

Estudio de la factibilidad de reutilizar como starter *Saccharomyces cerevisiae* recuperada de elaboraciones de cerveza artesanal

Gabriela Ohanian^a, Susana Bernasconi^a, Karina Garro^a, Daniela Fernández^a, Laura Musri^a, Exequiel Tommasiello^a, Jerónimo Ruiz^a, Mariana Oyarzábal^a, Ornella Londei^a, Tomás Bettles^a

^aGrupo GISAM, UTN Facultad Regional Mendoza, Rodríguez 273, Ciudad Mendoza, M5502AJE, Mendoza, Argentina

gohanian@frm.utn.edu.ar

Resumen

En los últimos años, en Argentina se ha presenciado un crecimiento exponencial en la industria de cerveza artesanal. En Mendoza, aunque a una velocidad menor, este fenómeno también se reproduce, generando una producción que equivale al 2% del total nacional anual.

Saccharomyces cerevisiae es la levadura que desempeña un papel fundamental en la elaboración de cerveza, ya que tiene la capacidad de transformar los azúcares presentes en los cereales en etanol y dióxido de carbono mediante el proceso de fermentación. Además, contribuye a la formación de diversos compuestos minoritarios que influyen en los sabores y aromas únicos que definen cada tipo de cerveza.

El objetivo de este trabajo es evaluar la factibilidad de reutilizar *Saccharomyces cerevisiae* recuperada de los procesos de fermentación de cerveza artesanal, elaborando un starter de levadura, a escala de laboratorio. La preparación del inóculo inicial consiste en un esquema “starter” para fermentar un lote de cerveza tipo Pale Ale. El término “starter” se refiere a una población de levaduras activas y saludables que se cultivan previamente antes de ser añadidas al mosto de cerveza, mejorando la fermentación y la calidad del producto final.

Este objetivo se llevó a cabo evaluando la viabilidad de las levaduras en las diferentes etapas del proceso de elaboración de cerveza, desde la preparación, escalamiento, fermentación, maduración y producto final.

También se analizaron parámetros fisicoquímicos de la cerveza como temperatura, densidad, pH, grado alcohólico y grados Brix y se relacionaron con el crecimiento de las levaduras y de esta manera, determinar las condiciones óptimas del cultivo para su reutilización.

Se concluye que los valores de viabilidad obtenidos realizando propagaciones por medio de un starter, son superiores al 95%. Según las normas de control de calidad de diversas empresas cerveceras, estos valores están dentro de las condiciones óptimas de viabilidad para hacer una futura reutilización de la levadura.

Los parámetros fisicoquímicos evaluados indican que la levadura presentó una buena actividad metabólica durante la fermentación, no existiendo condiciones de estrés que afectan al producto final.

Palabras Clave: cerveza - *Saccharomyces cerevisiae* - recuperación

1 Introducción

En Argentina, durante los últimos años, la industria local de cerveza artesanal ha escalado exponencialmente llegando a producir en el año 2021 alrededor de ocho millones y medio de litros [1], y más de 50 estilos distintos. Este fenómeno, aunque a un ritmo más lento, también se replica en Mendoza con una producción que representa el 2% del total nacional anual [3].

Las levaduras son el ingrediente esencial para la producción de cerveza, por su capacidad para convertir mediante fermentación, los azúcares contenidos en el cereal, en etanol y dióxido de carbono, como así también en otros compuestos minoritarios que forman parte del aroma y sabor característicos de cada cerveza. *Saccharomyces cerevisiae* es el organismo unicelular responsable de la fermentación alcohólica en la elaboración de cerveza. Para optimizar la fermentación, muchas microcervecías usan cultivos iniciadores o “starter”. Un starter es un pequeño volumen de mosto que la levadura usa como primer paso para multiplicarse y prepararse para fermentar un batch de cerveza. El propósito del starter es crear suficiente levadura limpia y saludable para fermentar un volumen mayor en condiciones óptimas [8]

La recuperación y reutilización de levaduras luego de varios procesos de fermentaciones es una práctica implementada en la mayor parte de las grandes cervecías a nivel mundial y en una menor proporción en las cervecías artesanales, dado que las pequeñas empresas no cuentan con este tipo de programas.

El proceso de recuperación de levaduras es simple y no sólo contribuye a la disminución de la generación de desechos, sino que también representa un ahorro en los costos de producción, dinero que podría ser destinado para otros procesos en la empresa [5].

Una compañía cervecera puede reutilizar levaduras hasta tres o cinco etapas de fermentación siempre que se mantengan procesos muy bien controlados y el almacenamiento de levaduras sea adecuado [6].

La reutilización de las levaduras en el proceso fermentativo requiere de estrictas condiciones de asepsia en cada etapa de este, y una correcta manipulación al momento de la recuperación, para que el inóculo esté libre de contaminantes. Además, es necesario cuidar que el proceso de fermentación genere el menor estrés posible a la levadura para asegurar que su metabolismo y estado fisiológico sean buenos.

Se pueden dar malas fermentaciones de levaduras recuperadas por diferentes motivos: tasa de inoculación de levadura inapropiada, mala salud de esta, baja o nula viabilidad, falta de oxígeno al inicio de la fermentación y escasez de nutrientes en el mosto, entre otras.

Al realizar la recolección de las levaduras del tanque fermentador para su posterior reutilización en la producción de cerveza artesanal, es imprescindible seleccionar siempre la mejor levadura, aquella cuyas células mantengan una alta viabilidad. El uso repetido de la misma levadura recuperada puede dar lugar a mutaciones de la cepa con resultados inciertos y sabores muy diferentes [2].

La viabilidad es el porcentaje de células vivas de una población en relación al total de células. Su importancia radica en que nos brinda una idea de la eficiencia de la levadura para fermentar. Cuanto mayor es el número de células vivas, mejor será el rendimiento neto del proceso de fermentación [7].

2 Materiales y métodos

A continuación, se describirá la metodología para la obtención de las muestras de trabajo denominadas “Lote-0”, que se inicia con un cultivo de levaduras secas liofilizadas, y “Lote-1”, que comienza con el cultivo de levaduras recuperadas, provenientes del “Lote-0”.

Preparación de medio de cultivo: la maceración de la mezcla de 2,5 kg de malta Pilsen molida con 7,5 L de agua se lleva a cabo en una olla de acero inoxidable a $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por una hora. Se lava, se filtra y se lleva a hervor durante una hora, se agregan 10 g de lúpulo por cada 10 litros de mosto, y por último se procede a enfriar la mezcla por debajo de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ en menos de 20 minutos.

Inoculación y propagación de levaduras: se utiliza levadura *Saccharomyces cerevisiae* SafAle S-04 (cepa Ale inglesa). El escalamiento de propagación se realiza a partir de la levadura de trabajo, con volúmenes crecientes de medio de cultivo de 10 mL, 100 mL y 1000 mL, preparados en Erlenmeyers previamente esterilizados (Fig. 1).



Fig. 1. Recipientes de escalamiento

Fermentación: pasados dos días de crecimiento en el starter de 1000 mL, se inicia la fermentación del “Lote-0” con el traspaso del contenido del starter a un recipiente fermentador que contiene 10 litros de medio de cultivo, realizando el seguimiento de la fermentación durante cinco días a temperatura ambiente (aproximadamente 19°C).

Determinación de parámetros fisicoquímicos: se toma una muestra por día de fermentación y se determinan los siguientes parámetros: densidad por medio de un densímetro calibrado a 25°C, concentración de alcohol en el destilado, por densitometría, pH con un pHmetro de bolsillo Pocket Pro marca Hach, temperatura y grados Brix con refractómetro de mano marca Lab Klass. También se calcula el volumen de alcohol contenido en 100 unidades de volumen del producto (ABV por sus siglas en inglés), utilizando la siguiente fórmula:

$$ABV [\%] = (DI - DF) \times 131,25 \quad (1)$$

Siendo:

DI = densidad inicial del mosto antes de la fermentación

DF = densidad final del mosto después de la fermentación

Viabilidad: se determina por el recuento en cámara de Neubauer en un microscopio óptico marca Nikon modelo Eclipse E 100, utilizándose el método de tinción de azul de metileno. Esta técnica se basa en la capacidad de las células viables para reducir el tinte en su forma incolora, mientras que las células no viables son incapaces de reducir el tinte tomando un tono azul. El recuento se realiza en las etapas de inoculación, propagación y fermentación, utilizando una muestra representativa, con un factor de dilución adecuado al número de células observadas, y evaluando en 5 cuadrantes de la cámara. El recuento se realizó en el microscopio con aumento de 40x y los resultados se expresaron en millones de células de levadura por mililitro.

Para el cálculo se utilizan las siguientes fórmulas:

$$Levaduras \text{ promedio por cuadrante (LPC) [Levaduras]} = \frac{\sum_{n=1}^i \text{cuadrantes}}{i} \quad (2)$$

Siendo i el número de cuadrantes leídos

$$\text{Concentración [Levaduras/mL]} = LPC \times \frac{25}{0.1} \times 10^3 \times \text{factor de dilución} \quad (3)$$

$$\text{Viabilidad [\%]} = \frac{\text{cantidad promedio de levaduras vivas}}{\text{cantidad promedio de levaduras totales}} \times 100 \quad (4)$$

En la figura 2 se muestra la cámara de Neubauer y las levaduras vivas y muertas, las cuales están coloreadas de azul.

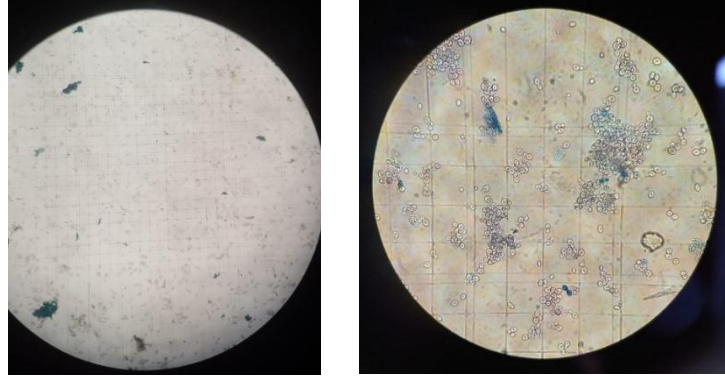


Fig. 1. Levaduras en objetivos 10x y 40x respectivamente

Recuperado y lavado de levaduras: finalizada la fermentación, se separan las levaduras sedimentadas en el fondo del fermentador, se lavan con agua estéril y se conservan a 4°C en frascos de vidrio y tapa metálica, previamente esterilizados en autoclave. Este procedimiento de lavado y refrigeración se repite dos veces más, para posteriormente iniciar un nuevo escalamiento y fermentación del Lote- 1 empleando el mismo método de trabajo que en el Lote-0.

En la figura 3 se muestra el primer lavado de las levaduras de la fermentación. Se pueden observar dos estratos bien definidos: la capa superior que contiene células menos flocculantes y poco desarrolladas y la capa inferior, con levaduras que tienen la mejor viabilidad y es considerada la mejor para la recolección de levaduras.



Fig. 3. Primer lavado de levaduras

3 Resultados y discusiones

Se determinó la viabilidad celular, al finalizar la propagación de cada starter y durante cada día de fermentación.

Ambas fermentaciones fueron evaluadas hasta el cuarto día, debido a que al cabo de ese tiempo, se obtuvieron valores constantes de densidad del medio y se alcanzaron los valores de máximos de crecimiento de levaduras.

Habitualmente en las cervecerías, el proceso de recuperación, consiste en trasladar directamente las levaduras que se eliminan del tanque al terminar la fermentación, a un nuevo batch para que continúe la fermentación, es decir el “Lote-0”, se pasa directamente a la fase de fermentación de un nuevo batch. Sin embargo, en este trabajo se desea evaluar la capacidad de estas levaduras recuperadas y lavadas para iniciar un nuevo sistema de Starters y la fermentación de un nuevo lote, por tanto, con el “Lote-0” se inició el Starter y fermentación del “Lote-1”.

Las tablas 1 y 2 muestran los resultados de la evaluación del recuento y viabilidad al starter del “Lote-0” y “Lote-1”, al finalizar la propagación y durante la fermentación, así como también los datos de concentración alcohólica, pH y grados Brix de ambas fermentaciones.

Los valores de viabilidad obtenidos son superiores al 95%; estos valores están dentro de las condiciones óptimas de viabilidad para hacer una futura reutilización de la levadura [4].

Tabla 1. Parámetros evaluados en el Lote-0

| Lote-0 | | | | | | | | | |
|-----------------------|------------|---------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|----------|-----------|
| Parámetros | Unidades | Starter (1 L) | Batch de fermentación (días) | | | | | | |
| | | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | σ | \bar{x} |
| Densidad | g/mL | 1,008 | 1,049 | 1,029 | 1,016 | 1,013 | 1,012 | 0,016 | 1,024 |
| Densidad corregida | g/mL | 1,006 | 1,048 | 1,027 | 1,014 | 1,011 | 1,010 | 0,016 | 1,022 |
| Temperatura | °C | 18 | 22 | 18 | 17 | 16 | 16 | 2,490 | 17,800 |
| Cantidad de levaduras | E+7 lev/mL | 19,7 | 1,97 | 7,85 | 10,65 | 12,38 | 17,4 | 5,700 | 10,050 |
| Viabilidad | % | 99,9 | 99,0 | 99,1 | 98,5 | 96,8 | 97,0 | 1,103 | 98,080 |
| Alcohol | % v/v | 5 | 0 | 1,9 | 3,9 | 4,1 | 4,5 | 1,898 | 2,880 |
| Azúcar | ° Brix | 5,8 | 12,7 | 9 | 6,9 | 6,2 | 6,4 | 2,730 | 8,240 |
| pH | - | 3,6 | 5,4 | 4,1 | 4,1 | 4,1 | 4,0 | 0,594 | 4,340 |

Tabla 2. Parámetros evaluados en el Lote-1

| Lote-1 | | | | | | | | | |
|-----------------------|------------|---------------|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|----------|-----------|
| Parámetros | Unidades | Starter (1 L) | Bach de fermentación (días) | | | | | | |
| | | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | σ | \dot{x} |
| Densidad | g/mL | 1,007 | 1,046 | 1,018 | 1,012 | 1,011 | 1,011 | 0,015 | 1,020 |
| Densidad corregida | g/mL | 1,006 | 1,045 | 1,017 | 1,011 | 1,009 | 1,009 | 0,015 | 1,018 |
| Temperatura | °C | 20 | 20 | 19,5 | 19 | 18 | 18 | 0,894 | 18,900 |
| Cantidad de levaduras | E+7 lev/mL | 17,0 | 1,70 | 9,20 | 15,85 | 13,20 | 5,80 | 5,657 | 9,150 |
| Viabilidad | % | 99,5 | 99,2 | 98,5 | 99,1 | 97,7 | 97,1 | 0,907 | 98,320 |
| Alcohol | % v/v | 4 | 0 | 3,2 | 3,6 | 3,7 | 3,8 | 1,615 | 2,860 |
| Azúcar | ° Brix | 5,0 | 11,6 | 5,6 | 5,8 | 6,0 | 6,0 | 2,577 | 7,000 |
| pH | - | 4,1 | 5,0 | 3,9 | 4,1 | 4,0 | 4,0 | 0,453 | 4,200 |

En la Figura 4 se representa el perfil de crecimiento celular en función del tiempo de fermentación. Se pueden observar dos comportamientos diferentes, el “Lote-0” tiene una evolución del tipo exponencial llegando al máximo de células en su último día de fermentación. Por su parte, el “Lote-1” presenta un pico luego de dos días de fermentación, disminuyendo lentamente hasta que se estabiliza su densidad, lo que indica la ausencia de azúcares del tipo fermentable.

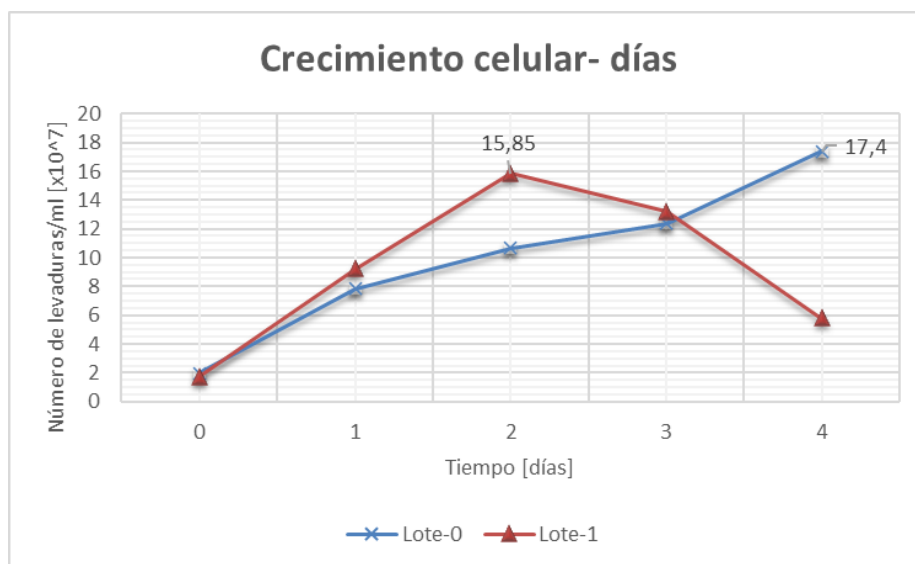


Fig. 4. Perfil de crecimiento celular

En las Figuras 5 y 6 se evalúa, para ambas fermentaciones, el perfil de grado alcohólico en [% v/v] y ABV en función del descenso de la densidad.

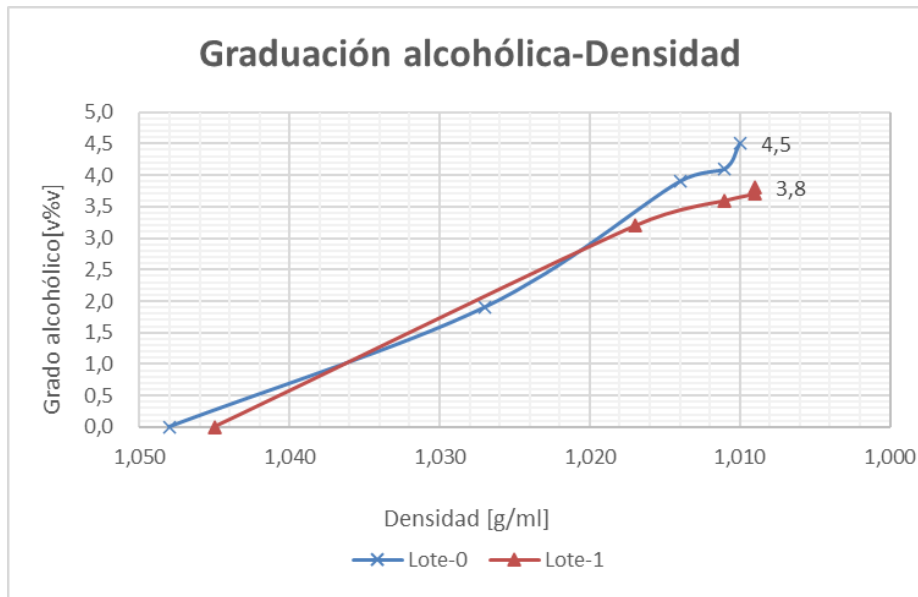


Fig. 5. Perfil de grado alcohólico en [%v/v]

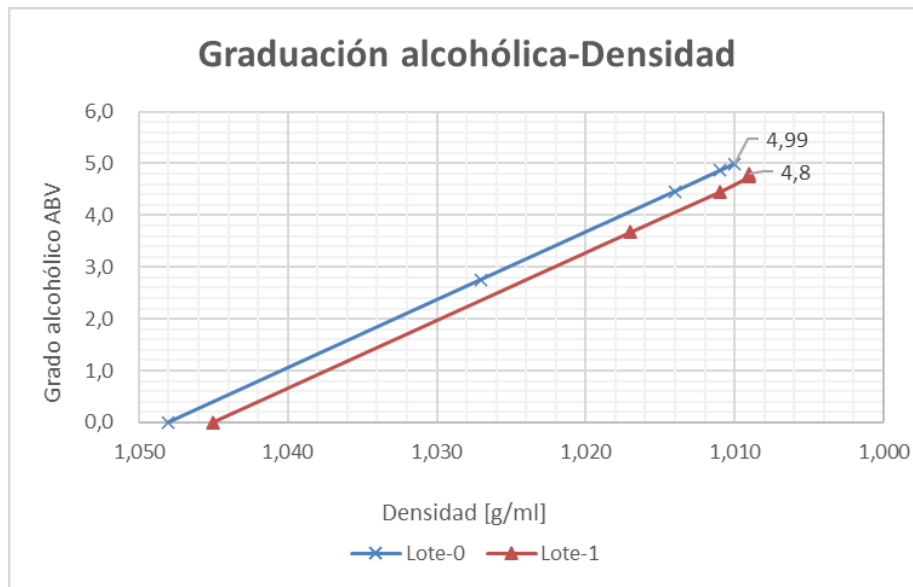


Fig. 6. Perfil de grado alcohólico en ABV

Si bien para el Lote-0 se obtuvo un grado alcohólico mayor que en el Lote-1, es importante mencionar que la densidad inicial para la fermentación Lote-0 es mayor, lo que indicaría mayor presencia de azúcares fermentables que se traduciría en un mayor porcentaje alcohólico al final de la fermentación de dicho lote.

4 Conclusiones

Los valores de máximo crecimiento en la fermentación con levadura recuperada, se producen en menor tiempo que para una fermentación con inóculo de levaduras nuevas; esto puede deberse a la capacidad de las levaduras a adaptarse al medio en un tiempo menor, lo que indicaría que se debe intensificar el control para fermentaciones que se lleven a cabo con levaduras recuperadas ya que pueden consumir los azúcares fermentables y producir un crecimiento excesivo de levaduras, ocasionando estrés y perjudicando la salud de las mismas.

Por otro lado, se observa menor producción de alcohol en la fermentación con levaduras recuperadas. Es importante tener en cuenta que esta fermentación (“Lote-1”) inició con un valor de densidad menor al anterior, siendo probablemente el motivo de la obtención de un menor grado alcohólico.

En ambas fermentaciones se obtuvieron valores de viabilidad superiores al 95% lo que indica que el proceso de recuperación de levaduras proporciona valores aceptables de crecimiento y rendimiento. Es necesario tener un control más estricto durante la cocción del mosto (respecto a temperatura y tiempo) para obtener un análisis más representativo de resultados.

Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento parcial de este proyecto de SCyT – UTN a través del proyecto MSUTIME0005175TC.

Referencias

- [1] Borgna, Diego O. (2019). Plan de negocio para la elaboración de cerveza artesanal en la ciudad de Alta Gracia, Córdoba. Universidad Católica de Córdoba.
- [2] Cruz Daza, E. L., & Meyer Sánchez, L. M. (2019). Evaluación de la reutilización de levadura *Saccharomyces Cerevisiae* para la implementación en un segundo proceso fermentativo de la cerveza tipo pale ale belga producida en la Cervecería Moonshine (Bachelor's thesis, Fundación Universidad de América). Bogotá, 2019.
- [3] IPATEC, CONICET – UNComahue. 2020. Caracterización de contaminantes microbianos: el primer paso para mejorar la calidad de las cervezas artesanales.
- [4] Kunze, W. (2006). Tecnología para Cerveceros y Malteros (Primera ed.). (C. Bauer, Trad.) España: VLB Berlín.
- [5] Naranjo Yanara, Caiza, Carlos (2014). Análisis de la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* empleada en la fermentación de cerveza en la empresa Quinde Brewery Co. mediante pruebas microbiológicas y fisicoquímicas para su reutilización en nuevos procesos fermentativos. Departamento de Ciencias de la Vida Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Sangolquí Ecuador. Diciembre, 2014.
- [6] Suárez Machín, Caridad, & Garrido Carralero, Norge Antonio, & Guevara Rodríguez, Carmen Amarilys (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 50(1),20-28.[fecha de Consulta 2 de Octubre de 2022]. ISSN: 0138-6204.
- [7] Toribio Tamayo, Karin. (2015). Evaluación de la estabilidad como starter de *Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis* para la producción de cerveza tipo Lager. Universidad nacional agraria La Molina. Lima Perú, 2015.
- [8] White, C. y Zainasheff, J. (2010). Levadura, la guía práctica para la fermentación de la cerveza.