80	2,89	4,99	4,89	81,61
<b>5</b>		12	1,00612	1,0073	5,97	13,79	2,88	4,98	4,91	81,65
<b>15 Días</b>	MADURACIÓN	0	1,00603	1,00721	5,96	13,80	2,82	4,92	4,90	81,95

**ANEXO 58: Cuadro completo de los parámetros de la vitalidad del método N°1- Cultivo -3**

<b>CUADRO DE LA VITALIDAD DEL MÉTODO N°1- "CULTIVO – C3"</b>										
<b>Días</b>	<b>ETAPA</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Densidad</b>	<b>Peso específico</b>	<b>alcohol % v/v</b>	<b>Extracto Original % p/p</b>	<b>Extracto Aparente % p/p</b>	<b>Extracto real % p/p</b>	<b>Alcohol % p/p</b>	<b>ADF %</b>
<b>Final del Escalamient</b>	<b>STARTER</b>	25	1,00905	1,01087	5,41	13,90	3,78	5,73	4,28	78,40
<b>0</b>										
<b>0</b>		12	1,05217	1,05417	0,00	13,90	13,89	13,90	0,00	0,12
<b>1</b>		12	1,04436	1,04554	1,44	13,89	9,65	10,68	1,12	20,46
<b>2</b>		12	1,02275	1,02459	3,73	13,89	6,98	8,34	2,88	52,49
<b>3</b>	<b>FERMENTACIÓN</b>	12	1,011	1,0184	5,66	13,86	3,33	5,36	4,43	77,65
<b>4</b>		12	1,01103	1,0109	5,69	13,85	3,30	5,33	4,47	78,05
<b>5</b>		12	1,00907	1,01089	5,71	13,86	3,28	5,31	4,49	78,14
<b>15 Días</b>	<b>MADURACIÓN</b>	0	1,00905	1,01087	5,41	13,80	3,25	5,27	4,28	78,40

**ANEXO 59: Cuadro completo de los parámetros de vitalidad del método N°2- Primer Mes-NI**

<b>CUADRO DE LA VITALIDAD DEL MÉTODO N°2 "Primer mes – NI"</b>										
<b>Días</b>	<b>ETAPA</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Densidad</b>	<b>Peso específico</b>	<b>alcohol % v/v</b>	<b>Extracto Original % p/p</b>	<b>Extracto Aparente % p/p</b>	<b>Extracto real % p/p</b>	<b>Alcohol % p/p</b>	<b>ADF %</b>
<b>Final</b>	<b>STARTER</b>	25	1,00864	1,01046	5,45	13,87	3,68	5,64	4,27	79,17
<b>0</b>		12	1,05217	1,05407	0,01	13,91	13,90	13,90	0,00	0,12
<b>1</b>		12	1,04395	1,04583	0,96	13,85	12,10	12,45	0,73	13,29
<b>2</b>		12	1,04082	1,0427	1,36	13,82	11,35	11,84	1,03	18,81
<b>3</b>	<b>FERMENTACIÓN</b>	12	1,03021	1,03082	2,67	13,79	8,87	9,83	2,05	40,91
<b>4</b>		12	1,01263	1,01446	4,93	13,79	4,59	6,37	3,85	71,34
<b>5</b>		12	1,01063	1,0123	5,14	13,67	4,07	5,92	4,02	75,20
<b>6</b>		5	1,01011	1,01198	5,44	13,69	3,55	5,50	4,25	76,84
<b>15 Días</b>	<b>MADURACIÓN</b>	0	1,00939	1,0112	5,34	13,65	3,67	5,59	4,18	77,66

**ANEXO 60: Cuadro completo de los parámetros de vitalidad del método N°2- Segundo Mes-N2**

**CUADRO DE LA VITALIDAD DEL MÉTODO N°2 - "Segundo mes – N2"**

Días	ETAPA	Temperatura (°C)	Densidad	Peso específico	alcohol % v/v	Extracto Original % p/p	Extracto Aparente % p/p	Extracto real % p/p	Alcohol % p/p	ADF %
<b>Final</b>	STARTER	25	1,01097	1,01279	5,43	13,87	3,78	5,74	4,25	78,71
<b>0</b>		12	1,05217	1,05407	0,00	13,89	13,90	13,90	0,00	0,11
<b>1</b>		12	1,04495	1,04683	1,06	13,90	12,50	12,40	0,74	13,28
<b>2</b>		12	1,04053	1,04171	1,52	13,80	11,07	12,15	1,45	19,56
<b>3</b>	FERMENTACIÓN	12	1,03289	1,03474	2,24	13,81	9,70	10,51	1,91	39,04
<b>4</b>		12	1,01037	1,01219	5,16	13,76	4,12	5,98	4,03	75,55
<b>5</b>		12	1,00923	1,01105	5,34	13,76	3,78	5,70	4,18	77,90
<b>6</b>		12	1,00922	1,00908	5,35	13,75	3,75	5,67	4,19	77,96
<b>15 Días</b>	MADURACIÓN	0	1,00976	1,01158	5,36	13,14	3,97	5,73	4,19	75,57

ANEXO 61: Cuadro completo de los parámetros de vitalidad del método N°2- Tercer Mes-N3

CUADRO DE LA VITALIDAD DEL MÉTODO N°2 "Primer mes – N3"										
Días	ETAPA	Temperatura (°C)	Densidad	Peso específico	alcohol % v/v	Extracto Original % p/p	Extracto Aparente % p/p	Extracto real % p/p	Alcohol % p/p	ADF %
<b>Final del Escalamiento</b>										
	STARTER	25	1,00918	1,01100	5,43	13,86	3,82	5,67	4,25	78,16
<b>0</b>		12	1,05217	1,05407	0,00	13,90	13,89	13,90	0,00	0,12
<b>1</b>		12	1,04454	1,04642	0,96	13,81	11,55	11,88	0,69	12,62
<b>2</b>		12	1,04058	1,04246	1,34	13,83	11,42	11,80	1,01	18,69
<b>3</b>	FERMENTACIÓN	12	1,03021	1,03082	2,67	13,84	6,63	9,87	2,05	38,81
<b>4</b>		12	1,01279	1,01461	4,79	13,85	4,92	6,65	3,73	70,50
<b>5</b>		12	1,01097	1,01279	5,10	13,85	4,06	5,78	4,06	73,08
<b>6</b>		12	1,01183	1,01217	5,41	13,84	3,98	5,35	4,34	74,71
<b>15 Días</b>	MADURACIÓN	0	1,00952	1,01133	5,31	13,74	3,88	5,45	4,29	76,32

**ANEXO 62: Cuadros comparativos del alcohol, atenuación aparente y extracto aparente de todos los cultivos**

**CUADRO COMPARATIVO DEL % ADF O ATENUACIÓN APARENTE EN LOS CULTIVOS**

Días	Etapa	CULTIVO C1	CULTIVO C2	CULTIVO C3	Primer mes N1	Segundo mes N2	Tercer mes N3
0		0,11	0,11	0,12	0,12	0,11	0,12
1		32,04	31,93	20,46	13,29	13,28	12,62
2		63,38	60,12	52,49	18,81	19,56	18,69
3	FERMENTACIÓN	81,38	80,23	77,65	40,91	39,04	38,81
4		82,27	81,61	78,05	71,34	75,55	70,50
5		83,82	81,65	78,14	75,20	77,90	73,08
6		-	-	-	76,84	77,96	74,71
15 Días	MADURACIÓN	83,78	81,95	78,40	77,66	75,57	76,32

**CUADRO COMPARATIVO DEL % DE ALCOHOL (v/v) EN LOS CULTIVOS**

Días	Etapa	CULTIVO C1	CULTIVO C2	CULTIVO C3	Primer mes N1	Segundo mes N2	Tercer mes N3
0		0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
1		2,24	2,22	1,44	0,96	1,06	0,96
2		4,63	5,02	3,73	1,36	1,52	1,34
3	FERMENTACIÓN	6,30	5,91	5,66	2,67	2,24	2,67
4		6,09	5,96	5,69	4,93	5,16	4,79
5		6,14	5,97	5,71	5,14	5,34	5,10
6		-	-	-	5,44	5,35	5,41
15 Días	MADURACIÓN	6,03	5,96	5,41	5,34	5,36	5,31

**CUADRO COMPARATIVO DEL EXTRACTO APARENTE % p/p EN LOS CULTIVOS**

Días	Etapa	CULTIVO C1	CULTIVO C2	CULTIVO C3	Primer mes N1	Segundo mes N2	Tercer mes N3
0		13,90	13,90	13,89	13,90	13,90	13,89
1		9,70	8,80	9,65	12,10	12,50	11,55
2		5,29	4,56	6,98	11,35	11,07	11,42
3	FERMENTACIÓN	3,67	3,02	3,33	8,87	9,70	6,63
4		3,01	2,89	3,30	4,59	4,12	4,92
5		2,99	2,88	3,28	4,07	3,78	4,06
6		-	-	-	3,55	3,75	3,98
15 días	MADURACIÓN	2,96	2,82	3,25	3,67	3,97	3,88

**ANEXO 63: Documentación de los datos fisicoquímicos de la cerveza final obtenida**



	<b><u>CONTROL DE PROCESOS</u></b>	
<b>ANALISIS DE CERVEZA FINAL</b>		Código: F-43 Versión: 01 Fecha: 23/08/12

Lunes, 8 de Abril del 2013

ANPAY PERU S.A.

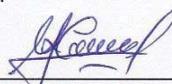
ANALISIS	Unidades	Norma ANPAY 650 ml.	Cultivo C1
Temperatura	° C	-	<b>0.7</b>
Extracto Aparente	° PLATO	1.80 – 2.20	<b>2.96</b>
Extracto Original	° PLATO	10.50 – 11.00	<b>13.87</b>
Extracto Real	° PLATO	3.51 – 3.90	<b>4.60</b>
Alcohol % Volumen	%	4.37 – 4.84	<b>6.03</b>
Alcohol % Peso	%	3.47 – 3.80	<b>4.73</b>
Grado Aparente de Fermentación (ADF)	%	79.24 – 83.64	<b>83.78</b>
Densidad	g/cm <sup>3</sup>	1.00520 – 1.00677	<b>1.00581</b>
Gravedad Específica		1.00701 - 1.00858	<b>1.00762</b>
Color	° SRM	2.3 – 2.6	<b>5.8</b>
pH		4.20 – 4.50	<b>3.92</b>
Turbidez	° EBC <sub>90°</sub>	≤ 0.60	<b>2.59</b>
Turbidez	° EBC <sub>20°</sub>	≤ 0.20	<b>3.92</b>
Sulfatos	ppm	80 – 150	<b>85</b>
Calcio	ppm	40 – 70	<b>32</b>
Cloruros	ppm	200 – 270	<b>179</b>
Amargo	U.A.	14.0 – 15.0	<b>18.6</b>
Acidez	% Ácido Láctico	0.13 – 0.18	<b>0.21</b>
Diacetilo Total	ppm	≤ 0.15	<b>0.50</b>
Polifenoles Totales	ppm	≤ 130	<b>178</b>

**OBSERVACIONES:** F<sub>cloruros</sub> = 0.7195 (1g); F<sub>c cloruros</sub> = 0.86 y F<sub>c calcio</sub> = 1.28

**NOTA:**

- Solicitud de Blga. Karin Toribio.
- Cerveza sin pasteurizar.

Atte.



**Ing. Juan Honorio Carrera Sánchez**  
Dpto. Aseg. y Control de Calidad  
PLANTA CERVEZA ANPAY

**ANYPSA PERU S.A**  
R.U.C. N° 20510957319

Av. Chacra Cerro 325 End. Chacra Cerro - Comas - Lima 07 - Perú  
ventas@anpayperu.com.pe www.anpayperu.com.pe Telf. (051-1) 613-9393 Fax: (51-1) 6139394



	<b>CONTROL DE PROCESOS</b>	
<b>ANALISIS DE CERVEZA FINAL</b>		Código: F-43 Versión: 01 Fecha: 23/08/12

Lunes, 8 de Abril del 2013

ANPAY PERU S.A.

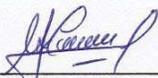
ANALISIS	Unidades	Norma ANPAY 650 ml.	Primer mes NI
Temperatura	° C	-	<b>0.8</b>
Extracto Aparente	° PLATO	1.80 – 2.20	<b>3.67</b>
Extracto Original	° PLATO	10.50 – 11.00	<b>13.65</b>
Extracto Real	° PLATO	3.51 – 3.90	<b>5.59</b>
Alcohol % Volumen	%	4.37 – 4.84	<b>5.34</b>
Alcohol % Peso	%	3.47 – 3.80	<b>4.18</b>
Grado Aparente de Fermentación (ADF)	%	79.24 – 83.64	<b>77.66</b>
Densidad	g/cm <sup>3</sup>	1.00520 – 1.00677	<b>1.00939</b>
Gravedad Especifica		1.00701 - 1.00858	<b>1.0112</b>
Color	° SRM	2.3 – 2.6	<b>5.5</b>
pH		4.20 – 4.50	<b>4.07</b>
Turbidez	° EBC <sub>90°</sub>	≤ 0.60	<b>2.78</b>
Turbidez	° EBC <sub>20°</sub>	≤ 0.20	<b>3.99</b>
Sulfatos	ppm	80 – 150	<b>91</b>
Calcio	ppm	40 – 70	<b>37</b>
Cloruros	ppm	200 – 270	<b>185</b>
Amargo	U.A.	14.0 – 15.0	<b>18.1</b>
Acidez	% Acido Láctico	0.13 – 0.18	<b>0.33</b>
Diacetilo Total	ppm	≤ 0.15	<b>0.70</b>
Polifenoles Totales	ppm	≤ 130	<b>182</b>

**OBSERVACIONES:** F<sub>cloruros</sub> = 0.7195 (1g); F<sub>c cloruros</sub> = 0.86 y F<sub>c calcio</sub> = 1.28

**NOTA:**

- Solicitud de Blga. Karin Toribio.
- Cerveza sin pasteurizar.

Atte.

  
**Ing. Juan Honorio Carrera Sánchez**  
**Dpto. Aseg. y Control de Calidad**  
**PLANTA CERVEZA ANPAY**

**ANYPSA PERU S.A**  
R.U.C. N° 20510957319

Av. Chacra Cerro 325 Fnd. Chacra Cerro - Comas - Lima 07 - Perú  
ventas@anpayperu.com.pe www.anpayperu.com.pe Telf: (051-1) 613-9393 Fax: (51-1) 6139394



	<b>CONTROL DE PROCESOS</b>	
<b>ANALISIS DE CERVEZA FINAL</b>		Código: F-43 Versión: 01 Fecha: 23/08/12

Lunes, 6 de Mayo del 2013

ANPAY PERU S.A.

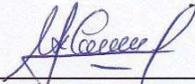
ANALISIS	Unidades	Norma ANPAY 650 ml.	Cultivo C2
Temperatura	° C	-	<b>0.9</b>
Extracto Aparente	° PLATO	1.80 – 2.20	<b>2.82</b>
Extracto Original	° PLATO	10.50 – 11.00	<b>13.80</b>
Extracto Real	° PLATO	3.51 – 3.90	<b>4.92</b>
Alcohol % Volumen	%	4.37 – 4.84	<b>5.96</b>
Alcohol % Peso	%	3.47 – 3.80	<b>4.90</b>
Grado Aparente de Fermentación (ADF)	%	79.24 – 83.64	<b>81.95</b>
Densidad	g/cm <sup>3</sup>	1.00520 – 1.00677	<b>1.00603</b>
Gravedad Específica		1.00701 - 1.00858	<b>1.00721</b>
Color	° SRM	2.3 – 2.6	<b>5.6</b>
pH		4.20 – 4.50	<b>3.95</b>
Turbidez	° EBC <sub>90°</sub>	≤ 0.60	<b>2.61</b>
Turbidez	° EBC <sub>20°</sub>	≤ 0.20	<b>3.94</b>
Sulfatos	ppm	80 – 150	<b>86</b>
Calcio	ppm	40 – 70	<b>31</b>
Cloruros	ppm	200 – 270	<b>175</b>
Amargo	U.A.	14.0 – 15.0	<b>18.7</b>
Acidez	% Ácido Láctico	0.13 – 0.18	<b>0.23</b>
Diacetilo Total	ppm	≤ 0.15	<b>0.50</b>
Polifenoles Totales	ppm	≤ 130	<b>179</b>

OBSERVACIONES:  $F_{\text{cloruros}} = 0.7195$  (1g);  $F_{\text{e cloruros}} = 0.86$  y  $F_{\text{e calcio}} = 1.28$

**NOTA:**

- Solicitud de Blga. Karin Toribio.
- Cerveza sin pasteurizar.

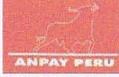
Atte.

  
**Ing. Juan Honorio Carrera Sánchez**  
**Dpto. Aseg. y Control de Calidad**  
**PLANTA CERVEZA ANPAY**

**ANYPSA PERU S.A**  
R.U.C. N° 20510957319

Av. Chacra Cerro 325 Fnd. Chacra Cerro - Comas - Lima 07 - Perú  
ventas@anpayperu.com.pe www.anpayperu.com.pe Telf: (051-1) 613-9393 Fax: (51-1)6139394



	<b>CONTROL DE PROCESOS</b>	
<b>ANALISIS DE CERVEZA FINAL</b>		Código: F-43 Versión: 01 Fecha: 23/08/12

Lunes, 8 de Mayo del 2013

ANPAY PERU S.A.

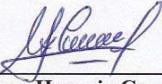
ANALISIS	Unidades	Norma ANPAY 650 ml.	Segundo mes N2
Temperatura	° C	-	0.7
Extracto Aparente	° PLATO	1.80 – 2.20	3.97
Extracto Original	° PLATO	10.50 – 11.00	13.14
Extracto Real	° PLATO	3.51 – 3.90	5.73
Alcohol % Volumen	%	4.37 – 4.84	5.36
Alcohol % Peso	%	3.47 – 3.80	4.19
Grado Aparente de Fermentación (ADF)	%	79.24 – 83.64	75.57
Densidad	g/cm <sup>3</sup>	1.00520 – 1.00677	1.00976
Gravedad Específica		1.00701 - 1.00858	1.01158
Color	° SRM	2.3 – 2.6	5.7
pH		4.20 – 4.50	4.04
Turbidez	° EBC <sub>90°</sub>	≤ 0.60	2.79
Turbidez	° EBC <sub>20°</sub>	≤ 0.20	4.01
Sulfatos	ppm	80 – 150	90
Calcio	ppm	40 – 70	36
Cloruros	ppm	200 – 270	185
Amargo	U.A.	14.0 – 15.0	18.2
Acidez	% Ácido Láctico	0.13 – 0.18	0.29
Diacetilo Total	ppm	≤ 0.15	0.70
Polifenoles Totales	ppm	≤ 130	181

OBSERVACIONES:  $F_{\text{cloruros}} = 0.7195$  (1g);  $F_{\text{cloruros}} = 0.86$  y  $F_{\text{calcio}} = 1.28$

**NOTA:**

- A Solicitud de Blga. Karin Toribio.
- Cerveza sin pasteurizar.

Atte.

  
**Ing. Juan Honorio Carrera Sánchez**  
 Dpto. Aseg. y Control de Calidad  
 PLANTA CERVEZA ANPAY



	<b>CONTROL DE PROCESOS</b>	
<b>ANALISIS DE CERVEZA FINAL</b>		Código: F-43 Versión: 01 Fecha: 23/08/12

Lunes, 3 de Junio del 2013

ANPAY PERU S.A.

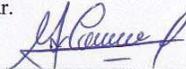
ANALISIS	Unidades	Norma ANPAY 650 ml.	Cultivo C3
Temperatura	° C	-	0.7
Extracto Aparente	° PLATO	1.80 – 2.20	3.25
Extracto Original	° PLATO	10.50 – 11.00	13.80
Extracto Real	° PLATO	3.51 – 3.90	5.27
Alcohol % Volumen	%	4.37 – 4.84	5.41
Alcohol % Peso	%	3.47 – 3.80	4.28
Grado Aparente de Fermentación (ADF)	%	79.24 – 83.64	78.40
Densidad	g/cm <sup>3</sup>	1.00520 – 1.00677	1.00905
Gravedad Específica		1.00701 - 1.00858	1.01087
Color	° SRM	2.3 – 2.6	5.8
pH		4.20 – 4.50	4.01
Turbidez	° EBC <sub>90°</sub>	≤ 0.60	2.99
Turbidez	° EBC <sub>20°</sub>	≤ 0.20	4.03
Sulfatos	ppm	80 – 150	86
Calcio	ppm	40 – 70	32
Cloruros	ppm	200 – 270	176
Amargo	U.A.	14.0 – 15.0	18.1
Acidez	% Ácido Láctico	0.13 – 0.18	0.24
Diacetilo Total	ppm	≤ 0.15	0.50
Polifenoles Totales	ppm	≤ 130	179

OBSERVACIONES:  $F_{\text{cloruros}} = 0.7195$  (1g);  $F_{\text{cloruros}} = 0.86$  y  $F_{\text{calcio}} = 1.28$

**NOTA:**

- Solicitud de Blga. Karin Toribio.
- Cerveza sin pasteurizar.

Atte.

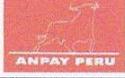


**Ing. Juan Honorio Carrera Sánchez**  
Dpto. Aseg. y Control de Calidad  
PLANTA CERVEZA ANPAY

**ANYPSA PERU S.A**  
R.U.C. N° 20510957319

Av. Chacra Cerro 325 Fnd. Chacra Cerro - Comas - Lima 07 - Peru  
ventas@anpayperu.com.pe www.anpayperu.com.pe Telf.: (051-1) 613-9393 Fax: (51-1)6139394



	<b>CONTROL DE PROCESOS</b>	
<b>ANALISIS DE CERVEZA FINAL</b>		Código: F-43 Versión: 01 Fecha: 23/08/12

Lunes, 6 de Junio del 2013

ANPAY PERU S.A.

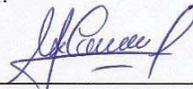
ANALISIS	Unidades	Norma ANPAY 650 ml.	Tercer mes N3
Temperatura	° C	-	0.9
Extracto Aparente	° PLATO	1.80 – 2.20	3.88
Extracto Original	° PLATO	10.50 – 11.00	13.74
Extracto Real	° PLATO	3.51 – 3.90	5.45
Alcohol % Volumen	%	4.37 – 4.84	5.31
Alcohol % Peso	%	3.47 – 3.80	4.29
Grado Aparente de Fermentación (ADF)	%	79.24 – 83.64	76.32
Densidad	g/cm <sup>3</sup>	1.00520 – 1.00677	1.00952
Gravedad Especifica		1.00701 - 1.00858	1.01133
Color	° SRM	2.3 – 2.6	5.5
pH		4.20 – 4.50	4.11
Turbidez	° EBC <sub>90°</sub>	≤ 0.60	2.89
Turbidez	° EBC <sub>20°</sub>	≤ 0.20	4.03
Sulfatos	ppm	80 – 150	89
Calcio	ppm	40 – 70	35
Cloruros	ppm	200 – 270	187
Amargo	U.A.	14.0 – 15.0	18.2
Acidez	% Ácido Láctico	0.13 – 0.18	0.29
Diacetilo Total	ppm	≤ 0.15	0.60
Polifenoles Totales	ppm	≤ 130	183

OBSERVACIONES:  $F_{\text{cloruros}} = 0.7195$  (1g);  $F_{\text{e cloruros}} = 0.86$  y  $F_{\text{e calcio}} = 1.28$

**NOTA:**

- Solicitud de Blga. Karin Toribio.
- Cerveza sin pasteurizar.

Atte.



**Ing. Juan Honorio Carrera Sánchez**  
Dpto. Aseg. y Control de Calidad  
PLANTA CERVEZA ANPAY

**ANYPSA PERU S.A**  
R.U.C. N° 20510957319

Av. Chacra Cerro 325 Erid. Chacra Cerro - Comas - Lima 07 - Perú  
ventas@anpayperu.com.pe www.anpayperu.com.pe Telf. (051-1) 613-9393 Fax. (51-1) 6139394