

ARELY FLORES CISNEROS

**PROTOCOLO DE BOTTOM CROPPING DEFINIDO POR
RENDIMIENTO DE FERMENTACIONES**

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

dirigido por **JORDI DE MIER VINUÉ**

Máster en BEBIDAS FERMENTADAS

Facultat d'Enologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**Tarragona
02 de septiembre del 2019**

ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	2
2.	ABSTRACT.....	3
3.	INTRODUCCIÓN.....	4
3.1.	ESTADO DEL ARTE.....	6
4.	OBJETIVOS.....	8
4.1.	OBJETIVO GENERAL	8
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
5.1.	SISTEMA DE CONTEO Y VIABILIDAD CELULAR.....	9
5.2.	COMPARACIÓN DE INDICADORES UTILIZADOS.....	12
5.3.	MUESTRAS A ANALIZAR.....	13
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
7.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	21
8.	PROPUESTA DE PROTOCOLO DE INOCULACIÓN	22
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	23

1. RESUMEN

El impacto de la levadura en un proceso fermentativo es realmente crítico además de ser un factor condicionante en la calidad de cerveza, es por ello que se requiere estandarizar la cantidad y viabilidad celular en cada una de las cervezas producidas. Se han utilizado dos sistemas de conteo y viabilidad celular para evaluar la efectividad de inoculación de levaduras de diferente generación, mediante los resultados obtenidos se define un protocolo para la mejora y estandarización de re utilización de levaduras de acuerdo a las condiciones de la cervecería, asegurando que el efecto de cosecha y almacenamiento de levaduras causen el menor deterioro al proceso fermentativo, manteniendo por consiguiente la calidad de la cerveza producida.

El protocolo de cosecha y almacenamiento de levadura representa un punto crítico de control que al no cumplir ciertos parámetros, existe un riesgo de generar variantes en el proceso de re utilización. El número máximo de generaciones a re utilizar es altamente dependiente de la cervecería y el proceso , por lo que debe ser evaluado en base a experiencias y consistencia del producto.

2. ABSTRACT

The impact of brewing yeast on fermentation performance is really critical as well as being a conditioning factor in beer quality, which is why necessary to standardize the quantity and cell viability in each of the beers produced. Two cell counting and viability systems have been used to evaluate the effectiveness of yeast inoculation of different generation, through obtained results a protocol is defined for the improvement and standardization of reusing yeasts according to the conditions of the brewery, ensuring that the effect of harvesting and storage yeasts cause the least deterioration to the fermentation process, thus maintaining the quality of the beer produced.

The protocol of harvesting and storage yeast represents a critical control point that by not meeting certain parameters, there is a risk of generating variants in the reuse process yeast. The maximum number of generations to be reused is highly dependent of the brewery and the process, so it must be evaluated based on experiences and consistency of the product.

3. INTRODUCCIÓN

El proceso de elaboración de una cerveza es complejo debido a las variables que se deben controlar para lograr las características organolépticas deseadas.

Una de las materias primas utilizadas durante este proceso es la levadura, ingrediente más activo e influyente en el proceso fermentativo, donde puede impactar significativamente de manera positiva como negativa en el resultado de la cerveza.

Antiguamente, los procesos fermentativos se llevaron a cabo por fermentación espontánea con levadura del medio ambiente, la cerveza resultante de este tipo de fermentaciones fue de gran calidad que se buscó repetir todas estas características mediante una selección, propagación e inoculación de cepas de levaduras. Por lo tanto, hoy en día se busca que mediante esta actividad se maximice la calidad y eficiencia de la producción e inoculación de levaduras en procesos fermentativos donde se proporcionen importantes beneficios técnicos y económicos a la industria cervecera (*Hirst y Richter, 2016*).

Una de las metodologías empleadas para la repetibilidad de resultados en procesos fermentativos es el sistema de recolección y re inoculación de levadura, práctica de gran importancia en la industria cervecera para eficientar costos de producción. Esta metodología permite el poder reutilizar la levadura durante al menos siete generaciones y, a menudo, hasta diez generaciones si se siguen buenas prácticas de recolección, almacenamiento e inoculación (*WYEAST LABS, 2019*). El método particular de inoculación dependerá de la cepa de levadura utilizada y la configuración de la cervecería, sin embargo, el objetivo principal es que los resultados sean consistentes.

Se ha demostrado que variaciones en ciertos parámetros durante el proceso de recolección de levaduras influyen en fermentaciones posteriores, por lo que se debe evitar cualquier efecto nocivo. Se busca mantener la pureza de la cepa mediante un proceso estandarizado de recolección y re inoculación de levadura. La cosecha de levadura nunca será idéntica de una cerveza a otra, pero las variables pueden ser controladas y las inconsistencias minimizadas.

Con el objetivo de evitar cualquier tipo de contaminación, el proceso de fermentación se realiza en tanques cilindro cónicos cerrados. Hacia el final de cada proceso

fermentativo, la levadura Ale o Lager comienza a formar grandes grupos de células y posteriormente se sedimentan en el cono del fermentador. La velocidad en la que se sedimentan las células varía según el tipo de levadura y su edad replicativa.

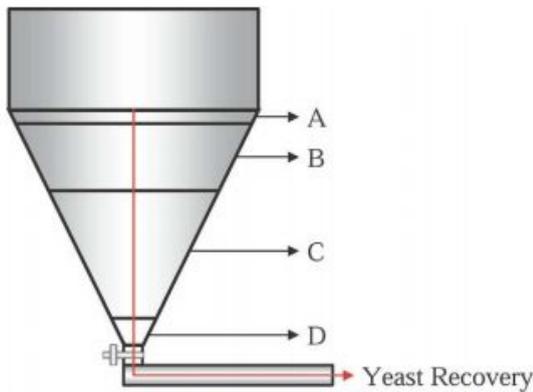


Fig. 1. Ilustración esquemática de la estratificación de la levadura durante la sedimentación.

En la figura 1, se observa la estratificación de la levadura durante su sedimentación. (A) indica la fracción celular más joven, (D) la fracción predominante envejecida. (A), (B) y (C) representan las fracciones reutilizadas para fermentaciones sucesivas con técnicas de cultivo tradicionales.

Para determinar la recolección celular ideal, se ha analizado la edad, cantidad y viabilidad celular de algunas levaduras recolectadas. El análisis de muestras se realiza en fracciones distintas, a través de un puerto de muestreo ubicado en la salida debajo del tanque de fermentación. La toma de cada muestra es analizada a intervalos de peso distintos y el fin de recolección se determina visualmente por la disminución en la viscosidad de la muestra. Se verifica que la fracción B (Fig. 1.), es la que aportará resultados consistentes en procesos fermentativos sucesivos (Powell, C. et al. 2004).

Otras variables, como el tiempo, presión y temperatura de recolección pueden afectar la calidad de la levadura cosechada y obtener resultados inconsistentes en fermentaciones posteriores. Se recomienda inocular levadura lo antes posible después de su recolección, evitar someter la levadura a cambios drásticos de cualquier variable para evitar su estrés. De no ser posible inocular la levadura de forma inmediata a otro proceso fermentativo, la levadura se puede recolectar en un tanque separado, previamente limpio y sanitizado.

3.1. ESTADO DEL ARTE

Michael H. (2009) señala que, los parámetros ideales para garantizar la calidad de la levadura durante su almacenamiento son:

- **Eliminación suficiente del trub.** Asegurarse que antes de almacenar la levadura del tanque de fermentación, se haya retirado el primer sedimento en la fermentación, que es el mayormente enriquecido con trub.
- **Despresurización.** La presión excesiva puede ser perjudicial para la levadura, por lo que debe adaptarse un método de despresurización. De igual forma, es importante =aplicar al tanque de almacenamiento una pequeña cantidad de presión (<5 PSI) con CO₂ para mantener un ambiente de presión positiva.
- **Almacenamiento en frío.** El recipiente debe estar equipado con camisas de enfriamiento, de no ser posible debe asegurarse que la temperatura donde se resguarde sea entre 2 a 4 ° C.
- **Almacenamiento corto.** La levadura no debería almacenarse por largos periodos antes de su re inoculación, se recomienda que sea máximo dos semanas.
- **Sin aireación durante el almacenamiento.** Se lleva a cabo la homogeneización y la aireación justo antes de la inoculación de la levadura.

Con la finalidad de identificar la interfaz entre la suspensión de levadura a almacenar y la cerveza, se recomienda instalar una mirilla en la salida principal del fermentador conectada a una válvula, utilizada para abrir y cerrar cuando se observe que la levadura cumpla con la consistencia deseada. Esto se juzga en base al volumen obtenido previamente analizado en conjunto al porcentaje de viabilidad.

Se debe tener precaución al retirar la levadura, cuidando en que la velocidad de flujo no sea demasiado alta, pues existe una tendencia, donde la fracción del centro del cono sale antes que la levadura cercana a las paredes.

Cuidar la levadura definitivamente mejorará la calidad de la cerveza. La calidad de la levadura debe mantenerse durante un manejo adecuado y adaptado de la levadura. Basado en una buena nutrición, la levadura tomará las vías discutidas en el orden correcto para fermentar rápidamente el mosto y producir los atributos de sabor deseados.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal de este proyecto es definir un protocolo de recolección, almacenamiento y cosecha de levadura de acuerdo a los resultados de viabilidad obtenidos en los procesos de fermentación de la cervecería EDGE Brewing.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para cumplir con el objetivo general, se han fijado una serie de objetivos específicos para la realización del proyecto:

- Seguimiento de procesos fermentativos de cuatro cervezas tipo ALE.
- Análisis de conteo y viabilidad celular mediante dos diferentes sistemas.
- Análisis de los datos obtenidos para extraer conclusiones.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Con la finalidad de verificar la funcionalidad del método de re inoculación de levadura realizado en la Fábrica Edge Brewing, se realizó un análisis y seguimiento de conteo y viabilidad celular en cuatro cervezas elaboradas en la cervecería.

La determinación de conteo y viabilidad celular se analizaron considerando las siguientes variables:

- Análisis comparativo entre dos sistemas de conteo y viabilidad celular.
 - Sistema de conteo con cámara Neubauer en el microscopio
 - Sistema Oculyze.
- Comparación de indicadores utilizados en análisis de viabilidad celular
 - Tinción con azul de metileno
 - Tinción con violeta de metileno
- Análisis de cuatro cervezas Ale de distinto estilo, codificadas como C1, C2, C3 y C4.
 - C1. GOSE, segunda generación de levadura.
 - C2. Sour IPA, primera generación de levadura.
 - C3. American PORTER, segunda generación de levadura.
 - C4. Session IPA, primera generación de levadura.
- Para hacer un análisis estadístico válido, cada muestra es analizada tres veces y en paralelo para cada sistema de conteo celular.

5.1. SISTEMA DE CONTEO Y VIABILIDAD CELULAR

Sistema con cámara Neubauer en el microscopio.

La cámara de Neubauer es un dispositivo de vidrio utilizado para determinar el número de células de forma directa contandolas con ayuda del microscopio.

La cámara consta de dos áreas de conteo de nueve bloques cada uno separado en tres lados por un foso. El área utilizada para el recuento de células de levadura es el bloque

central de nueve bloques, compuestos por 25 cuadrados que a su vez contienen 16 cuadrados más pequeños (Figura 2).

Todos los cuadrados tienen un área y profundidad definidas que al tapar con un cubreobjetos y colocar la muestra analizar, por capilaridad entrará en el espacio entre el dispositivo y el cubreobjetos (normalmente 0,1 mm). Si se identifica un gran número de células de levadura, se puede realizar una dilución para facilitar su conteo, en ese caso se deberá incluir el factor en el cálculo.

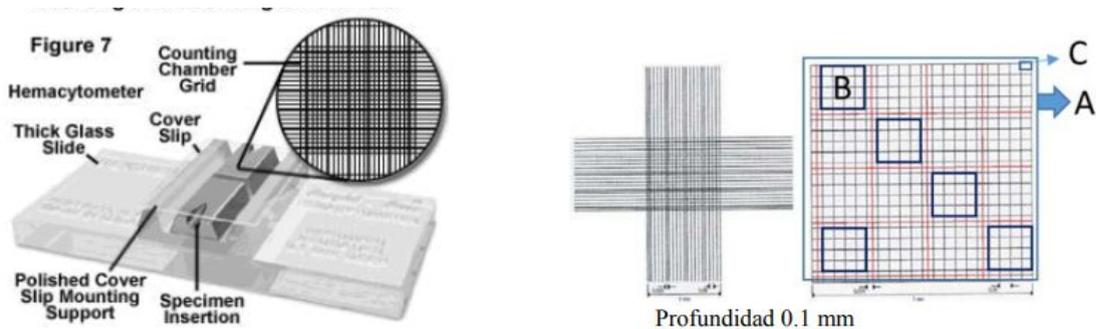


Fig. 2. Cámara de Neubauer y cuadrícula.

Se recomienda mantener el mismo criterio de conteo para las células que estén sobre las líneas exteriores de la zona de recuento. Incluir en el conteo solo las que toquen dos de las líneas del cuadrante, por ejemplo la cara superior e izquierda como se observa en la Figura 3.

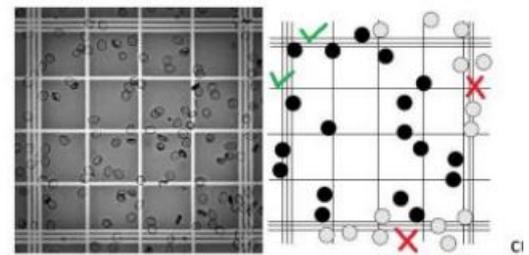


Fig. 3. Criterio de conteo sobre líneas del cuadrante.

La cuadrícula está dividida en diferentes secciones de acuerdo a su área, las cuales se deben tomar en cuenta para el cálculo del volumen final en función de la superficie de contaje seleccionada.

El conteo celular final por mililitro, se calcula en función del contaje de células, dilución de la muestra, cantidad de cuadros contados y superficie de contaje (Tabla 1).

Para determinar la viabilidad de una población de levadura, la muestra se mezcla en una proporción de 1: 1 con solución azul de metileno. Este indicador penetra en las células

muertas pues no pueden neutralizar el indicador, las células vivas pueden neutralizar el tinte y bajo el microscopio se observan incoloras. Al contar las células totales y las células azules (muertas), la viabilidad de la población de levadura se puede calcular de acuerdo con la fórmula 1. El análisis para la viabilidad de muestras con azul de metileno se realiza durante los primeros 5 minutos después de hacer la mezcla con el indicador. Si se identifica un gran número de células de levadura, se puede realizar una dilución para facilitar su conteo y viabilidad celular.

Tabla 1. Cálculo de células totales

Células totales/ ml	Volumen
$\frac{\text{N}^\circ \text{ cel x dilución}}{\text{N}^\circ \text{ cuadros x Volumen}}$	A= 1.0E-04
	B= 4.0E-06
	C= 2.5E-07

$$\% \text{ Viabilidad} = 100 - \% \text{ levaduras muertas} \quad \% \text{ Levaduras muertas} = \frac{\frac{\text{Levaduras}_{\text{muertas}}}{\text{ml}}}{\frac{\text{Levaduras}_{\text{Totales}}}{\text{ml}}} \cdot 100$$

Fórmula 1. % Viabilidad celular

Sistema con Equipo Oculyze

Oculyze ha desarrollado un sistema de determinación rápida para la concentración y viabilidad de células de levadura (Figura 4). Consiste en una aplicación para grabar imágenes microscópicas que se reenvían a un servidor de reconocimiento de imágenes. El software correspondiente permite una determinación automatizada de la concentración celular y la viabilidad (relación vivo / muerto) de la población de levadura respectiva.



Fig. 4. Microscopio Oculyze

Para la determinación de la viabilidad por este sistema, se prepara la muestra tal y como el Sistema con cámara Neubauer en el microscopio, si se identifica un gran número de

células de levadura se puede realizar una dilución para facilitar su conteo y viabilidad celular. Para determinar la viabilidad celular, la muestra se mezcla en una proporción de 1: 1 con solución indicadora dejando actuar 5 minutos para realizar cada análisis. La solución indicadora puede ser azul o violeta de metileno y dentro de la aplicación se debe seleccionar el indicador utilizado, el proveedor recomienda el uso de violeta de metileno por ser una alternativa eficaz a las tinciones tradicionales con azul de metileno (*Smart et al.*, 2018).

La concentración celular y viabilidad se pueden medir simultáneamente en la aplicación y el usuario recibe el resultado en segundos.

5.2. COMPARACIÓN DE INDICADORES UTILIZADOS

Debido a que todos los atributos que contribuyen al rendimiento de la fermentación son cuestionables, se decide hacer una comparación de análisis de viabilidad celular con dos distintos indicadores.

- Tinción con azul de metileno
- Tinción con violeta de metileno

Smart et al. (2018) comenta que el uso de azul de metileno se ha vuelto un estándar de la industria dado a que los ensayos tienden a ser más económicos y fáciles de usar, sin embargo, se ha sugerido que la tinción con azul de metileno puede solo representar una guía de la condición de la levadura, produciendo malas correlaciones con el rendimiento de fermentación y otros ensayos de viabilidad reconocidos.

En cambio, se ha demostrado que por la composición química del violeta de metileno (safranina), se genera una mayor resistencia a la desmetilación oxidativa y por lo tanto, una reducción en la variación de la intensidad del color, por lo que representa una alternativa adecuada al azul de metileno.

Se ha demostrado que el violeta de metileno puede ofrecer algunas ventajas; funciona mejor en las fases de crecimiento de las células de levadura (es decir, exponencial y estacionaria), así como en cultivos con baja viabilidad y cultivos totalmente muertos.

La solución azul de metileno utilizada durante este estudio fue del laboratorio Murphy & Son Ltd., donde el proveedor argumenta que no se requiere dilución. La solución violeta de metileno fue provista por Oculyze, a una concentración final de 0,01% (p / v).

La muestra de cerveza se mezcla en una proporción 1: 1 con cada una de las soluciones indicadoras por separado, dejando actuar 5 minutos para analizar la viabilidad celular mediante el sistema con cámara Neubauer en el microscopio y el sistema Oculyze.

5.3. MUESTRAS A ANALIZAR

Protocolo de toma de muestras C1, C2, C3 y C4 directamente del fermentador y para el análisis de conteo y viabilidad celular, se hace una dilución de cada muestra con agua destilada 1:10.

El conteo y viabilidad celular fueron monitoreados hasta el último día de fermentación de cada una de las cervezas y para hacer un análisis estadístico válido, cada muestra es analizada tres veces y en paralelo para cada sistema de conteo celular.

Todas las cervezas analizadas son cervezas tipo ALE, en el caso de las cervezas C2 y C4 corresponden a levadura de 1a. generación, en el caso de la levadura de cervezas C1 Y C3, se re utilizó levadura de una producción anterior.

Las levaduras de 2a. generación son almacenadas en EDGE Brewing por el protocolo descrito a continuación:

- 1.- Limpieza y sanitización del tanque, mangueras y conexiones utilizadas para el almacenamiento de la levadura.
- 2.- Purgar con CO₂ el tanque donde se almacenará la levadura, eliminando residuos del sanitizante o de aire que pudiera afectar o debilitar las reservas de la levadura.
- 3.- Almacenar tanque en cooler hasta asegurar que tenga una temperatura entre 2 a 4 ° C, normalmente 1 día antes de almacenar levadura.
- 4.- Comenzar con la eliminación la fracción predominante envejecida, donde se encuentra cantidad del trub, resinas de lúpulo y otras impurezas.
- 5.- Una vez que el cervecero visualmente observa que ha eliminado aquella fracción de levadura donde contiene impurezas, cierra la válvula de salida y la conecta a una manguera limpia, sanitizada y purgada hacia el tanque donde se almacenará la levadura.
- 6.- La levadura es almacenada hasta por 2 semanas máximo en un tanque de 50 litros

con levadura de segunda generación en el cooler a 0 ° C, y se despresuriza de forma diaria hasta su re inoculación.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las mediciones con los diferentes métodos se muestran en la Tabla 2. Se representan los valores gráficamente en las figuras 5-8. La idea principal de este análisis es medir la efectividad del la cosecha de levadura mediante dos distintos sistemas de conteo y viabilidad celular.

Tabla 2: Concentración celular y viabilidad en cuatro diferentes cervezas durante su proceso de fermentación.

Dia de Fermentación	C1				C2			
	Camara Neubauer		Oculyze		Camara Neubauer		Oculyze	
	Concentración celular (cell/ml)	Viabilidad %	Concentracion celular (cell/ml)	Viabilidad %	Concentracion celular (cell/ml)	Viabilidad %	Concentracion celular (cell/ml)	Viabilidad %
1	7.50E+06	46.0	1.86E+07	45.4	5.30E+07	80.5	1.06E+09	93.4
2	1.30E+07	30.7	2.70E+07	65.6	2.75E+07	81.8	6.93E+07	79.0
5	4.90E+07	76.0	1.09E+08	70.4	3.00E+07	70.8	7.35E+07	81.6
6	2.05E+07	67.2	1.55E+08	68.2	1.35E+07	48.6	6.65E+07	68.9
7	3.25E+07	80.3	6.76E+07	97.6	2.15E+07	27.1	5.77E+07	66.3
8	1.55E+07	71.3	8.78E+07	98.1	3.25E+07	26.6	3.63E+07	70.1
	C3				C4			
1	2.40E+07	18.6	4.65E+07	59.7	2.60E+07	80.9	4.82E+07	94.6
2	1.10E+07	22.0	2.70E+07	53.1	2.15E+07	91.2	5.24E+07	81.0
5	3.15E+07	63.7	2.62E+07	67.2	2.50E+07	93.9	8.20E+07	93.8
6	3.40E+07	70.5	9.97E+07	90.1	2.75E+07	91.2	6.34E+07	90.1
7	3.10E+07	69.0	1.08E+08	85.1	2.35E+07	73.6	4.63E+07	89.9
8	3.50E+07	65.0	1.05E+08	76.7	1.40E+07	93.9	2.92E+07	84.9

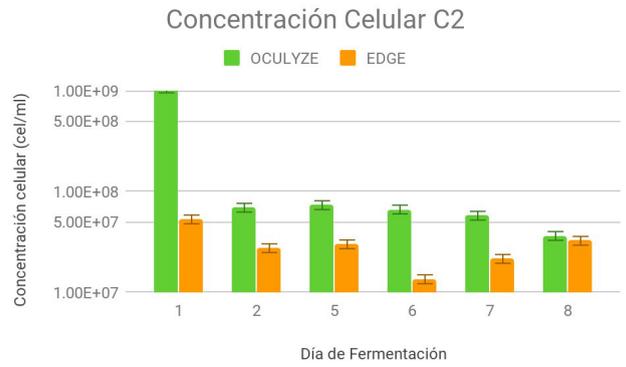
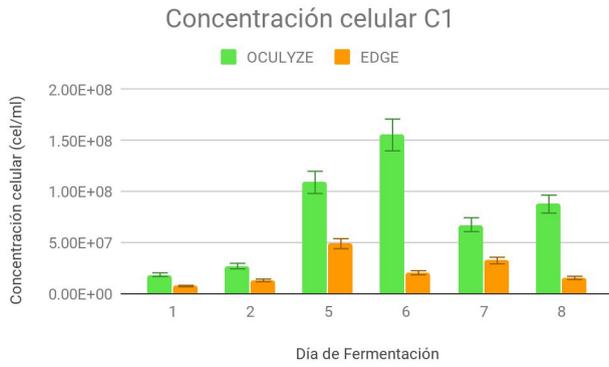


Figura 5: Concentración celular en C1 y C2 durante los primeros ocho días de fermentación.

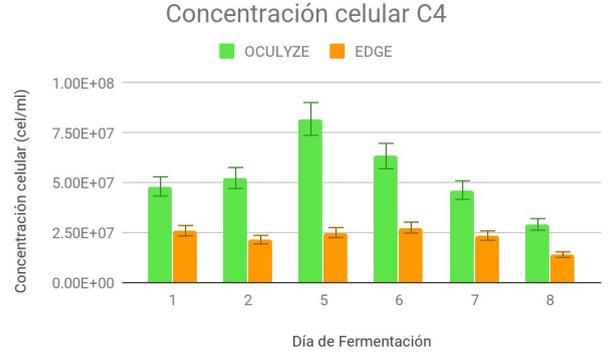
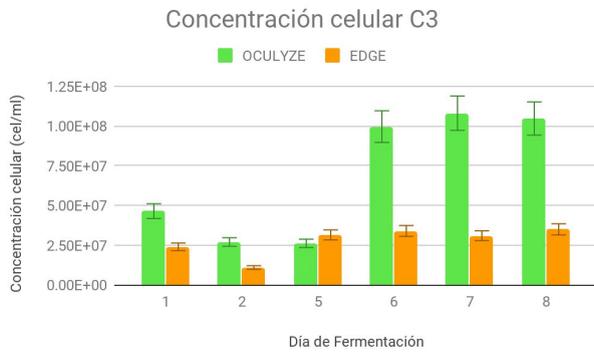


Figura 6: Concentración celular en C3 y C4 durante los primeros ocho días de fermentación.

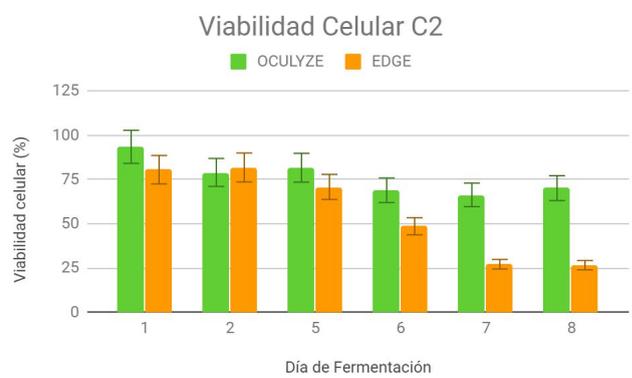
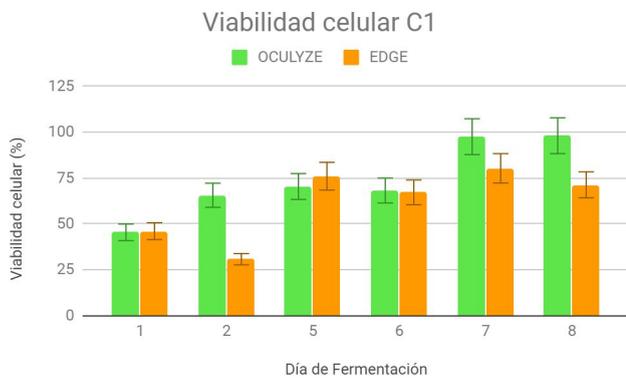


Figura 7: Viabilidad celular en C1 y C2 durante los primeros ocho días de fermentación.

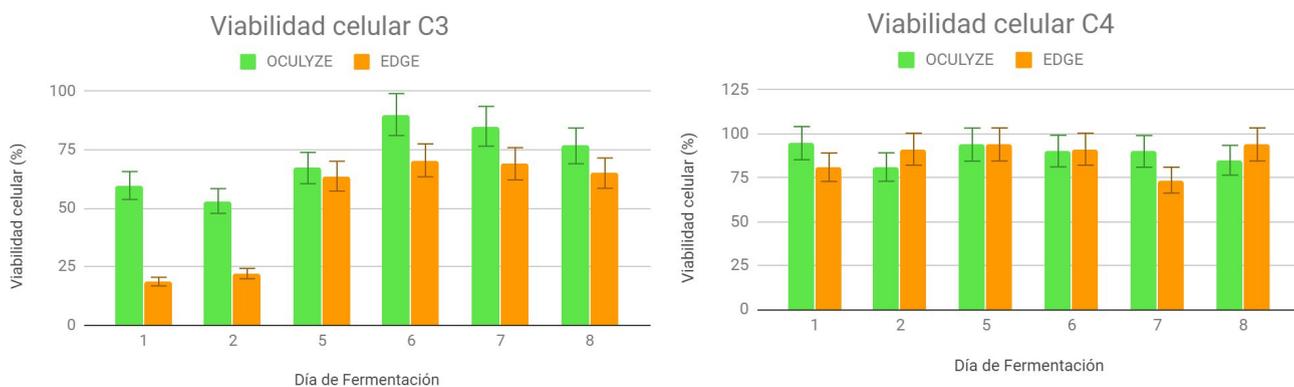


Figura 8: Viabilidad celular en C3 y C4 durante los primeros ocho días de fermentación.

Referente a los resultados anteriores, podemos observar una diferencia significativa entre el análisis realizado con el sistema de conteo con cámara Neubauer y el sistema Oculyze. Ambos sistemas se basan en la misma metodología, sin embargo usando el sistema Oculyze tanto el conteo como la viabilidad celular son calculados de forma automática por el software del equipo y las imágenes para este análisis son poco estables dependiendo al enfoque utilizado en el microscopio Oculyze (Figuras 9,10).

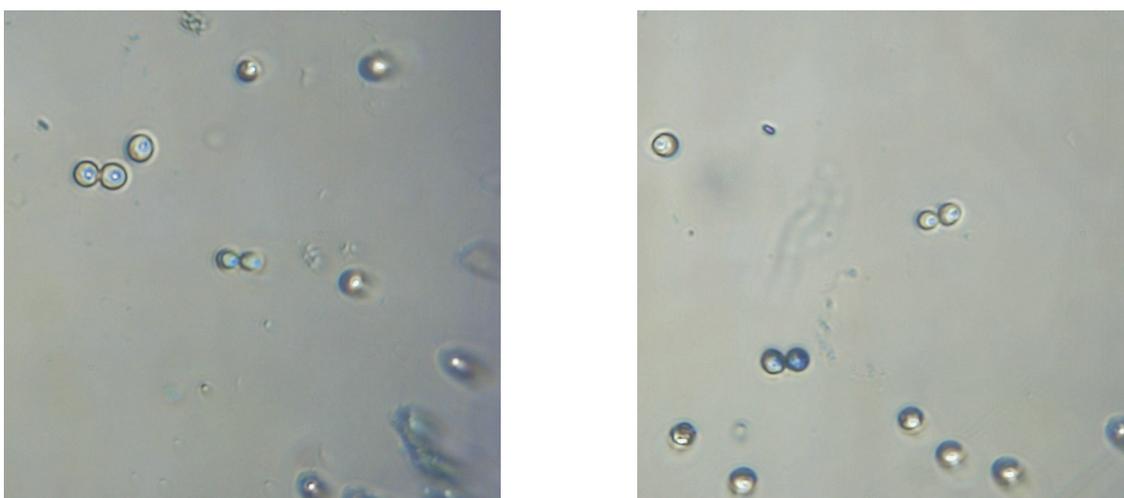


Figura 9: Células observadas con el microscopio Oculyze.

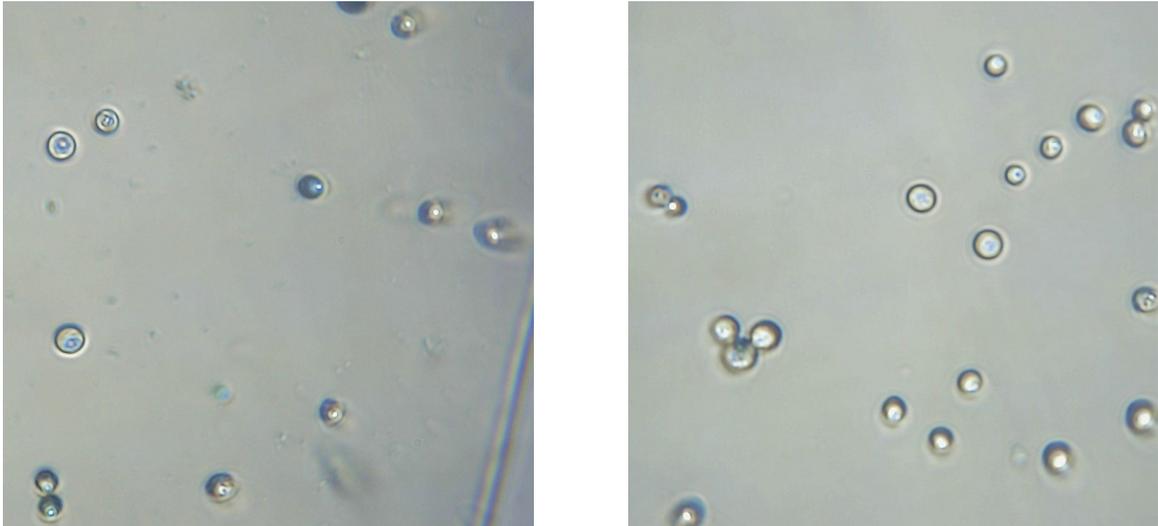


Figura 10: Células observadas con el microscopio Oculyze.

Otra variable que puede afectar la diferencia de resultados entre cada sistema de análisis de conteo y viabilidad es el uso del indicador utilizado para la tinción de muestras. Oculyze recomienda el uso de violeta de metilo para que los resultados sean más precisos y poder así reducir la variación de la intensidad del color en cada muestra (Figura 11 y 12).

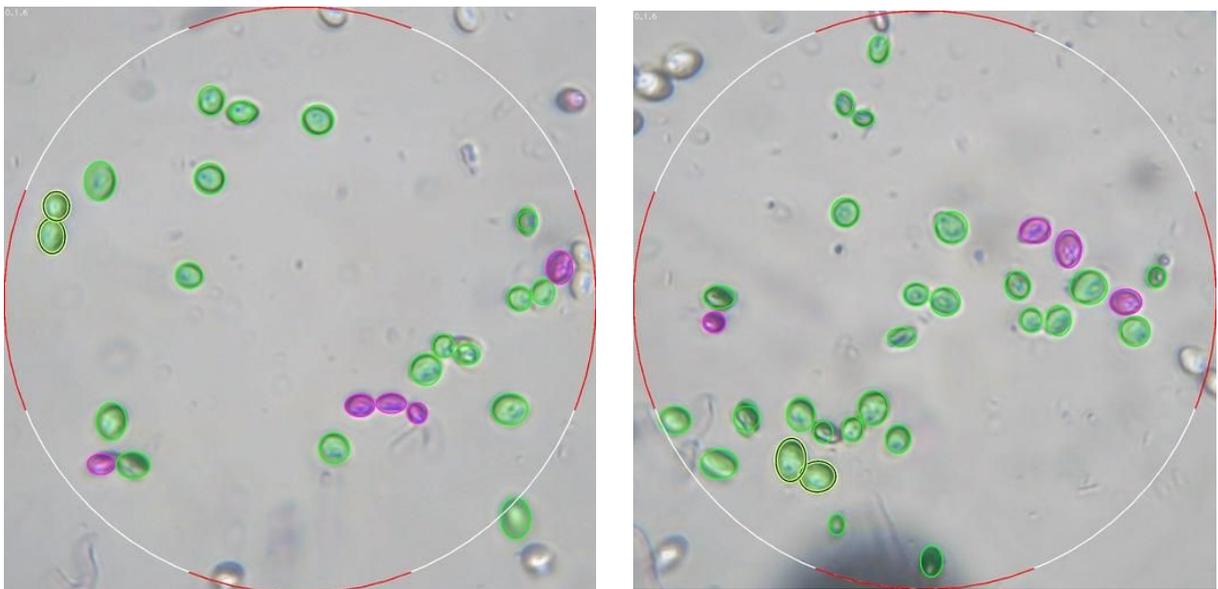


Figura 11: Células analizadas con el sistema Oculyze, utilizando violeta de metilo.

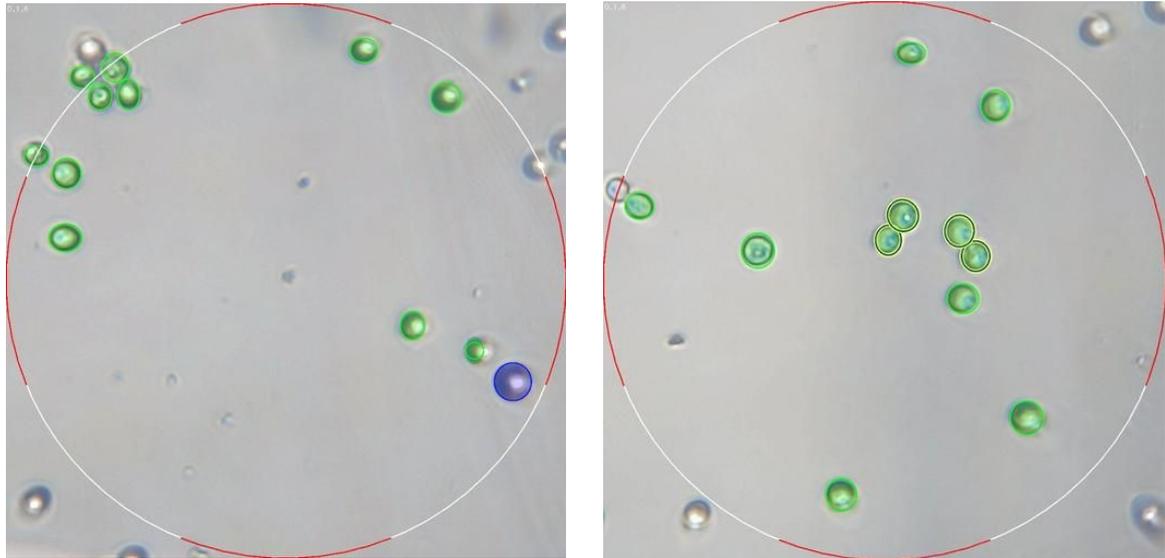


Figura 12: Células analizadas con el sistema Oculyze, utilizando azul de metilo.

El análisis donde se nota una menor desviación estándar es el realizado para la C4, donde en comparación a los análisis de las cervezas C1, C2 y C3, se decidió tomar la fotografía en el sistema Oculyze basado en el mejor enfoque de la imagen y no en la mayor cantidad celular mostrada en la parte inferior izquierda de la aplicación.

Durante el presente estudio, se observó que al hacer uso del violeta de metileno, la desviación estándar es aún menor entre cada sistema, además del que el proveedor del sistema Oculyze recomienda el uso del indicador del violeta de metileno dado la efectividad demostrada por la ASBC.

Debido a que no se cuenta con suficiente dilución del violeta de metileno se decide hacer la comparativa sólo con el azul de metileno para analizar la viabilidad de las muestras.

Al hacer uso continuo de la cámara del sistema Oculyze, se puede notar el desgaste de esta y es posible que sea una variable que genere un error en el análisis de las muestras. Se requiere definir el momento ideal de enfoque de imagen para evitar dañar la cámara y asegurar un correcto análisis.

Los resultados obtenidos para el conteo y viabilidad celular con cámara Neubauer concuerdan con la cantidad celular esperada en cervezas de primera generación así

como en las cervezas de segunda generación, puesto que los resultados coinciden con el porcentaje de viabilidad (49%) antes de ser re utilizada la levadura de segunda generación en cervezas 1 y 3.

Por otro lado, de acuerdo a los resultados de viabilidad podemos observar que en cervezas de primera generación se está logrando el porcentaje de viabilidad óptimo para realizar una cosecha y almacenaje de levadura, sin embargo, en las cervezas de segunda generación, se están cosechando levaduras con un porcentaje de viabilidad muy por debajo de lo recomendado, lo que prolonga el proceso de fermentación hasta por dos días pudiendo ocasionar defectos a nivel sensorial.

En EDGE Brewing se ha realizado la re inoculación de levaduras en diversas ocasiones, sin embargo no se realizaba el análisis de conteo y viabilidad celular de la levadura cosechada por falta de personal y tiempo.

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El sistema Oculyze es sin duda un método innovador, práctico y preciso, herramienta extraordinaria para dar seguimiento al proceso de fermentación en caso de no contar con un microscopio. A pesar de que, cualquier persona que no esté entrenada para realizar el conteo y viabilidad celular puede hacer uso del equipo Oculyze y obtener resultados, se requiere un entrenamiento previo al uso de este equipo así como conocimiento técnico para la interpretación de resultados, asegurando que el protocolo de toma de muestras sea el correcto, evitando cualquier desviación de resultados.

Sería de gran importancia el poder comparar los resultados de este estudio con el uso de violeta de metileno para ambos sistemas de conteo y viabilidad celular, pues se puede observar que, con el uso de este indicador se genera una mayor resistencia a la desmetilación oxidativa de cada muestra y que la desviación estándar de los resultados de cada sistema analizado (EDGE & Oculyze) es menor.

Los resultados obtenidos para levaduras de segunda generación indican que el proceso de re inoculación utilizado en la fábrica debe optimizarse para evitar cualquier riesgo de contaminación por subproductos presentes en la cerveza derivados de la autólisis de la levadura.

En caso de que se requiera estandarizar el nivel de atenuación en la producción de EDGE Brewing es necesario mejorar el porcentaje de viabilidad en cervezas con levadura de segunda generación, puesto que, en este estudio se comprueba que el proceso fermentativo puede extenderse hasta por tres días más y en caso de temporada alta se requiere eficientar el tiempo de atenuación.

8. PROPUESTA DE PROTOCOLO DE INOCULACIÓN

Dados los resultados del presente estudio y a las condiciones de la cervecería, se recomienda implementar el siguiente protocolo para la mejora y estandarización de reutilización de levaduras:

- Definir fracción celular de levadura con mayor porcentaje de viabilidad. La extracción de levadura a almacenar deberá cuantificarse mediante su peso en Kg y de forma paralela analizar la viabilidad celular. Así podremos definir la estratificación óptima de levadura a almacenar.
- Presurización. Colocar una válvula de presión al tanque donde se almacenará la levadura cosechada, cerciorándose que la presión del tanque con CO₂ sea <5 PSI.
- Para reutilización de levadura, programar una oxigenación del mosto entre 4ppm - 35ppm (Boulton C. y Quain D, 2001). Hay una tendencia comprensible a sobre oxigenar mosto porque evita los problemas de las bajas tasas de fermentación y pobre crecimiento de levadura.
- Asegurarse que la temperatura del tanque de almacenamiento para la levadura esté entre 2 a 4 ° C.
- Planear que la levadura se reutilice casi de forma inmediata a su almacenamiento, máximo 1 semana.

Se recomienda documentar el conteo y viabilidad celular de cada proceso de inoculación de levaduras, esto ayudará a tomar acciones correctivas durante el proceso de cosecha y almacenamiento para asegurar el cumplimiento a estándares de calidad así como optimizar costos por uso de levaduras.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. American Society of Brewing Chemists. *Report of Subcommittee on Improved Microscopic Yeast Cell Counting*. Journal 46:123, 1988.
2. Boulton C. y Quain D. (2001). *Brewing Yeast and Fermentation*. Oxford, Blackwell Science Ltd.
3. Cöllü, Isil (2018). *Report on the evaluation of the Oculyze yeast cell-counting system*. Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin e.V. Berlin.
4. Deans, K., Pinder, A., Catley, B.J. and Hodgson, J.A. (1997) *Effects of cone cropping and serial repitch on the distribution of cell ages in brewery yeast*. Proc. Eur. Brew. Congr. 26, 469-476.
5. Hirst MB, Richter CL. *Review of aroma formation through metabolic pathways of Saccharomyces cerevisiae in beverage fermentations*. Am J Enol Vitic. 2016; 4:361-70.
6. Katherine A. Smart, Kay M. Chambers, Ivan Lambert, Cheryl Jenkins & Christopher A. Smart (1999). *Use of Methylene Violet Staining Procedures to Determine Yeast Viability and Vitality*, Journal of the American Society of Brewing Chemists, 57:1, 18-23.
7. Kunze, W. (2006). *Technology Brewing and Malting*. Berlín, Alemania
8. Michael H., (2009). *Handbook of Brewing*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 141-207.
9. Powell, C., Quain, D. y Smart, K. (2003). *The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation*. ELSEVIER, 149-157.
10. Wyeast Laboratories, Inc. 2019, Yeast Harvesting/ Re Pitching. <https://wyeastlab.com/yeast-harvesting-re-pitching>