

**Propagación de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y
aseguramiento de la calidad de biomasa para la fermentación
de cerveza artesanal tipo ale.**

**Jorge Enrique Arce Vargas
Sergio Andrés Gutiérrez Luna**

**Director (a)
Dr. Carlos Aranaga Arias
Director (a)
Dra. Daniela Arturo Terranova**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de ciencias básicas
Programa de Microbiología
Cali, Colombia**

**Propagación de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y
aseguramiento de la calidad de biomasa para la fermentación
de cerveza artesanal tipo ale.**

**Jorge Enrique Arce Vargas
Sergio Andrés Gutiérrez Luna**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar
al título de: Microbiólogo.**

**Director (a)
Dr. Carlos Aranaga Arias
Director (a)
Dra. Daniela Arturo Terranova**

**Línea de investigación:
Microbiología Industrial
Grupo de investigación:
GIMIA**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de ciencias básicas
Programa de Microbiología
Cali, Colombia**

Impactos

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico	La reutilización y propagación de la levadura <i>S. cerevisiae</i> de la cepa Kveik, genera una optimización de costos e insumos para la elaboración de nuevos lotes de cerveza tipo Ale.	Universidad Santiago de Cali, gremio cervecero, micro cervecerías artesanales.
Responsabilidad social	La ejecución del aseguramiento de la calidad de la biomasa de la levadura <i>S. cerevisiae</i> , permitirá garantizar una buena fermentación y manejo de cepas de levaduras para la elaboración de nuevos lotes de cerveza tipo ale, para brindar buena calidad a los consumidores.	Comunidad en general.
Científico	Los procedimientos realizados en este trabajo, motivará e impulsará a micro cervecerías artesanales para ejecutar nuevas técnicas de manejo de levaduras, también motivará a la formación de nuevos profesionales en microbiología, promoviendo investigación en la industria cervecera.	Comunidad científica, micro cervecerías artesanales.
Indicadores de Gestión	Impacta el indicador de gestión interna: Producción.	Universidad Santiago de Cali.
Tecnológico	No aplica.	No aplica.
Técnico	Fermentación alcohólica.	Universidad Santiago de Cali, micro cervecerías artesanales.
Ambiental	El principal impacto ambiental será la reutilización de lo que antes era un residuo de la cervecería como parte del proceso de producción, reduciendo la necesidad de adquirir nuevos insumos, lo que también resulta beneficioso para el medio ambiente.	Universidad Santiago de Cali, micro cervecerías artesanales.
Social	Proveer a microempresarios de la región de biomasa costos más bajos y de excelente calidad, favoreciendo su productividad.	Universidad Santiago de Cali, micro cervecerías artesanales, gremio cervecero.

Tabla de Contenido

RESUMEN.	5
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	6
2. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4. CONCLUSIONES	26
5. RECOMENDACIONES	26
6. AGRADECIMIENTOS	26
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	27
8. ANEXOS	30

PROPAGACIÓN DE LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae* Y ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE BIOMASA PARA LA FERMENTACIÓN DE CERVEZA TIPO ALE.

Jorge Enrique Arce Vargas¹, Sergio Andrés Gutiérrez Luna¹, Carlos Aranaga Arias¹, Daniela Arturo Terranova².

1. Grupo de investigación GIMIA, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, Cali, Valle del Cauca.
2. Posgrado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Valle del Cauca.

RESUMEN.

La levadura es un microorganismo fundamental en la producción de alimentos y bebidas, utilizada desde la antigüedad para fermentación de pan y bebidas alcohólicas. En la actualidad, el aumento en el consumo de cerveza elaboradas con *Saccharomyces cerevisiae* ha impulsado tanto la estandarización de los procesos industriales como la innovación en la elaboración artesanal. Esta dinámica ha diversificado la oferta, brindando al consumidor una mayor variedad de opciones y experiencias sensoriales. Este estudio se centró en dos etapas principales: el aseguramiento de la calidad de biomasa de levadura y la reutilización de la levadura a través de múltiples generaciones. En la primera etapa, se implementaron procedimientos para garantizar la calidad de la biomasa, incluyendo la recuperación de levadura, el lavado, y la evaluación de una curva de crecimiento y parámetros de calidad. Los resultados indicaron una viabilidad superior al 95% y una propagación escalonada efectiva, donde se realizó una producción de cerveza *India Pale Ale* con un contenido alcohólico del 5.7%. En la segunda etapa, se llevó a cabo un análisis de la reutilización de la cepa *S. cerevisiae* donde se realizaron once generaciones de reutilización de la levadura, durante las cuales se evaluaron parámetros fisicoquímicos y de atenuación. Los resultados mostraron que la levadura mantenía un rendimiento constante y eficiente a lo largo de las generaciones. Este enfoque integral destaca la viabilidad y la eficacia de la reutilización de la levadura.

Palabras clave: Propagación, levaduras, *Saccharomyces cerevisiae*, Cerveza artesanal, Kveik.

PROPAGATION OF YEAST *Saccharomyces cerevisiae* AND ASSURANCE OF BIOMASS QUALITY FOR THE FERMENTATION OF ALE BEER.

ABSTRACT.

Yeast is a fundamental microorganism in food and beverage production, used since ancient times for the fermentation of bread and alcoholic beverages. Today, the increased consumption of the beer made with *Saccharomyces cerevisiae* has driven both the standardization of industrial processes and innovation in craft brewing. This dynamic has diversified the market, offering consumers a wider variety of options and sensory experiences. This study focused on two main stages: ensuring the quality of yeast biomass and reusing yeast through multiple generations. In the first stage, procedures were implemented to ensure biomass quality, including yeast recovery, washing, and evaluating a growth curve and quality parameters. The results indicated a viability exceeding 95% and effective staggered propagation, with the production of an *Indian Pale Ale* beer with an alcohol content of 5.7%. In the second stage, an analysis of the reuse of *S. cerevisiae* was conducted, where eleven generations of yeast reuse were evaluated, including physicochemical parameters and attenuation. The results showed that the yeast maintained consistent and efficient performance across generations. This comprehensive approach highlights the feasibility and effectiveness of yeast reuse.

Keywords: Propagation, Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, Artisanal Beer, Kveik.

1. INTRODUCCIÓN.

A través de los años, la levadura se ha utilizado para la elaboración de diferentes productos de consumo humano como la cerveza **(1)**. *Saccharomyces cerevisiae* participa en la formación de aromas durante la fermentación de la cerveza debido a que transforma los ingredientes del mosto, en alcohol y compuestos aromáticos como alcoholes superiores, ésteres y compuestos de carbonilo **(2)(3)**. El aumento de la demanda de productos generados por este microorganismo ha fomentado la estandarización de los procesos industriales de producción de biomasa de la levadura *S. cerevisiae* **(4)**. Esto ha generado un crecimiento en el consumo de cerveza que ha ocasionado un gran interés en los aficionados para producir sus propios sabores **(5)**, a través de la fermentación artesanal **(6)**. El consumo de cervezas artesanales tipo *Ale* en Cali, Colombia, está experimentando un notable crecimiento. La variedad de estilos, aromas y sabores en las micro cervecerías artesanales de la región se debe al uso de diferentes ingredientes y métodos de producción **(7)**. Las cervezas se clasifican como “Ale” porque utilizan la levadura *S. cerevisiae*, que se caracteriza por su alta fermentación. Se caracteriza por realizar su metabolismo a altas temperaturas (19 a 25°C) y por mantenerse en la parte superior del fermentador **(8)**. Las cervezas *Ale* tienen diferentes estilos provenientes de países con historia cervecera como Bélgica, Alemania, Estados Unidos y Reino Unido, los estilos más representativos son: Pale *Ale*, trigo, IPA, Lambie, Stout, Porter y Amber *Ale* **(9)**. Sin embargo, la elaboración de estos productos conlleva a una inversión alta en materias primas. Las levaduras utilizadas para el proceso fermentativo en micro cervecerías artesanales de Cali para la elaboración de cerveza tipo *Ale* son importadas al país y adquiridas mediante distribuidores. Un buen ejemplo es, la levadura Kveik, que es una cepa de *S. cerevisiae*. Esta se caracteriza por ser una levadura de fermentación alta y rápida a elevadas temperaturas, alcanzando una atenuación completa entre 48 y 72 horas lo que permite un ahorro energético y la optimización de la capacidad de producción de la sala de fermentación **(10)**. Además, durante la fermentación, los residuos acumulados en el fondo del madurador se suelen descartar, sin saber que contienen levadura que se puede propagar y volver a usar para hacer cerveza **(11)**. Por lo tanto, implementar un proceso de propagación y reutilización con la levadura restante en la producción de cerveza podría disminuir este costo **(12)**. Esto se podría lograr a través de la propagación de la biomasa necesaria para la producción de cerveza a partir de inóculos existentes.

La propagación es una estrategia que permite replicar las células de manera controlada **(8)**. Su objetivo es producir grandes cantidades de levaduras con características conocidas, para llevar a cabo el proceso de fermentación, en el menor tiempo posible. La propagación de levaduras es esencial en una cervecería para poder garantizar la estabilidad genética, la viabilidad, la vitalidad y la cantidad de células (biomasa) necesarias para llevar a cabo una fermentación exitosa y, por ende, una cerveza excelente. comenzando con un volumen pequeño de cultivo madre y escalando su producción de biomasa logrando un inóculo suficiente para la preparación de una cerveza comercial. El escalado introduce células en crecimiento activo en un nuevo suministro de nutrientes para producir una cosecha de levadura en el estado fisiológico óptimo **(13)**. Además, existen sistemas automáticos para la propagación de la levadura cervecera que optimiza la eficiencia y calidad de la producción lo que permite el control preciso de condiciones como temperatura, pH y reduce los riesgos por contaminación. También, facilita la escalabilidad de cultivos y asegura trazabilidad, cumpliendo normativas de seguridad alimentaria garantizando un producto final de alta calidad e impulsan la innovación en la industria cervecera **(4)**.

En el año 2021, se implementó un sistema de propagación de levaduras para la elaboración de bebidas alcohólicas en la Cervecería Libre de Colombia S.A. Esto con el objetivo de minimizar los costos de preparación y hacer que el proceso de producción sea más rentable. Para esto se planteó un procedimiento técnico que permitiera la propagación de *S. cerevisiae* utilizando la técnica de hidratación de levadura y determinación celular, desde 100 millones hasta 3000 millones de células, que sirvieran como inóculo para alimentar un lote de 300 litros de cerveza **(5)**. El proceso de propagación resultó ser viable y asequible porque lograron obtener un producto con características similares, cumpliendo con sabores y olores más puros e identificables. Las

células propagadas presentaron un buen tamaño, mayor división celular y resultaron aptas para ser reutilizadas.

En Colombia, la industria de la cerveza artesanal está en una etapa emergente y de crecimiento importante, con el reto de desarrollar nuevas estrategias de producción que permitan aumentar la competitividad manteniendo la calidad y mejorando la rentabilidad del proceso (14). Cali una de las principales capitales del país, ha llevado una considerable evolución en la elaboración de cervezas, contando con una micro cervecería artesanal en crecimiento al sur de la ciudad con seis cervezas tipo *Ale* de diferente estilo, con una producción mensual de más de 10.000 unidades de cerveza artesanal. Pero, para lograr esta producción se requiere de una inversión de insumos e inóculos tales como, malta, lúpulo, nutrientes, sales industriales y levaduras. Una de las inversiones más costosa e importante es la levadura liofilizada de 500 gramos, con un valor de importación de un millón quinientos sesenta mil pesos colombianos (\$1'560.000 COP), el cual es un precio considerable para una cervecería en crecimiento.

La micro cervecería realiza una siembra de levadura liofilizada por tanque, cuando cumple todas sus fases fermentativas no se reutiliza (15). Se necesita un proceso de reutilización y propagación de levadura a partir de la biomasa sobrante de la fase de sedimentación, para ahorrar costos invertidos, dado que se gasta aproximadamente ochocientos gramos (800 g) de levadura liofilizada al mes, la gran ventaja de este proceso de reutilización es que se logra una fermentación rápida con células de levadura recuperada y se reduce el tiempo de producción, las desventajas de este proceso, es la contaminación que es un riesgo significativo al reutilizar levadura cervecera, ya que puede afectar la calidad de la cerveza. Además, el uso repetido de la levadura puede provocar mutaciones que alteren sus características originales y el perfil de sabor. También existe la posibilidad de acumular subproductos indeseables de fermentaciones anteriores, lo que impacta negativamente en el aroma y el gusto de la cerveza. Por otro lado, algunas cepas pueden flocular en exceso, complicando su recuperación. Para evitar estos problemas, es fundamental seguir buenas prácticas en el manejo y almacenamiento de la levadura (16). Por los motivos previamente expuestos, en el presente estudio se evalúa un método alternativo para la reutilización levadura *S. cerevisiae* de la cepa Kveik en cervezas artesanales tipo *Ale*, evaluando la calidad de la biomasa propagada para la implementación de un segundo proceso fermentativo y por último determinar las generaciones de reutilización de la levadura *S. cerevisiae*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Localización

Este proyecto se realizó en los laboratorios e instalaciones de la Universidad Santiago de Cali, tomando en cuenta todos los protocolos de bioseguridad y las normas de gestión de calidad ISO 9001.

2.2 Recolección de información

En este trabajo de busco información científica en diferentes bases de datos que permitió desarrollar una propuesta metodológica, para implementar un proceso de propagación de levadura a diferentes escalas, para esto, se aplicó la metodología propuesta en el libro guía "The Yeast in the brewery" de los autores Gerolf Annemuller, Hans-J Mangery, Peter Lietz.

2.3 Cepas de levaduras cerveceras

En este estudio se trabajó con levaduras fabricadas en *LalBrew Premium series*® (LALLEMAND) **Levadura Kveik Ale** que corresponde a la especie *S. cerevisiae*, cepa de fermentación alta (*Ale*), originaria de Austria, la cual se caracteriza por poseer una eminente capacidad fermentativa (4).

2.4 Etapas de procedimiento

Se realizaron dos etapas en este estudio, la primera etapa consistió en una evaluación de la calidad de la biomasa de la levadura *S. cerevisiae*, donde se realizaron técnicas de manejo de levadura para una evaluación de la calidad de la biomasa, procedimientos de recuperación, lavado, determinación de viabilidad, vitalidad, evaluación preliminar de curva de crecimiento,

siembras por agotamiento, morfología, propagaciones escalonadas para la elaboración de una cerveza tipo *A/e* realizando pruebas fisicoquímicas y organolépticas para determinar sus características fermentativas.

Se realizó una prueba preliminar de evaluaciones de calidad y manejo de levadura para realizar una reutilización. La segunda etapa es una reutilización y determinación de levadura *S. cerevisiae* en tanques de fermentación de 450L, realizando un aseguramiento de la calidad de la biomasa.

2.5 Evaluación de la calidad de la biomasa de la levadura *S. cerevisiae*

2.5.1 Procedimiento para la recuperación y lavado de la levadura

Para la propagación de levadura, se recuperó la levadura *S. cerevisiae* de dos estilos de cervezas, Baltic Porter y Sauer elaboradas en la institución (160g de cepa liofilizada e inoculada en tanques de fermentación de 350L), que había sido utilizada para la elaboración de un lote anterior.

Primero se realizó un aislamiento de materiales e insumos en el que se esterilizó a través de autoclave el material de vidrio necesario y el agua.

Segundo, para la toma de la muestra de biomasa se realizó una purga del cono del tanque colocando una manguera de recuperación, previamente esterilizada en la abertura del cono fermentador (**figura 1**). La zona del cono se desinfectó con alcohol al 70%. Posteriormente, se abrió suavemente, permitiendo que todos los residuos de la fermentación fueran liberado; seguidamente en un frasco estéril, se transfirió la levadura almacenada en el fondo del tanque.

Posteriormente, se vertieron 250mL de agua estéril, cuya temperatura estaba en los 4°C, se realizó una agitación para mezclar completamente el sedimento con el agua y se dejó en reposo por 10 minutos en refrigeración, para permitir que las partículas más pesadas, como el lúpulo y la malta, se asentaran en el fondo del recipiente. Después de este proceso se observó la formación de tres fases, la superior que corresponde al agua, la del medio a la levadura y la tercera al sedimento de malta, lúpulo y materiales más pesados de las cuales la fase del medio que contenía la levadura fue recuperada. Este procedimiento se realizó tres veces, para una mejor calidad de la levadura. Se conservó 150mL de la levadura lavada durante 48 horas para prevenir la aparición de aromas y sabores indeseados (**17**).

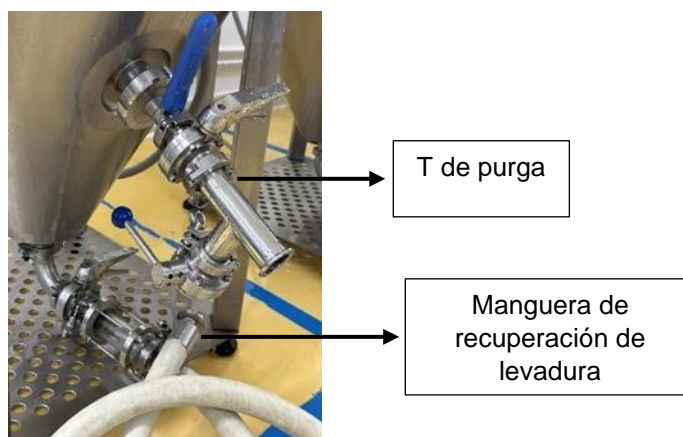


Figura 1. Modelo de recuperación en tanque de fermentador.

2.5.2 Determinación de la viabilidad celular mediante el recuento en Cámara de Neubauer

Para determinar la viabilidad celular, se realizó conteo en cámara de Neubauer a partir de una dilución 1:200 de la suspensión de levadura recuperada usando como diluyente, con azul de metileno para diferenciar las células viables como se observa en la **figura 2**. La muestra se agitó adecuadamente para garantizar su homogeneidad. Antes de la medición se limpió la cámara de Neubauer y el cubreobjetos con agua destilada, secándolos suavemente con papel para evitar contaminaciones. Luego, se colocó el cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer, asegurando que cubriera uniformemente el área de recuento (**18**).

Las muestras de levadura se homogenizaron durante 5-10 segundos en un agitador tipo vórtex, inmediatamente después de la agitación, se tomaron muestras de levadura utilizando una micropipeta, aplicándola en una de las ranuras de la cámara de forma que se logró distribuir bien por capilaridad en el área de recuento y poder permitir que las células se depositen en la cámara, para poder realizar el conteo (5).

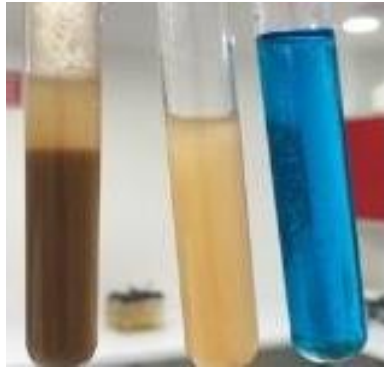


Figura 2. Diluciones añadiendo azul de metileno para determinación de viabilidad.

2.5.2.1 Procedimiento de recuento

Se determinó la cantidad de células existentes observando la cámara en el microscopio, con la finalidad de obtener una buena precisión de resultados en el conteo, los recuentos se realizaron por duplicado para cada muestra, repitiendo tanto el proceso de llenado de la cámara como el conteo. Las células en gemación se consideraron como única célula cuando la célula hija tiene un tamaño inferior a la mitad de la célula madre, caso contrario, deben contar como dos células (5). Se realizó el conteo a cinco recuadros distribuidos de manera cruzada, como se observa en la figura 3. Se realizó el procedimiento por duplicado.

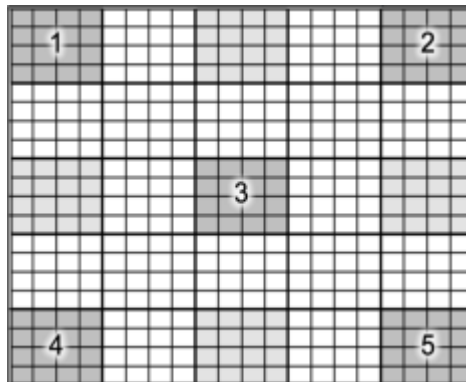


Figura 3. Recuadros Cámara de Neubauer.

Expresión de los resultados para el recuento total: la población de la muestra es expresada como células/mm³:

$$\text{Células/mm}^3 = N^{\circ} \text{ de células} / \text{profundidad} \times \text{área} \times \text{factor dilución}$$

Ecuación 1. Recuento de levaduras (5).

Donde:

Células/mm³= concentración final de células en la muestra original (por cada milímetro cúbico).

Nº de células= total de células contadas en un área específica de la cámara.

Profundidad= profundidad estándar de la cámara (0.1mm)

Área= área del cuadrado donde se realizó el conteo (mm²)

Factor de dilución= número de veces que se diluyo la muestra.

2.5.2.2 Determinación de la viabilidad celular

Una célula de levadura es viable cuando puede reproducirse. Las células viables tienen una enzima capaz de decolorar el azul de metileno; cuando las células de levadura entran en contacto con el colorante, éste se introduce en todas las células, pero solo lo metabolizan las células vivas.

Por ende, se debe diferenciar entre células muertas y células vivas examinándose en un microscopio; las células no viables se tiñen y las células vivas no se tiñen (19).

Se realizó una tinción con azul de metileno, mezclándolo con las muestras de levaduras, se homogenizaron durante 5 a 10 segundos en un agitador tipo vórtex. Las muestras se tomaron inmediatamente después de la agitación empleando una micropipeta, colocando la punta de la micropipeta en las ranuras de la cámara Neubauer de forma que la muestra se distribuya por capilaridad en el área de recuento. El recuento se realizó siguiendo las mismas consideraciones indicadas en el procedimiento de recuento celular (20).

La viabilidad se expresó con el porcentaje de células no teñidas, para este porcentaje se realizaron los cálculos de viabilidad que se expresan como:

$$\%Viabilidad = \frac{N^{\circ}Células\ viables}{N^{\circ}Células\ totales} \times 100$$

Ecuación 2. Porcentaje de viabilidad celular (21).

2.5.3 Determinación de vitalidad

Para determinar la vitalidad, se realizó la prueba de poder de acidificación (PA) utilizando 10 mL de la levadura KVEIK Ale recuperada. La levadura se almacenó a 4 °C, con el fin de obtener una gama completa de valores de vitalidad (22). Para la medición del PA, se colocaron 3 mL de levadura en un vaso de precipitados de 25 mL, se hidrató la levadura y se agregaron 10 mL de agua destilada. Para determinar el poder de acidificación, se midió el pH del medio antes de iniciar la fermentación y se registró este valor como el pH inicial. A los 10 minutos se añadió 0.5 mL de glucosa (20.2% p/v) y se realizó una medición de pH, repitiendo la medición a los 20 minutos y al finalizar el experimento tras una hora. El poder de acidificación (PA) de la levadura se determinó calculando el cambio en el pH (Δ pH) en cada intervalo de tiempo.

2.5.3.1 Cálculos de poder de acidificación

- Δ pH a los 10 minutos (Δ pH 10min): Δ pH 10min= pH inicial-pH a los 10min
- Δ pH a los 20 minutos (Δ pH 20min): Δ pH 20min= pH inicial-pH a los 20 min
- Δ pH final (Δ pH final): Δ pH final (después de 1 hora) = pH inicial-pH final

Estos cálculos permiten cuantificar la capacidad de la levadura para acidificar el medio, proporcionando una medida de su vitalidad en diferentes etapas del proceso de fermentación.

La vitalidad de la levadura se puede interpretar según la escala de PA obtenida:

- Alto poder de acidificación ($PA \geq 2$): indica una levadura altamente viable y activa, capaz de producir una cantidad significativa de ácido.
- Moderado poder de acidificación ($1 \leq PA < 2$): indica una levadura viable con una capacidad moderada de producir ácido.
- Bajo poder de acidificación ($PA < 1$): indica una levadura con baja viabilidad o inactiva, con una capacidad limitada para producir ácido.

2.5.4 Siembra por agotamiento

Para la siembra por agotamiento se utilizó el agar Yeast Glucose Chloramphenicol (YGC). Es un medio de cultivo recomendado para el aislamiento y desarrollo de hongos, también es útil para el cultivo de levaduras. Está compuesto por 20g/L de glucosa, 0.1g/L de Cloranfenicol, 5g/L de Extracto de levadura y 12g/L de agar bacteriológico. Se esterilizó a 121°C durante 15min, posteriormente, el medio se dejó enfriar a 50°C y se suspendió en las placas (23).

Una vez determinada su viabilidad, se seleccionó la levadura recuperada que presentaba una viabilidad superior al 95%. Se realizó una siembra por agotamiento utilizando el método del cuadrante (24). Las muestras fueron incubadas a 25°C durante 5 días. Se seleccionaron las colonias más aisladas, se volvieron a sembrar e incubar a 25°C durante 5 días. Luego se procedió a observar su morfología.

2.5.5 Prueba preliminar para evaluación de crecimiento de la levadura *S. cerevisiae*

Para evaluar el crecimiento de *S. cerevisiae*, se inoculó un cultivo de *S. cerevisiae* KVEIK en un medio de cultivo fresco, utilizando 3mL de un inóculo con una densidad inicial de 1.017g/mL. Los cultivos se incubaron a 23°C y se tomaron muestras a intervalos regulares durante las primeras 13 horas, debido a las restricciones de tiempo del laboratorio. Se realizó el recuento de las células de acuerdo con el procedimiento 2.5.2 y 2.5.2.1.

Los datos obtenidos se representaron gráficamente para construir una curva de crecimiento, permitiendo identificar y cuantificar las fases latencia, exponencial, estacionaria y potencialmente, de muerte. Este análisis proporciona información valiosa sobre la tasa de

crecimiento específica, el rendimiento celular y la influencia de diferentes factores en el desarrollo del cultivo.

2.5.6 Propagación de levadura

Se realizaron tres escalados para evaluar la levadura durante su propagación y crecimiento, analizando la calidad de la biomasa y su capacidad fermentativa mediante pruebas fisicoquímicas y organolépticas. Una vez confirmada la calidad de la biomasa inicial, se verificaron su viabilidad y vitalidad, asegurando que el porcentaje fuera conveniente para la inoculación en los tanques de fermentación (26). Esta recuperación se llevó a cabo con el fin de evaluar todos los parámetros de calidad y manejo de levadura requeridos en una planta cervecera, con el objetivo de elaborar una cerveza tipo *Ale* de 25L, como se muestra en la **figura 4**.

Para la propagación de la levadura, siguiendo los parámetros de calidad, se utilizaron matraces Erlenmeyer estériles de diferentes tamaños para cada etapa del proceso. En el primer escalado, se empleó un Erlenmeyer de 250mL con 25mL de levadura recuperada, y el proceso se realizó durante 12 horas a una temperatura de 35°C, bajo condiciones de agitación constante para favorecer el crecimiento y la reproducción de la levadura. A continuación, se transfirió a un Erlenmeyer de 500mL para el segundo escalado, manteniendo los mismos parámetros de propagación, temperatura y agitación. Finalmente, en el tercer escalado, se utilizó un Erlenmeyer de 1000mL, en el cual se inocularon 40mL de levadura.

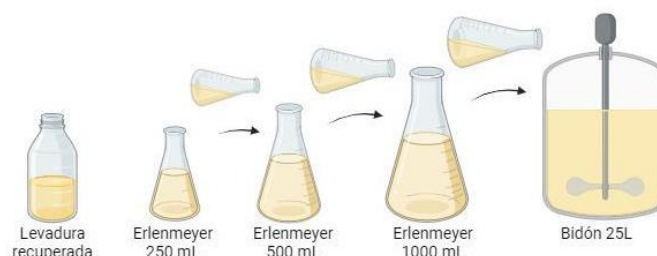


Figura 4. Escalado de propagación.

2.5.7 Elaboración de una cerveza tipo *Ale* con levadura propagada

Se realizó una maceración de malta Pale Ale y Múnich 3, para la elaboración de un mosto estándar. Se pasó a hervir el mosto, agregando lúpulo centenal, cascade y amarillo, se le agregó extracto de lúpulo citra y mosaic, por último, se le agregó nutriente de levadura al hervido, para un mejor crecimiento y reproducción. Se utilizó un bidón de 25L para pasar el mosto estándar elaborado, con la biomasa obtenida del procedimiento de propagación. La cerveza contó con cinco días fermentativos en los cuales se determinaron pruebas fisicoquímicas y atenuación a la cerveza.

2.5.7.1 Inoculación al bidón de 25L

El bidón de 25L fue sanitizado utilizando detergentes y alcohol al 70%. Luego, se le agregaron 20L de mosto previamente preparado y se incorporó 1L como inóculo proveniente del escalado de propagación. A continuación, se dejó crecer el cultivo durante el tiempo de crecimiento estipulado, realizando pruebas fisicoquímicas a lo largo del proceso.

2.5.7.2 Atenuación de la cerveza para evaluar la capacidad fermentativa

La atenuación es el porcentaje de azúcares del mosto que son convertidos en alcohol y CO₂ gracias a la fermentación (27). Para calcular la atenuación, se determinó la densidad del mosto antes de la inoculación con levadura y luego de haber finalizado el proceso de fermentación.

2.5.7.3 Densidad

Se determinó la densidad del mosto y de la cerveza fermentada mediante el uso de un densímetro en dos etapas del proceso de elaboración. Inicialmente, tras la cocción, se extrajo una muestra del mosto, la cual se colocó en una probeta y se midió la densidad utilizando el densímetro, que indica la concentración de azúcares, proporcionando así la densidad inicial. Durante la fermentación, se realizaron mediciones diarias para observar la evolución de la densidad. Finalmente, se tomó una muestra de la cerveza ya fermentada y se repitió el proceso

de medición para obtener la densidad final, lo que permitió evaluar el progreso y la eficacia de la fermentación (28).

2.5.7.4 Grados plato

Se realizó la medición de los grados plato, que es la unidad que mide la densidad del mosto o de la cerveza. A mayor densidad, más azúcares fermentables y por lo tanto más alcohol en la cerveza final. Se utilizó un refractómetro para la medición.

2.5.7.5 pH

Se midió el pH de la cerveza en fermentación utilizando un medidor de pH. Para ello se tomó una muestra de la cerveza en un vaso de precipitados y se registró el pH. Este procedimiento se repitió diariamente con el fin de monitorear el comportamiento del pH a lo largo del proceso de fermentación y así evaluar la capacidad fermentativa de la levadura propagada (30).

2.6 Reutilización de las levaduras y determinación de generaciones

Se realizaron reutilizaciones de la levadura *S. cerevisiae* gracias a las técnicas de manejo de levadura que se realizó en el apartado 2.5. En un tanque de fermentación de 450L como se observa en la **figura 5**, se realizó un aseguramiento de la calidad de la biomasa de levadura de un lote de cerveza anterior, se recuperaron 50mL de levadura evaluando sus parámetros de calidad. Se determinó la viabilidad y la vitalidad, se observaron las pruebas fisicoquímicas descritas anteriormente para determinar su capacidad fermentativa y su comportamiento durante los procesos de fermentación. Este procedimiento se realizó once veces en diferentes lotes de cerveza, pero con la misma biomasa de levadura inoculada en su primer proceso fermentativo.

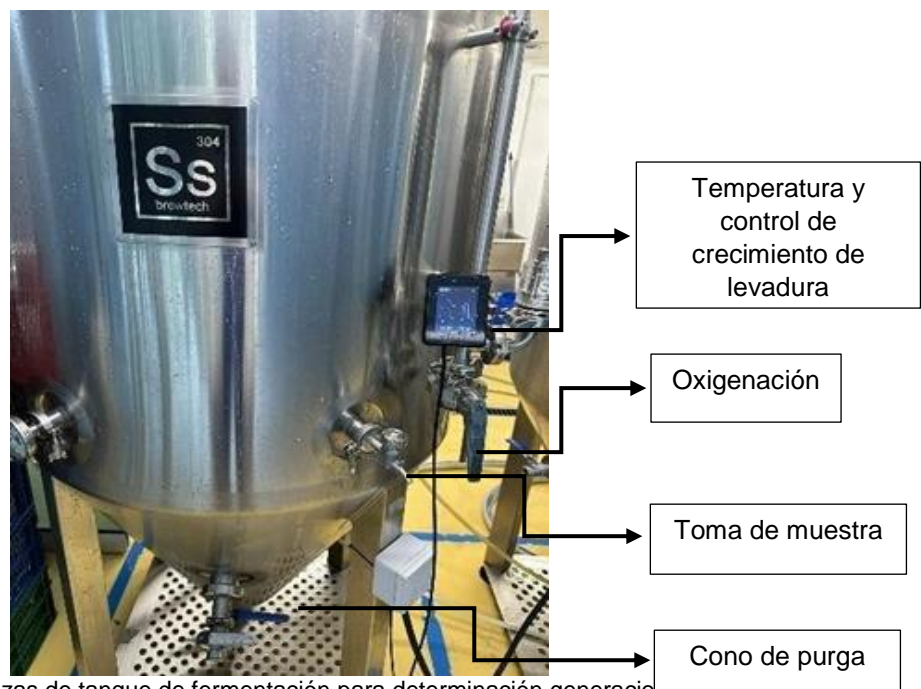


Figura 5. Piezas de tanque de fermentación para determinación generacionales.

2.6.1 Pruebas fisicoquímicas

Para cada reutilización se realizó atenuación a la cerveza, densidad, pH y grados plato con la metodología descrita anteriormente.

2.6.2 Estilos de cervezas utilizadas

Para las reutilizaciones de levadura en las primeras once generaciones, se realizaron con el estilo de cerveza Sauer debido a que es el estilo con más producción en la planta cervecera de las instalaciones de la Universidad Santiago de Cali.

Para las reutilizaciones de levadura en el duplicado, se realizaron con los estilos Sauer y Wee heavy, para determinar características de la levadura en diferentes procesos fermentativos y estilos de cerveza.

2.6.3 Pruebas organolépticas

Por último, se realizó test organoléptico con el maestro cervecero Carlos Marino Orejuela Mejía, donde determinaron vista, gusto y olfato del lote nuevo, verificando que la levadura propagada cumpla con los estándares requeridos para la cerveza fermentada en las instalaciones de la Universidad Santiago de Cali.

Cada procedimiento mencionado se realizó por duplicado para asegurar la calidad de los resultados.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LA BIOMASA DE LA LEVADURA *S. CEREVISIAE*

3.2.1 Recuperación de levadura *S. cerevisiae* de la cepa Kveik en fase de sedimentación

Después de la fermentación de un lote de cerveza, la levadura *S. cerevisiae* de la cepa Kveik cae al fondo del fermentador en su fase estacionaria debido a la falta de nutrientes y al aumento del alcohol. Esta levadura puede ser reutilizada y propagada para nuevos lotes, siempre que se realice un proceso de aseguramiento de la calidad.

En la **figura 6.A**, se observa la recuperación de levadura de un lote de Baltic Porter, que se caracteriza por notas frutales oscuras, caramelo y un aroma maltoso balanceado como se observa en **Anexo 1**. Los resultados indican que la cepa evaluada posee las características necesarias para su propagación y reutilización, respaldadas por pruebas sensoriales que destacan su idoneidad para futuros lotes. La levadura mostró una notable capacidad fermentativa, completando una buena fermentación en cinco días para la cerveza Baltic Porter. Se recolectó una levadura con un aspecto adecuado de sedimentación y un olor floral, sin evidencias de oxidación, envejecimiento ni otros defectos olfativos. Así, la levadura cumplió con los parámetros organolépticos necesarios para su recolección.

Por otro lado, en la **figura 6.B**, se muestra el duplicado de la recolección de levadura de un lote de cerveza estilo Sauer, utilizando tubos centrífugos como método alternativo de recuperación. Este proceso también cumplió con los parámetros organolépticos, presentando buenos olores, textura adecuada y capacidad fermentativa en el lote anterior.

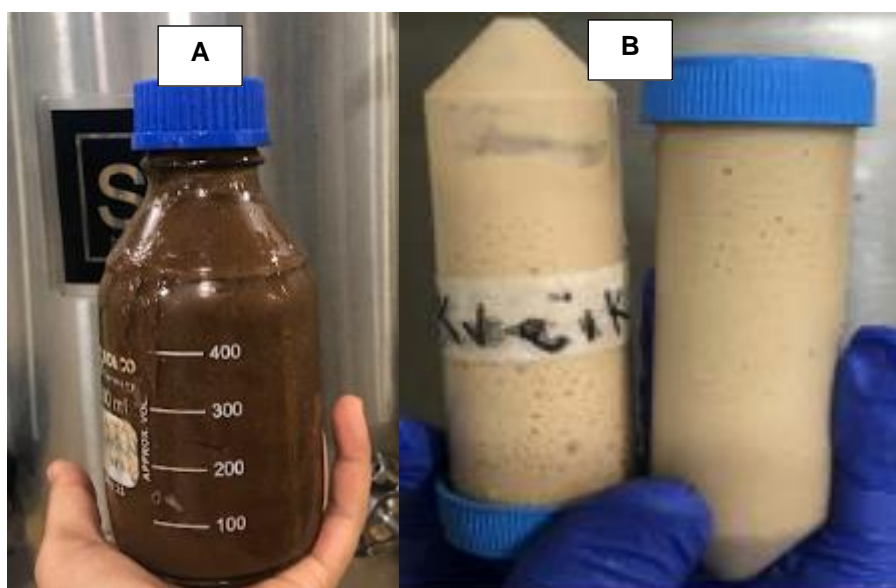


Figura 6. Recuperación de levadura *S. cerevisiae* de la cepa Kveik **A.** recuperación estilo Baltic Porter. **B.** recuperación estilo Sauer

Se logró una recuperación de levadura, debido a que la cepa Kveik es conocida por su alta capacidad fermentativa y su tolerancia a temperaturas elevadas, lo que convierte en una opción adecuada para la producción de diversos estilos de cerveza. Este procedimiento es positivo según otros estudios de propagación como el de Cruz y Meyer (2020), dado que la levadura recuperada debe presentar buen aspecto de sedimentación, olores agradables y ausencia de olores de oxidación o envejecimiento. Esto quiere decir que la biomasa que se obtuvo en el momento de la recuperación es adecuada para una evaluación de calidad.

3.2.2 Lavado de levadura *S. cerevisiae* de la cepa Kveik en fase de sedimentación

Posterior a la recuperación de la levadura, se realizó el lavado de esta, obteniendo los siguientes resultados. En la **figura 7. A.** se observa un lavado de levadura *S. cerevisiae* con una separación heterogénea de tres etapas, la primera está el agua agregada para el lavado, la segunda etapa la levadura recuperada y la tercera etapa los sedimentos de malta y lúpulos. En la **figura 7. B.** se observa una separación del agua y levadura, con un color claro por parte de la levadura, dejando atrás sedimentación que no necesitaba.

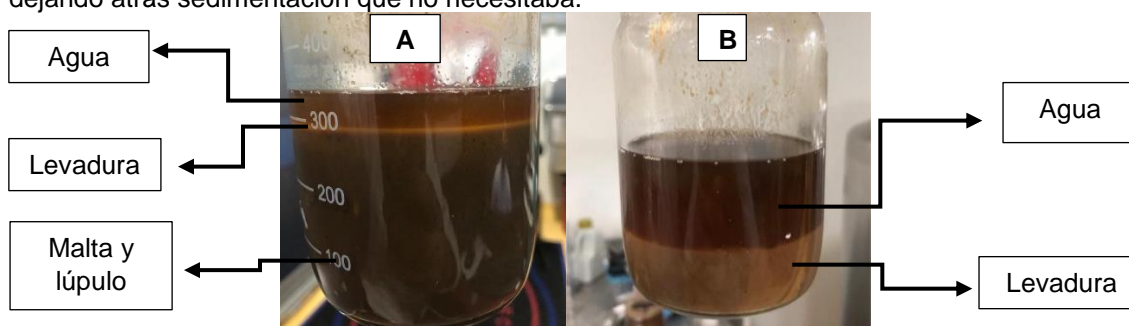


Figura 7. Lavado de levadura *S. cerevisiae* de la cepa Kveik **A.** separación de agua, levadura y sedimentos de malta. **B.** levadura lavada.

Para este proyecto se realizó un lavado de levadura, dejando atrás sedimentos de malta y lúpulos, repitiendo el proceso varias veces para garantizar óptimos resultados. debido a que un lavado deficiente puede resultar en un estrés adicional para la levadura, lo que puede afectar en su viabilidad, vitalidad y aseguramiento de la calidad de la biomasa para reutilización y propagación (36).

3.2.3 Recuento celular

Como se observa en la **figura 8**, la muestra de Baltic Porter contabilizó 172 células viables/mL, lo que equivale a una concentración de 1.48×10^9 células/mL (tabla 1). En contraste, la muestra de Sauer mostró una mayor densidad, con 201 células viables/mL y una concentración de 4.57×10^9 células/mL. Esta diferencia se atribuye al mayor volumen de inóculo utilizado en la elaboración de la cerveza Sauer, lo que favorece un crecimiento y producción de biomasa de levadura más altos durante la fermentación.

Los resultados indican que ambas muestras poseen una población de levaduras viable y suficiente para garantizar una fermentación eficiente; sin embargo, la muestra de Sauer tiene una densidad celular significativamente mayor, lo que es coherente con las características típicas de este estilo de cerveza y el protocolo de elaboración empleado.

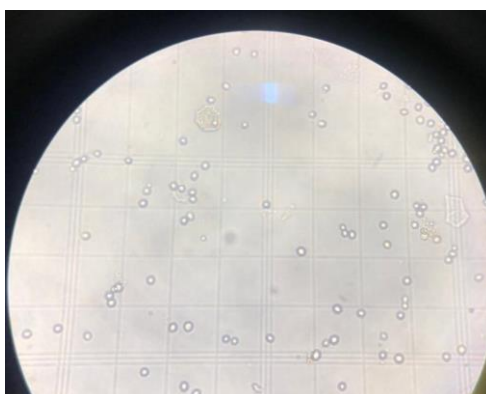


Figura 8. Recuento celular en cámara de *Neubauer* bajo el microscopio, con un aumento de 40x.

Los cálculos del conteo celular se realizaron con ayuda del programa Brew Meister (53). Especializado en procesos de producción de cerveza y específicamente en cálculos de cantidad de levadura, obteniendo los resultados encontrados en la **tabla 1**.

Tabla 1. Recuento de levaduras

Recuento de levaduras		
Ensayo	Levaduras/mL	Desviación estándar
Levadura recuperada de cerveza estilo Baltic Porter	1.48×10^9	$0.24 \times 10^9 \sigma$
Levadura recuperada de cerveza estilo Sauer	4.57×10^9	$2.48 \times 10^9 \sigma$

La concentración celular de levaduras, especialmente de la cepa Kveik, es crucial en la elaboración de cerveza. Conocida por su rápida fermentación a altas temperaturas y buenas características, la Kveik requiere una concentración celular adecuada para obtener resultados óptimos (34). Esta concentración afecta la eficiencia de la fermentación, la producción de aromas no deseados y la atenuación del mosto; una concentración baja puede provocar fermentaciones lentas o incompletas y sabores indeseables.

Factores como la cepa específica de Kveik, las condiciones de fermentación y las prácticas de manejo de levaduras influyen en esta concentración (16). Según Albarracín (2020), la concentración celular para la reutilización de levadura puede variar según el estilo de cerveza y las preferencias del cervecero. Para un inicio de fermentación exitoso, se recomienda una concentración de 5 a 10 millones de células por mililitro (mL) en el mosto de cervezas tipo Ale. En este estudio, se determinaron concentraciones superiores a 10 millones de células en las levaduras recuperadas (tabla 1), lo que indica que son aptas para una posible fermentación completa. Este resultado se atribuye a la correcta elección de la cepa y a la eficiencia en su recuperación.

3.2.4 Determinación de la viabilidad celular

La determinación de la viabilidad de una levadura es esencial para evaluar su tasa de crecimiento o mortalidad (18). Según las normas de control de calidad de diversas empresas cerveceras, la viabilidad de la levadura debe superar el 95% para garantizar que las cervezas producidas mantengan características similares a las obtenidas con levadura nueva. En la **tabla 2** se observa que la viabilidad de la levadura recuperada para el estilo Baltic Porter es del 96%, lo que indica que cumple con el requisito para su reutilización o propagación. Este resultado refleja una buena recolección de levadura, permitiendo su uso en los siguientes procedimientos.

Tabla 2. Porcentaje de viabilidad celular determinadas en cada ensayo.

Viabilidad celular		
Ensayo	Porcentaje de viabilidad	Desviación estándar
Levadura recuperada estilo Baltic Porter	96.28% levaduras/mL	0.089σ
Levadura recuperada estilo Sauer	98.32% levaduras/mL	0.028σ

En la **tabla 2**. Se determinó la viabilidad de los ensayos de levadura recuperada estilo Baltic Porter con 172 vivas y 5 muertas con un porcentaje de viabilidad de 96.28%. Para el ensayo de la levadura recuperada estilo Sauer, se determinaron 201 vivas y 3 muertas con un porcentaje de viabilidad del 98.32%.

Para la levadura recuperada estilo Sauer el porcentaje de viabilidad dio 98% y también cumple con más del 95%. Esto quiere decir que la viabilidad obtenida fue mayor a otros porcentajes de viabilidad de otros estudios como el de Albarracín (2020), que determino una viabilidad en el mosto de fábrica del 88% y una viabilidad en YM de 82% o el estudio de Cruz y Mayer (2020)

que obtuvo una viabilidad del 91%. Estos resultados pudieron ser afectados por diferentes factores: almacenar la levadura recuperada en cadena de frío unos días antes de que se analizara la viabilidad, otro factor que pudo afectarles es una posible contaminación al momento de extraer la levadura del tanque de fermentación y por último una posible floculación que afecte de manera directa la viabilidad de la levadura obtenida. Por estos factores en este presente proyecto se realizaron seguimientos a los parámetros de recuperación, cumpliendo un buen manejo de levadura la cual no afectara la viabilidad en el momento de la recuperación, también influye mucho la elección de cepa utilizada para estos procedimientos, ya que facilita el trabajo realizado.

Estos datos muestran el buen manejo de recuperación y lavado que se realizaron para una evaluación de calidad, también la elección de la cepa Kveik para las fases experimentales de este proyecto.

3.2.5 Morfología de la levadura *S. cerevisiae* de la cepa Kveik

Bajo el microscopio, con un aumento de 40x, se pudo observar en la **figura 9**, células en distintas etapas del proceso de gemación, desde células madre hasta células hijas pequeñas. Este proceso de reproducción asexual, común en las levaduras, consiste en la formación de nuevas células hijas a partir de pequeñas protuberancias en la superficie de la célula madre **(10)**.

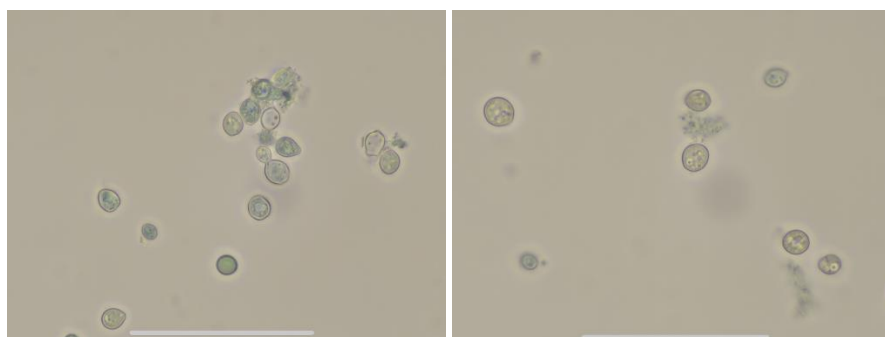


Figura 9. Microscopía de *S. cerevisiae* de la cepa Kveik.

Aunque las cepas de Kveik generalmente muestran características típicas de *S. cerevisiae*, pueden presentar variaciones dependiendo de la cepa específica y las condiciones de cultivo. Estas variaciones morfológicas y de tamaño celular son el resultado de una combinación de factores genéticos, ambientales y de selección a lo largo del tiempo **(38)**. La selección de cepas específicas para su uso continuo en la producción de cerveza podría haber favorecido aquellas con morfologías más grandes, que ofrecen ventajas en términos de rendimiento o características de fermentación **(11)**.

3.2.6 Determinación de vitalidad

La determinación de la vitalidad celular de una levadura es crucial para estimar su capacidad de reproducción y actividad metabólica **(15)**. En la tabla 3 se presentan los resultados de las pruebas de acidificación: la levadura recuperada del estilo Baltic Porter mostró un poder de acidificación (PA) de 1.08, mientras que la Sauer alcanzó 1.12, con desviaciones estándar de 0.005 y 0.022, respectivamente. Estos valores, superiores a 1, indican un poder de acidificación moderado, lo que sugiere que las levaduras son viables y metabólicamente activas, con capacidad para producir ácidos y realizar fermentaciones de manera eficiente en futuras elaboraciones.

La acidificación se debe a la transformación de aminoácidos por pérdida de nitrógeno, lo que disminuye el pH del medio. Además, la producción de dióxido de carbono durante la fase de fermentación aerobia también contribuye a la reducción del pH. Aunque el poder de acidificación no es un método estandarizado para evaluar la vitalidad de la levadura cervecera, puede servir como un indicador preliminar; un pH bajo señala un alto poder de acidificación, mientras que un pH alto indica lo contrario.

Tabla 3. Determinación de vitalidad y poder de acidificación para cada ensayo

Determinación de vitalidad		
Ensayo	Poder de acidificación	Desviación estándar
Levadura estilo Baltic Porter	1.08	0.005 σ
Levadura estilo Sauer	1.12	0.022 σ

Se determinó que las levaduras recuperadas llevaron a cabo la fermentación de glucosa, produciendo ácidos como subproductos metabólicos. La disociación de estos ácidos en solución libera protones (H⁺), lo que reduce el pH del medio circundante. La vitalidad de la levadura, que refleja su capacidad de crecimiento y reproducción, se evalúa comúnmente mediante viabilidad celular y estado fisiológico. Según Cruz y Mayer (2020), durante la fermentación, los valores de pH para la levadura en un mosto caliente oscilan entre 5,0 y 5,2, mientras que, en la cerveza en fermentación, los valores se sitúan entre 4,2 y 4,3.

El estilo de cerveza Sauer se caracteriza por la fermentación láctica, donde las bacterias, como los lactobacilos, convierten azúcares en ácido láctico, contribuyendo significativamente a la acidez del producto final. En sus experimentos, Cruz y Mayer (2020) reportaron pH finales de 4,27 y 4,34, considerados óptimos para el consumo. No obstante, sería beneficioso realizar pruebas específicas de acidificación de la cepa recuperada para determinar con mayor precisión su capacidad acidificante, ya que la interacción entre levaduras y bacterias lácticas es fundamental en la producción de cervezas Sauer.

Para el estilo Sauer, se obtuvo un pH ácido debido a la acidificación que caracteriza este tipo de cerveza. Los resultados mostraron una producción de ácido considerable, con un poder de acidificación (PA) de 1.12, indicando una capacidad moderada para producir ácidos. Aunque Albarracín (2020) y Giraldo (2021) realizaron determinaciones de viabilidad, no evaluaron la vitalidad de la levadura propagada, lo que podría ofrecer una visión más completa del proceso fermentativo y su impacto en el producto final.

3.2.7 Siembra de la levadura *S. cerevisiae* de la cepa Kveik

Se realizó una siembra por agotamiento de la levadura recuperada de estilos Baltic Porter y Sauer, para la obtención de un cultivo propio, y determinación de colonias puras, para procesos de propagación, en la **figura 10**. Donde se muestra una considerable cantidad de colonias puras para la obtención de un cultivo propio. Este procedimiento fue realizado para observar la morfología en medio de cultivo YGC y para tener un banco de colonias puras para un cultivo propio.



Figura 10. Siembra por agotamiento de la levadura recuperada para obtención de colonias puras

Para un manejo de levadura en una planta cervecera es recomendable realizar siembras para la obtención de colonias puras y realizar procesos de almacenamiento o conservación de las cepas, para una futura optimización de tiempo y dinero. Este procedimiento se realizó para dejar una técnica de conservación o de almacenamiento a las micro cervecerías que quieran elaborar sus propias propagaciones. Diferentes estudios mencionan la importancia de realizar siembras para la conservación, pero no demuestran los procedimientos de una siembra para obtención de colonias puras. Debido a esto, en este proyecto realizó una siembra para la obtención de colonias puras y así asegurar a las micro cervecerías de obtener futuras propagaciones o conservaciones de levadura con cultivo propio.

3.2.8 Prueba preliminar para la evaluación de crecimiento de la levadura *S. cerevisiae*

En la **Figura 11** se evaluó una prueba preliminar de crecimiento de la levadura *S. cerevisiae* de la cepa Kveik, realizada a temperaturas de 30 a 35 °C para optimizar su desarrollo. Se llevaron a cabo recuentos celulares en la hora 0 y 1 antes del crecimiento, utilizando una cámara Neubauer. En estudios de crecimiento microbiano, la curva típica se divide en fases: adaptación, exponencial, estacionaria y de declive. Sin embargo, en este estudio solo se observó la fase exponencial, lo que plantea interrogantes sobre las condiciones del entorno y los parámetros experimentales.

El tamaño del inóculo, en este caso de 1×10^6 cél/mL, puede haber influido en la ausencia de la fase de adaptación, ya que una concentración inicial baja puede alterar el comportamiento del crecimiento celular, permitiendo una multiplicación rápida en un medio rico en nutrientes. Para futuros estudios, se recomienda considerar parámetros experimentales como temperatura, tasa de dilución, tamaño del inóculo, condiciones del medio y estrés ambiental para determinar adecuadamente una curva de crecimiento.

En la **Figura 12**, los datos de células/mL se transformaron a escala logarítmica para mejorar la visualización del comportamiento de crecimiento; no obstante, esta transformación no reveló cambios significativos en las tendencias observadas, indicando que la fase exponencial se mantuvo constante durante el período analizado. Los resultados sugieren que la hora de crecimiento inicial de la levadura Kveik abarca de la hora 1 a la hora 13, evidenciando su capacidad de reproducción y crecimiento. Aunque la cepa Voss Kveik tiene un tiempo de crecimiento como cualquier otra levadura cervecera, se destaca por su rápido crecimiento y fermentación, especialmente a altas temperaturas (**39**).

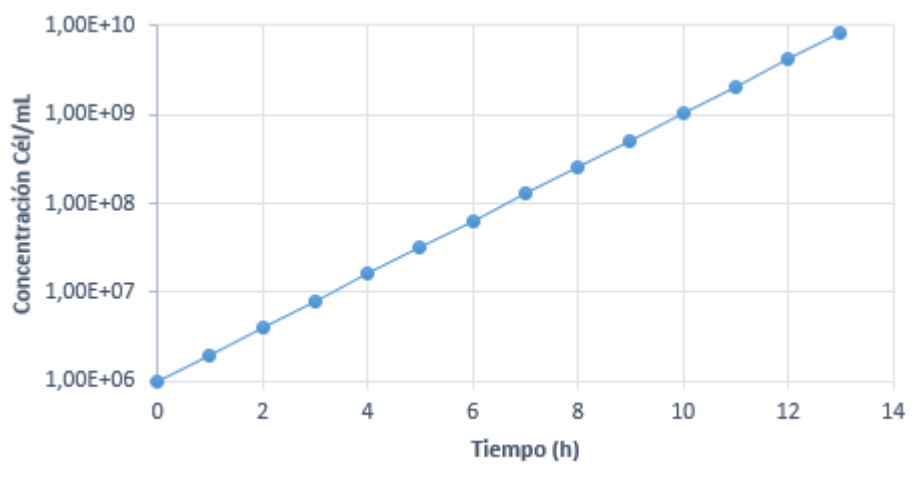


Figura 11. Evaluación de crecimiento de *S. cerevisiae* de la cepa Kveik concentración vs tiempo (h)

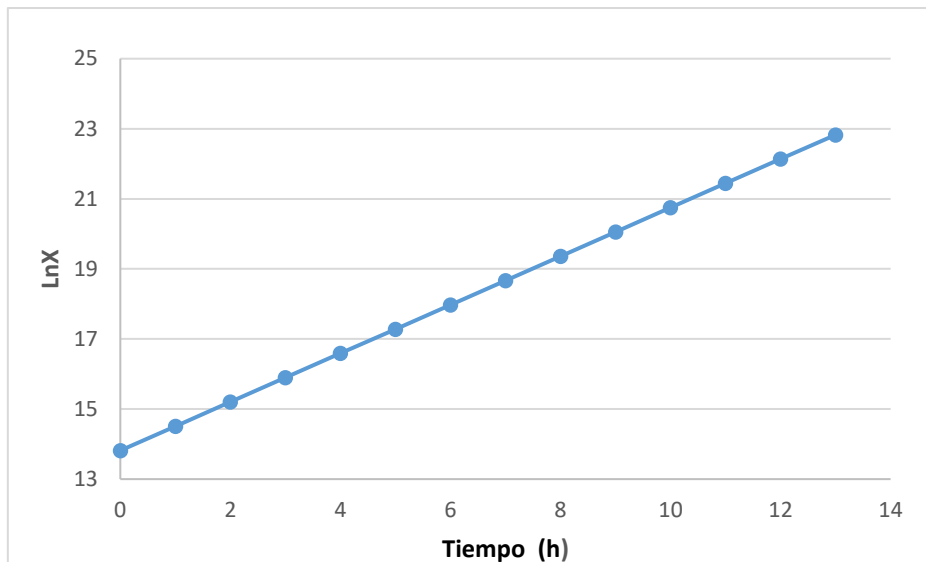


Figura 12. Evaluación de crecimiento de *S. cerevisiae* de la cepa Kveik LnX vs tiempo (h).

En este estudio se evaluó la levadura *S. cerevisiae* en un medio de cultivo específico, observándose un crecimiento exponencial con una tasa de duplicación celular de aproximadamente una hora y una tasa de crecimiento específica de 0.69 h^{-1} , manteniéndose hasta la hora 13. Estos resultados son consistentes con los reportes en la literatura sobre la cepa Kveik, que se caracteriza por su rápido crecimiento y una fase exponencial prolongada de 12 a 24 horas. Aunque no se alcanzó la fase estacionaria en este experimento, se sugiere que, al extender el tiempo de observación, el agotamiento de nutrientes y la acumulación de productos de desecho habrían reducido eventualmente la tasa de crecimiento. La cepa Kveik presenta una fisiología y metabolismo únicos, que contribuyen a su capacidad de mantener una fase exponencial prolongada. Esta cepa es altamente eficiente en el uso de nutrientes y presenta una elevada tolerancia al etanol y a temperaturas superiores a las óptimas para otras levaduras, lo cual reduce el impacto negativo de las condiciones ambientales y permite una fermentación continua sin una desaceleración temprana. Además, Kveik tiene un metabolismo que favorece la rápida conversión de azúcares, produciendo energía de manera eficiente, lo que facilita la adaptación rápida a su entorno y permite una división celular sostenida por más tiempo.

En el estudio de Sánchez (2024) señala la importancia de considerar la composición del medio, las características de la cepa microbiana y las condiciones de cultivo para entender mejor la curva de crecimiento observada. Estudios como los de Salazar (2020) y Cruz y Mayer (2020) realizaron curvas de crecimiento de hasta 192 horas, en las que se identificaron todas las fases de crecimiento de la levadura y su comportamiento en el medio. En este caso, la curva de crecimiento se limitó a 13 horas debido al tiempo disponible en los laboratorios de la Universidad Santiago de Cali, lo cual impidió extender las mediciones. Sin embargo, se alcanzó el objetivo de caracterizar el comportamiento de la levadura y su tiempo de duplicación durante la fase exponencial, proporcionando información relevante sobre su capacidad de adaptación y su viabilidad en condiciones de fermentación rápida.

3.2.9 Propagación de la levadura recuperada

En la **figura 13**. Se observa propagaciones de levadura escaladas, desde 250mL hasta 25L. en cada etapa, se obtuvo una cantidad adecuada de biomasa, lo que muestra la eficiencia del proceso. La figura ilustra visualmente los resultados obtenidos con diferentes tipos de mosto: un mosto oscuro con maltas especiales.



Figura 13. Propagaciones escalonadas de levadura recuperada y de colonias puras de la levadura *S. cerevisiae* de la cepa Kveik.

3.2.10 Elaboración de cerveza con levadura propagada

Se realizó la elaboración de un lote de cerveza estilo India Pale Ale como se observa en la **figura 14**, con la levadura propagada con sus procedimientos de escalonamiento donde la densidad inicial fue de 1.055g/mL, pH de 5.1 y grados plato de 13.7. Al pasar cinco días la levadura terminó su fermentación con una densidad final de 1.011 g/mL, pH de 4.1 y grados platos de 2.7. La cepa Kveik demostró ser una opción altamente viable para la elaboración artesanal de una India Pale Ale. Su capacidad fermentativa, evidenciada por la rápida atenuación y la producción de un perfil alcohólico acorde al estilo. La rápida fermentación, completada en tan solo cinco días, no solo optimizó el tiempo de producción, sino que también contribuyó a la obtención de una cerveza con características organolépticas muy definidas. Los aromas y sabores cítricos y resinosos, característicos del lúpulo cascade y centennial utilizado, se vieron realzados por los ésteres frutales producidos por la levadura Kveik, resultando en una cerveza con un perfil aromático complejo y balanceado. La ausencia de sabores fenólicos o diacetilo indica una fermentación limpia y eficiente.



Figura 14. Cerveza elaborada en tarros cerveceros con mosto estándar y levadura recuperada *S. cerevisiae* estilo Baltic Porter de la cepa Kveik. **A.** elaboración de cerveza de la levadura propagada en una garrafa cervecera de 25L. **B.** Cerveza estilo India Pale Ale.

Se comparó resultados con estudios previos realizados a escala industrial, se observó que la cepa Kveik puede adaptarse tanto a entornos de producción a gran escala como a micro cervecías artesanales. Sin embargo, es importante destacar que las condiciones de fermentación y las características del mosto pueden influir significativamente en el perfil sensorial final de la cerveza.

La capacidad de la cepa Kveik para fermentar a altas temperaturas y su tolerancia al alcohol la convierten en una herramienta valiosa para los cerveceros artesanales que buscan experimentar con diferentes estilos y perfiles de sabor. Además, su capacidad para producir una fermentación limpia y eficiente reduce el riesgo de contaminación y facilita la gestión del proceso de elaboración.

3.3 REUTILIZACIÓN DE LEVADURAS Y DETERMINACIÓN DE GENERACIONES

3.3.1 Reutilización de levadura *S. cerevisiae* de la cepa Kveik para determinación de generaciones

Se realizaron 11 generaciones de levadura con dos estilos de cerveza más comercializados en las instalaciones de la Universidad Santiago de Cali: Wee Heavy y Sauer. Ambos estilos comparten un proceso de elaboración similar, pero difieren en la cantidad de malta y alcohol. Las cervezas Wee Heavy tienen un alto contenido de malta, lo que les confiere un sabor dulce y herbal, comenzando con densidades altas. En cambio, las cervezas Sauer son ligeras y turbias, con un sabor principal a trigo y densidades bajas.

Se realizaron ocho generaciones de cervezas Sauer (Generaciones 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10 y 11) para mantener condiciones comparables, inoculándolas a las mismas temperaturas y oxigenándolas durante 10 segundos con O₂ para favorecer la fermentación. Por otro lado, se elaboraron tres generaciones de Wee Heavy (Generaciones 1, 5 y 8) a la misma temperatura que las cervezas Sauer, utilizando la misma cepa de levadura en todas las generaciones. Este proceso permite la reutilización de levadura, optimiza el tiempo y facilita fermentaciones rápidas a altas temperaturas. Sin embargo, se debe considerar el riesgo de estrés en las levaduras, aunque se tomaron precauciones durante todo el manejo. La reutilización es más efectiva cuando la levadura proviene de cervezas de baja gravedad, como Sauer, y se utiliza para fermentar cervezas de gravedad igual o superior, como Wee Heavy, asegurando la salud de la levadura. Se mantuvieron estrictas condiciones de limpieza para evitar contaminación y se utilizó la cepa Kveik, que es más tolerante a condiciones variables de fermentación y reutilización. Esto permite a los cerveceros programar el recultivo o la sustitución de cepas según sea necesario, garantizando que la levadura empleada esté en óptimas condiciones para producir un producto de calidad (44).

Generaciones 2,3,4,6 y 7 (Sauer): En las primeras cuatro generaciones, la levadura mostró una alta capacidad fermentativa, con el estilo Sauer. La atenuación se mantuvo en un 98% con alta viabilidad (96-97%) como lo indica la **figura 16**. Las generaciones seis y siete se destacaron por una rápida fermentación, adaptabilidad y eficiencia. Las diferencias en tiempos de fermentación y densidad final reflejan la adaptación de la levadura a distintos estilos y condiciones, como el pH y la densidad inicial del mosto.

Generaciones 1, 5 y 8 (Wee heavy): La primera, quinta y octava generación, con el estilo Wee Heavy, requirió un tiempo de fermentación más largo debido a la mayor densidad del mosto. Sin embargo, la viabilidad y eficiencia fermentativa se mantuvieron altas. Las generaciones siguientes, con el estilo Sauer, presentaron una reducción en los tiempos de fermentación y mantuvieron una alta atenuación, mostrando una adaptación continua de la levadura.

Generaciones 9 a 11 (Sauer): Las últimas generaciones destacaron por una rápida fermentación, especialmente con la levadura Kveik, que mostró adaptabilidad y eficiencia. La atenuación superó el 100% en varias ocasiones, y la viabilidad se mantuvo constante, indicando un proceso de fermentación robusto y eficiente a lo largo de todas las generaciones estudiadas. La novena generación se determinó una viabilidad del 95% inferior a las demás generaciones, ya que la levadura puede disminuir debido a una variedad de factores, tanto intrínsecos como extrínsecos. Estos factores pueden afectar la capacidad de la levadura para llevar a cabo sus funciones metabólicas y reproducirse.

Para las once generaciones, se obtuvo un poder de acidificación superior a 1.0, como se muestra en las **figuras 15**, lo que indica un moderado poder de acidificación, evidenciado en el procedimiento **2.5.3**. Este fenómeno se debe a la transformación de aminoácidos mediante la pérdida de nitrógeno, lo que provoca una disminución del pH en el medio. Estos resultados

destacan la capacidad de la levadura para mantener un alto rendimiento fermentativo en diversas condiciones, adaptándose eficazmente a los cambios en el estilo de cerveza y las características del mosto.

En comparación, la cepa US-05, una levadura estadounidense comúnmente utilizada, presenta una viabilidad del 80-90% a temperaturas moderadas de 18 a 22 °C, porcentaje inferior al de la cepa Kveik en este estudio, que muestra mayor adaptabilidad a condiciones estresantes, siendo adecuada para fermentaciones rápidas y a altas temperaturas. Kveik demostró la capacidad de reducir el pH a niveles de 3.8 a 4.0, lo que indica un notable potencial para producir ácidos orgánicos, como el ácido láctico y acético. En contraste, la cepa US-05 reduce el pH a niveles de 4.0 a 4.3, lo que refleja una menor capacidad de acidificación.

La comparación entre Kveik y US-05 revela diferencias significativas en viabilidad, poder de acidificación y capacidad fermentativa. Kveik se destaca por su alta viabilidad, rapidez en la fermentación y capacidad para acidificar el mosto, lo que la hace adecuada para cervezas que requieren fermentaciones rápidas y perfiles ácidos. Por otro lado, US-05 ofrece un proceso más controlado y un perfil de sabor limpio, siendo ideal para cervezas más tradicionales (44).

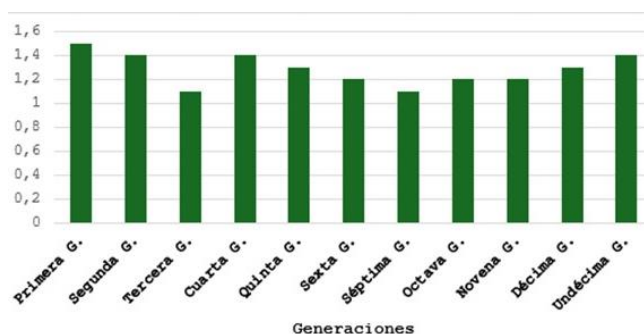


Figura 15. Determinación de poder de acidificación evaluando el aseguramiento de calidad de las reutilizaciones de levadura *S. cerevisiae*

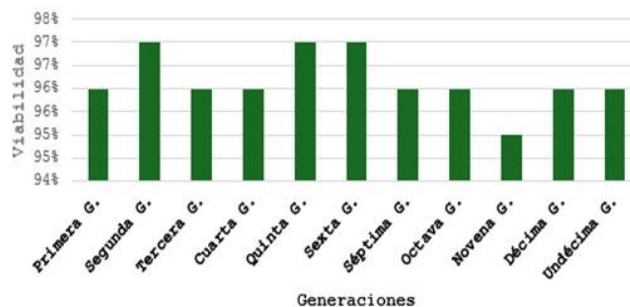


Figura 16. Determinación de viabilidad evaluando el aseguramiento de calidad de las reutilizaciones de levadura *S. cerevisiae*

En la **tabla 6**. Se determinaron las pruebas fisicoquímicas, donde muestra densidades, pH, grados platos y atenuación de la cerveza durante los días de fermentación, donde se observa que la generación que se demoró más fermentando fue la quinta generación con siete días de procesos fermentativos. Debido al rango de la densidad, entre mayor sea la densidad es mayor el tiempo de fermentación. La diferencia de concentración de azúcares comparado con las otras generaciones es de 1.052 a 1.018, La cantidad y el tipo de azúcares presentes en el mosto influyen en la velocidad de fermentación. Mostos más complejos pueden requerir más tiempo para ser fermentados completamente. Algunos estilos de cerveza requieren procesos de fermentación más largos o condiciones específicas que pueden prolongar el tiempo total de fermentación. Las generaciones que menos se demoraron fueron la décima y undécima con dos días de procesos fermentativos.

Tabla 6. Pruebas fisicoquímicas de la reutilización de levadura *S. cerevisiae* de la cepa Kveik

Ensayo	P. fisicoquímicas	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Primera generación	pH	5.2	5.1	4.5	4.2	4.1	--	--
	Densidad	1.053	1.046	1.035	1.026	1.019	--	--
	Grados plato	13.2	11.5	8.7	6.5	4.7	--	--
	Atenuación	98%						
Segunda generación	pH	3.5	3.4	3.6	3.5	--	--	--
	Densidad	1.040	1.031	1.015	1.010	--	--	--
	Grados plato	11.2	7.7	3.7	2.5	--	--	--
	Atenuación	98%						
Tercera generación	pH	3.7	3.5	3.8	3.8	--	--	--
	Densidad	1.040	1.025	1.018	1.012	--	--	--
	Grados plato	10	6.25	4.5	3	--	--	--
	Atenuación	98%						
Cuarta generación	pH	3.8	3.6	3.8	3.8	--	--	--
	Densidad	1.035	1.022	1.018	1.011	--	--	--
	Grados plato	8.7	5.5	4.5	2.7	--	--	--
	Atenuación	103%						
Quinta generación	pH	4.52	4.62	4.55	4.67	4.58	4.59	4.62
	Densidad	1.052	1.045	1.035	1.032	1.029	1.025	1.020
	Grados plato	13	11.2	8.7	8	7.2	6.2	5
	Atenuación	98%						
Sexta generación	pH	3.7	3.5	3.6	3.4	--	--	--
	Densidad	1.032	1.027	1.016	1.012	--	--	--
	Grados plato	8	6.7	4	3	--	--	--
	Atenuación	98%						
Séptima generación	pH	3.8	3.6	3.8	--	--	--	--
	Densidad	1.035	1.012	1.010	--	--	--	--
	Grados plato	6.2	3	2.5	--	--	--	--
	Atenuación	98%						
Octava generación	pH	4.5	4.8	4.7	4.8	4.5	4.7	--
	Densidad	1.049	1.036	1.035	1.032	1.028	1.019	--
	Grados plato	12.2	9.5	8.7	8	7	4.7	--
	Atenuación	98%						
Novena generación	pH	3.7	3.6	3.5	--	--	--	--
	Densidad	1.021	1.014	1.008	--	--	--	--
	Grados plato	5.2	3.5	2	--	--	--	--
	Atenuación	98%						
Decima generación	pH	3.5	3.5	--	--	--	--	--
	Densidad	1.018	1.010	--	--	--	--	--
	Grados plato	4.5	2.5	--	--	--	--	--
	Atenuación	103%						
Undécima generación	pH	3.5	3.6	--	--	--	--	--
	Densidad	1.016	1.008	--	--	--	--	--
	Grados plato	4	2	--	--	--	--	--
	Atenuación	104%						

Todas las 11 generaciones de levadura se realizaron con todos los parámetros de aseguramiento de calidad, cada una de estas generaciones obtuvieron porcentajes de viabilidad mayores al 90%, se les realizó poder de acidificación, y parámetros fisicoquímicos, donde se observó que en las primeras seis generaciones del primer proceso tuvieron una capacidad fermentativa un poco más demorada que las últimas cinco generaciones, esto es debido a que las últimas levaduras ya tienen una adaptación al medio ambiente específico, en el que se han fermentado anteriormente **(41)**. Además, tienen una mayor cantidad de células vivas, ya que durante la reutilización las levaduras pueden acumularse en mayor concentración por el volumen de biomasa generado, también se debe agregar que las levaduras reutilizadas tienen ausencia de periodo de adaptación inicial, esto les permite tener una fermentación más rápida. Es por eso que las últimas generaciones de levadura (9 a 11) tenían menos días de fermentación que las primeras, por su ausencia de adaptación **(42)**. Esta levadura Kveik es una levadura con un alto nivel fermentativo **(30)**. A medida que una cepa de levadura se reutiliza en múltiples lotes de cerveza, su viabilidad y vitalidad pueden disminuir debido al estrés acumulado y la acumulación de mutaciones genéticas.

Esto puede afectar la capacidad de fermentación y la calidad del producto final. En este estudio se podía seguir con la secuencia de generaciones, pero se corría el riesgo de futuras mutaciones que pueden introducir variaciones genéticas en la población de levaduras. Algunas de estas variaciones pueden ser beneficiosas, proporcionando características que mejoran el proceso de fermentación, como mayor tolerancia al alcohol o producción de sabores deseables. Sin embargo, otras mutaciones pueden resultar en características indeseadas. Además, las mutaciones pueden alterar el perfil de sabor de la cerveza. Cambios en la producción de ésteres y fenoles pueden llevar a variaciones en los aromas y sabores, que podrían ser considerados positivos o negativos según el estilo de cerveza. La teoría establece que *S. cerevisiae* puede reutilizarse hasta 10 generaciones, lo que resalta su potencial para mantener características deseadas a lo largo del tiempo. Determinar las generaciones de reutilización de cada cepa de levadura en un lote de cerveza es, por tanto, una práctica crucial para asegurar la consistencia y calidad del producto final **(43)**. De igual manera, proporciona información valiosa sobre el rendimiento y la salud de la levadura a lo largo del tiempo, lo que ayuda a optimizar el proceso de elaboración de la cerveza **(44)**.

Las cervezas tipo Ale, son cervezas que están en crecimiento en los mercados, pero la falta de recursos en las micro cervecerías artesanales no deja que este crecimiento se mantenga. En el estudio de Salazar (2020), informan que la levadura *S. cerevisiae* tiene una esperanza de vida limitada cuando se trata de ser replicada consecutivamente, el envejecimiento de las células de levadura puede llevar a modificaciones genéticas, morfológicas y metabólicas tales como alteraciones en la forma, tamaño y superficie de la célula, disminución del metabolismo. Sin embargo, esta puede ser reutilizada hasta siete veces. Cruz y Mayer (2020), también informan que la teoría de los ciclos o las generaciones varían entre cinco a seis veces.

Es importante aprender el manejo y el comportamiento de las cepas de levaduras antes de realizar una reutilización o repitching, es necesario realizar una guía de manejo de levadura y una evaluación de la calidad de la biomasa como se realizó en este proyecto.

Anexo: Análisis de Levadura a lo Largo de Once Generaciones/fermentaciones.

El presente anexo detalla el análisis exhaustivo llevado a cabo sobre la levadura utilizada y reutilizada en nuestra producción cervecera a lo largo de once generaciones. Este estudio fue realizado con el objetivo de evaluar las características sensoriales de la levadura y su idoneidad para la producción comercial de cerveza.

Durante el proceso de investigación, se realizó un meticuloso análisis organoléptico para garantizar la calidad y consistencia de nuestras cervezas comerciales. Se examinaron aspectos como aroma, sabor, textura, capacidad de floculación y atenuación de la cerveza a lo largo de las once generaciones de levadura reutilizada.

Los resultados obtenidos reflejan una gama completa y adecuada de aromas, sabores, indicando la idoneidad de la levadura para su uso en la producción de cerveza comercial. Se destacan notas aromáticas muy neutras con sutiles matices frutales, en referencia a las cervezas elaboradas en cada ciclo con la levadura las fermentaciones se pueden catalogar como muy limpias, esto haciendo énfasis en el nulo aporte de off-flavors o sabores indeseados al producto terminado.

Este análisis detallado a lo largo de cada generación de levadura reutilizada es un testimonio de nuestro compromiso con la excelencia y la innovación en la industria cervecera. Los hallazgos obtenidos reflejan el cuidado y la atención dedicados a cada etapa de nuestro proceso de elaboración de cerveza.

Agradecemos el interés en este estudio y confiamos en que los resultados aquí presentados sean de utilidad para la comunidad académica y profesional interesada en el campo cervecero.

Atentamente,



Carlos Marino Orejuela Mejía
Maestro Cervecerero
jefe de producción cervecería USACA
EXPERTO Organoléptico Juez BJCP

12/12/2024

Figura 17. Resultados de pruebas organolépticas de la determinación de generaciones

Figura 17. Este proceso no tuvo complicaciones en olor, sabor o textura de los lotes elaborados por estas generaciones, Además, no obtuvo crecimiento microbiológico en pruebas finales. Se realizaron pruebas organolépticas a las 11 generaciones con la ayuda de Carlos Marino Orejuela, donde aprobó los lotes elaborados de estas generaciones.

4. CONCLUSIONES

Se implementó un método de propagación alternativo para la levadura *S. cerevisiae* de la cepa Kveik en la producción de cervezas artesanales tipo Ale. Este enfoque no solo optimizó el crecimiento y la viabilidad de la levadura, sino que también mejoró significativamente la eficiencia fermentativa. Además, se logró realzar las características sensoriales de la cerveza, evidenciando el potencial de la cepa Kveik en la elaboración de productos de alta calidad.

Se elaboró una cerveza tipo Ale estilo India Pale Ale, con levaduras recuperadas y propagadas, la cerveza tuvo un tiempo fermentativo de 5 días con una densidad inicial de 1.055 y una densidad final de 1.011, obteniendo una buena capacidad fermentativa. Se cumplieron con las pruebas sensoriales de este lote elaborado. Con un porcentaje de alcohol de 5.7%.

El estudio demuestra que la levadura Kveik puede ser reutilizada de manera exitosa en múltiples generaciones, manteniendo una alta viabilidad y capacidad fermentativa. Esto sugiere que la cepa Kveik es particularmente robusta y adaptable a diferentes condiciones de fermentación.

Se concluye que las reutilizaciones cerveceras no solo representan un esfuerzo significativo hacia la sostenibilidad ambiental a reducir residuos y consumo de recursos, sino que también reflejan un compromiso con la calidad y la innovación en la industria cervecera. Al determinar las generaciones de reutilización, se establece un estándar de excelencia que no solo optimiza los procesos de producción, sino que también promueve la creatividad y la adaptabilidad ante desafíos futuros.

5. RECOMENDACIONES

Se sugiere realizar estudios de almacenamiento y conservación de levaduras, se deben almacenar en un lugar fresco, deben tener una temperatura adecuada para mantener su viabilidad. Evitar almacenarla en lugares expuestos a la luz solar directa o cerca de fuentes de calor, almacenarla en recipientes herméticos para protegerla de la humedad y el aire. Buscar técnicas de congelación e hidratación y evitar las contaminaciones cruzadas.

Para profundizar en el entendimiento de las características fermentativas de la levadura Kveik, se recomienda realizar una curva de crecimiento con un tiempo de análisis extendido. Este enfoque permitirá obtener datos más completos sobre la fase de latencia, el crecimiento exponencial, y la fase estacionaria, así como sobre la viabilidad celular a lo largo del tiempo.

Para las propagaciones se recomienda optimizar las condiciones de fermentación, como temperatura, oxígeno y nutrientes, puede mejorar significativamente la eficiencia de la propagación. Es recomendable establecer un rango óptimo de temperatura para la cepa Kveik que maximice la actividad metabólica sin inducir estrés. Además, el uso de medios de cultivo ricos en nutrientes puede acelerar el crecimiento y la viabilidad de la levadura.

Se recomienda calcular los ahorros de costos derivados de la reducción de la necesidad de adquirir levadura nueva y la optimización de los recursos utilizados en el proceso de fermentación. Esto puede incluir el análisis de costos asociados a la energía, el agua y otros insumos, así como el impacto en la producción y la calidad del producto final.

De ser posible se recomienda realizar determinaciones de generaciones y aseguramiento de la calidad de biomasa de levaduras tipo Lager.

6. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, le queremos agradecer a Dios por habernos brindado la fuerza, la sabiduría, la perseverancia, por las bendiciones y salud percibidas, a nuestros padres por el amor incondicional y el apoyo inquebrantable, sus palabras de aliento y sacrificio han sido nuestra mayor inspiración, para cumplir todos nuestros objetivos. También le agradecemos profundamente a nuestros tutores; Carlos Aranaga Arias y Daniela Arturo Terranova por su

orientación experta, su paciencia infinita, dedicación y correcciones que hicieron de este proyecto posible. A la profesora Aura Dayana Falco y al Maestro Cervecerero Carlos Marino Orejuela por brindarnos las herramientas necesarias, por su tiempo y compromiso para hacer este proyecto realidad. A la institución Universidad Santiago de Cali y a la Cervecería USACA por prestar sus instalaciones y su servicio, Por último, al director, coordinadora, auxiliares y amigos de la Cervecería USACA que de una u otra forma hicieron esto posible.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Mejía-Barajas, J. A., Montoya-Pérez, R., Cortés-Rojo, C., & Saavedra-Molina, A. (2016). Levaduras Termotolerantes: Aplicaciones Industriales, Estrés Oxidativo y Respuesta Antioxidante. En *Información Tecnológica* (Vol. 27, Número 4). <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000400002>
2. Pérez Macedo, C. Alexandra., & Romero Gómez, S. de J. (2017). *Obtención de cepas de Saccharomyces cerevisiae mejoradas para su uso en cerveza tipo Ale*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO.
3. Warnasooriya, WMDR. (2011). *Modeling and simulation of the beer fermentation process and temperature control*. University of Moratuwa.
4. Albarracín Torres, K. (2020). *Estudio de parámetros para la propagación de las cepas de levadura cervecera saccharomyces cerevisiae y saccharomyces carlsbergensis para la fabricación de cerveza artesanal*.
5. Giraldo Grisales, V. (2021). *Sistema de propagación de levadura para la elaboración de bebidas alcohólicas en la cervecería libre de Colombia S.A*. Universidad de Antioquia.
6. Ignacio Manfredo. (2020). EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE CERVEZA ARTESANAL Y SU MEJORAMIENTO MEDIANTE TÉCNICAS DE RECIRCULACIÓN DE LEVADURAS EN LA ETAPA DE FERMENTACIÓN. *UTEC*, 35–37.
7. Arroyave Pulgarín, Adriana., & Villaquiran Arce, Lizeth. (2023). *Estudio de Factibilidad para la Fabricación de Cerveza Artesanal en la Ciudad de Santiago de Cali*. Institución Universitaria Antonio José Camacho.
8. Galarza Vera, Andrea E. (2018). *Elaboración de cerveza Amber Ale de alta fermentación saborizada y aromatizada con frutas y plantas aromáticas ecuatorianas*. Universidad Central del Ecuador.
9. González, M. R. (2017). *Principios de Elaboración de las Cervezas Artesanales* (Lulu Enterprises. – Lulu Press Inc, Ed.; Primera).
10. Kawa-Rygielska, J., Adamenko, K., Pietrzak, W., Paszkot, J., Gasiński, A., & Głowacki, A. (2022). Characteristics of New England India Pale Ale Beer Produced with the Use of Norwegian KVEIK Yeast. *Molecules*, 27(7). <https://doi.org/10.3390/molecules27072291>
11. Cuellar, Luis. (2017, September 12). *Cómo reutilizar o cultivar levadura de cerveza*. <https://www.cerveza-artesanal.co/como-reutilizar-o-cultivar-levadura-de-cerveza/>
12. Revista Semana. (2020). *La universidad colombiana que ahora produce cervezas artesanales*. <https://www.semana.com/economia/articulo/la-universidad-colombiana-que-ahora-produce-cervezas-artesanales/202024/>
13. Goldammer, T. (2000). *The Brewer's Handbook–The Complete Book to Brewing Beer*. (Third Edition).
14. Salazar Garavito, D. A. (2020). *Evaluación del efecto de la reutilización de la levadura*

para el proceso de fermentación en la producción de cerveza artesanal del estilo blonde ale en la empresa cervecera OD Colombia. Fundación Universidad de América.

15. Toribio Tamayo, K. (2015). Evaluación de la estabilidad como starter de *Saccharomyces pastorianus* ssp. *carlsbergensis* para la producción de cerveza tipo Lager.
16. Rojas, Rodrigo., & Reyes, Eugenio. (2005). Aseguramiento de la Calidad y Biotecnología en la Industria del Vino. *ResearchGate*.
17. Menoscal Muñoz, K. J., & Santamaría Campoverde, A. B. (2021). *Mejora del proceso de floculación de la levadura cervecera*. Escuela Superior Politécnica Del Litoral.
18. Murillo Cornejo Michael Kenneth. (2023). *PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN FITO CELULAR DE UN CULTIVO MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DEL INSTRUMENTO BIOLÓGICO CÁMARA DE NEUBAUER*. Universidad Técnica de Machala
19. Pardo, S., Galvagno, M. Á., & Cerrutti, P. (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.
20. Burini, J. A. (2023). Desarrollo de cultivos iniciadores cerveceros basados en levaduras nativas para la producción de bebidas fermentadas con alto valor agregado
21. González, A. F., Moreno, A. L., Ramos, M. D. M. D. P., García, A. R., Ibáñez, O. E., Porcel, N. F., ... & Arias-Santiago, S. (2016). Optimization of human keratinocyte culture to develop an artificial human skin model: Cell alternatives as feeder layer of advanced therapies. *Actual. MEDICA*, 101, 85-94. DOI: [10.15568/am.2016.798.or04](https://doi.org/10.15568/am.2016.798.or04)
22. Johnston, G. (2011). Innovando la ciencia del conteo celular. *Pharmaceutical technology*, 9(Innovando la ciencia del conteo celular).
23. Zumárraga-Parra, R. Hernán. (2023). *Estudio para la reutilización de la levadura Saccharomyces Cerevisiae procedente de un proceso de fermentación en la elaboración de cerveza artesanal*. Universidad Central del Ecuador.
24. Giordano, M. A. (2019). *Efecto del tiempo de preservación empleando el método de Castellani y la crioconservación sobre la actividad enzimática en Candida albicans*. Universidad Nacional del Nordeste.
25. Condalab. (n.d.). *Agar Cloranfenicol (Agar YGC) ISO*. www.condalab.com
26. Hall, B. G., Acar, H., Nandipati, A., & Barlow, M. (2014). Growth rates made easy. *Molecular biology and evolution*, 31(1), 232-238. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst187>
27. Zúñiga, S. C. R., & Aristizábal, C. I. G. (2022). Manual práctico de microbiología básica. En *Manual práctico de microbiología básica*. <https://doi.org/10.2307/j.ctv2cmr9j1>
28. Cuellar, L. (2018, September 14). Buenas prácticas para la reutilización de levadura. <https://www.cerveza-artesanal.co/buenas-practicas-para-la-reutilizacion-de-levadura/>
29. *Atenuación de la cerveza*. (n.d.). Retrieved May 4, 2023, from <https://www.cocinista.es/web/es/recetas/hacer-cerveza/trucos-y-consejos/atenuacion-de-la-cerveza.html>
30. *Medición del Grado Plato en línea durante el proceso de fermentación de la cerveza, a través del DT302 Transmisor de Densidad de SMAR*. (n.d.). Retrieved May 4, 2023, from <https://www.smar.com/es/articulo-tecnico/medicion-del-grado-plato-en-linea-durante-el-proceso-de-fermentacion-de-la-cerveza-a-traves-del-dt302-transmisor-de-densidad-de-smar>

31. checerveza. (2019). *Densidad de la Cerveza*. <https://checerveza.com/densidad/>
32. Preiss, R., Tyrawa, C., Krogerus, K., Garshol, L. M., & Van Der Merwe, G. (2018). Traditional Norwegian Kveik are a genetically distinct group of domesticated *Saccharomyces cerevisiae* brewing yeasts. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02137>
33. Vega, B. O. A., & Voltolina, D. O. M. E. N. I. C. O. (2007). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal, 1, 17-25.
34. Raines-Casselman, M. (2009). Yeast Propagation and Maintenance: Principles and Practices. www.Maltosefalcons.Com, 25.
35. Yin, H., Deng, Y., Zhao, J., Zhang, L., Yu, J., & Deng, Y. (2021). Improving oxidative stability and sensory properties of ale beer by enrichment with dried red raspberries (*Rubus idaeus* L.). *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 79(4), 370-377
36. Caicedo L, Sierra J, & Hoyos H. (2018). Estudio Comparativo De Cuatro Sistemas De Propagación De Levadura Cervecera Por Lote Alimentado. *Revista Colombiana De Biotecnología*.
37. Cuellar, Luis. (2017, September 12). Cómo reutilizar o cultivar levadura de cerveza. <https://www.cerveza-artesanal.co/como-reutilizar-o-cultivar-levadura-de-cerveza/>
38. Merinas-Amo, T., Merinas-Amo, R., Font, R., del Río Celestino, M., & Alonso-Moraga, A. (2021). Toxicological and epigenetic studies of two types of ale beer, tyrosol and iso-alpha humulone. *Processes*, 9(3), 485.
39. Otero, M. A., Guerrero, I., Wagner, J. R., Cabello, A. J., Sceni, P., Garcíá, R., Soriano, J., Tomasini, A., Saura, G., & Almazañ, O. (2011). Yeast and its derivatives as ingredients in the food industry. *Biotecnología Aplicada*, 28(4).
40. Warnasooriya, WMDR. (2011). Modeling and simulation of the beer fermentation process and temperature control. University of Moratuwa
41. Quain, D. E. (2006a). Yeast genetics in brewing: New insights and opportunities. En *Brewing: New Technologies*. <https://doi.org/10.1533/9781845691738.149>
42. Quain, D. E. (2006b). Yeast supply and propagation in brewing. En *Brewing: New Technologies*. <https://doi.org/10.1533/9781845691738.167>
43. González Sicard, I. (2020). Desarrollo de documentación requisito de las Buenas Prácticas de Manufactura y estandarización del proceso de propagación y reutilización de levadura en la empresa La Cofradía Brewing S.A. UNIVERSIDAD DE COSTA RICA.
44. Barkhuizen, JH., Coetzee, G., van Rensburg, E. et al. The effect of growth rate on the production and vitality of non-*Saccharomyces* wine yeast in aerobic fed-batch culture. *Bioprocess Biosyst Eng* 44, 2655–2665 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02634-3>
45. Postigo, V., García, M., Cabellos, J. M., & Arroyo, T. (2021). Wine *Saccharomyces* yeasts for beer fermentation. *Fermentation*, 7(4), 290. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040290>
46. Kordialik-Bogacka, E., & Diowks, A. (2013). Physiological state of reused brewing yeast. *Czech Journal of Food Sciences*, 31(No. 3), 264–269. doi: 10.17221/84/2012-cjfs
47. Olivares-Marin, I. K., González-Hernández, J. C., Regalado-Gonzalez, C., & Madrigal-Perez, L. A. (2018). *Saccharomyces cerevisiae* Exponential Growth Kinetics in Batch

- Culture to Analyze Respiratory and Fermentative Metabolism. Journal of visualized experiments: JoVE, (139), 58192. <https://doi.org/10.3791/58192>
48. Raghavendran, V., Webb, J. P., Cartron, M. L., Springthorpe, V., Larson, T. R., Hines, M., Mohammed, H., Zimmerman, W. B., Poole, R. K., & Green, J. (2020). A microbubble-sparged yeast propagation-fermentation process for bioethanol production. *Biotechnology for biofuels*, 13, 104. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01745-5>
49. Forino, M., Picariello, L., Rinaldi, A., Moio, L., & Gambuti, A. (2020). How must pH affects the level of red wine phenols. *Lwt*, 129, 109546. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109546>
50. Revista Softonic 2023 Brew Meister: Measure Manage <https://brew-meister-measure-manage.softonic.com/iphone?ex=RAMP-2081.0#:~:text=La%20aplicaci%C3%B3n%20Brew%20Meister%20luego,Brix%20y%20contenido%20de%20alcohol>.

8. ANEXOS

El presente anexo indica que la cepa evaluada posee las características necesarias para su propagación y reutilización en futuras elaboraciones, dado que las pruebas sensoriales enfatizan que la levadura es la mejor opción posible para el propósito deseado. Baltic Porter y Sauer, han mantenido sus características de estilo después del proceso de recuperación.

Aroma de la levadura recuperada Baltic Porter: Se observó un perfil aromático robusto y complejo, caracterizado por notas de café tostado, chocolate negro y un leve toque de licor. La presencia de esteres frutales era sutil pero apreciable, complementando las notas maltosas predominantes.

Aroma de la levadura recuperada Sauer: La cerveza Sauer presentó un aroma distintivo de acidez suave, con notas de frutas ácidas y un ligero toque de lactosa. El perfil aromático era fresco y equilibrado, sin predominancia de defectos fermentativos.



Carlos Marino Orejuela Mejía
Maestro Cervecerero
jefe de producción cervecera USACA
EXPERIMENTO ORGANOLÉPTICO - Juez BJCP

Anexo 1. Carta de pruebas sensoriales en proceso de recuperación de levadura.

Santiago de Cali, 19/05/2023
Señores
COMITÉ DE TRABAJO DE GRADO
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
UNIVERSIDAD SANTIAGO DE CALI
CALI



Referencia: Presentación de ANTEPROYECTO DE TRABAJO DE GRADO para su evaluación

Cordial saludo,

Por medio de la presente formalmente recomiendo el trabajo de grado **PROPAGACIÓN DE LEVADURA Y ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE BIOMASA PARA LA FERMENTACIÓN DE CERVEZA EN MICRO CERVECERÍAS ARTESANALES** de los estudiantes **JORGE ENRIQUE ARCE VARGAS** identificado con cédula de ciudadanía No. 1192800241 y **SERGIO ANDRÉS GUTIÉRREZ LUNA** con cédula de ciudadanía No. 1144107847 del programa de microbiología, debido a que la cervecería USACA ve un gran potencial de mejora en los procesos productivos a corto plazo con los resultados de este trabajo investigativo, es de suma importancia usar los recursos intelectuales de la universidad para apoyar el desarrollo de nuestras empresas bajo la modalidad de Spin-off.

Agradeciendo la atención prestada a la presente.

Diego Fernando Galindo

Director departamento financiero universidad Santiago de Cali
Director general cervecería USACA

Anexo 2. Carta de permiso de la cervecería USACA para la realización del proyecto.

CERVEZA ESTILO BALTIC PORTER

Delta pH 10 minutos

Δ pH 10min: pH inicial-pH 10min

Δ pH 10min: 5.10-4.90

Δ pH 10min: 0.20

Delta pH 20 minutos

Δ pH 20min: pH inicial-pH 20min

Δ pH 20min: 5.10-4.50

Δ pH 20min: 0.60

Delta pH final

Δ pH final: pH inicial-pH final

Δ pH final: 5.10-4.02

Δ pH final: 1.08

CERVEZA ESTILO SAUER

Delta pH 10 minutos

Δ pH 10min: pH inicial-pH 10min

Δ pH 10min: 4.87-4.70

Δ pH 10min: 0.17

Delta pH 20 minutos

Δ pH 20min: pH inicial-pH 20min

Δ pH 20min: 4.87-4.20

Δ pH 20min: 0.67

Delta pH final

ΔpH final: pH inicial-pH final
 ΔpH final: 4.87-3.75
 ΔpH final: 1.12

Anexos 3. Cálculos para determinación de vitalidad del Delta (ΔpH) para cada intervalo

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Anexo 4. Fórmula para calcular la desviación estándar en resultados de vitalidad, viabilidad, concentración celular y determinación de generaciones.

Anexo 5. Tabla de concentración celular

Tiempo (horas)	Número de células (células/mL)	Ln(x)
0	1,00E+06	13,81551056
1	2,00E+06	14,50865774
2	4,00E+06	15,20180492
3	8,00E+06	15,8949521
4	1,60E+07	16,58809928
5	3,20E+07	17,28124646
6	6,40E+07	17,97439364
7	1,28E+08	18,66754082
8	2,56E+08	19,360688
9	5,12E+08	20,05383518
10	1,02E+09	20,74698236
11	2,05E+09	21,44012954
12	4,10E+09	22,13327672
13	8,19E+09	22,82642391

Cálculo de velocidad de crecimiento

$$\mu = \frac{\ln(N_2/N_1)}{(t_2-t_1)} \mu = \frac{\ln(8.19E+09/1.00E+06)}{(13-0)} = 0.693$$

Anexo 6. Calculo de velocidad de crecimiento

Cálculo de tiempo de duplicación

$$T.D = \frac{\ln 2}{\mu} T.D = \frac{0.693147}{0.693} = 1.0h$$

Anexo 7. Calculo de tiempo de duplicación

Anexo 8. Tabla de generaciones de levadura *S. cerevisiae* de la cepa Kveik.

Ensayo	Viabilidad	pH inicial	pH final
Primera generación	96%	4.22	4.08
Segunda generación	97%	4.12	4.02
Tercera generación	96%	4.31	4.19
Cuarta generación	96%	4.14	4.03

Quinta generación	97%	4.4	4.21
Sexta generación	97%	4.25	4.12
Séptima generación	96%	4.7	4.02
Octava generación	95%	4.3	4.21
Novena generación	95%	4.19	4.08
Decima generación	96%	4.21	4.13
Undécima generación	96%	4.26	4.10