

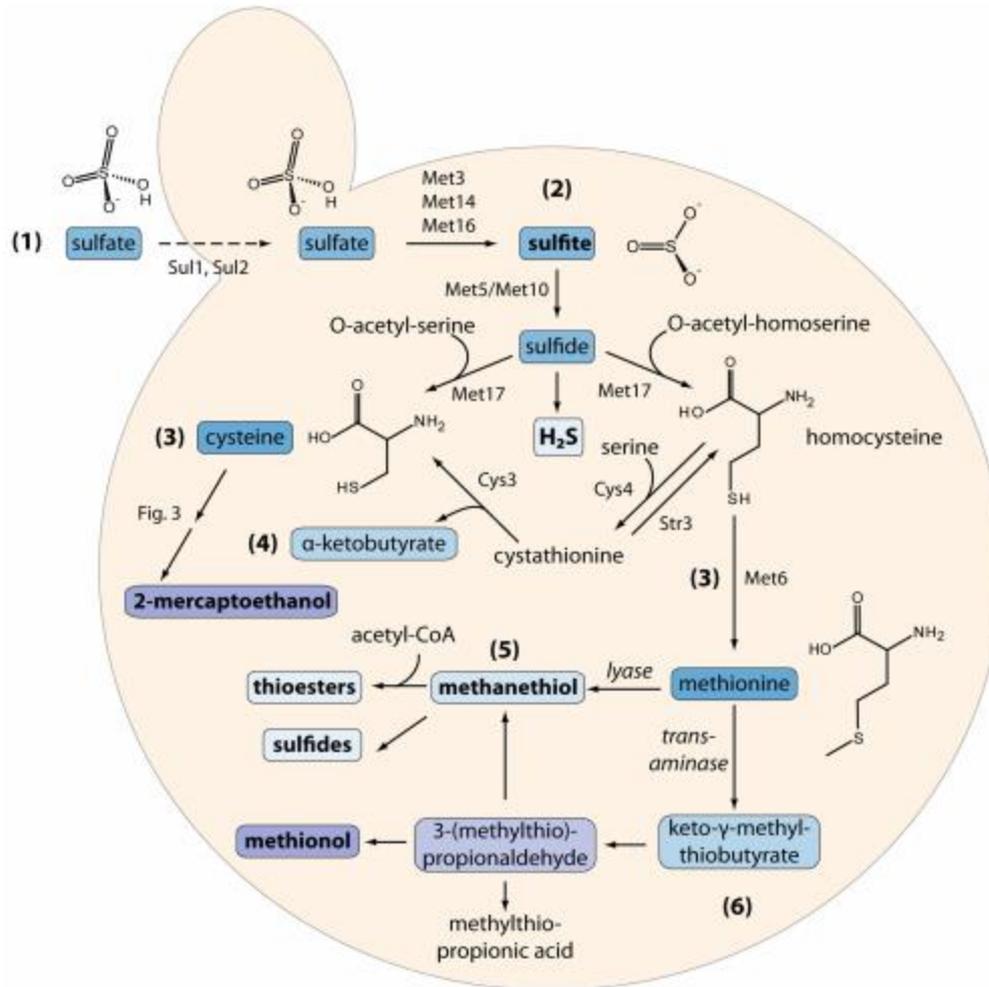
LEVADURAS

(Clase 3)



Lic. Sebastián Oddone
ESPECIALISTA EN FERMENTACIONES INDUSTRIALES

Compuestos sulfurados



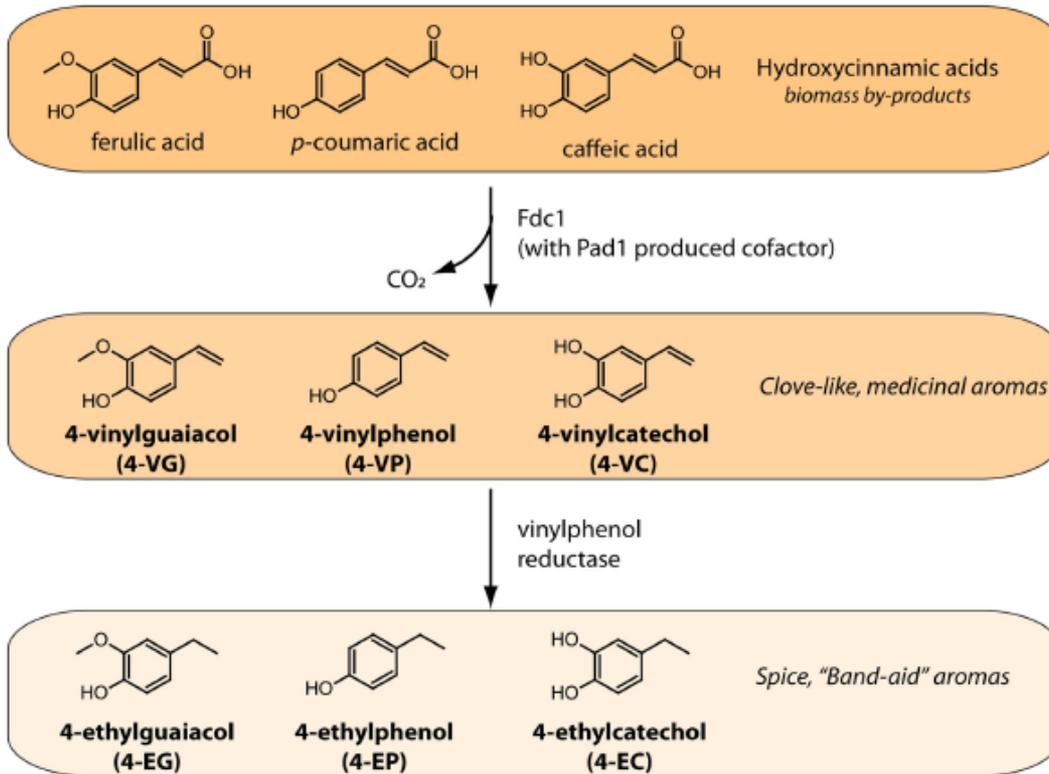
Un bajo nivel de nitrógeno podría derivar en mayor producción de H₂S

Las bajas temperaturas favorecen los sulfurados (los sulfuros son volátiles)

H₂S: huevo podrido
 SO₂: fósforo quemado
 Tioles: goma quemada
 DMS: proviene de la malta (choclo)

Para reducir los sulfuros mantener una fermentación activa y sana

Compuestos fenólicos



Compuestos derivados de los vegetales que podrían ser tóxicos para la levadura

La levadura los convierte en otros compuestos menos tóxicos por intermedio de una descarboxilación

Sin embargo, la mayoría de las cepas comerciales han sido seleccionadas para no realizar la conversión

Inoculación de la levadura y a fermentar...



Inocular cuando el mosto ocupa un 10% del fermentador. En este momento la temperatura se recomienda que sea algo mayor, luego una vez que alcanza el 20% del fermentador se enfría a la temperatura objetivo.

Nutrientes

Normalmente en las cocciones “todo grano” los nutrientes suelen estar en los niveles adecuados.

Podría sin embargo, haber necesidad de suplementar con alguna fuente de nitrógeno (el DAP es una buena opción) y zinc (necesario para un correcto crecimiento y generación de alcohol). Es más evidente la necesidad de este tipo de refuerzo cuando se reutiliza levadura o bien cuando se utiliza alto porcentaje de adjuntos.

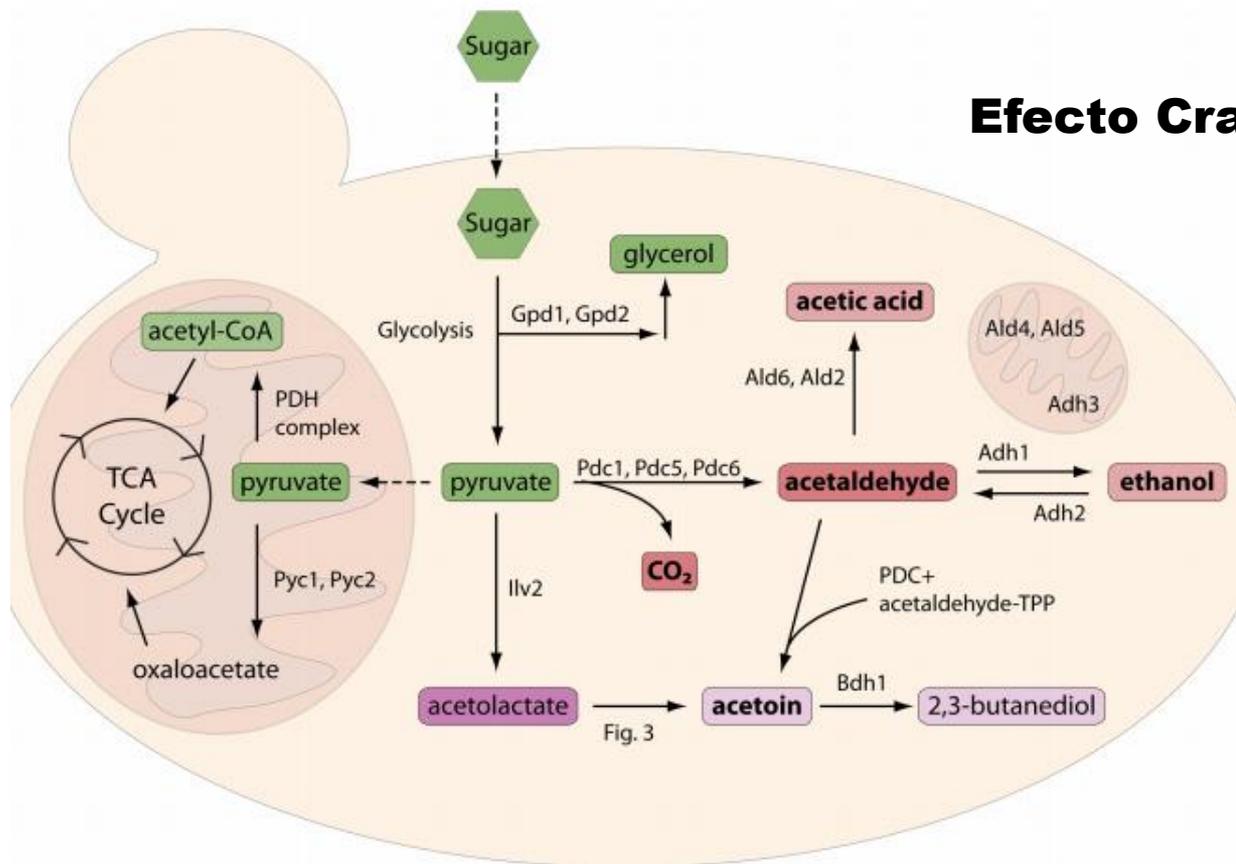
El nutriente que siempre es necesario adicionar es el oxígeno. Sin un adecuado suministro de oxígeno las levaduras pueden mostrar una baja viabilidad y una baja performance en fermentación.

OXIGENACIÓN: ¿Cómo lograr una buena oxigenación?



Efecto Crabtree

Mucho más eficiente

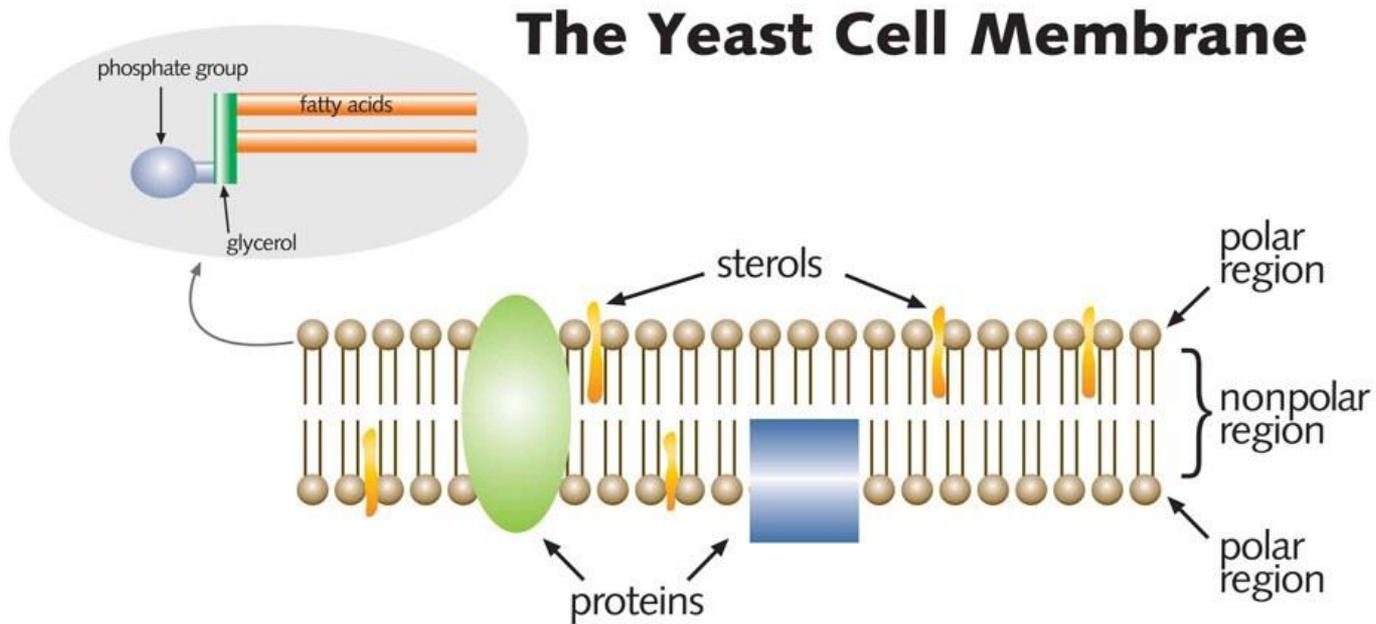


Efecto Crabtree

Fig. 3

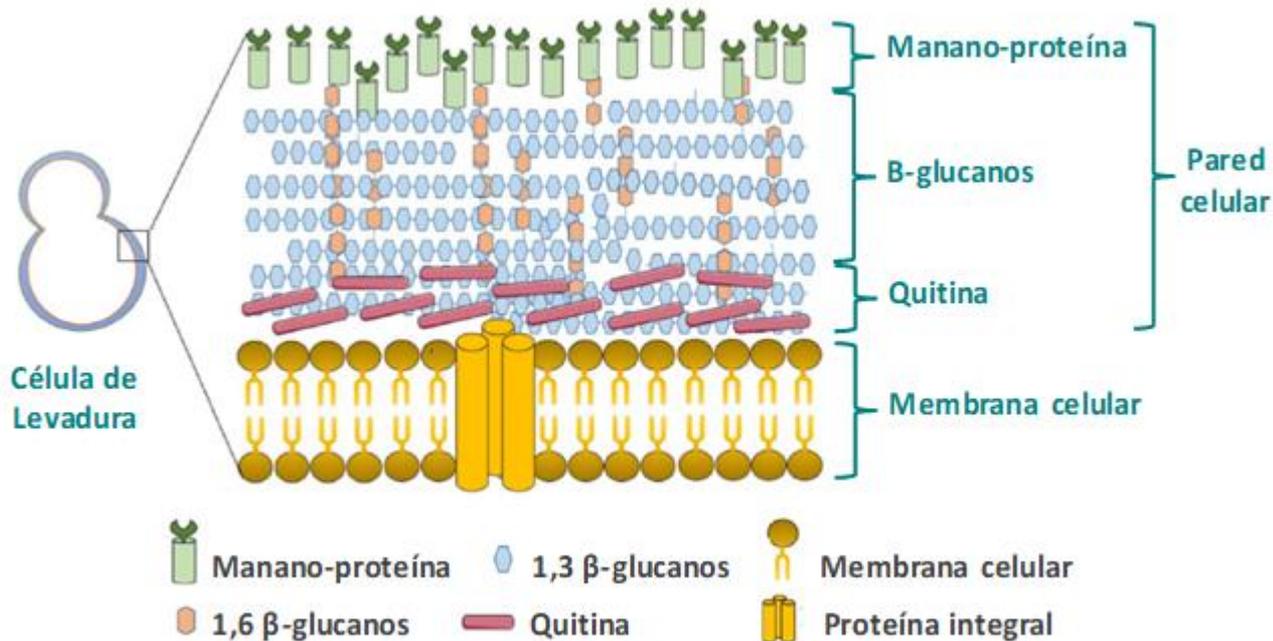
ENTONCES...

¿Por qué es necesario oxigenar?



Pared celular de la levadura

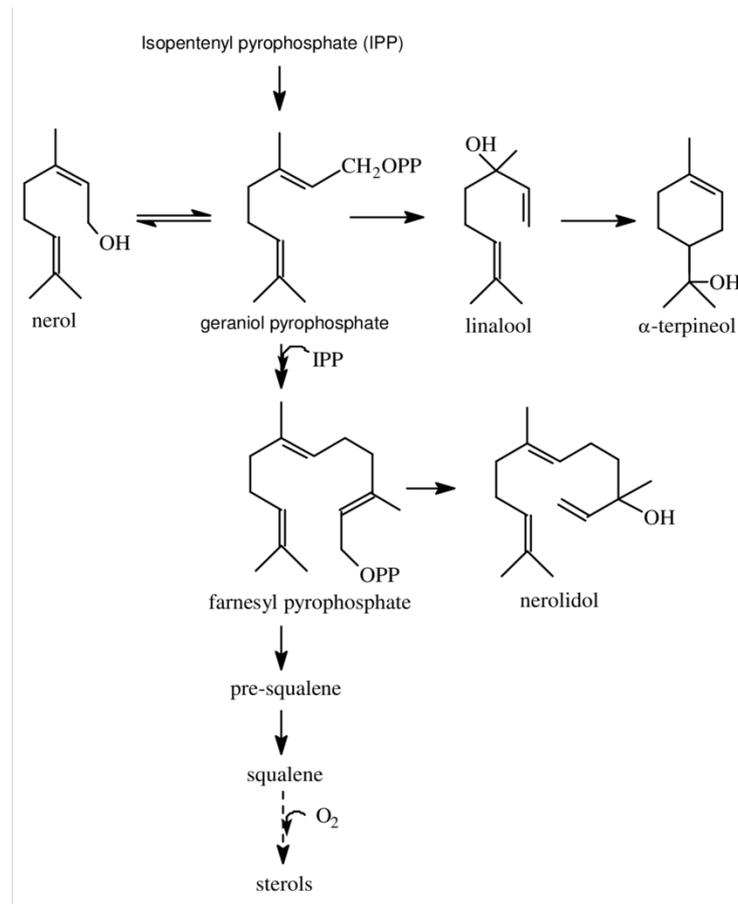
Figura 1. Estructura de la pared celular de la levadura *S. cerevisiae*.



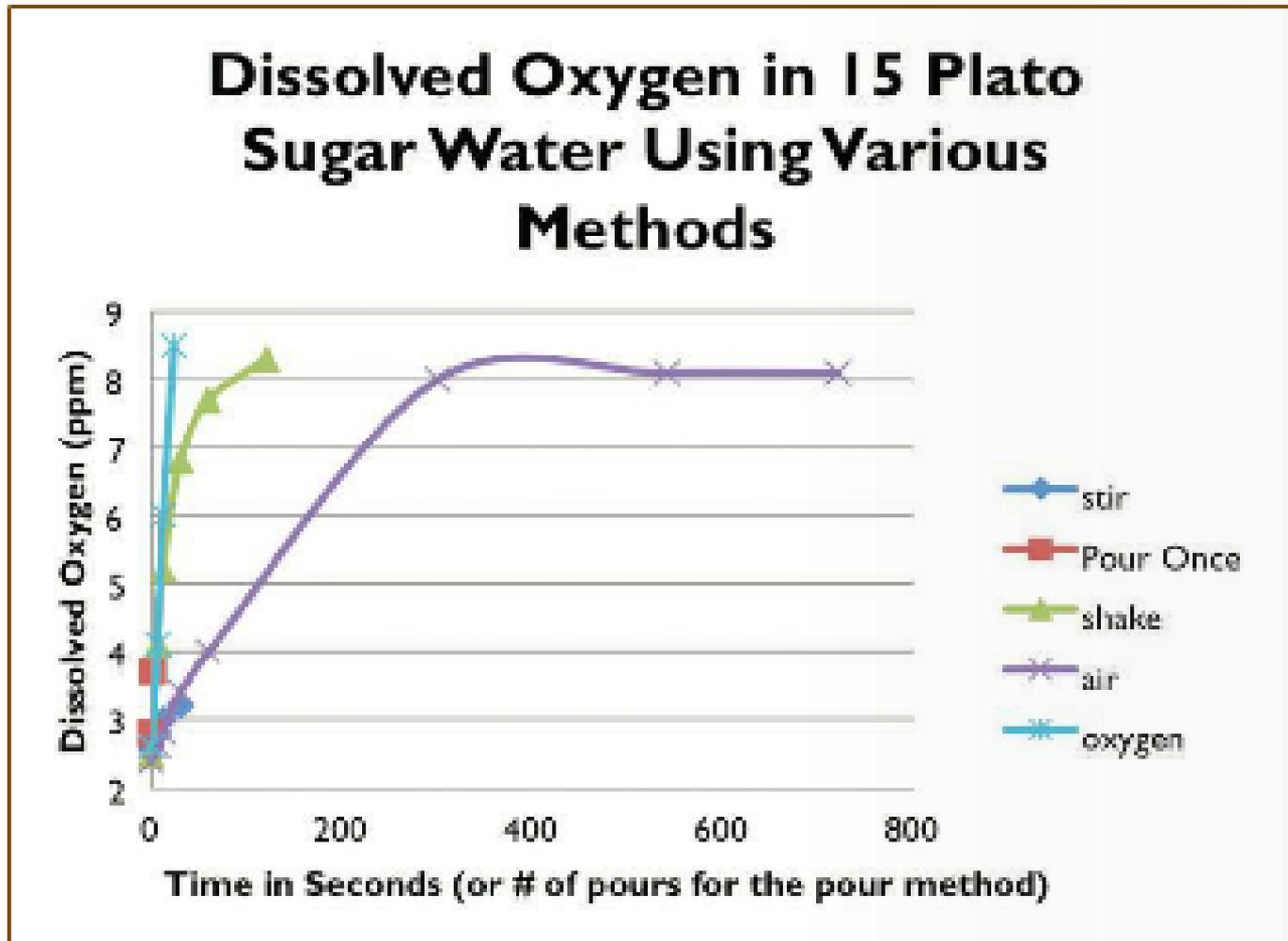
PARED: posee grupos fosfato y carboxilo que al pH del mosto se encuentran con cargas negativas

MEMBRANA: bicapa de fosfolípidos. La oxigenación del mosto permite que esta bicapa sea fluida

Formación de esteroides



¿Qué diferencia hay entre el oxígeno y el resto de los nutrientes?



Tiene que pasar de la fase gas a la fase líquida

$$OTR = k_L a \cdot (OD_{SAT} - OD)$$

k_L ← Coeficiente de transferencia líquido-gas

a ← Superficie de contacto entre fases líquido-gas

← Concentración de Oxígeno Disuelto de Saturación (equilibrio con el gas)

← Concentración de Oxígeno Disuelto en el líquido

La velocidad de transferencia de oxígeno la aumentamos incrementando el k_L o el área o la concentración de saturación de oxígeno disuelto en equilibrio con el gas.

¿Cómo aumentamos el k_L ?

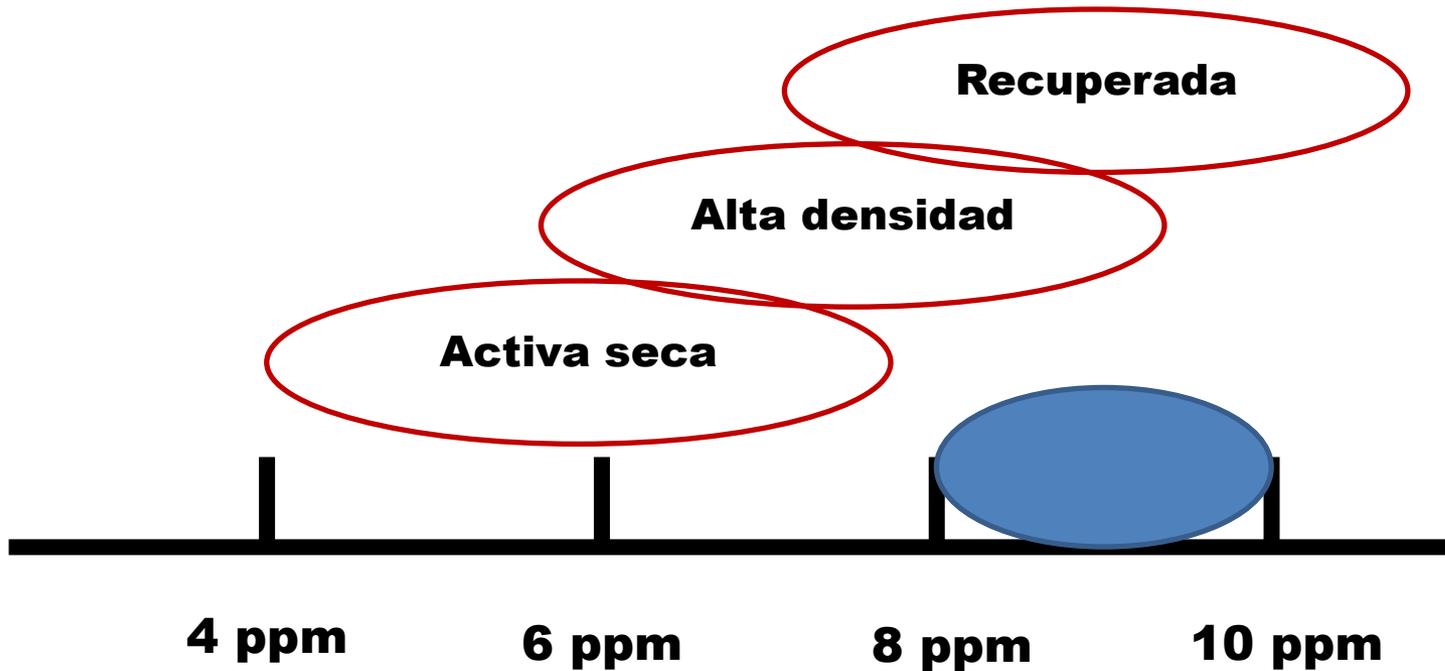
¿Cómo aumentamos el área?

¿Cómo aumentamos el OD_{sat} ?

¿Se puede medir el oxígeno disuelto?



¿Cuál es el nivel de oxígeno disuelto requerido para una correcta fermentación?



Un ejercicio

Digamos que desea agregar 8 ppm (mg/L) de oxígeno a un lote de 20 litros. Para ello se necesitarán 160 mg de oxígeno.

Esos 160 mg equivalen a 0,005 moles de oxígeno (0,16 gramos / 32 gramos de oxígeno por mol = 0,005 moles).

Si multiplicamos 0,005 moles por 22,4 l/mol, podemos ver que se requieren 0,112 litros de oxígeno para suministrar los 160 mg necesarios para producir una concentración de 8 ppm en los 20 litros de mosto.

Para llevar adelante el procedimiento de oxigenación, en la práctica se recomienda utilizar un rotámetro de gas (o flow meter). Conseguir uno que tenga una escala en litros por minuto con un rango entre 0-1 litros/minuto y 0.1 subdivisiones. En este ejemplo, *si se hace funcionar el flujo de gas a 0,2 litros por minuto y durante 30 segundos se introducirán aproximadamente 0,1 litros de oxígeno*. Este valor es aproximadamente el necesario para oxigenar correctamente el mosto del ejemplo.

¿Cuál es el nivel de oxígeno disuelto que se puede alcanzar?

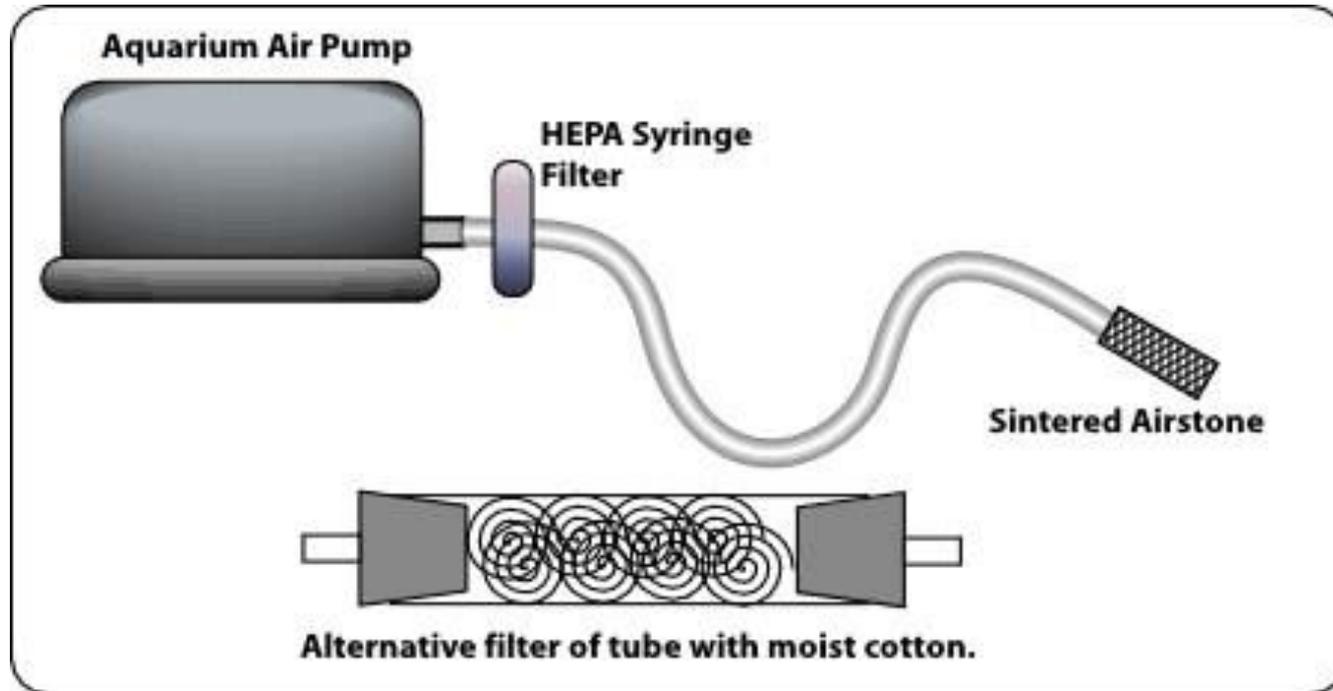
Method of Oxygenation	Level of Dissolved Oxygen	Time Required
Siphon spray during transfer to primary fermenter	4 ppm	0 seconds
Splashing or shaking primary fermenter	8 ppm	40 seconds
Aquarium pump with carbonation stone prior to fermentation	8 ppm	5 minutes
Pure oxygen with carbonation stone prior to fermentation	10-14 ppm	60-120 seconds

*Table modified from <http://yeastlab.com/oxygenation> and Figure 4.1 from *Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation*, White and Zainasheff, 2010

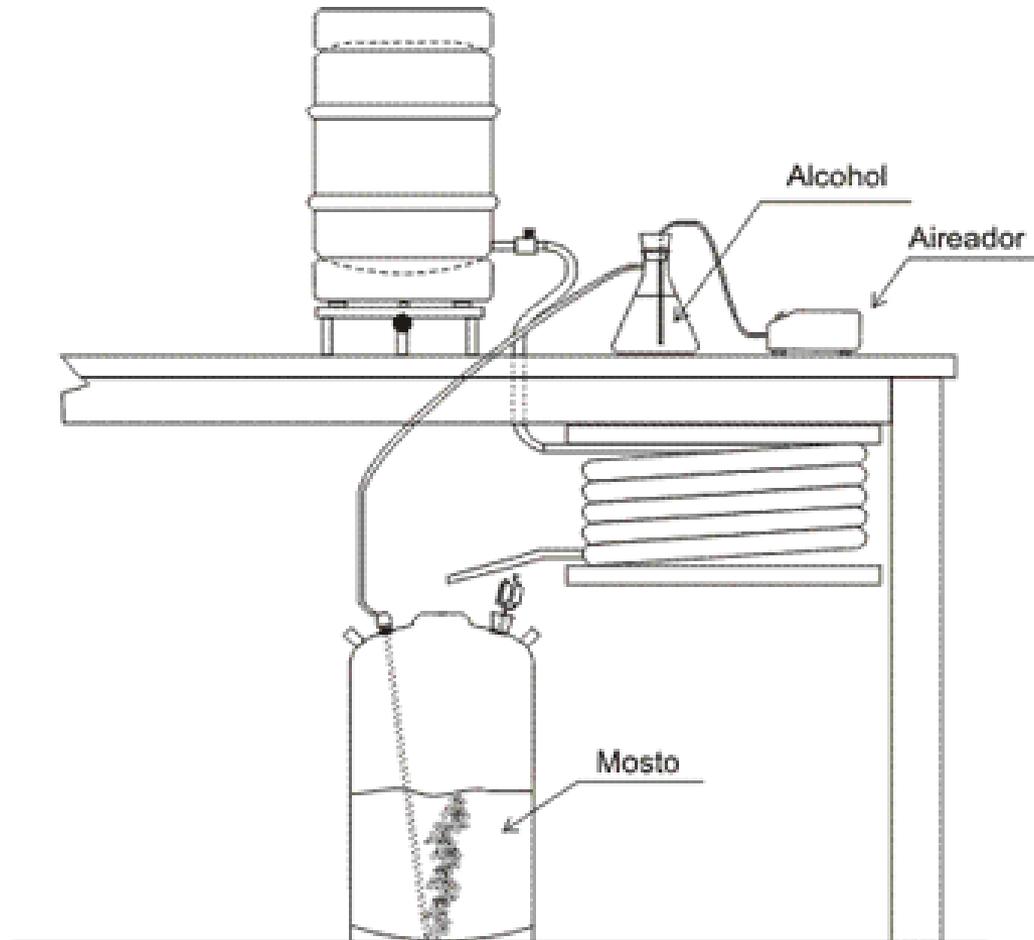
¿Cómo oxigenar?



¿Cómo oxigenar?



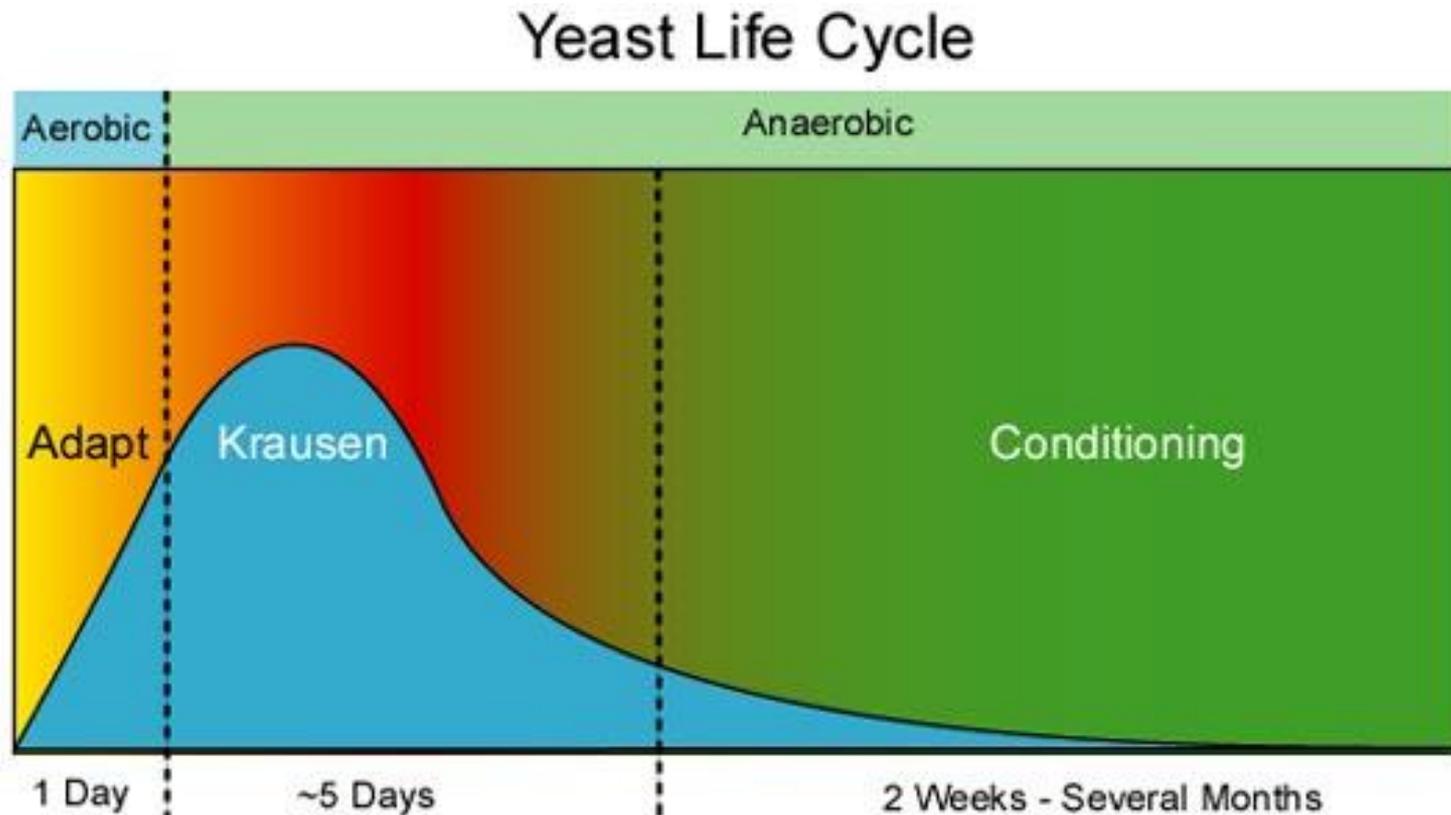
¿Cómo oxigenar?



¿Cómo oxigenar?



El Proceso Fermentativo



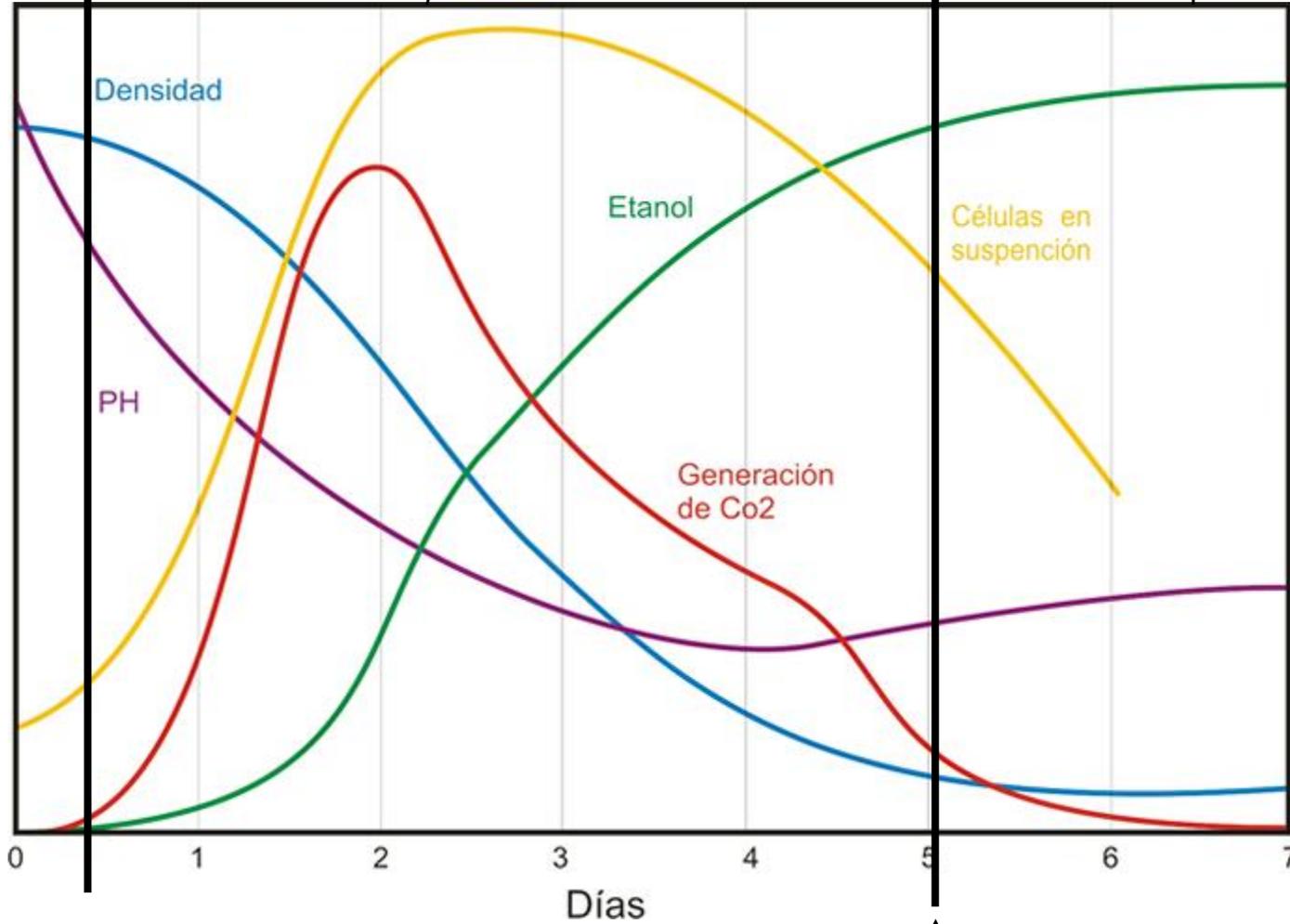
19 °C

Elevar la temperatura o re-inocular si es necesario.
Por ejemplo, cepas muy floculantes

Adaptación o LAG

Crecimiento y Producción de alcohol

Etapa final



Cerveza “verde”, con diacetilo, acetaldehído y H2S

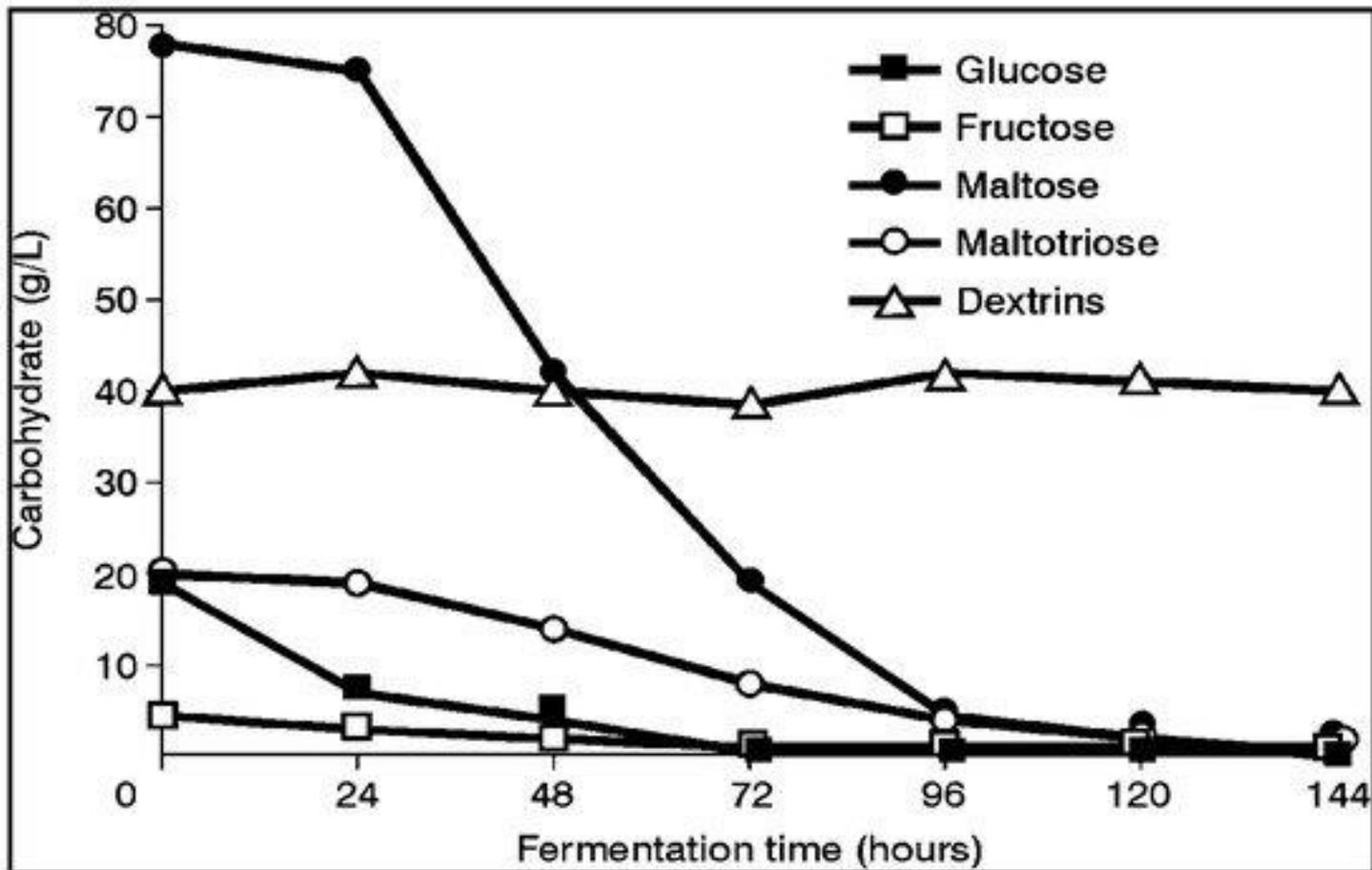
El Arranque de la Fermentación

(Ejemplo ALE)

Muy sub-inoculada	Traería problemas de fermentación	Ver más adelante
Levemente sub-inoculada	Iniciar a temperatura 22 a 24°C (va a crecer más al inicio, pero también va a generar más acetolactato)	Descanso de diacetilo a 23 a 25°C
Correctamente inoculada	Iniciar a temperatura 17 a 19°C	Permitir que la temperatura vaya incrementando las primeras horas hasta alcanzar la temperatura deseada

La Fase Exponencial y la Producción de Alcohol

(Metabolismo de los azúcares)



Variables “en alta” que afectan la fermentación

	Densidad Alta	Temperatura Alta	Oxigeno Alto
Efectos	Estrés osmótico / más alcohol	Fermentación vigorosa / alta tasa de crecimiento / producción de alcoholes superiores, esteres, acetaldehído / posibilidad de muerte y mutaciones	Altos niveles de alcoholes superiores, acetaldehido
Solución	Mayor Tasa de inoculación / usar levadura más resistente	Controlar temperatura según cepa	Controlar la oxigenación en el caso de utilizar oxígeno puro
Colateral	Requiere mayor concentración de oxígeno (puede realizarse una re-oxigenación al día siguiente)	Disminuye la solubilidad del oxígeno	

Variables “en baja” que afectan la fermentación

	Densidad Baja	Temperatura Baja	Oxigeno Bajo
Efectos	Cervezas muy livianas	Fermentación lenta pero más limpia. Si es muy baja al final puede terminar con más diacetilo y sulfuro	Podría causar problemas en la fermentación / diacetilo / baja viabilidad
Solución	Usar más cantidad de malta	Controlar temperatura según cepa y de acuerdo a la etapa	Oxigenar el mosto más eficientemente
Colateral		Requiere mayor tasa de inoculación	

Compound	Perception Threshold	66° F (19° C)	75° F (24° C)
Ethanol	1.4% ABV	4.74% ABV	5.04% ABV
1-Propanol	600 ppm	23.78 ppm	22.76 ppm
Ethyl acetate	30 ppm	22.51 ppm	33.45 ppm
Isoamyl alcohol	70 ppm	108.43 ppm	114.92 ppm
Total diacetyl	150 ppb	7.46 ppb	8.23 ppb
Total 2,3-pentanedione	900 ppb	5.09 ppb	3.17 ppb
Acetaldehyde	10 ppm	7.98 ppm	152.19 ppm

Las levaduras producen la mayoría de los compuestos de “flavor” en las primeras 72 horas. Por tal motivo es crucial controlar la temperatura en esos momentos.

Efecto de la Tasa de Inoculación

	Tasa inoculación Baja	Tasa inoculación Alta
Efectos	Fermentación retrasada desde el inicio y trunca / densidad final elevada / contaminación / más diacetilo y compuestos sulfurosos	Fermentación rápida y generación de alcoholes superiores / falta de cuerpo / autólisis / acetaldehído

Tasa de Inoculación

	CERVEZAS ALE		CERVEZAS LAGER	
	Densidad <1,060	Densidad >1,060	Densidad <1,060	Densidad >1,060
Levadura activa seca	0,5-0,8 gr/litro	1 gr/litro	1 – 1,5 gr/litro	2 gr/litro
Levadura recuperada	0,8 kg/100 litros 0,75 millones*	1 kg/100 litros 1 millón*	1.5 kg/100 litros 1,5 millones*	2 kg/100 litros 2 millones*

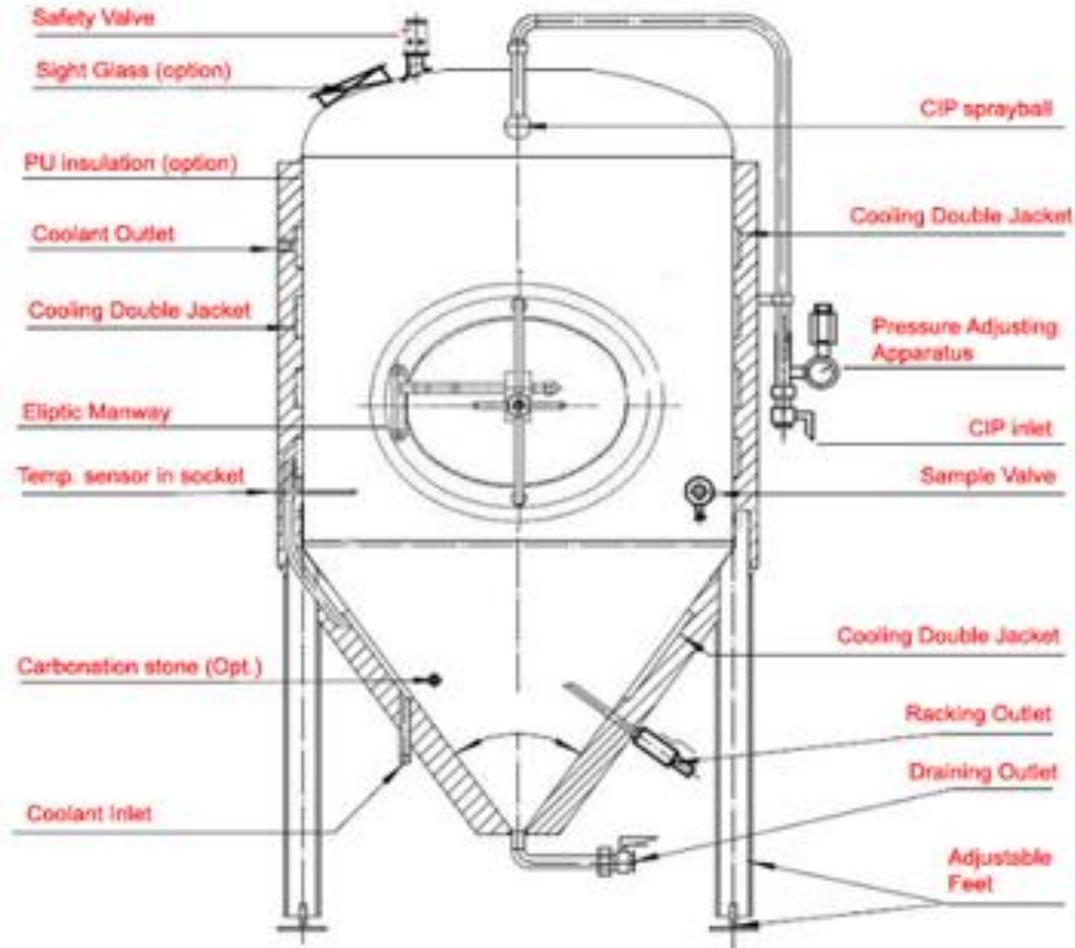
*por ml/°Plato

Efecto de la Presión

	Sin presión	Alta presión	Muy alta presión
Efectos	Equipamiento más sencillo y accesible.	Carbonatación con el CO2 de la propia fermentación / reducción de esteres / ¿más cuerpo? / menor riesgo de contaminación / mejora la floculación	Reprimir crecimiento / bajar la producción de esteres / incrementar diacetilo y acetaldehido

Fermentador isobárico

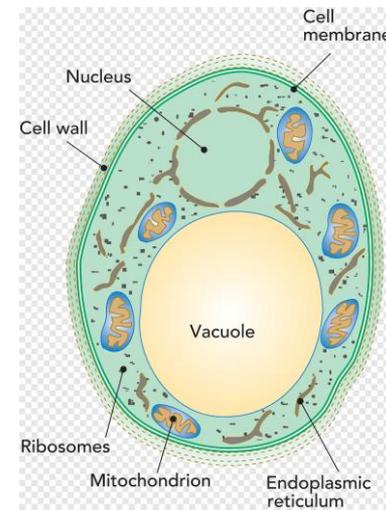
Cylindrical-conical fermentation tank : 0.0 to 3.0 bar



Control de Temperatura



Al ser humano no le afecta tanto un cambio sutil de temperatura, ya que tiene la posibilidad de neutraliza el efecto gracias a su compleja maquinaria metabólica

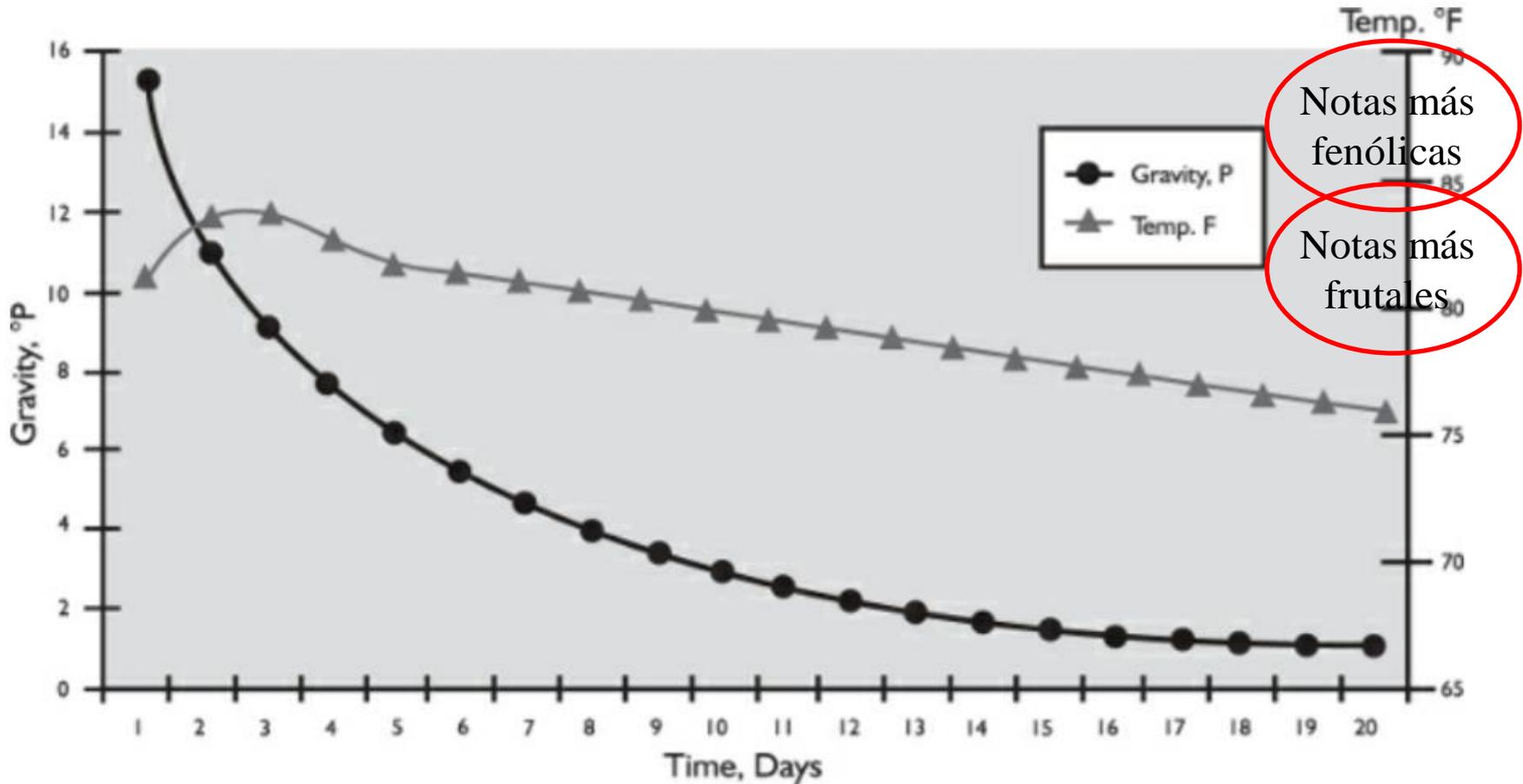


La levadura, al ser unicelular y estar en un medio líquido tiene menos resistencia a los cambios

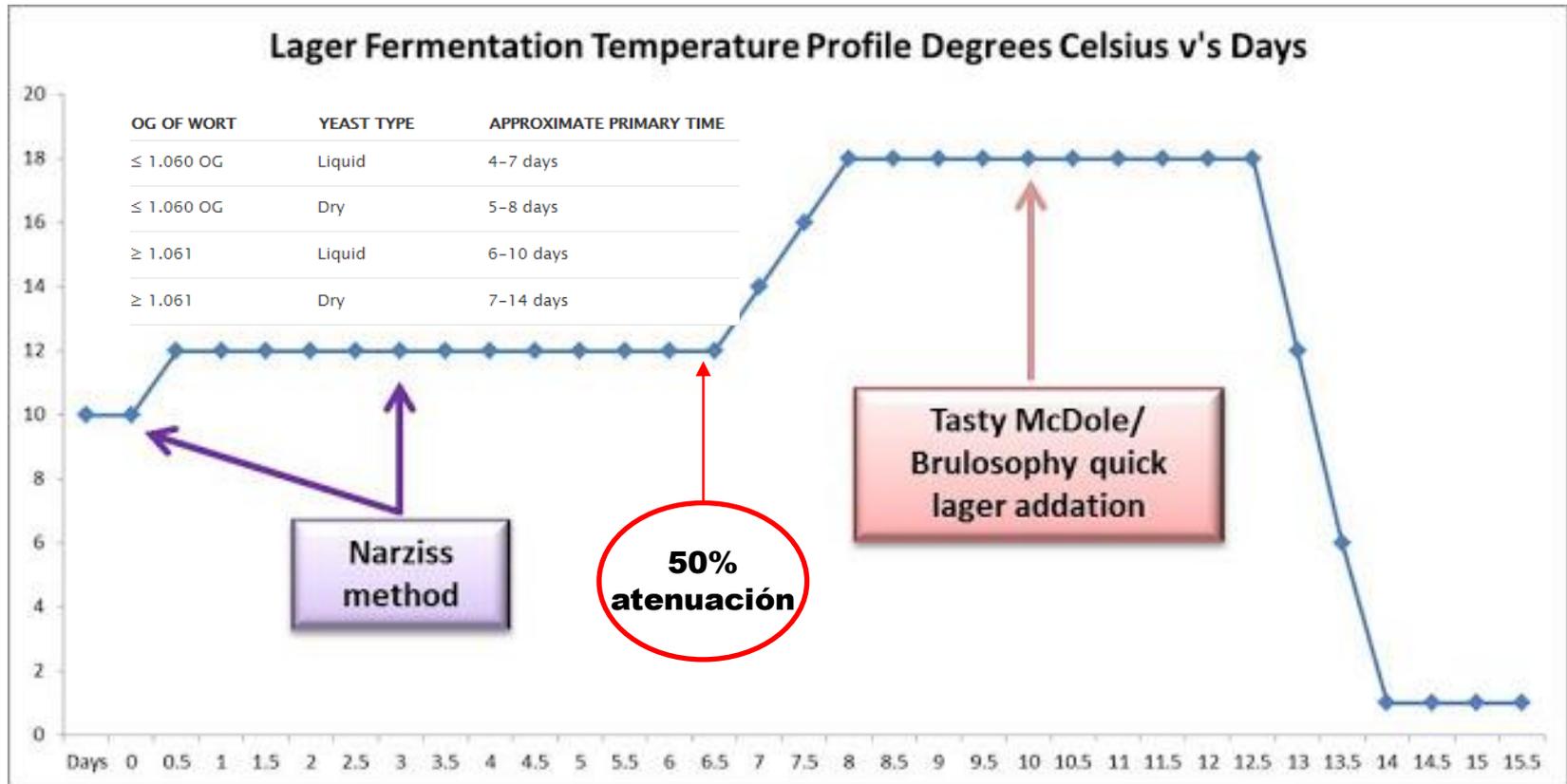
Dos preguntas muy comunes

- 1) ¿Es posible hacer cocciones dobles y fermentar en un único fermentador?**
- 2) ¿Es posible hacer una cocción y dividir en 1 o varios fermentadores?**

Fermentaciones especiales (Ej. Saison)



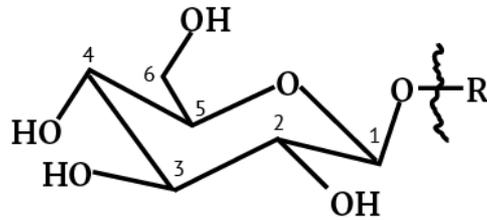
Fermentaciones Especiales (Lager)



Biotransformación

1- clivaje de glicósidos

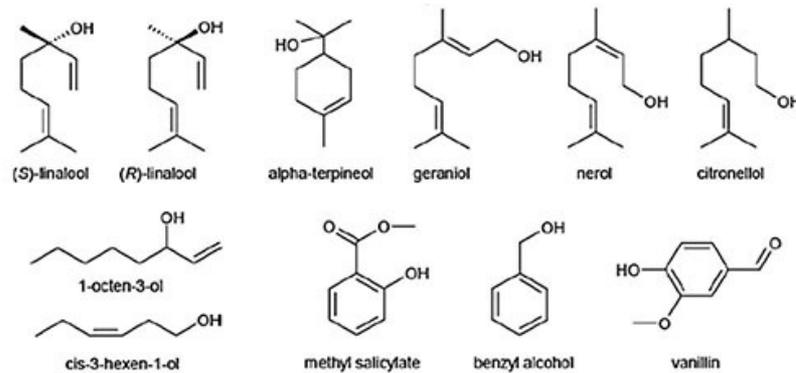
Figure 1: Structure of a glycoside



β -D-Glycosides
R=Aglycones

"R" represents the flavor molecule.

Figure 2: Examples of glycosidically-bound aroma compounds



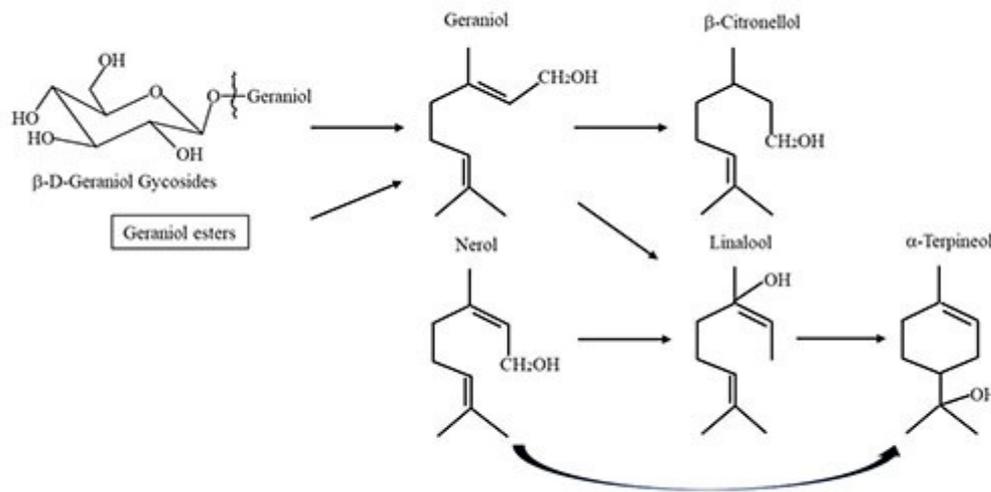
Adapted from Daenen³

El glicósido no aporta aroma, sin embargo el compuesto liberado del clivaje sí lo hace.

Biotransformación

2- transformación de terpenos

Figure 3: Biotransformation pathway of monoterpene alcohols by yeast



Adapted from K. Takoi, et al. Brewing Science 70, 177–186, 2017

Las levaduras pueden metabolizar algunos compuestos del lúpulo y transformarlos en otros, con otras características de aroma y sabor

Biotransformación

3- liberación de tioles

Las levaduras también pueden liberar “Tioles” a partir de sus precursores. Dichos compuestos sulfurados otorgan a la cerveza potentes aromas frutales, exóticos, uva, maracuyá.

Lúpulos con altos niveles de
Tioles **libres**

Citra
Apollo
Eureka!
Simcoe

Lúpulos con altos niveles de
“**precursores**” de Tioles

Citra	Hellertau
Simcoe	Perle
Eureka!	Saaz
Apollo	Calypso
Cascade	Sorachi Ace

Durante la maduración

- **Algunos esteres se van degradando como el Acetato de Isoamilo**
- **Otros esteres se van generando como Etilnicotinato (solvente, medicinal), Etilpiruvato (pasto recién cortado) y Etilactato (mantecoso)**
- **Bajan los niveles de acetaldehído y diacetilo (carbonilos)**
- **Bajan los compuestos de sulfuro**