



Manejo de Levaduras Cerveceras



Dr. Diego Libkind

Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología
Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y
Medioambiente (INIBIOMA), CONICET-UNComahue,
Bariloche, Argentina.

INIBIOMA



CONICET
U N C O

¿Qué es lo más importante en la elaboración de CERVEZA?

1° EL CERVECERO/A

2° LIMPIEZA y SANITIZACIÓN

3° UNA BUENA FERMENTACION

1° EL CERVECERO/A



Control

Capacitación



2° LIMPIEZA y SANITIZACIÓN

| | Limpieza Química Alcalina | Limpieza Química Acida | Desinfección Química |
|-----------------|---|---|-----------------------------------|
| Producto | Soda Caustica (NaOH), + quelantes, buffers | Ac. Fosfórico | Ac. Peracético (peroxiacético) |
| Cuando? | Siempre | Piedras, oxalato de calcio, depende tipo de agua | Siempre |
| Concentración?* | 0,8 – 2,0 % (1%) | 0,5 – 1,5 % | 0,2 – 0,5% (0,25%) |
| Temperatura | 40-80°C (>60°C) | 20-70°C | 10-30°C (20°C, evap) |
| Tiempo | 20-60min (acción mecánica) | 15-30 min | 2-30 min |
| Enjuage | Si (60°C) | Si (60°C) | No |

3° UNA BUENA FERMENTACION



Levadura

¿Qué es una LEVADURA?

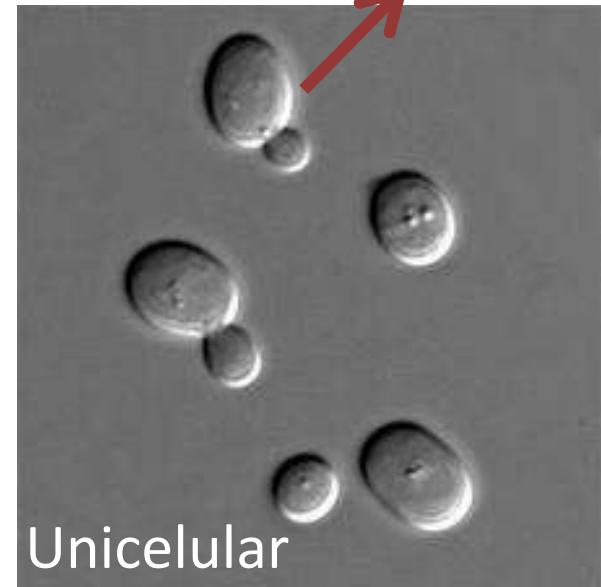
Hongo



Saprófito, oportunistas,
ambientes húmedos



Gemación
Reproducción Asexual



(1 célula = 1 individuo)

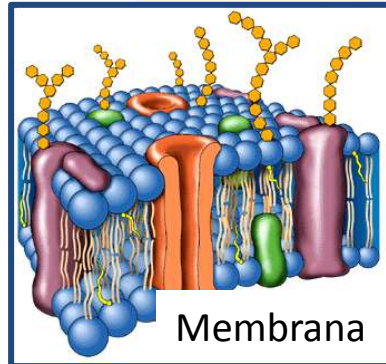
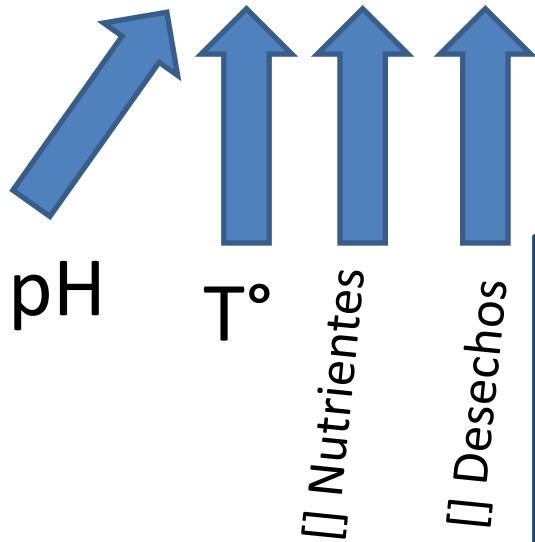
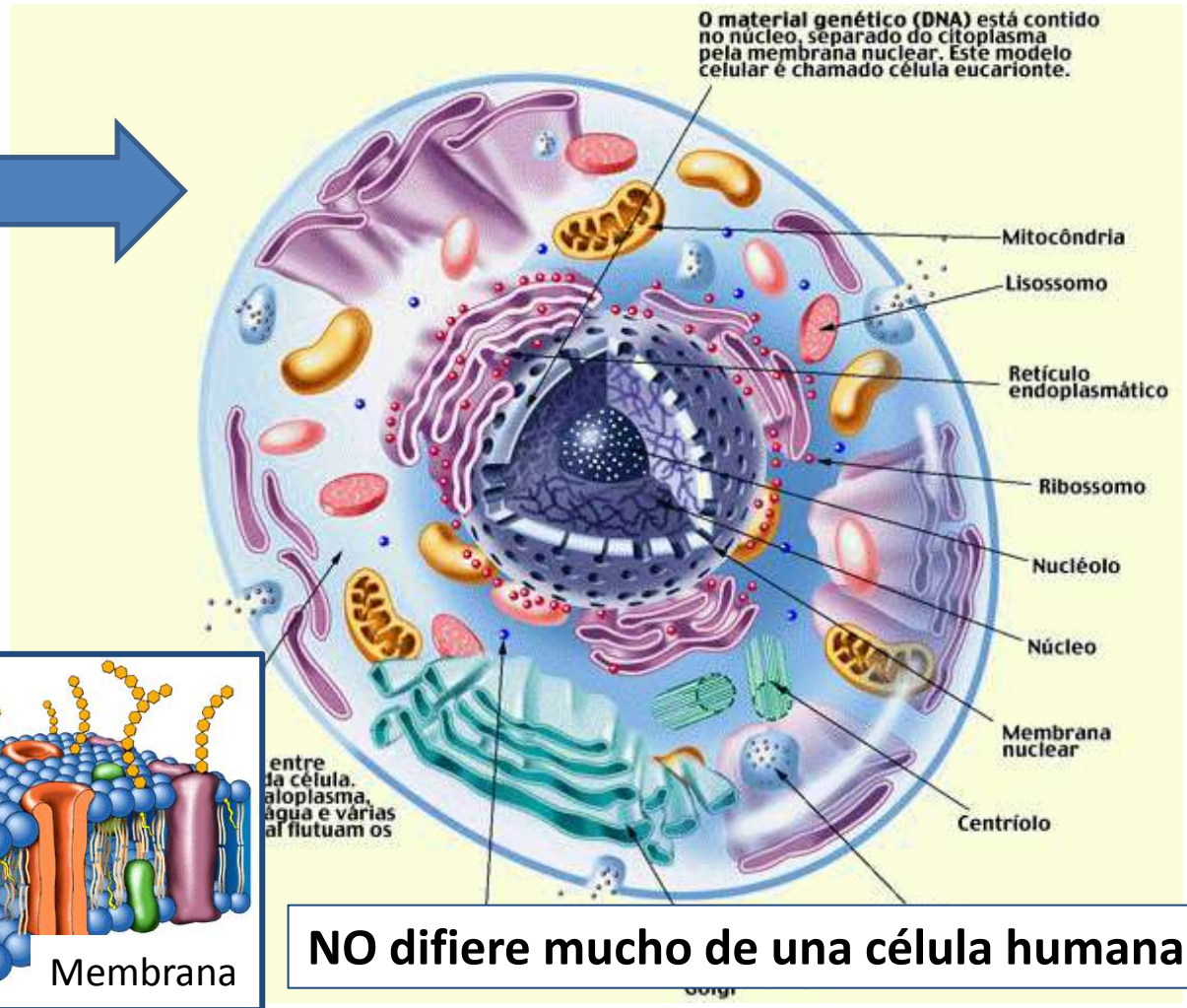
Microscópicos (3-10 μm)

¿Qué significa ser UNICELULAR?

¿Sencillo?

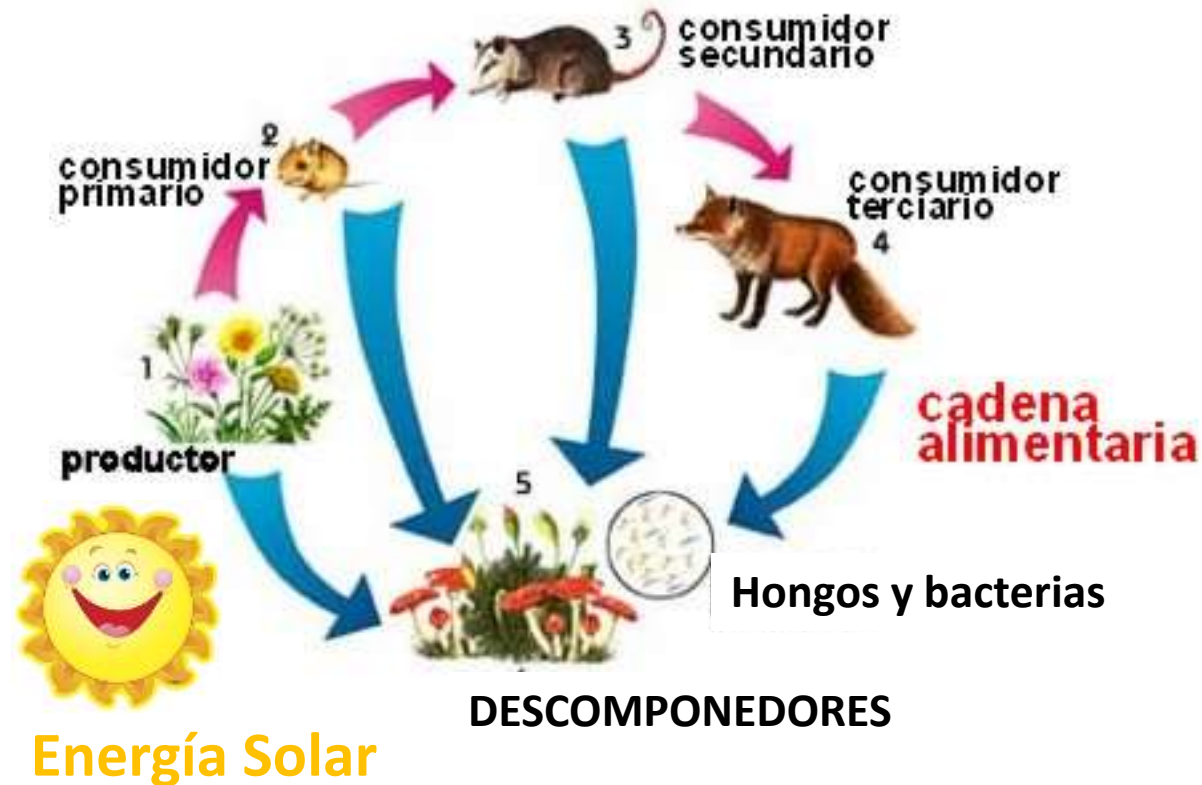


Esquema de la estructura interna de una célula de levadura



Muy susceptibles a cambios del ambiente... físico y químico

¿Qué hacen?



Descomposición de materia orgánica
para... *comer y reproducirse*



Levaduras

¿Para qué las usamos?



Cerveza

Vinos



Champagne



Pizza



Pan



Sidra



Chocolate



Cafe



Salsa Soja



Biocombustibles

OTROS: Compuestos químicos, vacunas, hormonas, prebióticos, etc.

Bebidas destiladas:
Whisky, Vodka,
Tequila, Pisco, etc.

¿Para qué las usamos?



Cerveza

Vinos



Champagne



Pizza



Pan



Sidra



Chocolate



Salsa Soja



Cafe



Biocombustibles



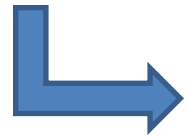
Bebidas destiladas:
Whisky, Vodka,
Tequila, Pisco, etc.

OTROS: Compuestos químicos, vacunas, hormonas, prebióticos, etc.

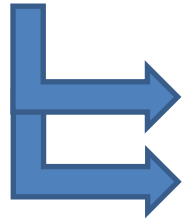
Levaduras



> 1800 especies conocidas



Saccharomyces (hongo del azúcar)



Saccharomyces cerevisiae (ALES, pan, vino)

Saccharomyces pastorianus (LAGERS)

Híbrido (Ale + ?)



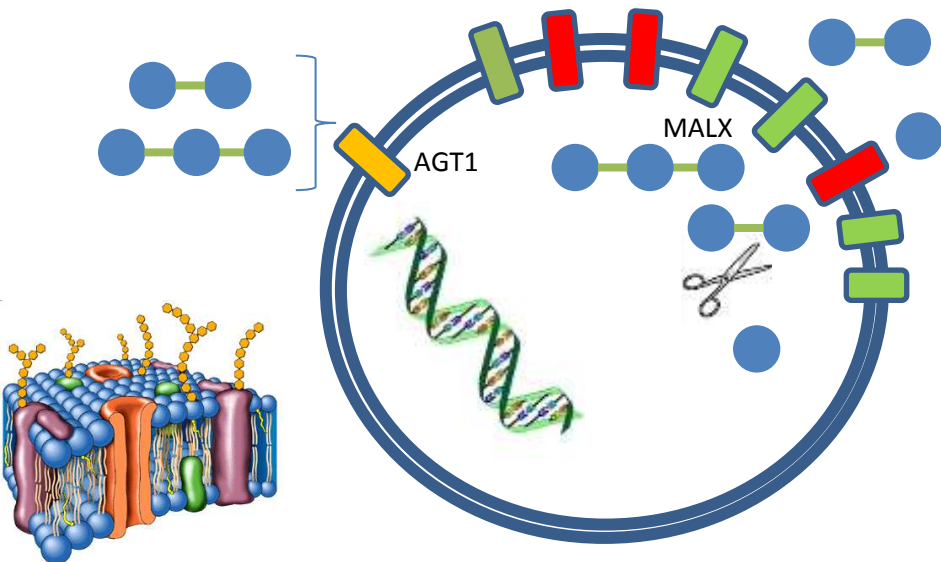
Levaduras domesticadas =

Levaduras cerveceras

Adaptadas a las condiciones de fermentación a través de la constante re-utilización y selección por los maestros cerveceros



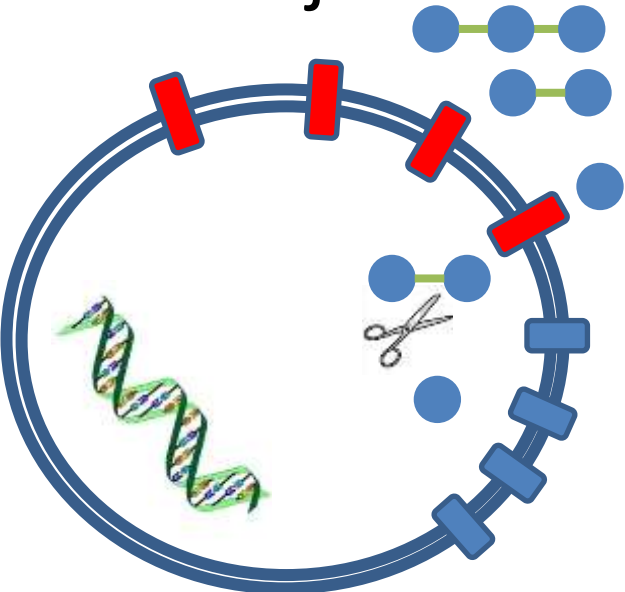
Levaduras Domesticadas



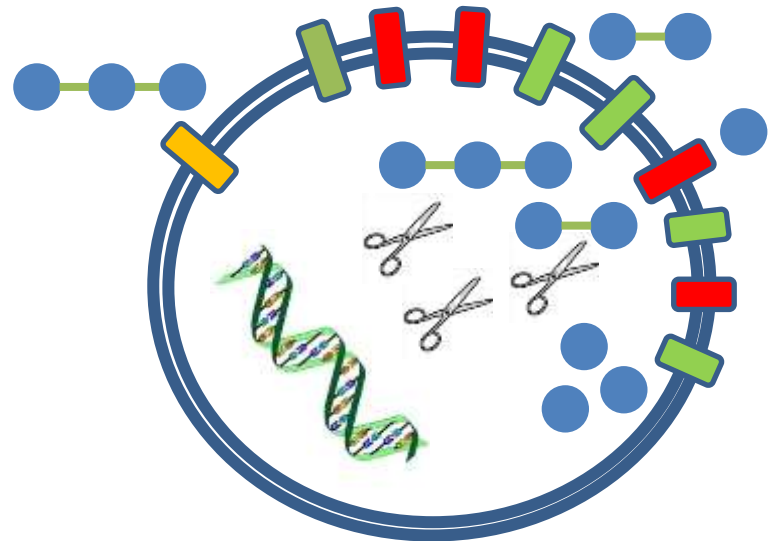
Mosto Cerveceo

- **Glucosa** (5-10%)
- **Maltosa** (60-70%)
- **Maltotriosa** (15-20%)

Salvajes



Domesticadas



LEVADURAS

CERVECERAS

¿De dónde vienen?

Principales levaduras de Cervecería

Levaduras Ale

S. cerevisiae

Agente fermentación originario (6000 A.C)

Gran número de cepas y variabilidad



Levaduras Lager

S. pastorianus

Aparición más reciente (cientos de años) en relación a la práctica de fermentación a menores temperaturas (Baviera).

Híbrido entre una levadura ALE y una levadura adaptada al frío: *S. eubayanus*



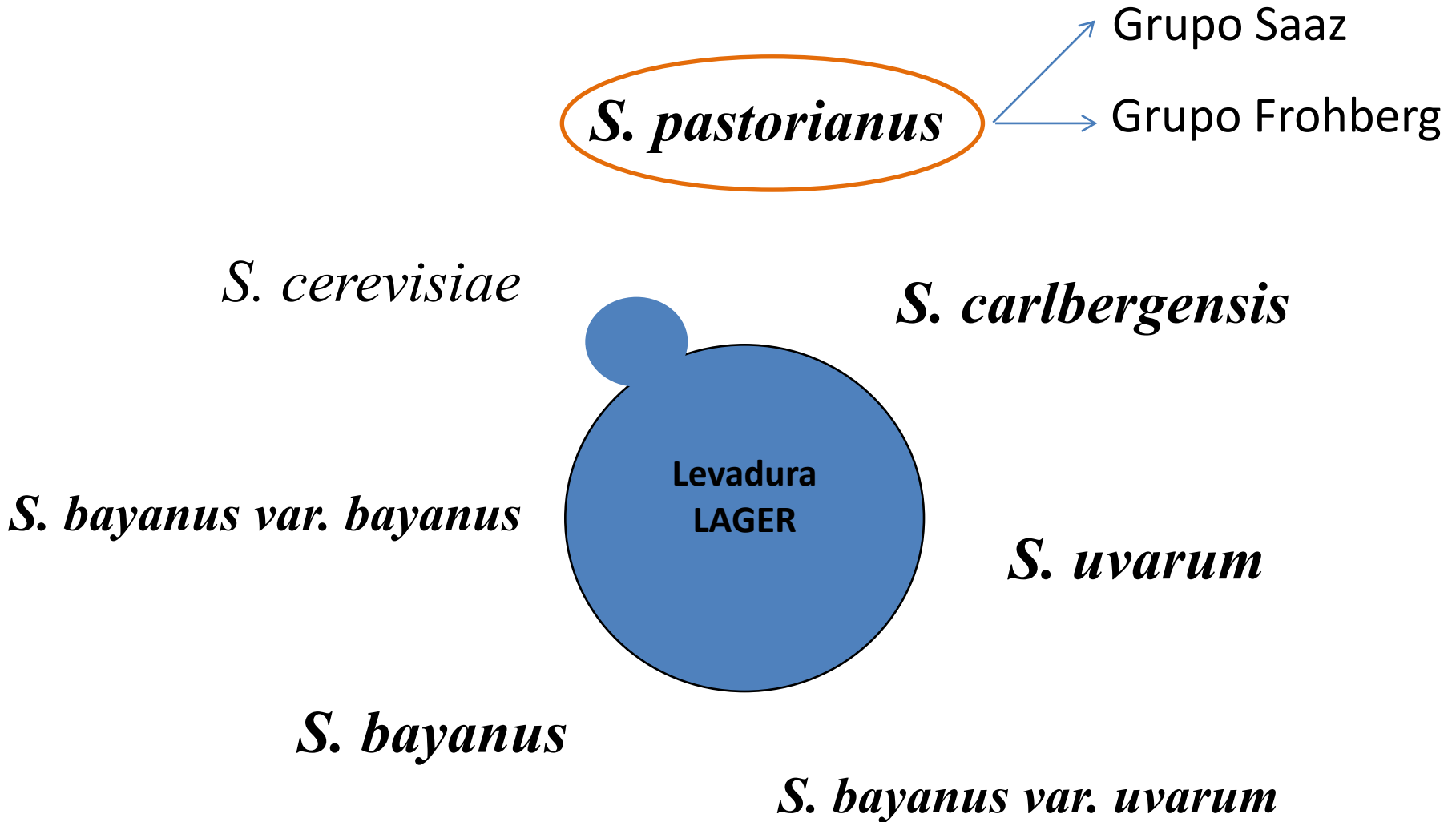
Posee ventajas selectivas a bajas temperaturas.

Dos variantes principales (Saaz y Froberg)

Bajo número de cepas y variabilidad

Levadura más estudiada

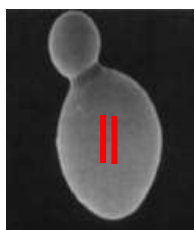
Taxonomía de Levaduras LAGER



Origen del proceso Lager, Cerveza Lager, y levadura Lager

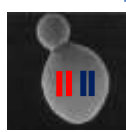
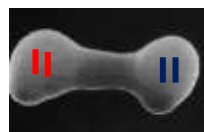


Inicio producción cerveza Lager.

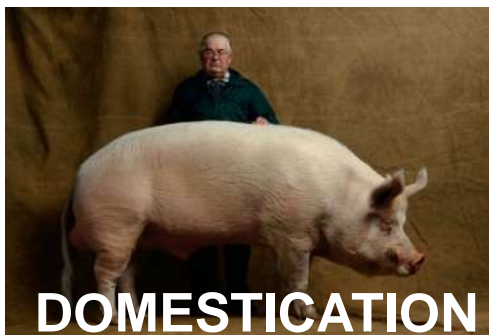
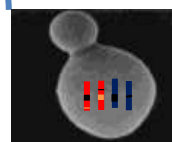


S. cerevisiae
+*S. uvarum*?
+*S. kudriavzevii*?

~1500



Proceso evolutivo influenciado por los humanos para satisfacer sus necesidades.



DOMESTICATION



Proto-Lager Levadura



?

Saccharomyces adaptada al Frio

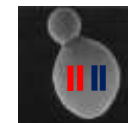
S. bayanus?

S. uvarum

Levadura Lager *S. pastorianus*



Aislamiento de cepa LAGER pura y distribución en principales cervecerías.



Levadura Híbrida (Allopoliploide)



1883

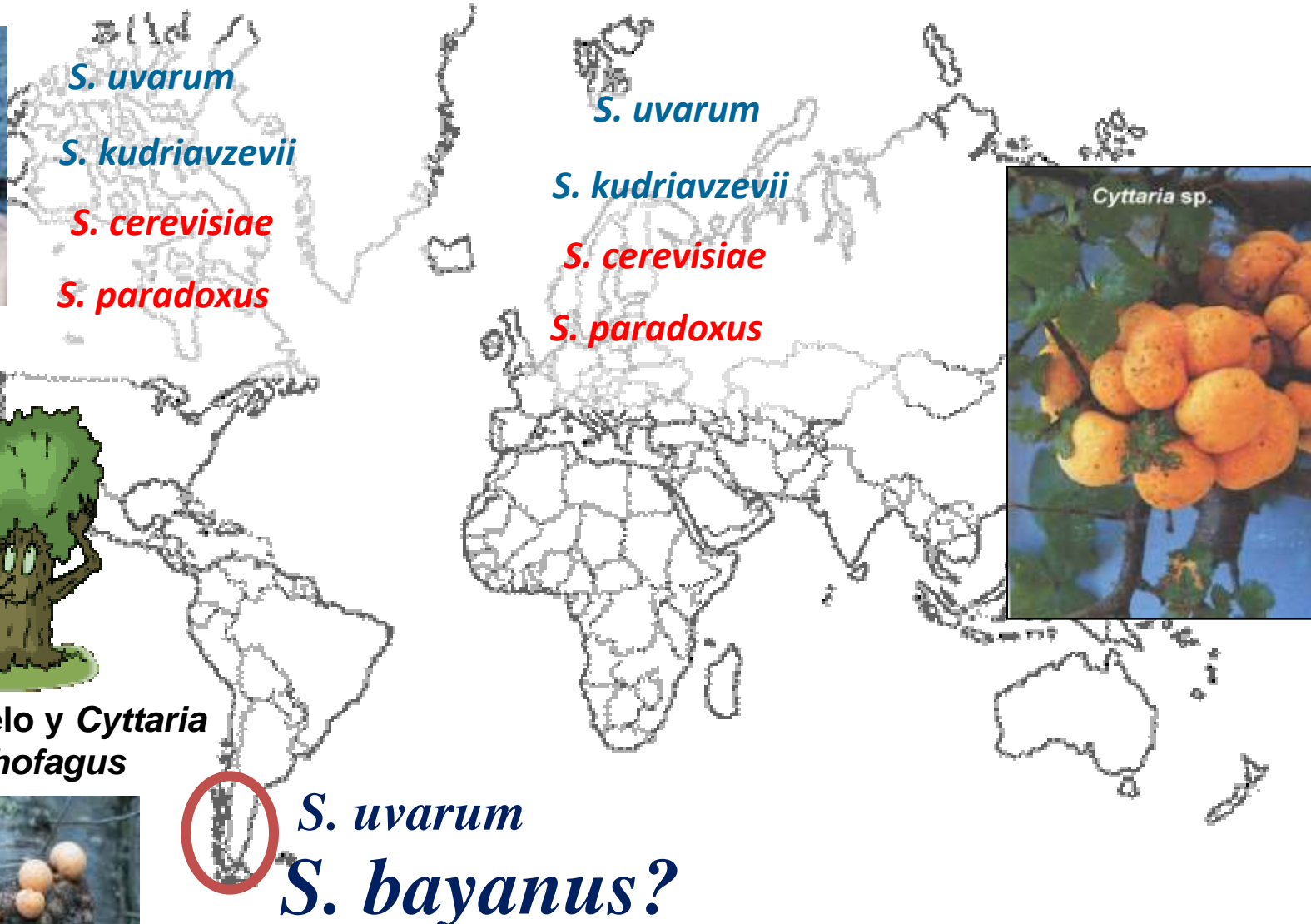
Resultados de la búsqueda en hemisferio sur



Jose Paulo Sampaio (Portugal)



Corteza, suelo y *Cyttaria* en *Nothofagus*



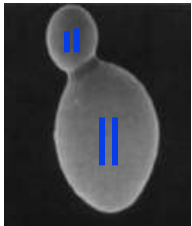
Cyttaria sp.

➤ Es la cepa patagónica el progenitor faltante?



Secuencia genómica usando Next Generation Sequencing Technology (Illumina GAI, 36bp single-paired end, 13x cobertura).

Cepa patagónica



...ATGCCTGATTTCTTTAATTGGGCCTAATCATC...

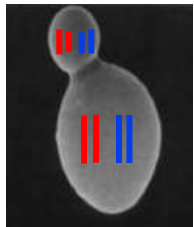
S. bayanus?



99,5 % homología



Dr. Chris Hittinger
Universidad de Wisconsin
Madison, EEUU



...ATGCCTGATGTCTTTAATTGTGCCTATTCATC...

? Genoma no *S. cerevisiae*

...AGGGCCTTGATATGTGATTGTGTTTATTCATC...

S. cerevisiae

S. pastorianus

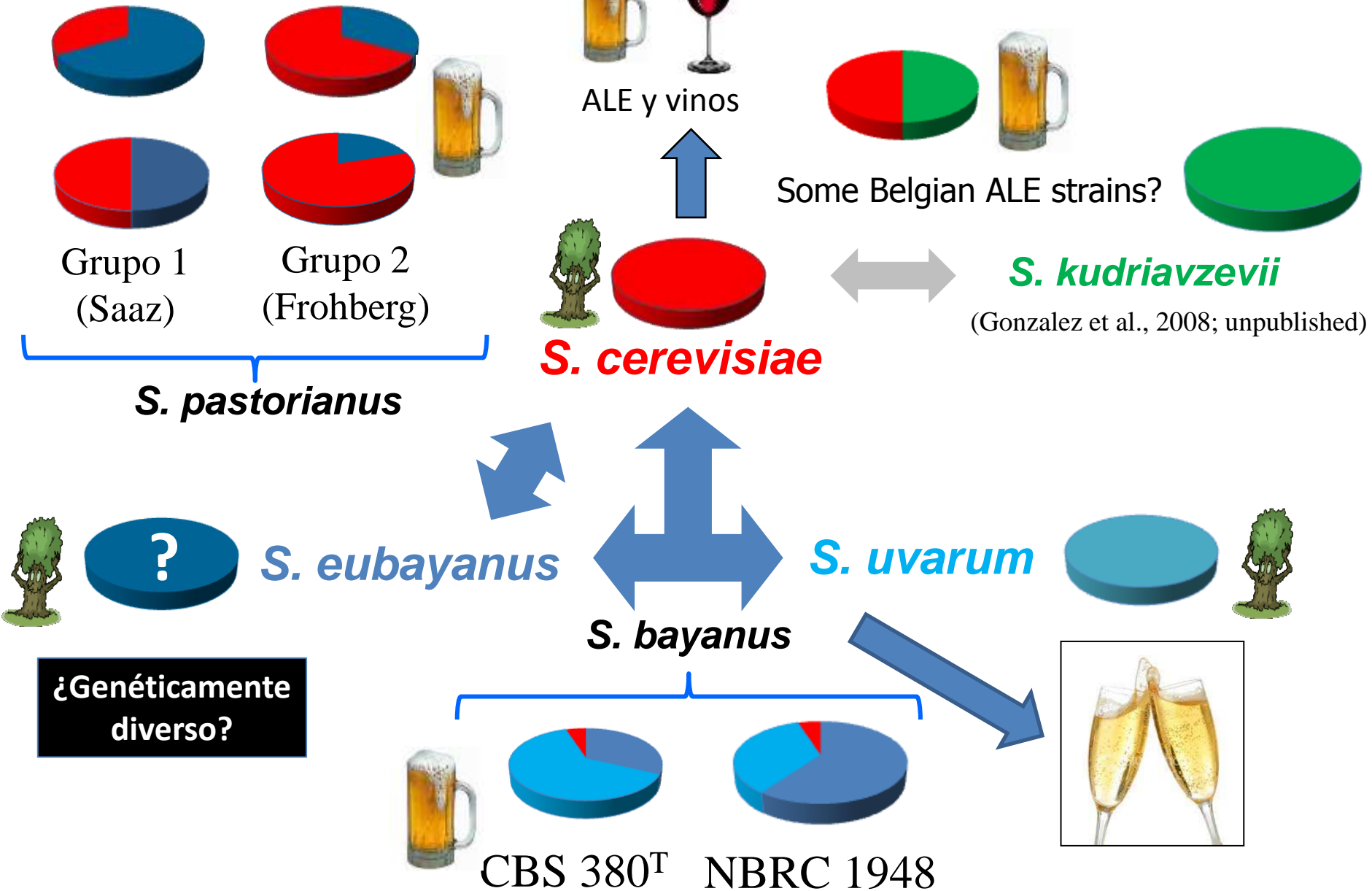
Levadura Lager W34/70

Se describe como *S. eubayanus*

S. eubayanus es el progenitor faltante de la levadura Lager

Genomic map of brewing strains and related species

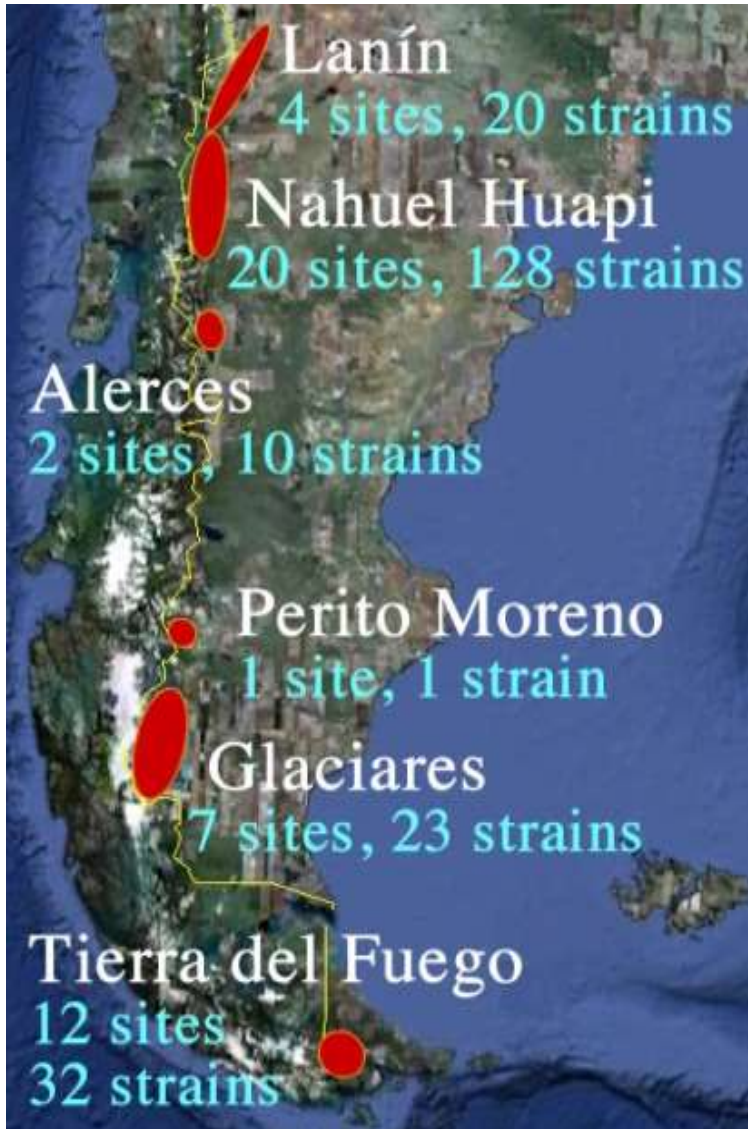
(Dunn & Sherlock, 2008)



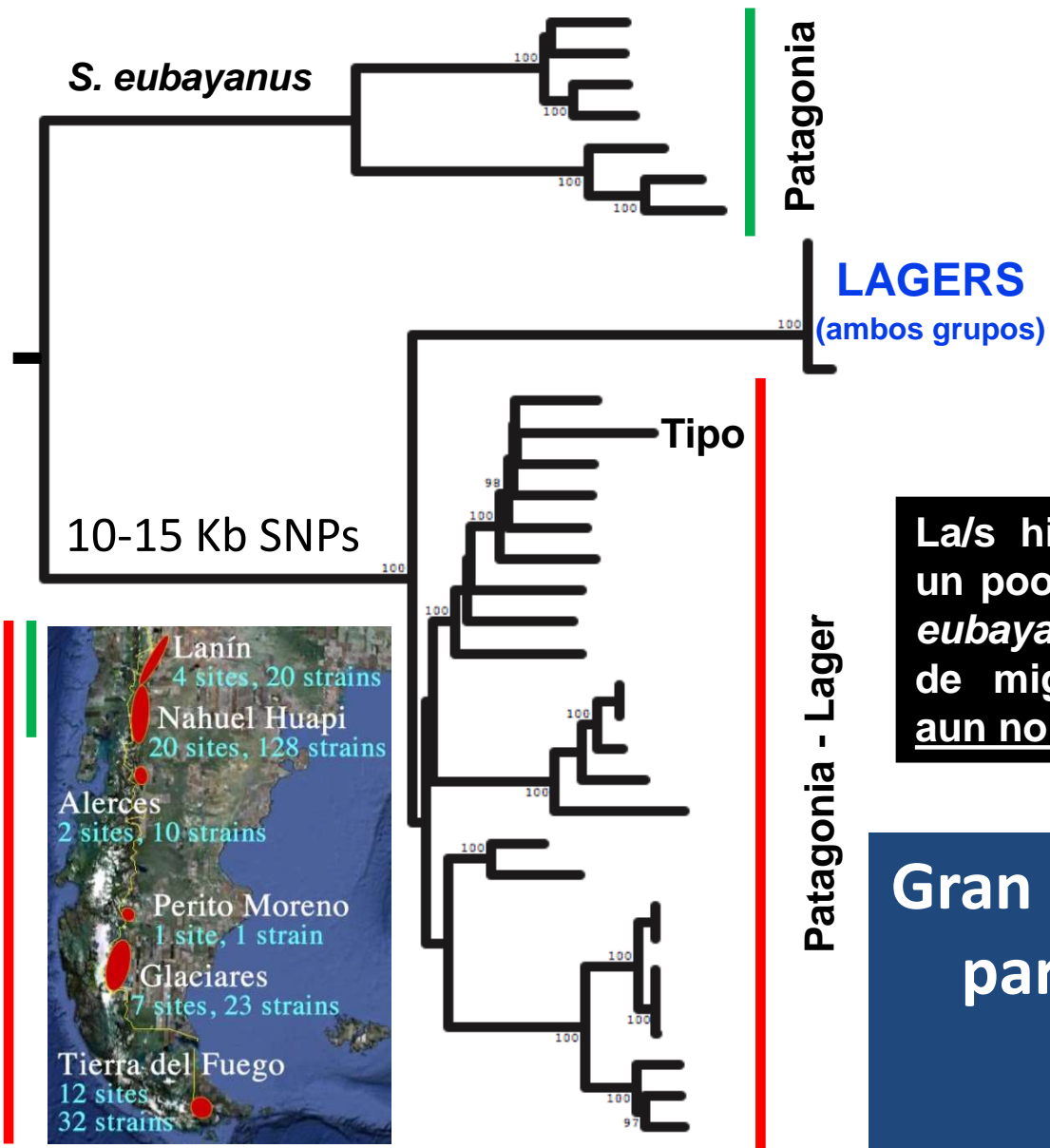
(Gonzalez et al., 2008; unpublished)

(Libkind et al., 2011)

Muestreo adicional en Patagonia (Argentina)



Diversidad y biogeografía de *S. eubayanus*



S. eubayanus presenta alta diversidad genética (~1%), y una gran abundancia en Patagonia lo que sugiere que es una especie establecida en la región hace mucho tiempo.
ESPECIE NATIVA

La/s hibridación/es ocurrieron con un pool genético muy pequeño de *S. eubayanus*, lo cual apoya la hipótesis de migración. Población específica aun no detectada.

Gran variabilidad genética para relevamiento de propiedades fermentativas



LEVADURAS
CERVECERAS
¿Ingrediente?

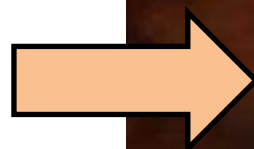
Levaduras cerveceras: Cómo transformar un **ingrediente** en una herramienta vital para la mejora de la calidad, productividad, rentabilidad y diferenciación productiva

Ingredientes:

Agua, Malta, Lúpulo, Levaduras



...oxígeno, sales, adjuntos...



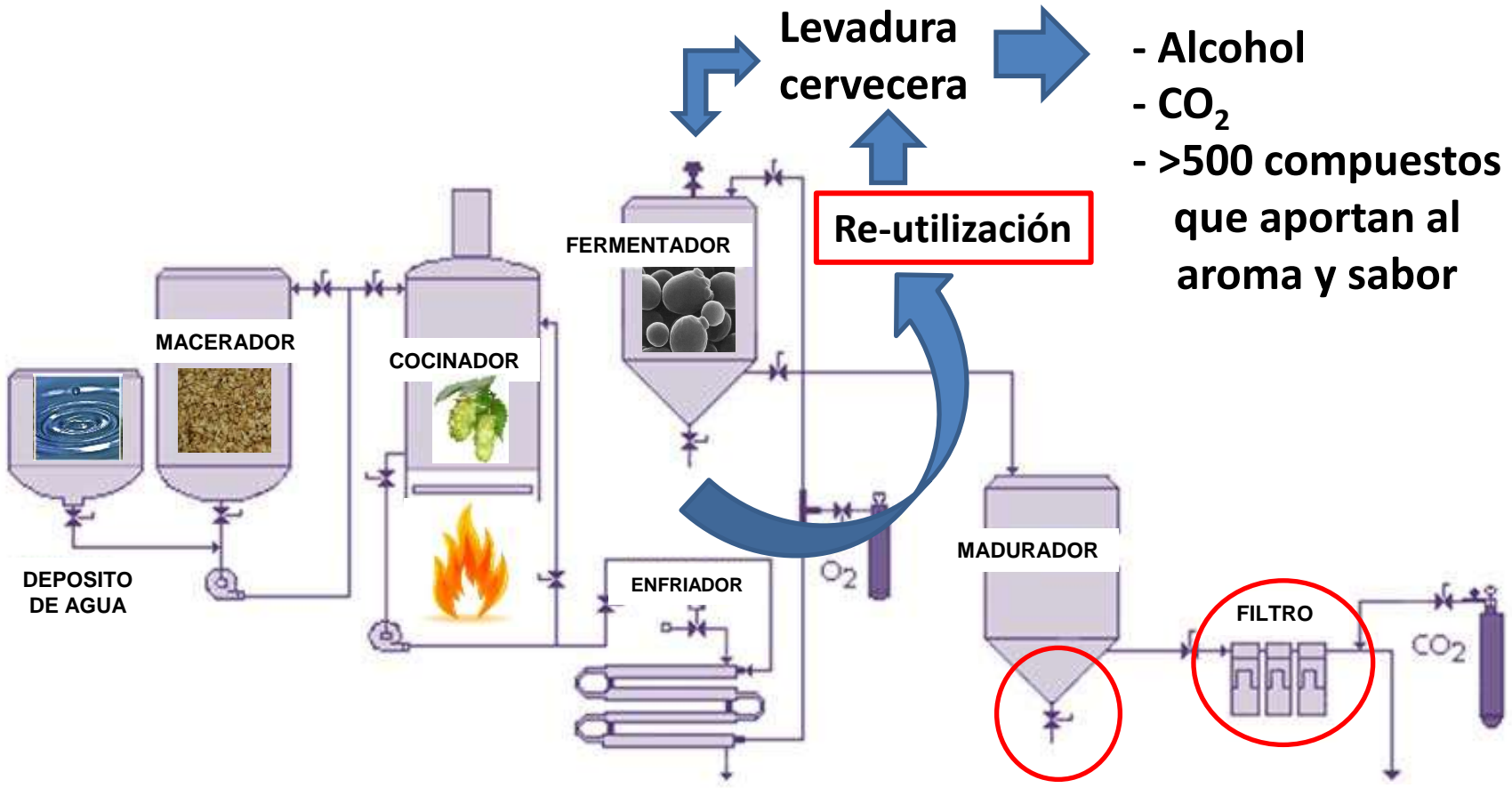
«... es el alma de la cerveza».

«El cervecero hace el mosto y la levadura la cerveza»

«...pongo la levadura y la dejo hacer su magia»

Expresiones comunes que minimizan el rol del cervecero!

Proceso de elaboración de cerveza (Rol de la *levadura cervecera*)



- Alcohol
- CO₂
- >500 compuestos que aportan al aroma y sabor

LEVADURA CERVECERA = INGREDIENTE?



¿Ingrediente?



- Participación activa pero transitoria → Rol transformante
- Ser vivo (unicelular) → **Proceso biotecnológico**
Necesidades fisiológicas...

Comer y Reproducirse

- Se multiplica → **Subproducto** -> Reutilización*

A la levadura no le
interesa hacer cerveza



¿Ingrediente?



Debe ser manipulada/conducida...



Herramienta

¿Quién la maneja?



VOS

LEVADURAS

CERVECERAS

¿de dónde las obtengo?

Fuentes de levadura:

Laboratorio especializado



Levadura re-utilizada



- Propia
- Otra cervecería



VS.



Levadura seca

Levadura liquida

FUENTES DE LEVADURA CERVECERA

Rol en el *flavor*: *aroma y sabor* de la cerveza



Diferenciación productiva

Levadura seca



| Categorías | Secas | Líquidas |
|------------|-------|----------|
| Ale | 2-3 | 25 |
| Lager | 1-2 | 15 |
| Especiales | 1-3 | 19 |

10%



Levadura líquida



**100% importadas
 disponibilidad
 limitada y variable**

**No existen en la
 Argentina**

Levaduras secas vs. líquidas

Levadura seca

Levadura líquida

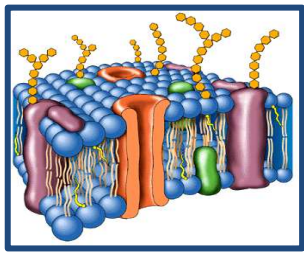


| Categorías | Secas | Líquidas |
|-----------------------|------------------------------|-----------------------|
| Pureza | Baja o media | Alta |
| Re-utilización | Limitada | ok |
| Precio | Bajo (10v menos) | Alto?* |
| Comportamiento | Menor floculación y esterres | Ok |
| Variedades | Limitada (10%) | Ilimitada >100 |
| Almacenamiento | Prolongado (años) | Reducido (sem./meses) |
| Uso | Principiantes | Avanzados |

LEVADURAS

CERVECERAS

Consejos de hidratación

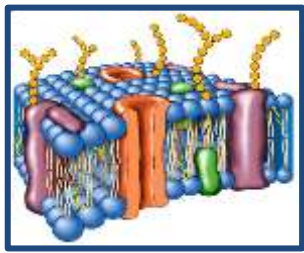


Pasos de rehidratación (1)

(Levadura Ale)



- Esparcir la levadura en la superficie de agua limpia y esterilizada a 30-35°C (Ale), 20-25°C (Lager)
- **No mezclar !!!**
- Dejar reposar 15 Min. sin mover a 30 – 35 °C (tapado)
- La presencia/ausencia de espuma no es indicador de vitalidad
- **Sanitizar todos los elementos que entren en contacto con el agua o la levadura con alcohol 70% y exponer lo menos posible al aire.**



Pasos de rehidratación (2)

(Levadura Ale)



- Después de 15 Min. mezclar gentilmente hasta que la levadura esté en suspensión
- Dejar reposar 5 min.
- **Atemperar gradualmente**, cada 5 min agregando alicuotas de mosto, evitando los cambios de temperatura mayores a 7°C.
- **Sanitizar todos los elementos que entren en contacto con el agua o la levadura con alcohol 70% y exponer lo menos posible al aire.**

Pasos de rehidratación (3)

(Levadura Ale)



- Una vez atemperado inocular inmediatamente
- Tiempo total proceso: 30-**60** min
- Aireación del mosto no es necesaria*
- **Tasa de inoculación:**
0,8 - 1 g/L (Ale)
El doble para Lagers

LEVADURAS
CERVECERAS
Líquidas de
Laboratorios
especializados

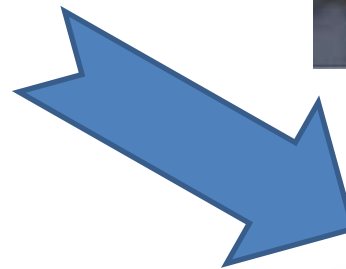
Fuentes de levadura:



Levadura re-utilizada



- Propia
- Otra cervecería



- Stamm
- LaLear



Levadura liquida



Levadura seca

Conservación de levaduras y provisión de inóculo líquido

Estabilidad genética

Pureza

Banco de levaduras (>100)

Crio-conservación



Conservación

Propagación a escala
(5 ml – 7Lts)



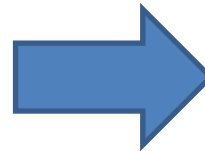
Propagación
Laboratorio

Propagación a escala
(20 – 50Lts)



Propagación
Semi-piloto

Propagación
Piloto
(50-100Lts)



La contaminación debería ser nula

Banco de levaduras

Crio-conservación



Propagación a escala Lab
(5 ml – 7Lts)



Propagación a escala piloto
(20 – 100 Lts)



Conservación

Propagación
Laboratorio

Propagación
Lab/cervecería

HOY

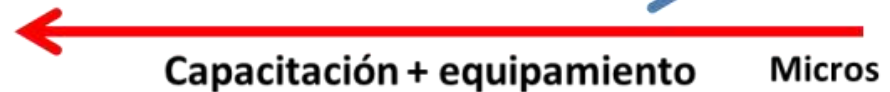
MABB



FUTURO

MABB

Equipamiento



MABB: Lab. Microbiología Aplicada y Biotecnología Bariloche (INIBIOMA, CONICET – UNComahue)

Fuentes de levadura:

Laboratorio especializado



Levadura re-utilizada



- Propia
- Otra cervecería



Levadura seca

Levadura liquida



- Vos re-utilizas?. – Noooo, Yo uso siempre levadura fresca-

Recuperando un arte milenario....



Qué cambia cuando re-utilizo?

| % Insumos/tipo levadura | Seca* | Seca | Líquida |
|-------------------------|-------------|------------|------------|
| Malta | 44,2 | 77,1 | 77,4 |
| Levadura | 45,5 | 4,2 | 3,8 |
| Lúpulo | 5,9 | 10,4 | 10,5 |
| Otros | 4,4 | 8,3 | 8,4 |
| Reutilización | No | si | Si |

Micro-cervecería de 15.000 Lts mensuales, solo materia prima. Precios julio 2014.

* empleada según indicaciones fabricante (dosis).

Levaduras secas vs. líquidas

Levadura seca

Levadura líquida



| Categorías | Secas | Líquidas |
|-----------------------|------------------------------|-----------------------|
| Pureza | Baja o media | Alta |
| Re-utilización | Limitada | ok |
| Precio | Bajo (10v menos) | Alto?* |
| Comportamiento | Menor floculación y esterres | Ok |
| Variedades | Limitada (10%) | Ilimitada >100 |
| Almacenamiento | Prolongado (años) | Reducido (sem./meses) |
| Uso | Principiantes | Avanzados |

Re-utilización de levaduras

Colectar lo antes posible... en caliente

- Atenuación deseada
- Remoción de acetaldehído y precursores diacetilo

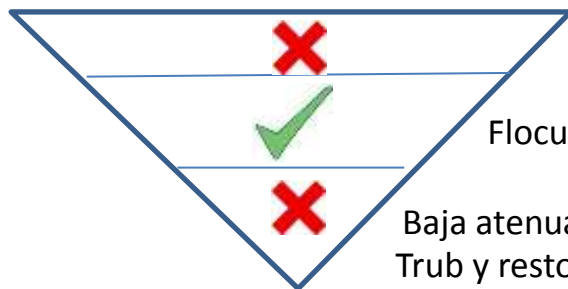
Inicio de enfriado

Para uso inmediato: **Antes de llegar a los 10-12°C**

Para almacenado en frío: **Cosechar al 1er - 2do día**

Control de temperatura en el cono (independiente!)

Levadura = aislante



Baja floculación, posibles mutantes respiratorias

Floculación y atenuación promedio



Baja atenuación, alta floculación, células muertas
Trub y restos lúpulo

Alcohol



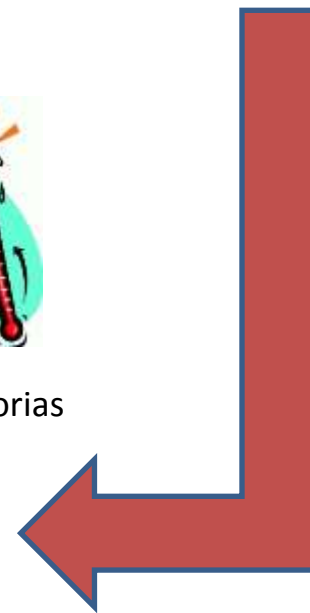
Presión



pH



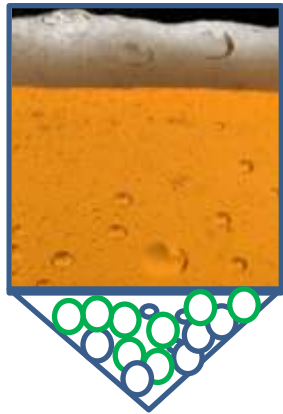
Nutrientes



Estratificación

Re-utilización de levaduras

¿Cuántas veces?: 3-5 (8-10)

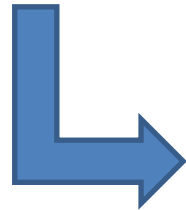


Airlock o
equivalente

Mosto
Oxígeno
Nutrientes

Inoculación

¿Cuánto?



Alcohol 70%
Ac. Peracético



Valores Referencia:
0,8 – 1 Kg / 100L



Re-Limpio y re-Sanitizado

Almacenado en frio (1-2°C)

<1 semana



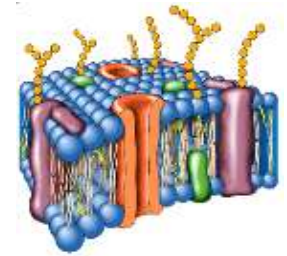
NO dejar crema y colocar nuevo mosto!

Utilizando levadura líquida: Cosecha de levaduras



LEVADURAS
CERVECERAS
¿Cuánto uso?

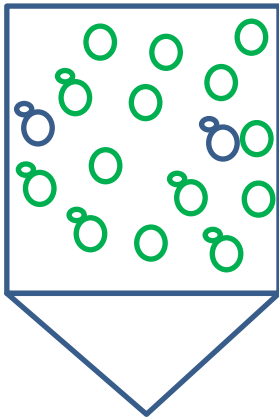
Tasa de inoculación



¿Por qué la cantidad de levadura es importante?

Sub-inoculación

INICIO



Exceso crecimiento levadura para alcanzar densidad crítica



Mayor estrés osmótico levadura



Retraso inicio fermentación (Lag: 24-48 hs) } Contaminación!!

Freno en fermentación

FINAL



Menor atenuación (azúcares residuales) } Contaminación!!

Alcoholes superiores, esteroides, diacetilo, comp. azufrados

Baja calidad de levadura para re-utilización (Células estresadas!)

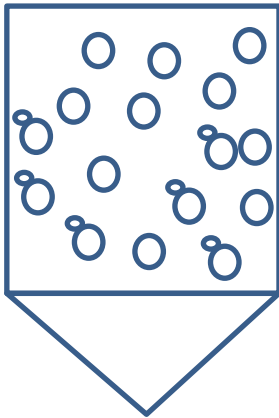
Tasa de inoculación

- Células nuevas
- Células viejas

¿Por qué la cantidad de levadura es importante?

Sobre-inoculación

INICIO



Fermentaciones muy rápidas y violentas
Autólisis por muerte de levaduras

FINAL



Bajos esterres
Falta de cuerpo, baja retención espuma
Aromas y sabores por autólisis levadura (goma, sulfuro)

Baja calidad de levadura para re-utilización (Células Viejas!)

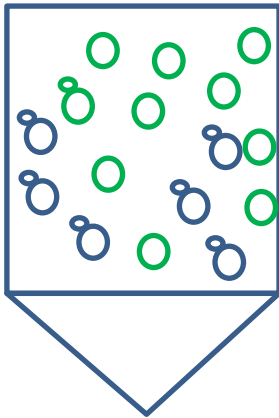
Tasa de inoculación

- Células nuevas
- Células viejas

¿Por qué la cantidad de levadura es importante?

Inoculación apropiada

INICIO



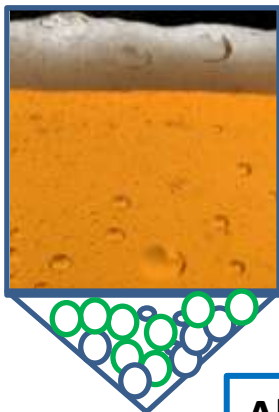
Fermentaciones eficientes y rápidas (Lag <12 hs)

Unas pocas duplicaciones (2-4 divisiones)

Mínimo estrés levadura



FINAL



Cervezas de fermentación limpia libres de *off-flavors*

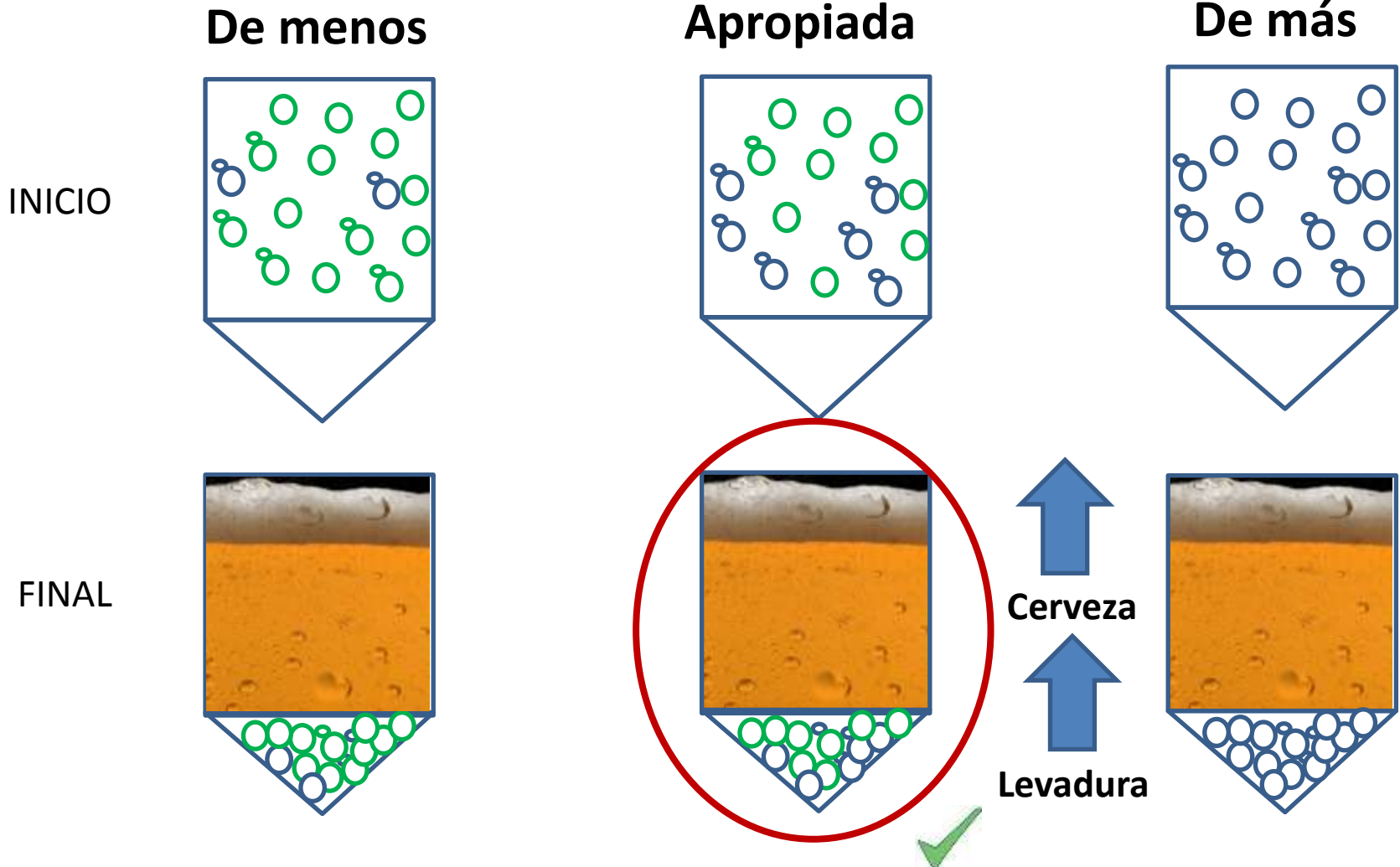
Aromas y sabores deseados

Alta calidad levadura para re-utilización (jóvenes y no estresadas)

Tasa de inoculación

¿Por qué la cantidad de levadura es importante?

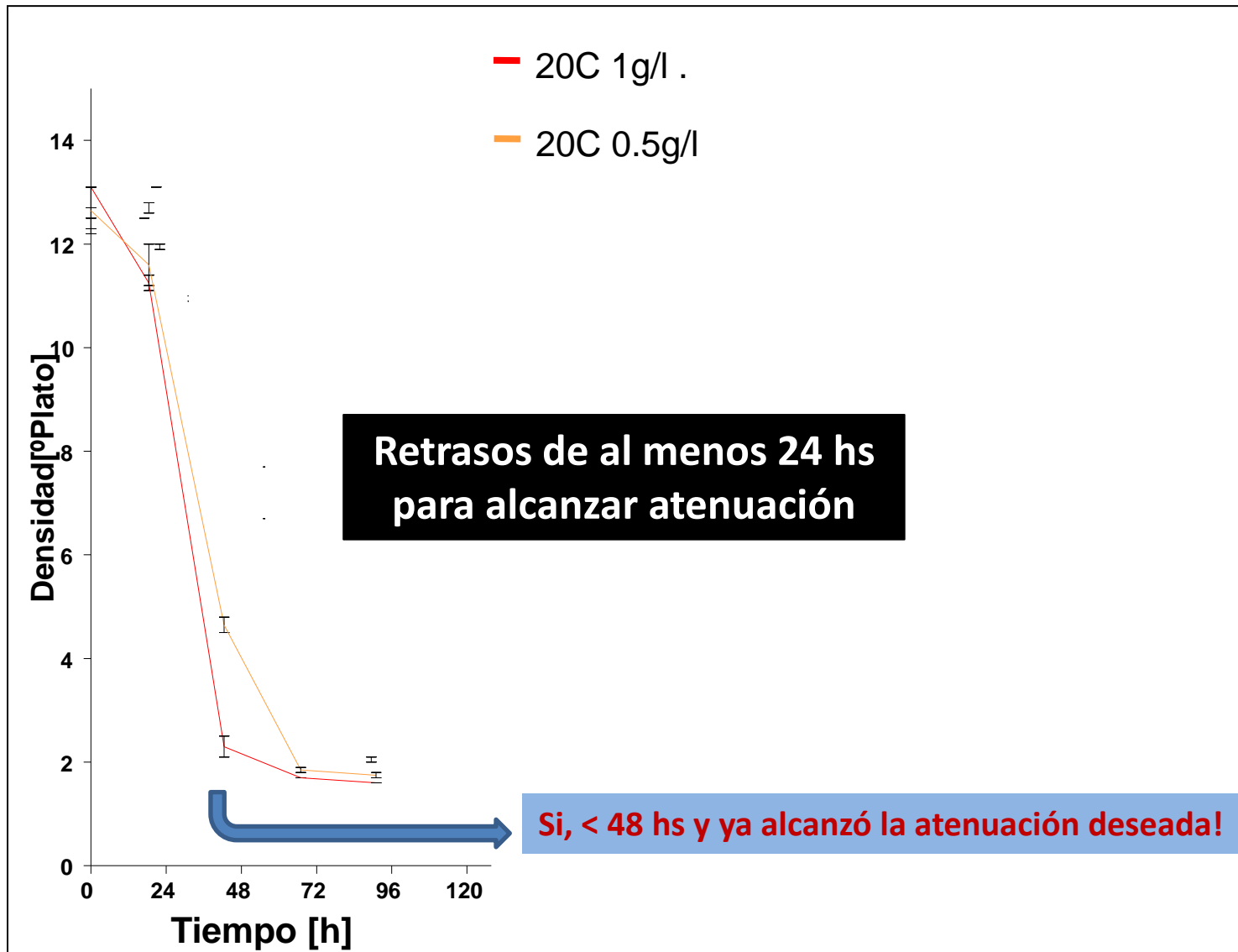
○ Células nuevas
○ Células viejas



Pensar en buscar una mejora calidad de levadura redonda en una mejor calidad de cerveza

Efecto de usar menor cantidad de levadura

Levadura Ale - Rehidratada



Densidad de levaduras en diferentes fuentes

| Fuente | Células/mL |
|---------------------------|--------------------|
| Cerveza (terminada) | <1 millón |
| Mosto inicio fermentación | 5-15 millones |
| Mosto final fermentación | 25-60 millones |
| Crema «slurry» | 1 – 3 mil millones |

Tipo de Levadura

Tamaño y forma de fermentador

Temperatura y tiempo de cosecha

**Valor referencia:
0,8-1 Kg cada 100 lts**






Mucha variabilidad!!




¿Cuánta levadura tengo?



Comparación de métodos para evaluar cantidad de levadura

| Método | Inversión | Tiempo | Contras | Ventajas |
|--|---|---------|---|-------------------|
|  Placa de cultivo (UFC) | Media (Lab) | >24hs | Esterilidad, personal entrenado. | Cuento Vivas |
|  Cámara Neubauer | Media ()  | 30 min | Requiere entrenamiento | Tinciones vitales |
|  Turbidez (espectrofotometría) | Alta | 30 min | Calibrar, partículas no levadura | Simple |
|  Automáticos <i>Coulter counter</i> <i>Citómetro de flujo</i> | Muy alta | <10 min | No diferencia viables, gemas ni flóculos. | Preciso |

 *Rango de inversión necesario: 3.500-6.000\$*



TASAS INOCULACION



Cantidades sugeridas de levaduras para inoculación

10 millones cel./ml

ALE: 18-19 °C

Células a inocular = 0,75 millones de células* x mL mosto x grados Plato mosto

$0,75 \times 10^6$

LAGER: 10-12 °C

Células a inocular = 1,5 millones de células* x mL mosto x grados Plato mosto

$1,5 \times 10^6$

Valores recomendados a la hora de **re-utilizar levadura**.

En el caso de utilizar *startes* frescos obtenidos apropiadamente, los valores recomendados pueden reducirse a la mitad.

Efecto Temperatura

Valores de referencia!!!

12° Plato = 1.048

LEVADURAS CERVECERAS

¿Y si tomamos el control?



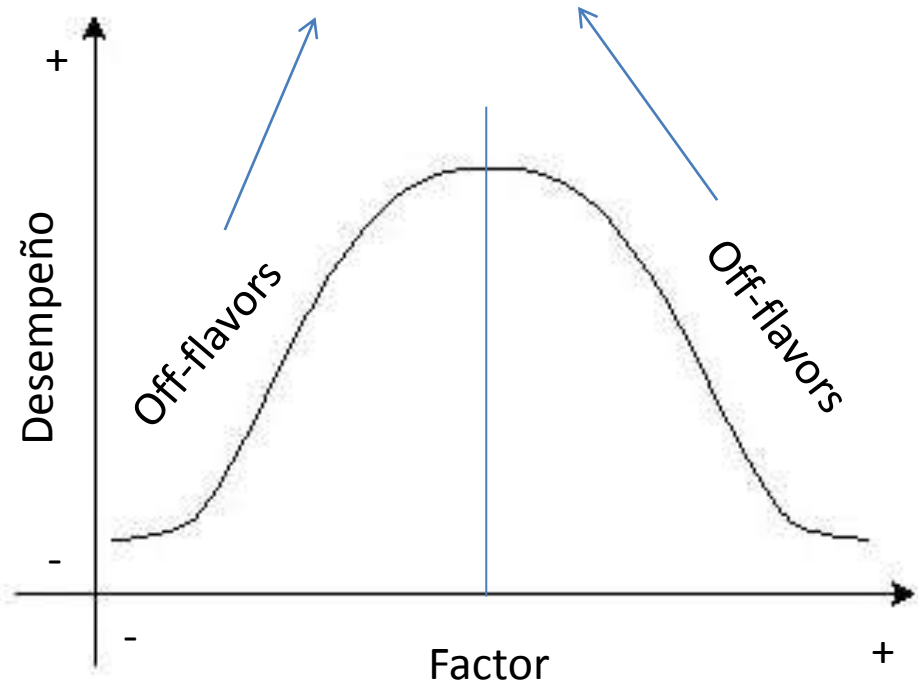
¿qué puedo controlar y cómo?

Cepa de levadura ↔ Características organolépticas deseadas

- Cantidad y calidad de levadura a inocular
- Temperatura fermentación
- Nutrientes mosto
 - Micronutrientes (vitaminas, Zn, etc.)
 - Oxígeno
- Hidratación (seca)
- Sanitización
- pH (5.2)

Análisis Sensorial

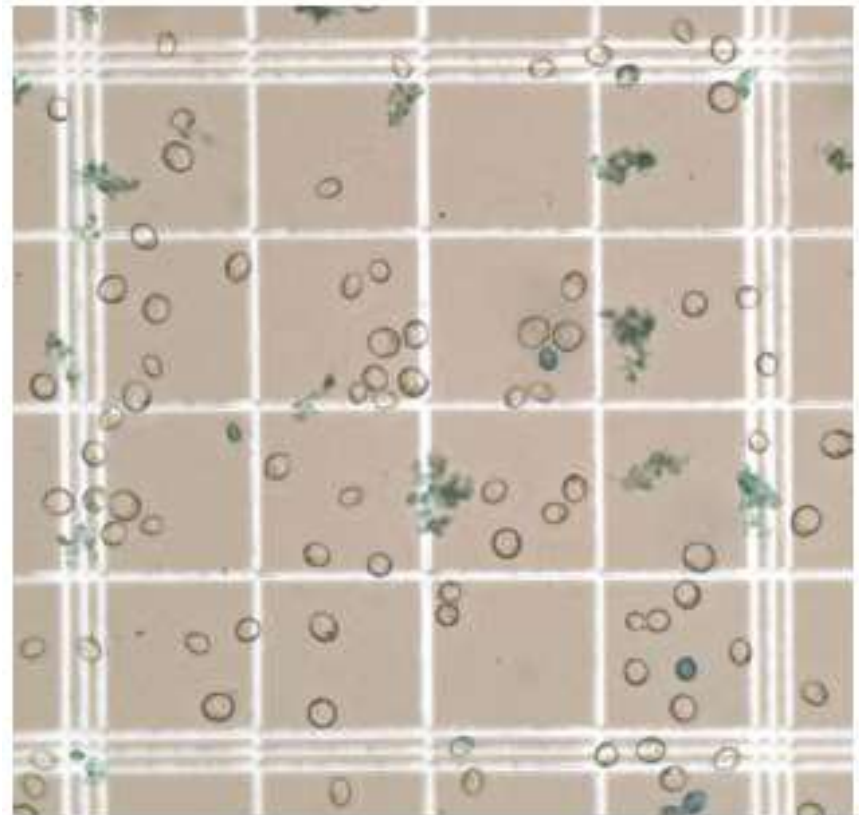
Herramienta de comunicación



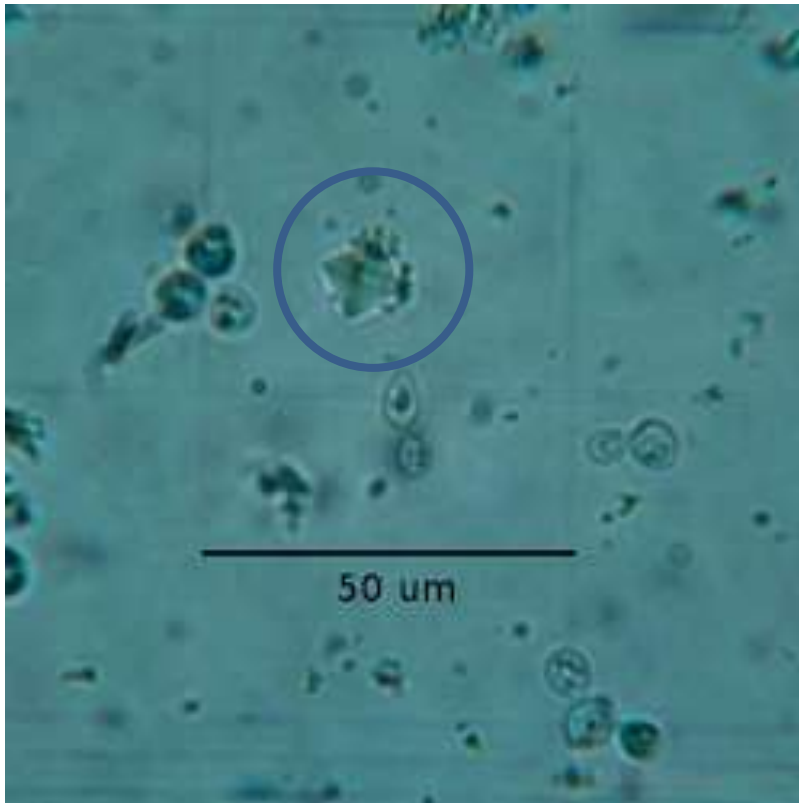
Ventajas del microscopio



- Evaluación de calidad y cantidad de levaduras (x400-x600)
- Origen turbidez
- Detección contaminaciones con bacterias (x1000) y levaduras salvajes



Galeria Imágenes



Cristal Oxalato de calcio



Cristal Oxalato de calcio

MO Permite diferenciar turbidez en producto terminado...

Galeria Imágenes



Precipitado frio

Temperaturas de fermentación

¿Cuál es la temperatura óptima?



Tipo de levadura
Estilo de cerveza
Flavor buscado

Temperaturas óptimas de fermentación:

Levadura Ale: ~32°C

Levadura Lager: ~ 27°C

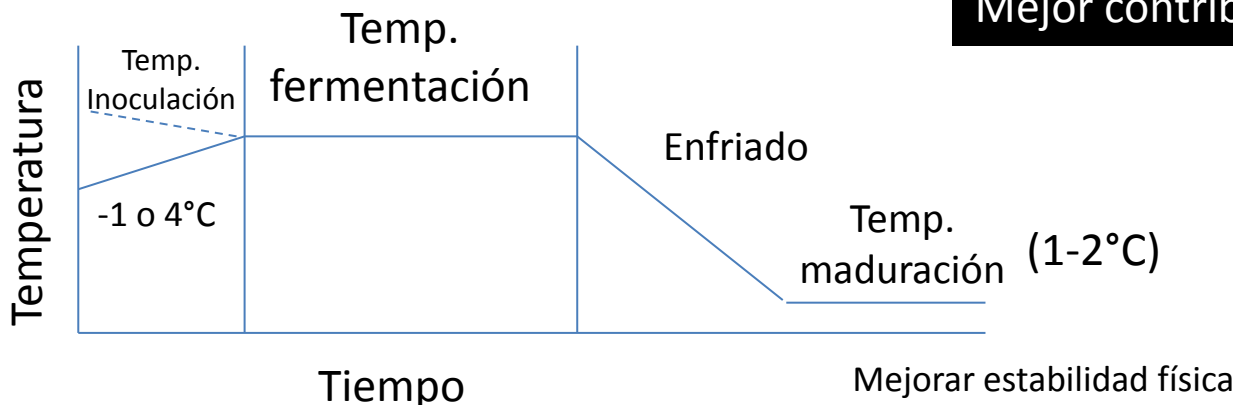
Temperaturas óptimas de fermentación para elaboración de cerveza

Levadura Ale: 18-20°C

Levadura Lager: ~ 10°C

Con inoculación apropiada*:

Crecimiento celular moderado
Mejor contribución al *Flavor* de la cerveza



Producción de aromas y sabores
1eras 36 hs

Nutrientes del mosto

Un mosto «pura malta» debería proveer todos los nutrientes necesarios para la fermentación excepto:

1) Oxígeno (O₂) Factor determinante del crecimiento



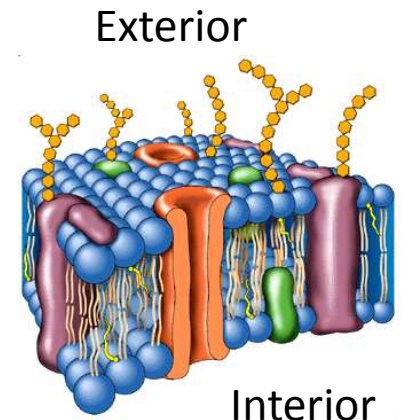
Las levaduras no son organismos estrictamente anaerobios, necesitan oxígeno para reproducirse.

Fundamental para la síntesis de ácidos grasos y ergosterol, compuestos indispensables para la constitución de membranas celulares adecuadas (estrés).

Valores deseables de Oxígeno Disuelto: **8-10 ppm**

Fundamental para asegurar una buena calidad de levadura para reutilizar

Es difícil alcanzarlo sin oxígeno Puro



Métodos de oxigenación

Objetivo: agregar la cantidad adecuada de oxígeno para la **cantidad de levadura** inoculada y el **crecimiento** que quiero que tenga.

Splash/agitación

Micros: No más de 4 ppm

Caseros: ≤ 8 ppm



Aire

Riesgo de contaminación

Imposible airear en exceso

Económico

O₂ Puro

Estéril

Riesgo de sobre-oxigenar

Más caro pero práctico

Ejemplos:

| Método aireación | O ₂ ppm |
|------------------------------------|--------------------|
| Agitación, 5 min. | 2,71 |
| O ₂ Puro, 30 seg. | 5,12 |
| O₂ Puro, 60 seg. | 9,20 |
| O ₂ Puro, 120 seg. | 14,08 |

20 Lts mosto, 1.077 a 24°C. (1Lt/min con piedra aireadora de 0,5 micrones)

Nutrientes del mosto

Un mosto «pura malta» debería proveer todos los nutrientes necesarios para la fermentación excepto:

1) ZINC



División celular

Co-factor enzimas responsables producción alcohol

Aditivos nutricionales para levaduras:

Fuente balanceada de nitrógeno, minerales (Zn) y vitaminas.



X 500 Grs = 400\$

1 gr (80 ctvs) para 100lts

Últimos minutos hervor, Whirlpool

Alternativa:

-Agregado de 0,1-0,2 ppm zinc ($ZnCl_2$ o $ZnSO_4$) (en fermentador).

LEVADURAS

CERVECERAS

¿Cómo las eligo?

Características generales levaduras cerveceras

| Tipo | Flavor | T° | Aten. | Floc. | Ej. lev. secas |
|-----------------------------|--|-------|--------|----------------|----------------|
| ALE Inglesa | Más frutada (manzana, pera) | 18-21 | 63-70% | Alta | S-04, Windsor |
| ALE Americana | Menos frutada, resalta lúpulo | 20-23 | 73-80% | Media | US-5 |
| ALE Alemana (Kolsch/Alt) | Limpio, Sulfuroso , poco frutado | 18-20 | 72-78% | Alta | ? |
| Belgas | Frutado complejo, clavo (+) | 20-26 | 78-85% | Media | Belle Saison |
| Hefeweizen | Banana , clavo(-) | 18-20 | 72-76% | Baja | WB-06, Munich |
| LAGER | Limpio , Sulfuroso, poco frutado | 10-13 | 72-80% | Media/ Alta | W34/70 |

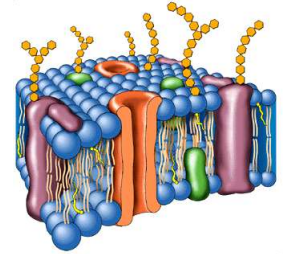
Otras variables!

FLOCULACION

- Nutrientes y factores de crecimiento

Inducida por la falta de nutrientes y por condiciones de estrés.
Falta de Oxígeno en inicio de Fermentación

(No actúa directamente: Ácidos grasos insaturados y esteroides)

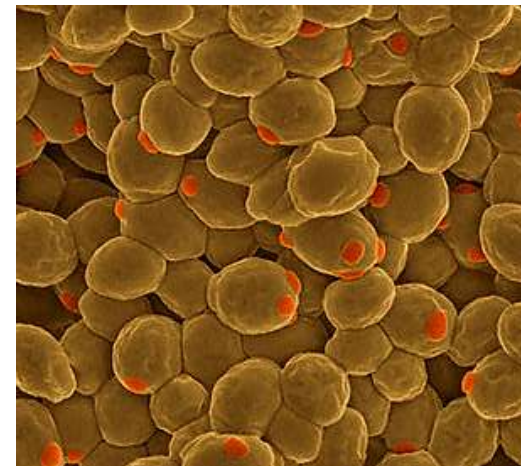
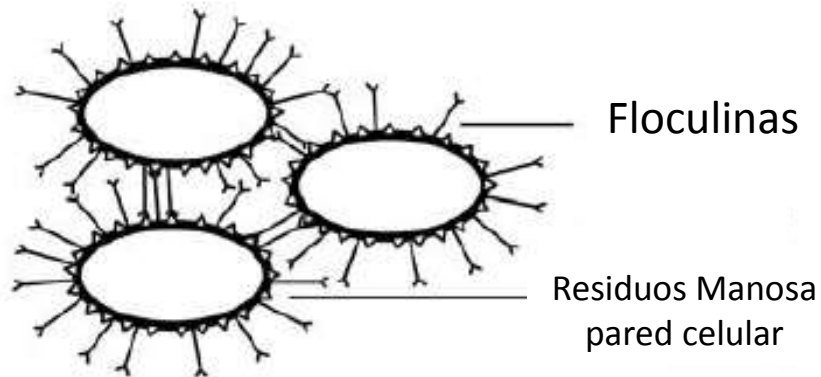


- Edad y tamaño de las levaduras

Células **viejas** (mas cicatrices y arrugadas) **floculan más e intensamente**

↳ Más arrugadas, más grandes*, más floculinas

*Incrementa sedimentación

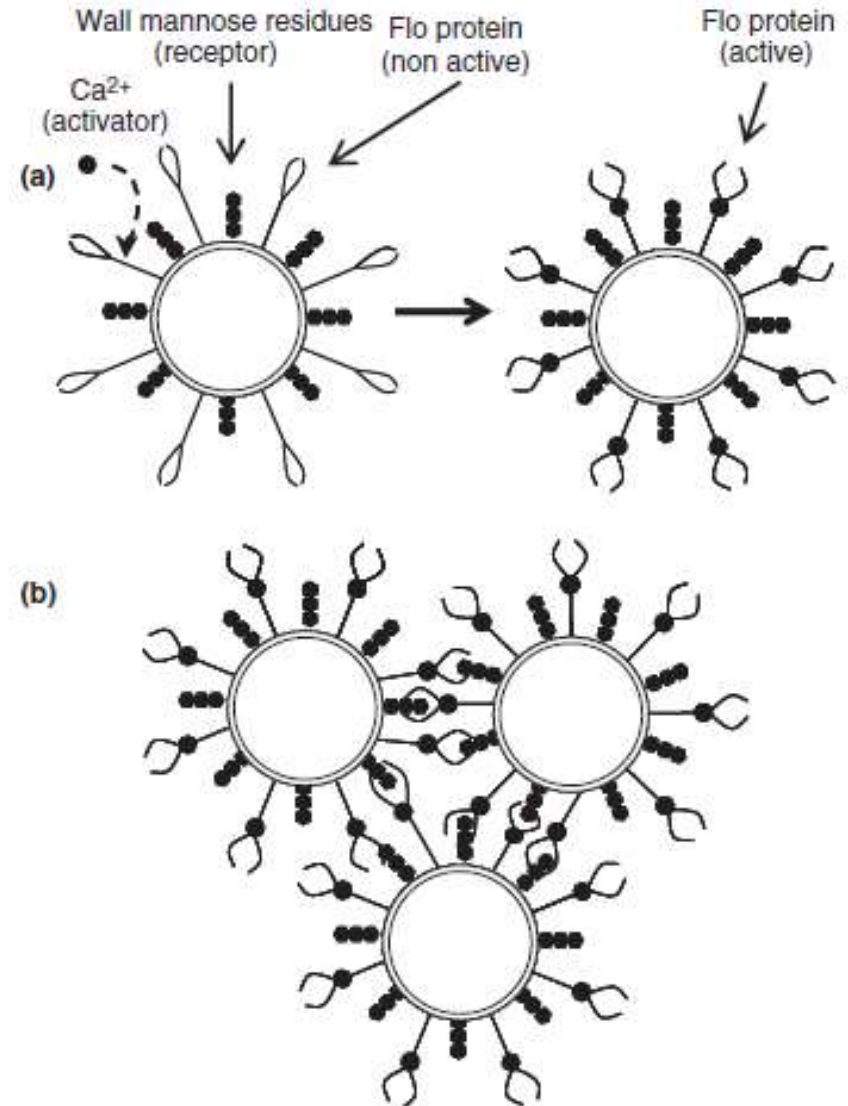
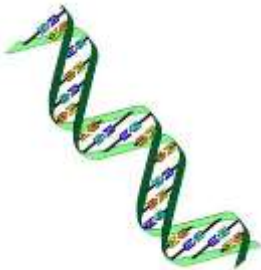


FLOCULACION

Otros: pH, manejo de levaduras:
(Lav. ácido, T° conservación,
forma de cosecha),

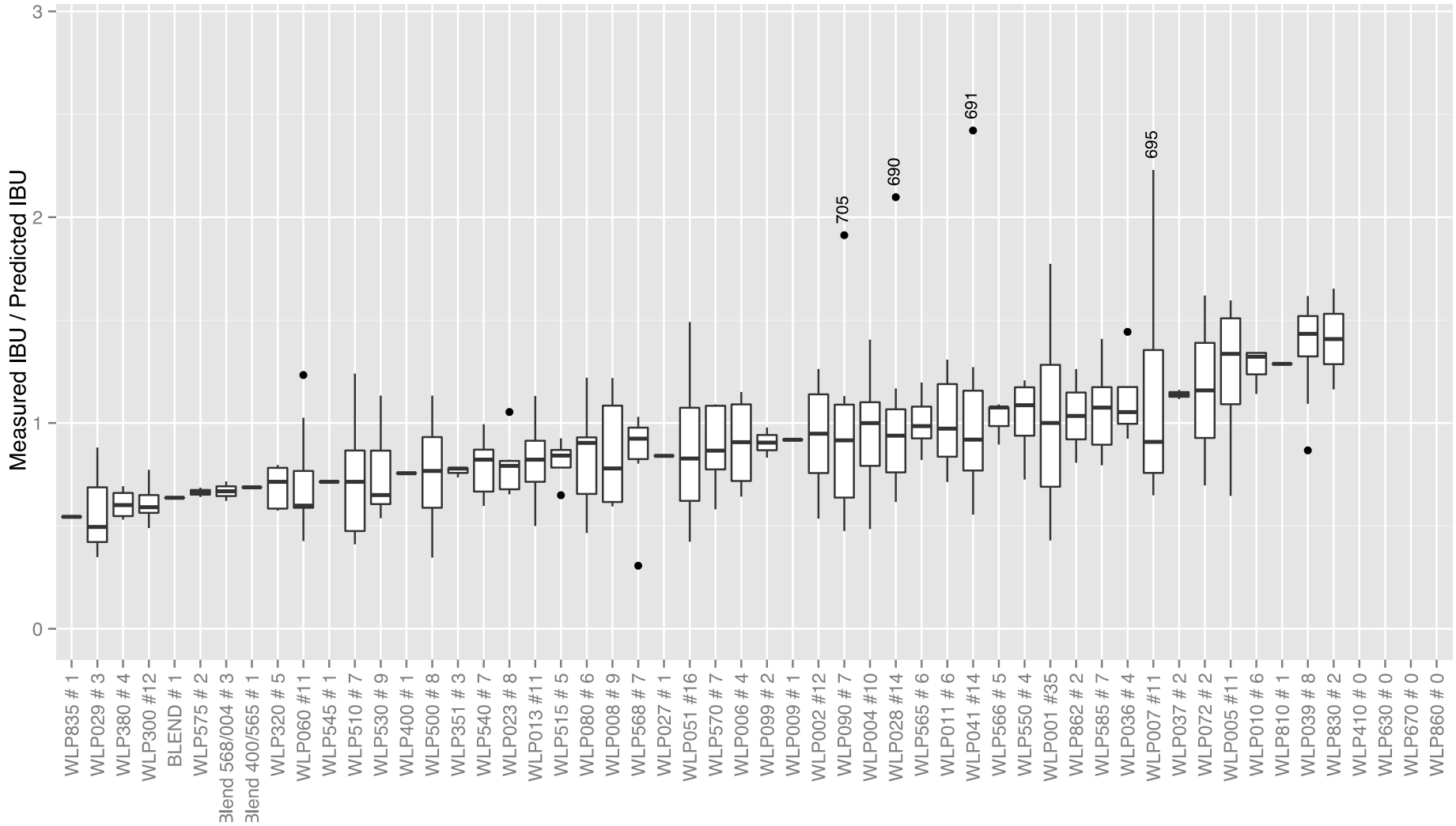
Presencia de Calcio (100-200ppm)!!

Carácter variable:
Número de re-utilizaciones!



Otras variables:

Influencia cepas sobre IBU Ratio



Otras variables:



¿Mortalidad / Viabilidad?

Viabilidad vs. Vitalidad



% Levaduras vivas

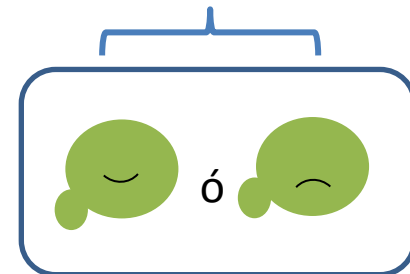
Cultivo en placa (UFC) 

Tinción vital

Condición fisiológica
de las Levaduras vivas

!No existe método estándar!

Test poder de acidificación 

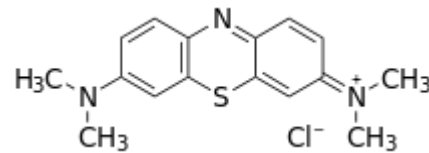


Tinción Vital – Azul metileno



Colorantes vitales: Tiñen diferencialmente células vivas y muertas

- Azul de metileno { Convencional
Alcalino
Citrato
- Violeta de metileno
- Azul Tripan
- Azul de anilina
- Fluorescentes



3,7-bis(Dimethylamino)-phenothiazin-5-ium chloride

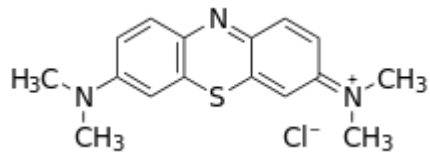


★ Recomendado por la American Society for Brewing Chemists (ASBC)

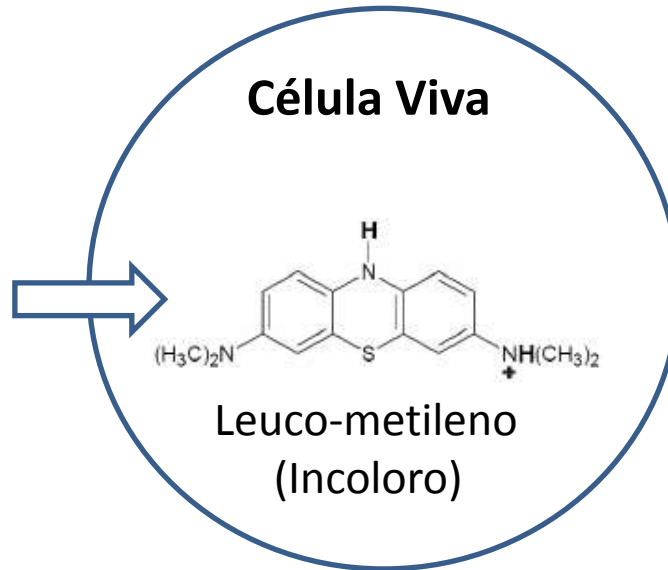
Tinción Vital – Azul metileno



Reacción en Célula viva



Azul de metileno
(Azul)



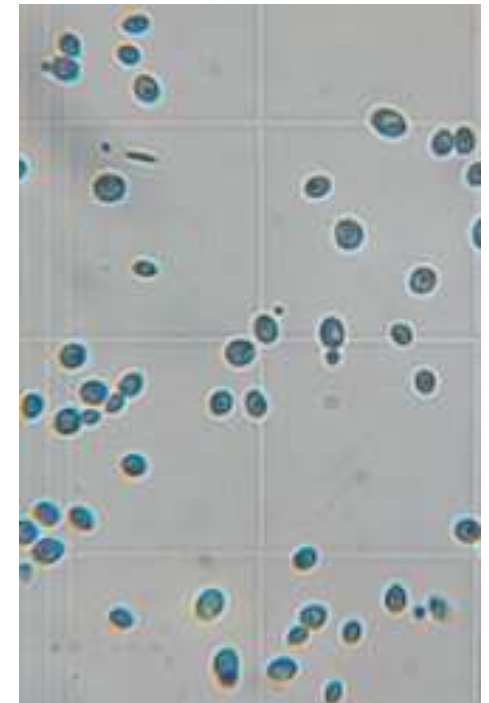
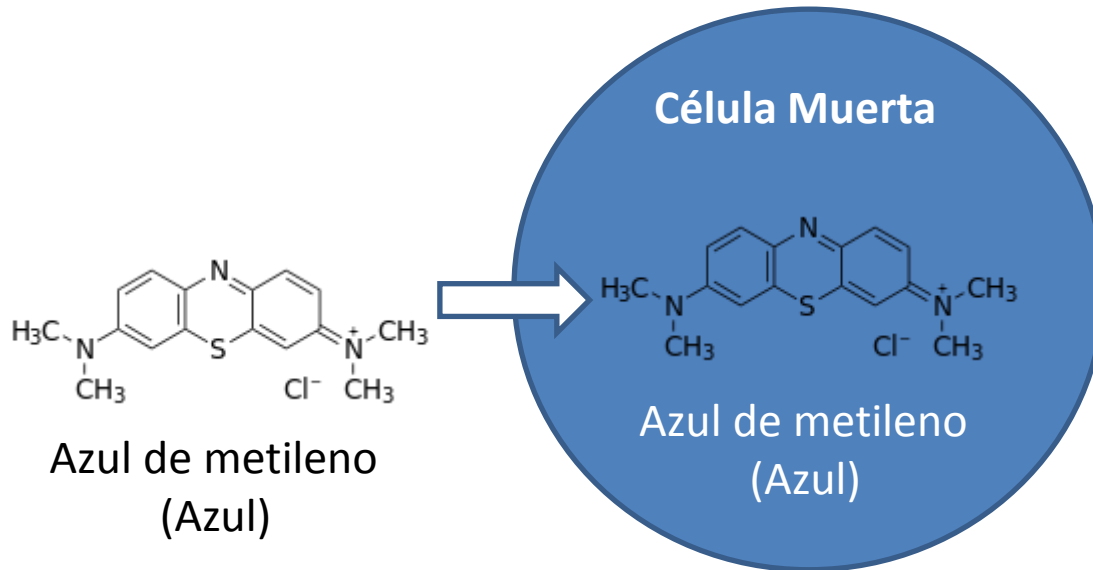
Leuco-metileno
(Incoloro)



Tinción Vital – Azul metileno



Reacción en Célula Muerta

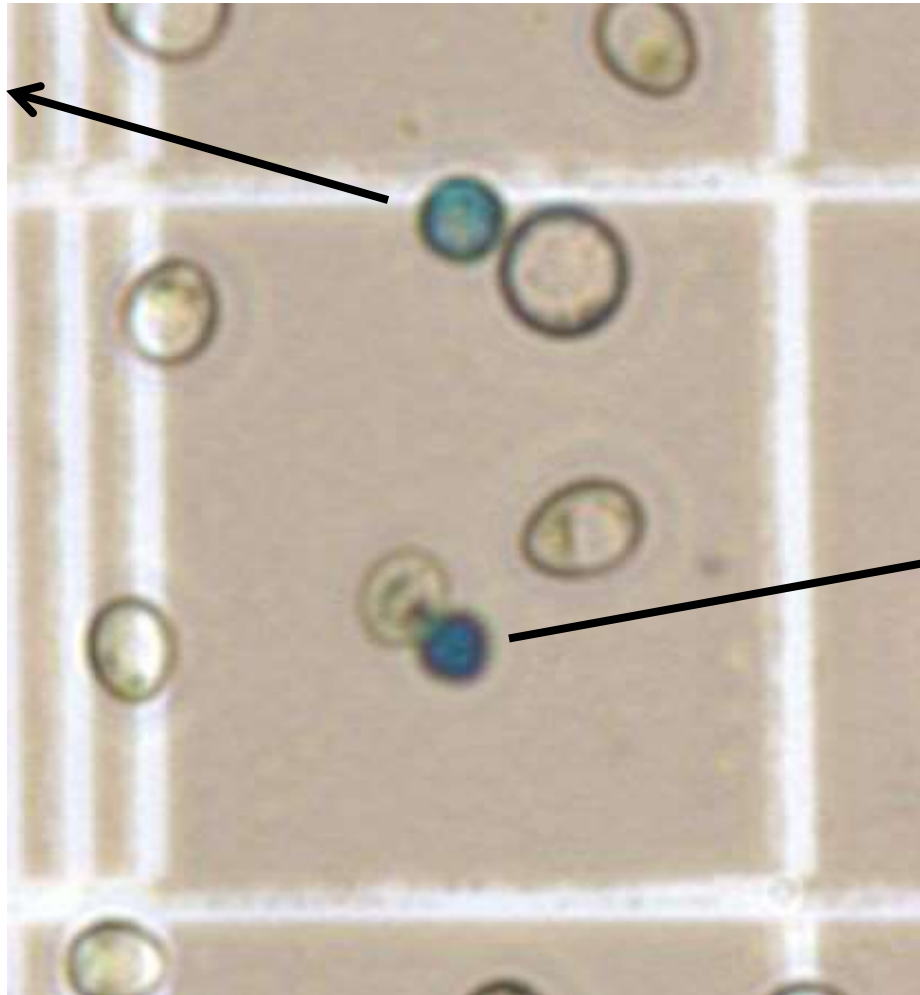


Tinción Vital – Azul metileno



Consideraciones a la hora de contar:

Azul pálido (Viva!) ←

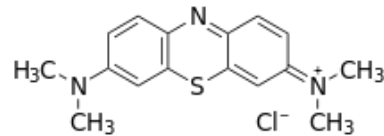


→ Gema (Viva!)

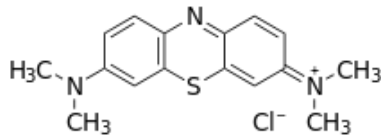
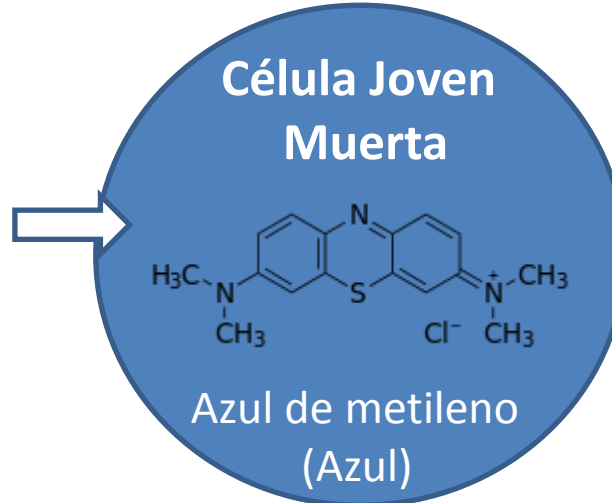
Tinción Vital – Azul metileno



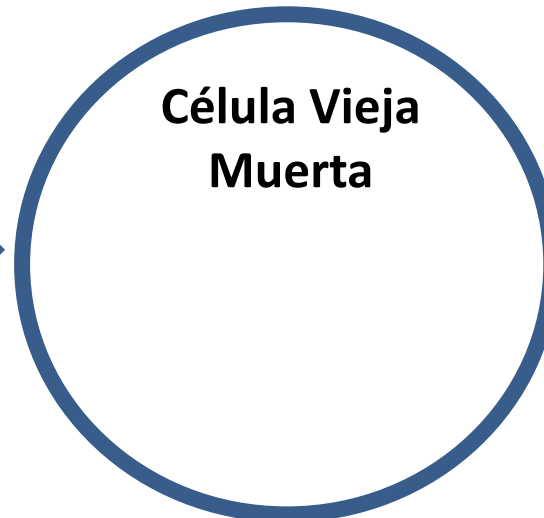
Limitaciones de la técnica (edad de las levaduras):



Azul de metileno
(Azul)



Azul de metileno
(Azul)



Sobre-estimación de Viabilidad por debajo del 90%



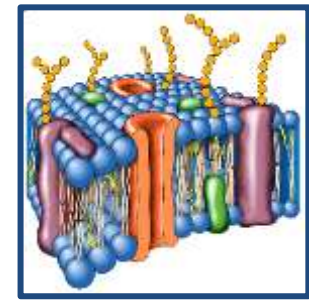
Se recomienda NO utilizar levaduras con viabilidad $\leq 90\%$

Valor de referencia!!!

LEVADURAS CERVECERAS

nutrición y subproductos

Glucosa/Fruktosa, Maltosa y Maltotriosa

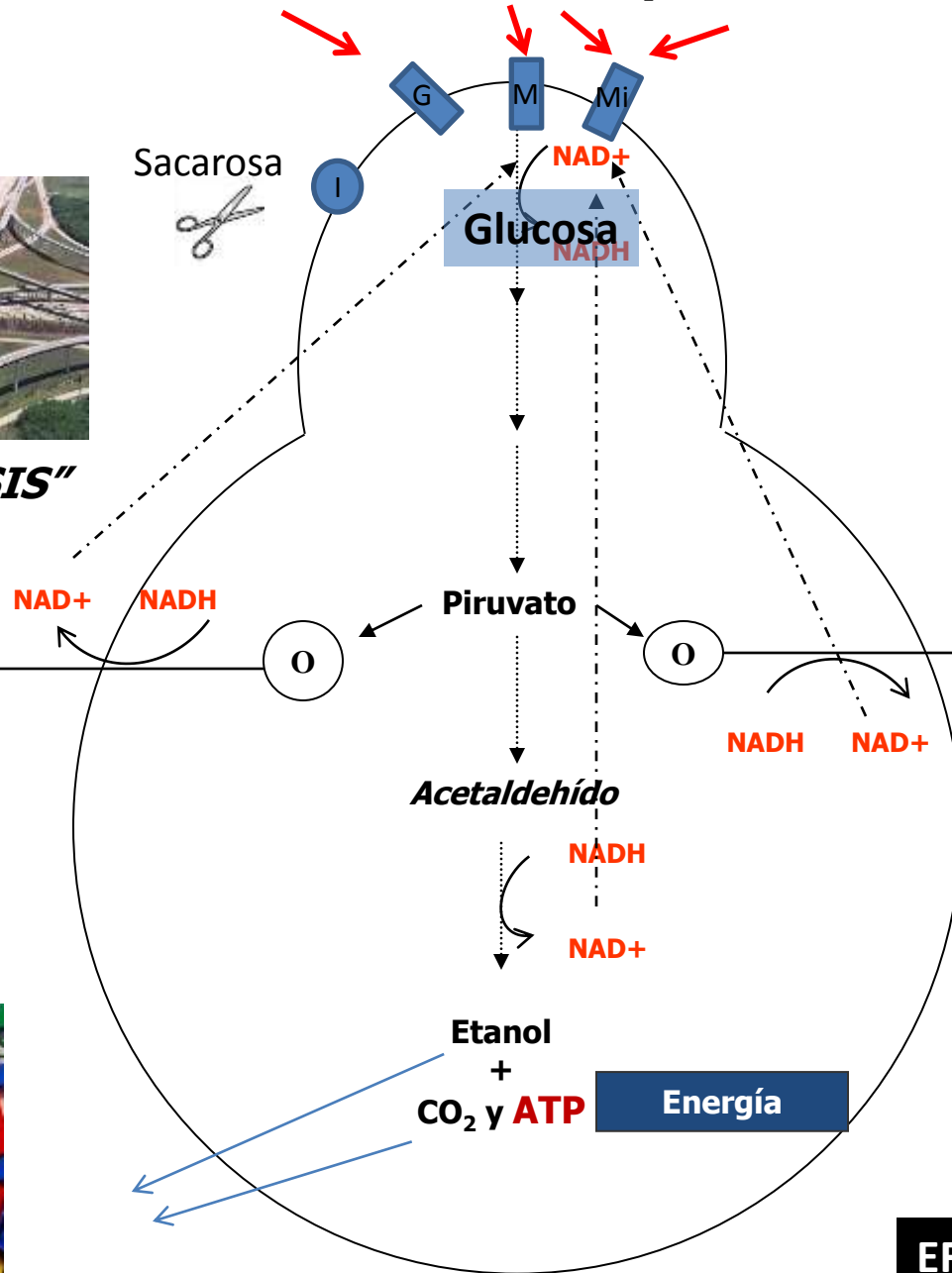


"GLUCÓLISIS"

Sacarosa

COMPUESTOS DE CRECIMIENTO

- Lípidos
- Aminoácidos
- Ácidos nucleicos



COMPUESTOS DE SABOR

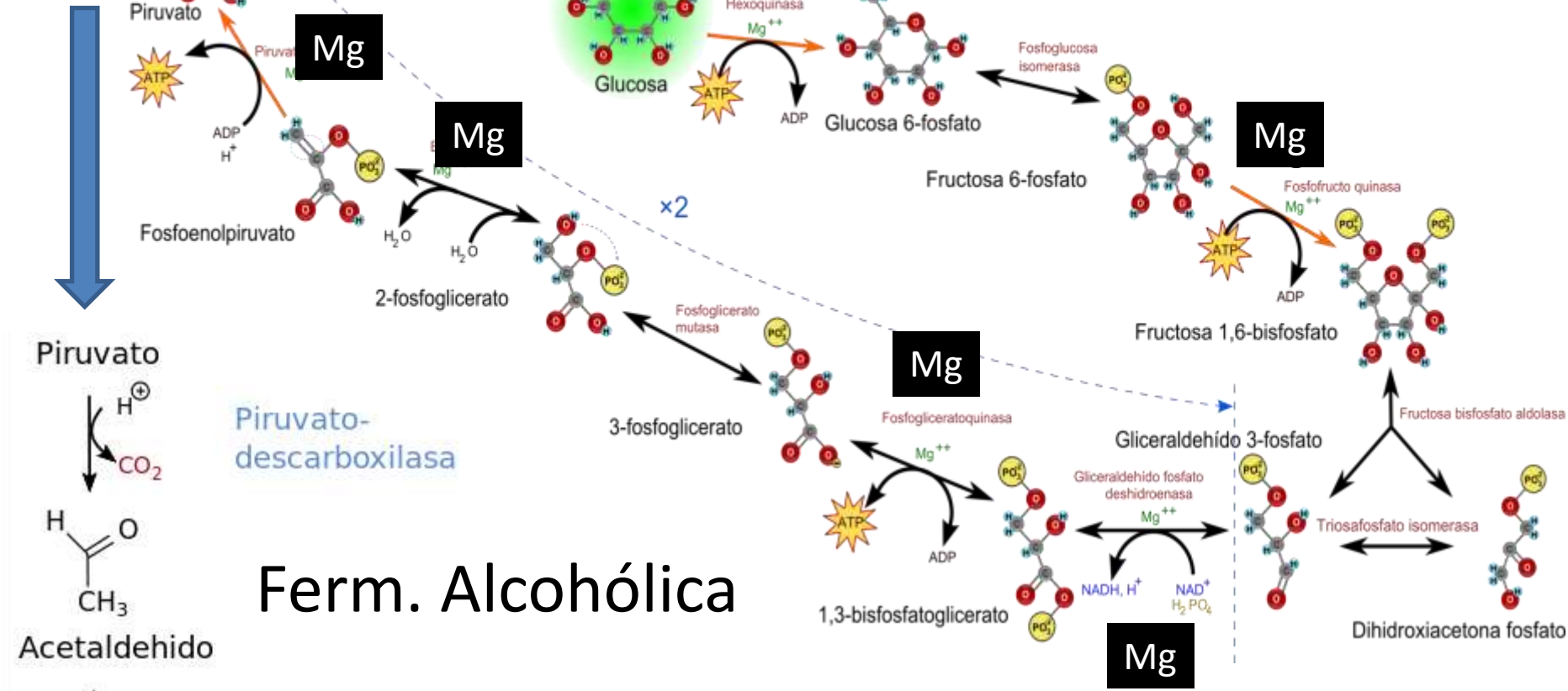
- Alcoholes superiores
- Ésteres
- Compuestos de azufre
- Precursores diacetilo
- Acetaldehído

EFFECTO TEMPERATURA

Glucolisis

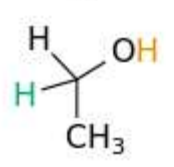
GLUCOSA

Piruvato


























Ferm. Alcohólica
















Importancia de Zn y Mg, y Temperatura



Zn

Mg

| Compuesto de sabor | Subproducto de: | ¿Por qué se produce? | Puntos críticos de control en proceso y nutrición |
|--|--|--|--|
| <p>Diacetilo (VDK)</p>  | <p>Síntesis de aminoácidos valina y leucina</p> | <p>Las proteínas celulares (estructurales, transporte, enzimas)</p> <p><i>Pediococcus</i> y <i>Lactobacillus</i></p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. Cepa de levadura 2. Cosecha prematura  3. Oxígeno insuficiente  4. [Zinc] insuficiente  5. Tasa de inoculación baja  6. Temperatura*   7. > FAN  |
| <p>Ésteres (ej. acetato de etilo, acetato isoamílico, caproato de etilo, caprilato de etilo)</p>  | <p>La síntesis de ácidos grasos y esteroides</p> | <p>Bloques de construcción de membrana</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. Cepa de levadura (estrés) 2. Presión hidrostática*  3. Factores que aumenten crecimiento levadura   4. Mayor relación C/N  5. Temperatura  6. Tiempo  7. Densidad inicial  8. > claridad del mosto  |
| <p>Acetaldehído</p>  | <p>Glucólisis</p> | <p>Energía (ATP)</p> <p><i>Zymomonas</i></p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. Cepa de levadura 2. Mayor claridad mosto*  3. FAN de malta  4. Exceso Oxígeno disuelto  5. Presión gas  6. Separación prematura leva  |

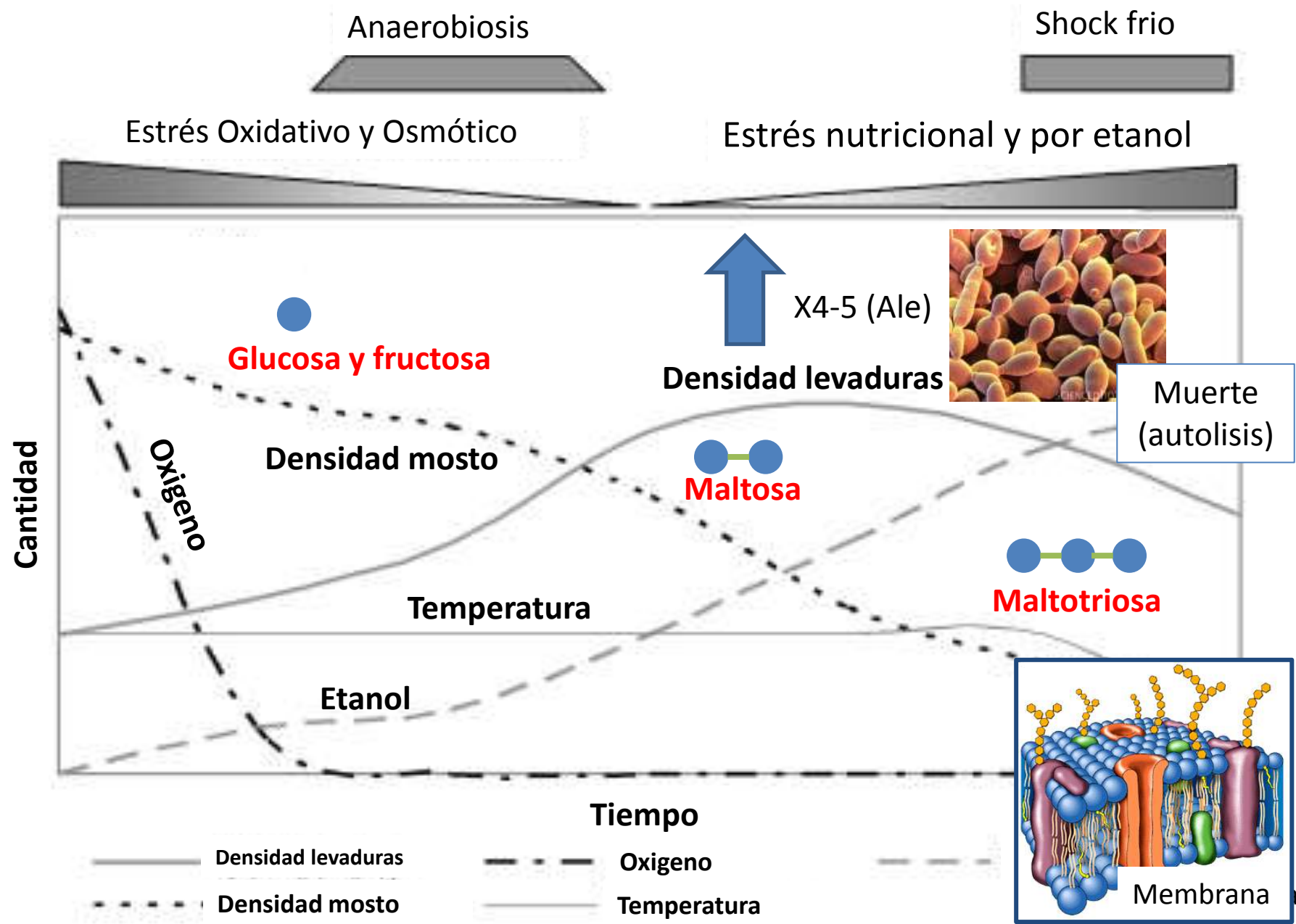
| Compuesto de sabor | Subproducto de: | ¿Por qué se produce? | Puntos críticos de control en proceso y nutrición |
|---|--|---|---|
| <p>Alcoholes superiores (Ej. alcohol isoamílico, alcohol amílico activo, alcohol de isobutilo y N-propil alcohol)</p>  | <p>Síntesis de aminoácidos (las vías anabólicas y catabólicas)</p> | <p>Las proteínas celulares (estructurales, transporte, enzimas)</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. Cepa de levadura (Ale) 2. Sobre-oxigenación  3. > Temperatura Ferm.  4. > Presión hidrostática  5. > FAN  6. Vitalidad y viabilidad de levadura  7. Mala nutrición  |
| <p>Sulfídicos y Sulfurosos</p>    | <p>Síntesis de los aminoácidos metionina y cisteína</p> | <p>Las proteínas celulares (estructurales, transporte, enzimas)</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. Cepa de levadura 2. Bajo vigor leva  3. Deficiencia vitam./zinc  4. Contacto de cobre*  5. Mosto con trub  6. Cosecha tardía de levadura  |

LEVADURAS CERVECERAS

¿A que las sometemos?

La fermentación

¿A qué se enfrenta la levadura?



Etapas de la fermentación

Anaerobiosis

Shock frio

Estrés Oxidativo y Osmótico

Estrés nutricional, por etanol, pH

LAG

(<15 hs)

EXPONENCIAL

(4hs-4días)

ESTACIONARIA

(3-10 días)

Cantidad



- Remueve acetaldehído y precursor diacetilo.
- Recupera reservas energéticas (re-utilizar)

Tiempo

— Densidad levaduras

- - - Oxigeno

- - - Etanol

- - - Densidad mosto

— Temperatura

LEVADURAS CERVECERAS

¿Ya atenuó y ahora...?

Maduración

ACONDICIONAMIENTO - MADURACION

El proceso de **acondicionamiento /maduración** de la cerveza es función de... **la levadura cervecera**

Una vez finalizada la fase de atenuación, fermentación primaria: CERVEZA VERDE

- La mayoría de los azúcares fueron convertidos a alcohol.
- Se han producido todos los otros subproductos (36-72hs).



Levadura empieza a reprocesarlos

MADURACION EN CALIENTE

- **Reducción de precursores diacetilo (acetolactato, pentanodione)**
- **Acetaldehído**
- **Alcoholes superiores -> esteres. (Temp+)**

Acondicionamiento y Maduración en frío

FACTORES: Tiempo y Temperatura



Tiempo < Temperatura



-3 días-

En algunos casos con un solo día alcanza pero depende de la temperatura!!)



-0°C-

Ninguna cerveza debería congelarse a -1°C ($0,42^{\circ}\text{C}$ – cada 1% alcohol)

- Sedimentación de levadura (se lleva taninos y polifenoles)
- Precipitación de polifenoles y proteínas del *Chill haze*
- > Genera sabores suaves e integrados, mejora estabilidad física del producto y reduce *chill haze*

CONCLUSIONES

- 1) En la elaboración de cerveza lo más importante es el cervecero, luego su capacidad para limpiar y sanitizar, después obtener fermentaciones eficientes y controladas a partir de un manejo adecuado de las levaduras.
- 2) Las Levaduras son hongos unicelulares muy susceptibles al ambiente y lo único que buscan es... , al único que le gusta hacer cerveza es a...
- 3) Las Levaduras cerveceras son ejemplos de microbios domesticados por el hombre con características tecnológicas determinadas por su continua selección y re-utilización.
- 4) La levadura Lager es un híbrido entre una levadura Ale y una especie que se descubrió en Patagonia que le aporta su capacidad de fermentar en frío.
- 5) El descubrimiento de *S. eubayanus* abre las puertas para la denominación de origen en Cervezas Argentinas.

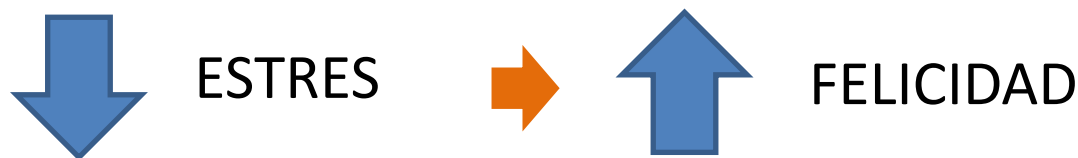


CONCLUSIONES

- 5) La Levadura es una herramienta para transformar el mosto en cerveza, y sólo el cervecero puede conducirla para obtener una Cerveza de excelente calidad.
- 6) Existen pros y contras para cada formato de levadura, cada uno tiene su forma de manejo que permite minimizar contaminaciones y pérdidas de viabilidad/vitalidad. La hidratación no debe tomarse a la ligera...
- 7) La re-utilización de levaduras es una práctica más que recomendable que influye positivamente en muchos aspectos de la producción. ¿Por qué no?.
- 8) Menos es más a la hora de re-utilizar: no innovar, manipular lo menos posible
- 9) Tomar control de los principales parámetros fermentativos es clave para alcanzar calidad de cerveza y poder traslucir la parte creativa del proceso.
- 10) El *flavor* de la cerveza esta en gran parte determinado por el conjunto de compuestos de sabor y aroma (buenos y malos) producidos por la levadura en su búsqueda por....

Cerveceros, Levaduras y Estrés

- Las levaduras cerveceras por su naturaleza unicelular y por las condiciones de fermentación sufren múltiples tipos de estrés que generan la síntesis de productos secundarios indeseables. La reducción del estrés de las levaduras a través de una correcta manipulación y control del proceso es fundamental para lograr cervezas de calidad... entre muchas otras cosas!.



Aplicable a todo ser vivo.... también a las LEVADURAS.



Muchas Gracias por su atención!!!!!!

INIBIOMA



CONICET
U N C O



asociación
argentina de
microbiología

