

# Seguimiento de la Viabilidad y Concentración de Células de Levaduras Líquidas durante su Almacenamiento

## Monitoring the Viability and Cell Concentration of Liquid Yeasts during Storage

Presentación: 21/08/2024

### **Tobías Aramburu**

Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Alimentos (CIDTA), FRRo, UTN  
correoelectronico@correo.com (Open Sans 9)

### **Gianfranco Boz Magni**

Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Alimentos (CIDTA), FRRo, UTN  
correoelectronico@correo.com

### **Milagros Rubio Bonnet**

Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Alimentos (CIDTA), FRRo, UTN  
correoelectronico@correo.com (Open Sans 9)

### **Sofia Rey**

Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Alimentos (CIDTA), FRRo, UTN  
correoelectronico@correo.com (Open Sans 9)

### **Candela Modica**

Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Alimentos (CIDTA), FRRo, UTN  
correoelectronico@correo.com (Open Sans 9)

### **Lisandro Rudolf**

Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Alimentos (CIDTA), FRRo, UTN  
correoelectronico@correo.com (Open Sans 9)

### **Ezequiel Godoy**

Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Alimentos (CIDTA), FRRo, UTN  
ezgodoy@frro.utn.edu.ar

### **Germán Campetelli**

Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Alimentos (CIDTA), FRRo, UTN  
correoelectronico@correo.com (Open Sans 9)

### **Roxana Martinet**

Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Alimentos (CIDTA), FRRo, UTN  
guadamar67@gmail.com

## Resumen

La utilización de levaduras líquidas por parte de productores de cervezas artesanales presenta la dificultad de la logística de traslado y requerir el almacenamiento a bajas temperaturas, lo cual conlleva una elevada inversión y altos costos operativos. En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue realizar el seguimiento de la viabilidad y concentración de células de levaduras líquidas producidas en Santa Fe y almacenadas en condiciones subóptimas luego de su comercialización. A los efectos, muestras de levaduras líquidas almacenadas durante 15 días a 6°C fueron analizadas para determinar la factibilidad de su utilización en la producción de cervezas artesanales. Los resultados obtenidos mostraron valores de viabilidad de alrededor de 95 % y concentraciones de células vivas de  $7,6 \cdot 10^8$  durante los primeros 9 días de almacenamiento, siendo así las levaduras adecuadas para su uso en fermentaciones, mientras que dichos valores decrecieron significativamente a partir del día 12 de almacenamiento.

**Palabras clave:** Levaduras líquidas, Almacenamiento, Viabilidad, Concentración de células.

## Abstract

The use of liquid yeasts by craft beer producers presents the difficulty of requiring the maintenance of low temperatures, which entails a high investment and high operating costs. In this context, the objective of this work was to monitor the viability and cell concentration of liquid yeasts produced in Santa Fe and stored in suboptimal conditions after their commercialization. For this purpose, samples of liquid yeast stored for 15 days at 6 °C were analyzed to determine the feasibility of their use in the production of craft beers. The results obtained showed viability values of around 95 % and live cell concentrations of  $7.6 \cdot 10^8$  during the first 9 days of storage, thus making the yeasts suitable for use in fermentations, while these values decreased significantly from the day 12 of storage onwards.

**Keywords:** Liquid yeasts, Storage, Viability, Cell concentration.

## Introducción

Las levaduras utilizadas para la fermentación de cervezas se comercializan principalmente en dos modalidades, líquidas y secas. En general, la elección entre una u otra depende del tipo de cerveza que se desea producir, las condiciones de fermentación y las preferencias del cervecero (Bonatto, 2021: 110125).

Las levaduras secas se obtienen usualmente mediante secado por liofilización o secado spray (Fujii et al., 2011: 1981-1985), y se presentan en sobres o paquetes sellados. Estas tienen la ventaja de ser fáciles de almacenar y transportar, ya que no requieren refrigeración, además de tener una vida útil más larga y ser más resistentes a las variaciones de temperatura y a los cambios operativos durante su manipulación.

Por otro lado, las levaduras líquidas se obtienen mediante propagación de cultivos de cepas seleccionadas (Raines-Casselmann, 2005), y se comercializan en viales o paquetes que contienen las células en suspensión. Estas ofrecen en general una mayor variedad de cepas y, en muchos casos, una mejor calidad de fermentación, aunque requieren refrigeración durante su comercialización hasta su utilización, y tienen una vida útil más corta.

En Argentina, las levaduras secas son en general importadas y cuentan con amplia disponibilidad, mientras que hasta hace unos años, solo se producían levaduras líquidas en la Patagonia, lo cual dificultaba su utilización efectiva por productores de cerveza artesanal en el centro del país. Recientemente, se instaló un laboratorio en la ciudad de Santa Fe que produce y comercializa levaduras líquidas. Aún así, persisten las dificultades antes mencionadas para su utilización por parte de cerveceros artesanales, debido a que muchas veces no tienen disponible las instalaciones necesarias para mantener la cadena de frío en condiciones óptimas.

En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue realizar el seguimiento de la viabilidad y concentración de células de muestras de levaduras líquidas producidas en la ciudad de Santa Fe y almacenadas en condiciones subóptimas luego de su comercialización, a los efectos determinar la factibilidad de su utilización en la producción de cervezas artesanales.

# Desarrollo

## Materiales

Se utilizó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* en forma líquida (Laboratorio Vermont, Santa Fe, Argentina). Todos los reactivos químicos utilizados fueron de grado analítico (Cicarelli, Argentina).

## Metodología experimental

Las levaduras líquidas fueron almacenadas en recipientes herméticos y estériles a una temperatura de 6 °C durante toda la duración de la experiencia. En los días 1, 2, 5, 6, 8, 9, 12, 14 y 15, se tomaron muestras representativas de las levaduras almacenadas mediante medios estériles. Previo a la toma de cada muestra, ésta fue homogeneizada mediante agitación suave.

## Determinación de la viabilidad y concentración de células de las levaduras

El recuento de cantidad de células vivas, muertas y totales en cada muestra de levaduras se realizó a través del método de tinción con azul de metileno (Dalmasso et al, 2020: 119-129; Moreno et al, 2022: 343-348). Se realizaron diluciones de las muestras de levadura hasta 1:50. Como indicador, se utilizó una solución de azul de metileno al 0.01% con el fin de diferenciar las células vivas de las células muertas, donde éstas últimas se tiñen de un color azul intenso. Para realizar el recuento en microscopio, se utilizaron dos cámaras de Neubauer espejadas. Mediante cámara digital acoplada al microscopio, se tomaron imágenes fotográficas de 5 recuadros de la retícula de la cámara de Neubauer. El conteo del número de células vivas, muertas y totales se realizó luego manualmente. La viabilidad de cada muestra de levaduras se determinó según la Ec. (1).

$$Viabilidad (\%) = \frac{Cantidad\ total\ de\ células\ contadas - Cantidad\ de\ células\ muertas\ contadas}{Cantidad\ total\ de\ células\ contadas} \quad (1)$$

La concentración de células de cada muestra de levaduras se calculó según la Ec. (2). La cantidad de células contadas corresponderá al número de células vivas, de células muertas o de células totales, según se desee determinar la respectiva concentración de células.

$$Concentración\ de\ células\ \left(\frac{cel}{ml}\right) = Cantidad\ de\ células\ contadas * 10000 * factor\ de\ dilución \quad (2)$$

## Análisis estadístico

Los resultados se presentan como los valores medios y sus desviaciones estándar. Los resultados experimentales se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor, con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . La existencia de diferencias significativas entre los resultados experimentales se reporta con las diferentes letras obtenidas mediante pruebas post-hoc de Tukey. Los análisis estadísticos se realizan en el software R-4.3.2.

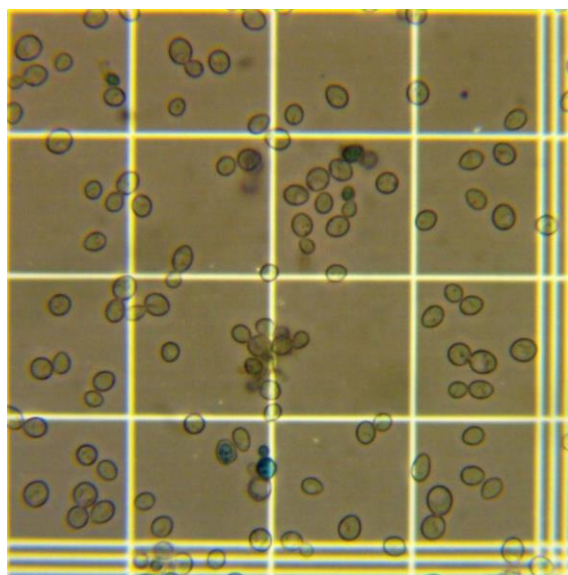
## Resultados y discusión

La Fig. 1 presenta, a modo de ejemplo, dos imágenes fotográficas utilizadas para el recuento del número de células vivas, muertas y totales de dos muestras de la levadura líquida. Las levaduras líquidas originales (apenas extraídas del recipiente en la cual son provistas por el laboratorio) mostraron una alta viabilidad de  $99,28 \pm 0,79$  % (ver imagen de la izquierda). Se destaca que este valor de la viabilidad inicial de las levaduras líquidas fue similar al previamente observado por los autores en muestras de otros batch de las mismas.

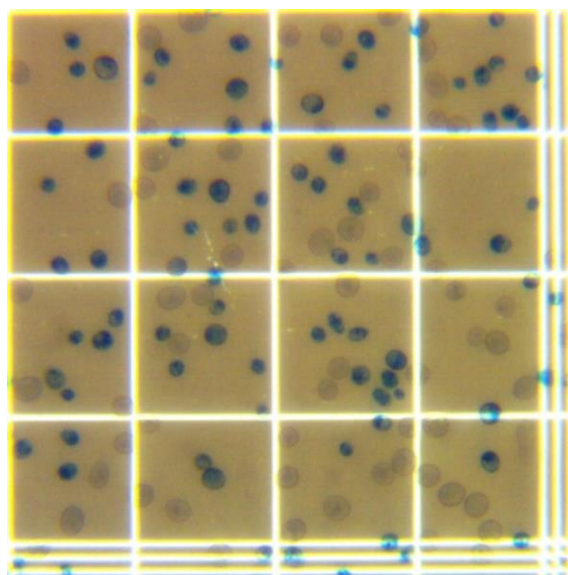
En contraste, se reportaron previamente valores de la viabilidad inicial de dos cepas comerciales de levaduras liofilizadas (SafAle S-04 y S-05, Fermentis by Lesaffre, Francia) de  $62,52 \pm 1,90$  % y  $56,82 \pm 1,71$  % (Boz Magni et al., 2024). Se presume que el proceso de secado por liofilización, utilizado para alargar la vida útil del polvo de levaduras, impacta negativamente en la viabilidad de las levaduras comercializadas en esta modalidad. Por su

parte, las levaduras líquidas muestran una mayor viabilidad inicial, pero requieren mantener la cadena de frío desde su producción hasta su uso, siendo su vida útil recomendada menor a las alternativas liofilizadas.

Como se discutirá más adelante, la viabilidad de las levaduras disminuye durante el almacenamiento debido a la muerte de una fracción significativa de las células (ver imagen de la derecha para el día 14 de almacenamiento).



a. Levaduras líquidas originales.



b. Levaduras líquidas para el día 15 de almacenamiento.

Figura 1. Imágenes utilizadas para el recuento de células vivas y muertas en muestras de las levaduras.

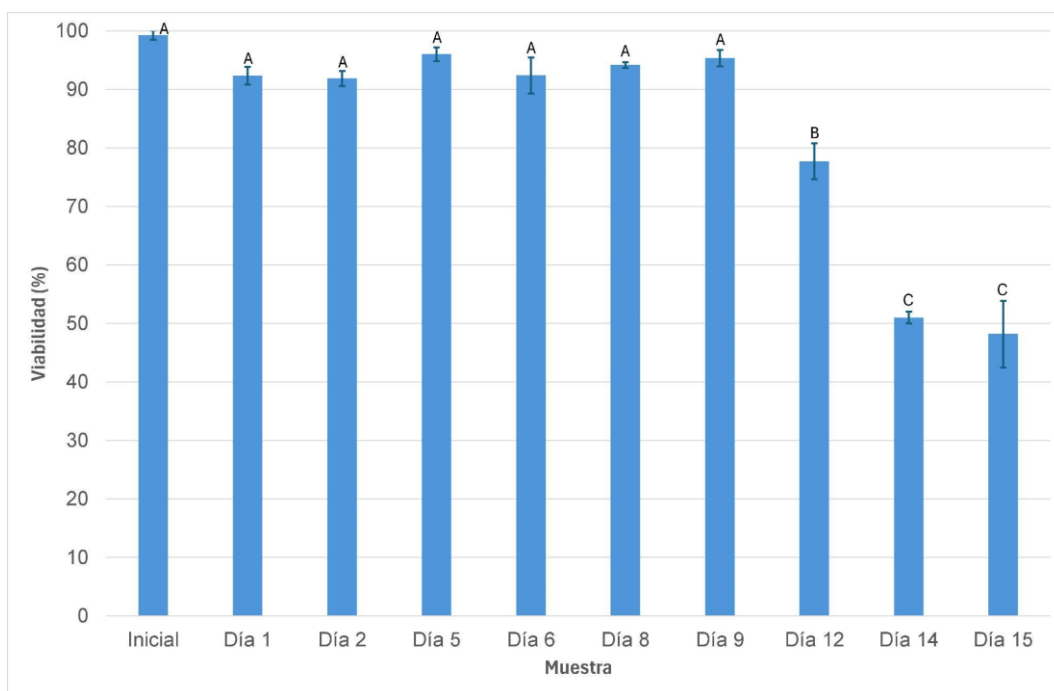


Figura 2. Evolución de la viabilidad durante el almacenamiento de las levaduras líquidas (diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas respecto al tiempo de almacenamiento).

La Fig. 2 muestra la evolución de la viabilidad de las levaduras líquidas durante dos semanas de almacenamiento a una temperatura de 6 °C. Hasta el día 9 de almacenamiento, se observan valores de viabilidad levemente menores que los iniciales, pero sin diferencias significativas entre los mismos. Por otra parte, a partir del día 12 de almacenamiento, la viabilidad disminuye abruptamente, alcanzando valores de  $48,21 \pm 5,69$  % para el día 15 de almacenamiento. En el mismo sentido, la Fig. 3 muestra la evolución de la concentración de células

vivas y de células muertas durante el almacenamiento. Se aprecia aquí que el número de células vivas decrece marcadamente a partir del día 12 de almacenamiento, mientras que la proporción de células muertas se incrementa significativamente a partir del mismo día.

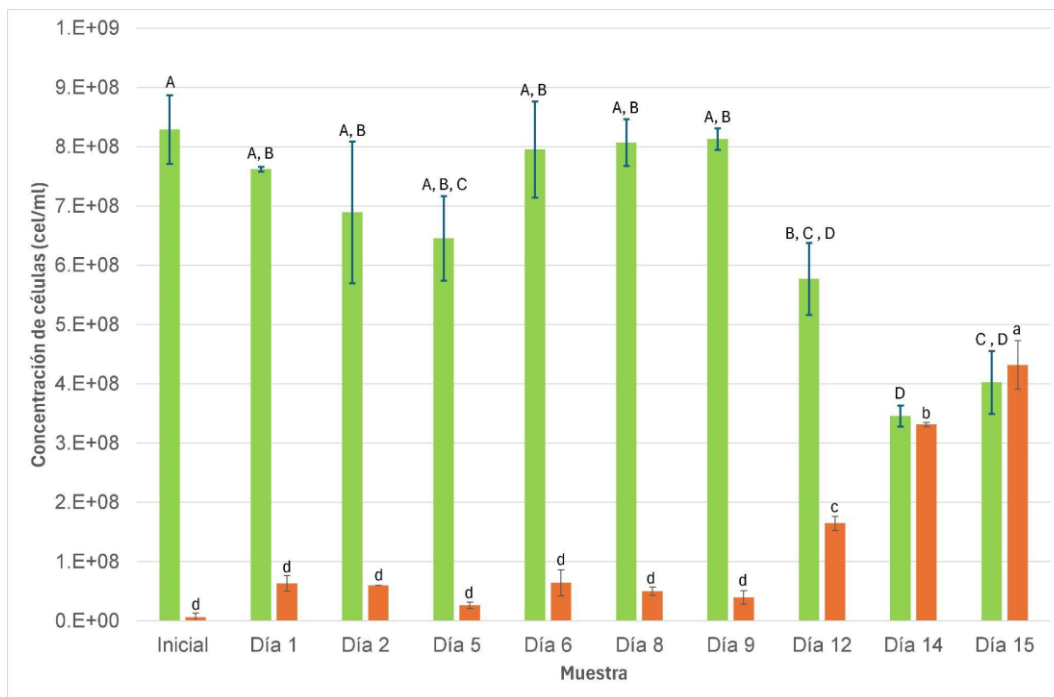


Figura 3. Evolución de la concentración de células vivas y muertas durante el almacenamiento de las levaduras líquidas (diferentes letras sobre las columnas de un mismo color indican diferencias significativas respecto al tiempo de almacenamiento).

Se reportó previamente que la viabilidad de la cepa *S. pastorianus* RIBM 95 fue del 94 % al 98 % cuando la misma fue criopreservada en nitrógeno líquido durante 3 años, a la vez que esta levadura fue metabólicamente más activa post-criopreservación que otras muestras almacenadas en condiciones convencionales a 4 °C (Matoulková & Sigler, 2011: 383-388). No obstante, el almacenamiento a bajas temperaturas, y más aún la criopreservación, pueden resultar prohibitivas a los productores artesanales de cerveza, debido a la necesidad de equipamientos específicos y los altos costos asociados a la operación de los mismos. Durante su almacenamiento en condición ambiente, las levaduras líquidas y las bacterias ácido-lácticas producen compuestos antimicrobianos que hacen que el ambiente sea desfavorable para la supervivencia y la multiplicación de diversos microorganismos (Alaru et al., 2024: 168-182). Este tipo de fenómeno puede explicar el aceleramiento de la muerte celular una vez que la fracción de células no viables comienza a incrementarse durante el almacenamiento de las levaduras líquidas.

## Conclusiones

El seguimiento de la viabilidad y concentración de células vivas de levaduras líquidas almacenadas en condiciones subóptimas mostró que las mismas exhiben características adecuadas para su utilización en la fermentación de cervezas artesanales durante 9 días de almacenamiento; mientras que a partir del día 12 de almacenamiento, dichos parámetros empeoraron significativamente, por lo cual su uso en estas condiciones podría impactar negativamente en los rendimientos y características de las eventuales cervezas resultantes. Luego, la utilización de levaduras líquidas producidas en el país y almacenadas en condiciones accesibles para los productores de cervezas artesanales se puede constituir en una opción viable considerando los tiempos usuales de comercialización y almacenamiento, en reemplazo de levaduras liofilizadas importadas cuyo costo suele resultar más elevado.

Como continuación de este trabajo de investigación, se prevé analizar otros parámetros de las levaduras líquidas durante su almacenamiento, así como utilizar las mismas en pruebas de fermentación a pequeña escala en un biorreactor de laboratorio para determinar la performance del proceso fermentativo.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Tecnológica Nacional por el financiamiento a través del proyecto ECA8080TC, y a la cervecería Kalber por el suministro de las levaduras líquidas.

## Referencias

- Alaru, P. A. O., Shitandi, A. A., Mahungu, S. M., & Muia, J. M. K. (2024). Impact of Storage Temperature on Microbial Diversity and Probiotic Effect of Liquid Brewers' Yeast. *Open Journal of Animal Sciences*, 14(03), 168-182.
- Bonatto, D. (2021). The diversity of commercially available ale and lager yeast strains and the impact of brewer's preferential yeast choice on the fermentative beer profiles. *Food Research International*, 141, 110125.
- Boz Magni, G., Aramburu, T., Zapata, L., Rubio Bonnet, M., Rey, S., Modica, C. Godoy, E., Capetelli, G., & Martinet, R. (2024). *Optimización de la recuperación y reutilización de levaduras en pequeña escala para la producción de cerveza artesanal*. Villa María, Córdoba, Argentina, Congreso de Investigaciones y Desarrollos en Tecnología y Ciencia (IDETEC 2024).
- Dalmaso, L. P., Gallace, M. E., Cenizo, V. J., Caramutti, V. E., & Ruíz Espínola, M. (2020). *Microbiología cervecera: manual teórico práctico*. Toay, La Pampa, Argentina, Universidad Nacional de La Pampa.
- Fujii, S., Sakamoto, Y., Aso, T., Aktas, T., Yoshimoto, N., & Yamamoto, S. (2011). Drying of yeasts—factors affecting inactivation during drying. *Drying technology*, 29(16), 1981-1985.
- Matoulková, D., & Sigler, K. (2011). Impact of the Long-Term Maintenance Method of Brewer's Yeast on Fermentation Course, Yeast Vitality and Beer Characteristics. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(3), 383-388.
- Moreno, A., Stüber, Y., Godoy, E., Martinet, R. Campetelli, G. (2022). *Recuento de levadura cervecera para aplicaciones en escala micro industrial*. San Francisco, Santa Fe, Argentina. Jornadas de Ciencia y Tecnología 2022 (JCT 2022).
- Raines-Casselmann, M. B. (2005). Yeast Propagation and Maintenance: Principles and Practices. *The maltose falcons, California*.