

LEVADURAS

(Clase 11)



Lic. Sebastián Oddone
ESPECIALISTA EN FERMENTACIONES INDUSTRIALES

Manejo de Levaduras

Dependiendo de la fuente de levaduras, es posible realizar más de una acción:

Levaduras líquidas comerciales: propagar en starter

Levaduras activas secas: utilizar en inoculación directa / pre-hidratar / propagar en starter

Levaduras líquidas recuperadas: top y bottom crop / revitalizar (en caso de levadura vieja) / resuspender (en caso de alta densidad y alcohol, o bien por uso de fermentadores planos)

En todos los casos podemos almacenar atendiendo a las mejores prácticas y condiciones, y controlar cantidad y estado por recuento en microscopio. Veremos también una técnica práctica por medición de pH.

Test grosero de viabilidad del barro

- 1) Determinar el pH del barro al momento de la cosecha
- 2) Determinar el pH del barro al momento de la inoculación
- 3) Si el pH actual es un punto superior al pH inicial, entonces descartar el barro



Escala larga y corta

Valor		Escala corta	Escala corta	Escala larga	Escala larga
$10^0 =$	1	uno	$1\ 000^{1-1}$	uno	$1\ 000\ 000^{0.0}$
$10^3 =$	1 000	mil	$1\ 000^{1+0}$	mil	$1\ 000\ 000^{0.5}$
$10^6 =$	1 000 000	millón	$1\ 000^{1+1}$	millón	$1\ 000\ 000^{1.0}$
$10^9 =$	1 000 000 000	billón	$1\ 000^{1+2}$	mil millones o millardo	$1\ 000\ 000^{1.5}$
$10^{12} =$	1 000 000 000 000	trillón	$1\ 000^{1+3}$	billón	$1\ 000\ 000^{2.0}$
$10^{15} =$	1 000 000 000 000 000	cuatrillón	$1\ 000^{1+4}$	mil billones o billardo	$1\ 000\ 000^{2.5}$
$10^{18} =$	1 000 000 000 000 000 000	quintillón	$1\ 000^{1+5}$	trillón	$1\ 000\ 000^{3.0}$
$10^{21} =$	1 000 000 000 000 000 000 000	sextillón	$1\ 000^{1+6}$	mil trillones o trillardo	$1\ 000\ 000^{3.5}$

Microscopía y Recuento

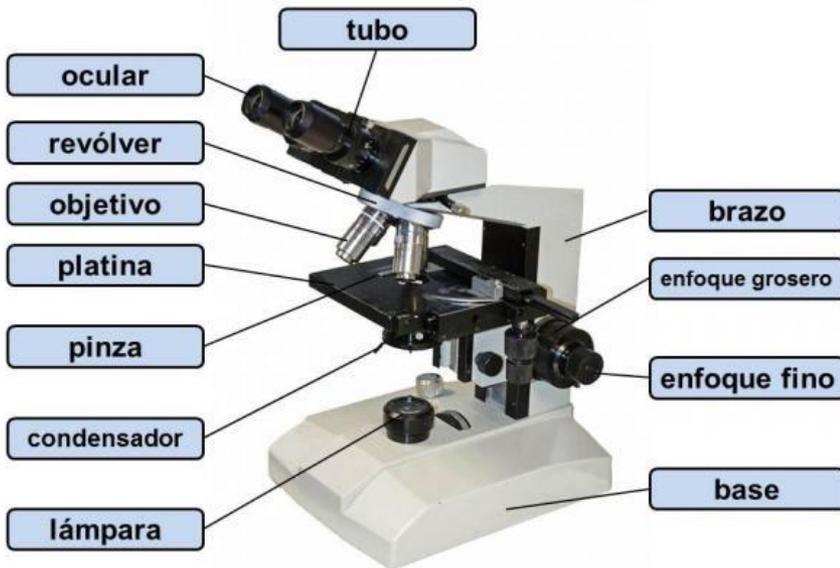


El microscopio

RECUENTO → Número de células

VIABILIDAD → Diferenciación entre vivas y muertas

Presencia de MO contaminantes (ver más adelante)



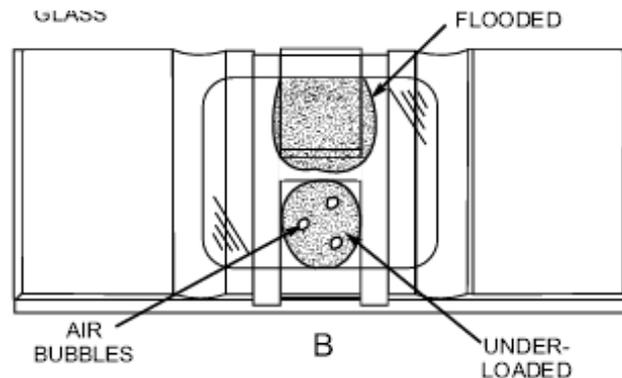
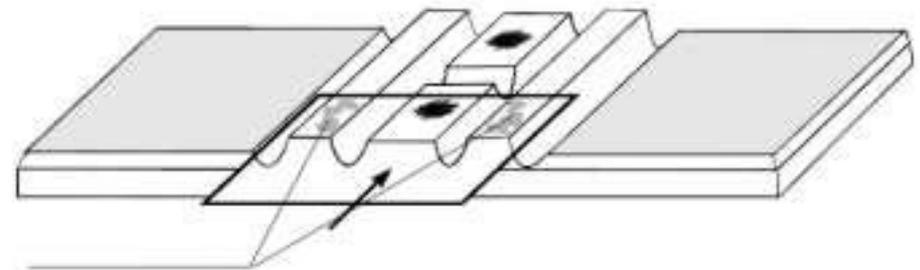
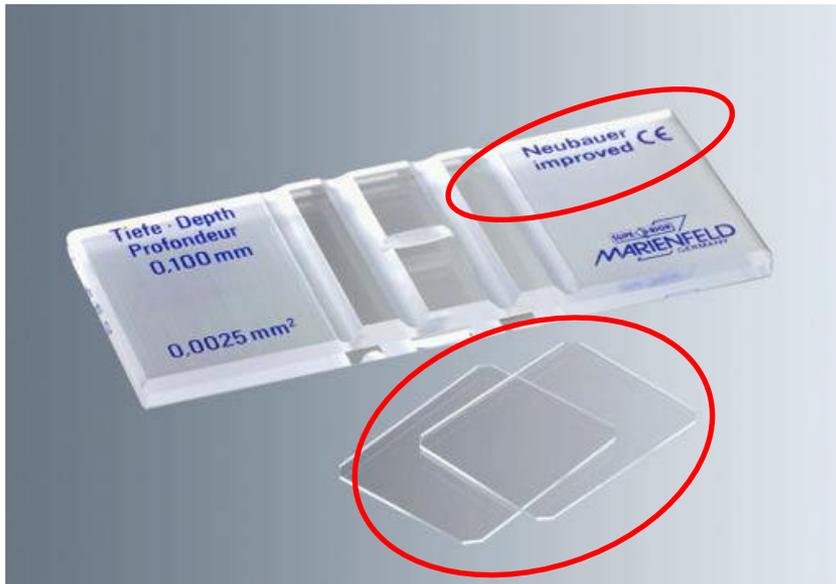
<http://light-microscope.net>

LO BÁSICO

- ✓ Lentes binocular o monocular
- ✓ Iluminación propia (preferiblemente lámpara LED)
- ✓ Platina móvil
- ✓ Juego básico de objetivos (4X, 10X, 40X, 100X)

La cámara de Neubauer

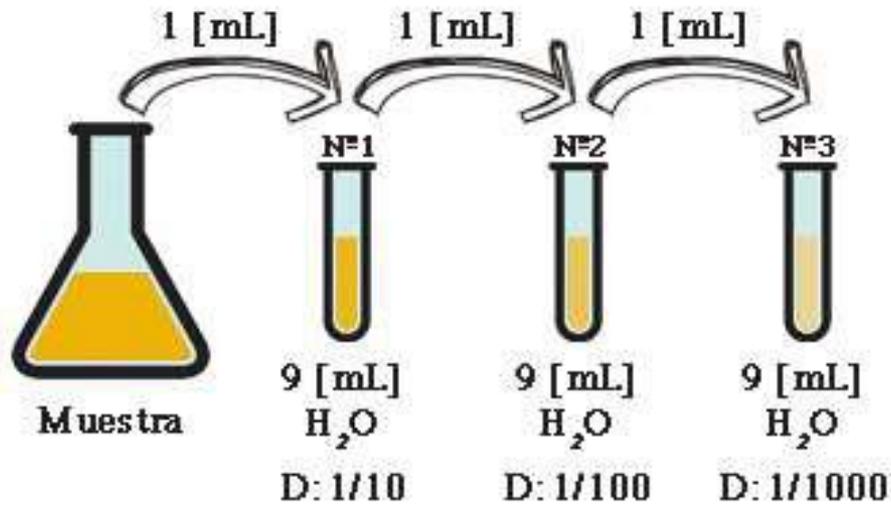
Dispositivo de vidrio que posee dos superficies reticuladas (retículos) para el conteo de las células y dos columnas laterales que poseen una altura de 0,1 mm por encima del retículo



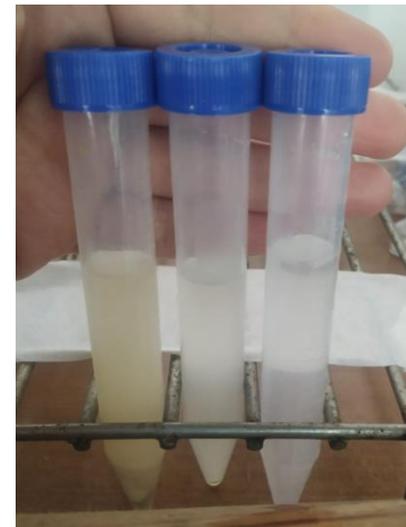
Antes de comenzar el recuento...

Obtención de la muestra (crema de levaduras)

- ✓ Sanitizar el toma-muestra con alcohol 70/30
- ✓ Purgar durante 5-10 segundos
- ✓ Utilizar frasco estéril para recoger la muestra
- ✓ Reducir al mínimo el tiempo de exposición al ambiente
- ✓ Sanitizar el tomamuestra

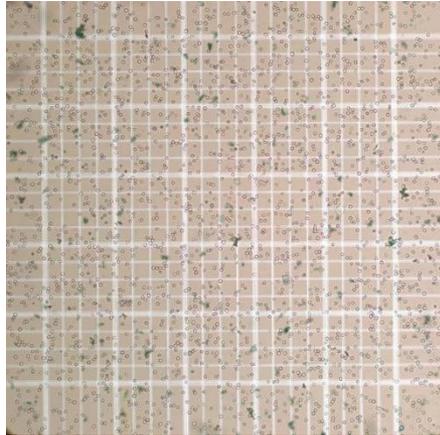


Preparación de diluciones

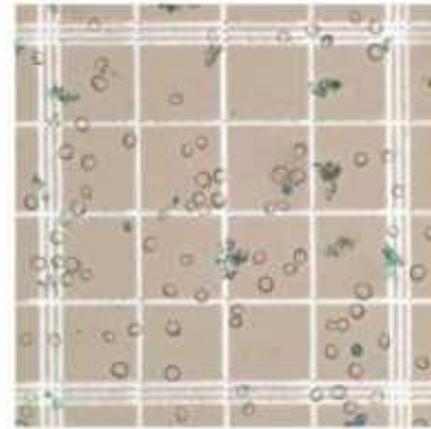


Recuento en cámara de Neubauer

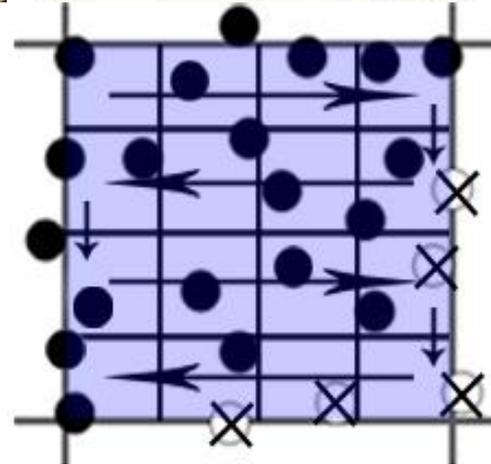
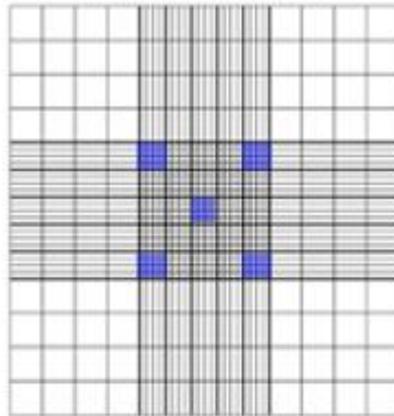
Campo de observación 20 X



Campo de observación 40 X



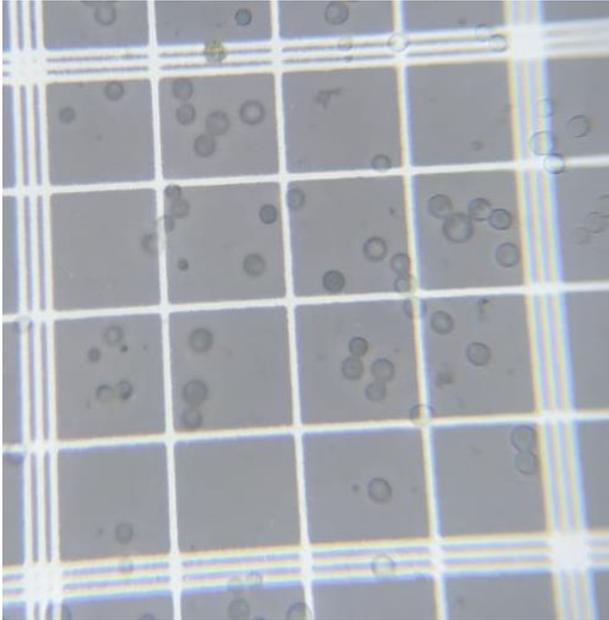
- Contar **sólo 5 de los cuadros** (coloreados en azul).



- Por cuadrado, se deben contar aproximadamente entre **30 y 60 células**

- Cargar la cámara y llevarla al microscopio.
- Colocar el objetivo de 40X y enfocar hasta ver nítidas las levaduras.
- Comprobar que la distribución de las células sea uniforme.

Cálculos en el recuento



RECuento

1= 50 (aprox en imagen)

2= 48

3= 38

4= 52

5= 37

Si la suma de 5 cuadrados da un total de 225 entonces el total de la cámara (estimado) será de **$225 \times 5 = 1125$**

Las células por ml se estiman en:

$$1125 \times 10.000 = 11.250.000 = 1,125 \times 10^7$$

Multiplico por factor de dilución ejemplo (1/100) entonces:

$$1,125 \times 10^7 \times 100 = 1,125 \times 10^9 \text{ cel/ml}$$

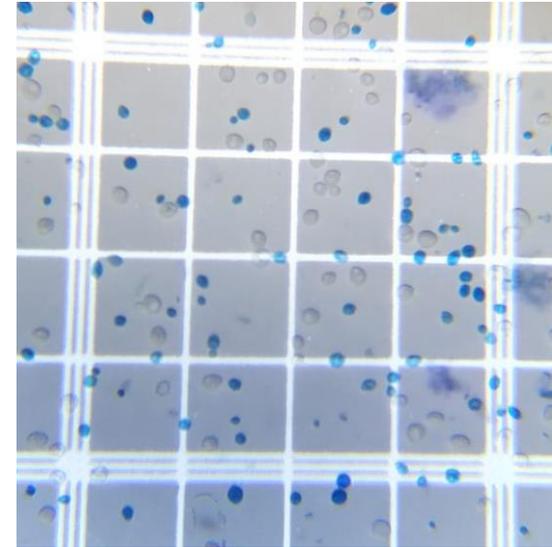
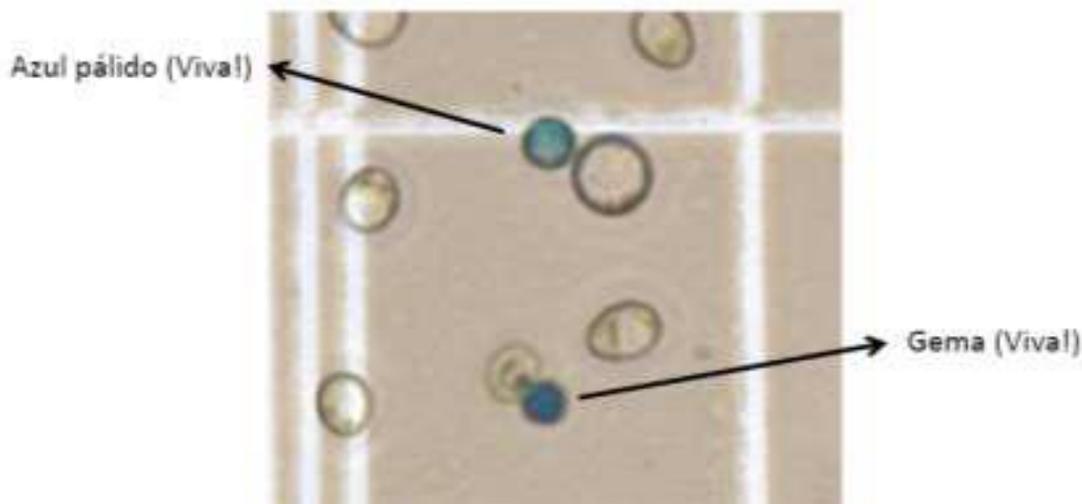
Células/ml = Células totales contadas x 5 x 10.000 x factor de dilución

VIABILIDAD %= (Cel Totales – Cel Muertas) / Cel Totales x 100

VIABILIDAD %= (225 – 13) / 225 x 100 = 94,2%

Tinción vital con azul de metileno

Evaluación de viabilidad: Diferenciación de vivas y muertas

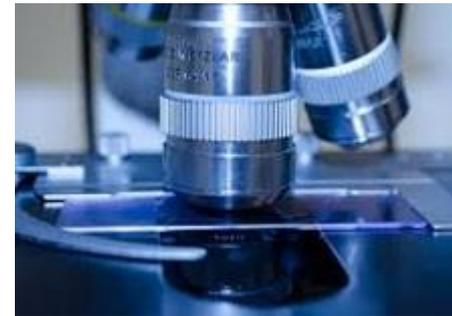


- En un tubo de ensayo, colocar **1 ml** de la dilución preparada anteriormente y agregar **1 ml** del colorante azul de metileno. --- Es importante considerar que, **si se utilizó la dilución 1/100, con el agregado del azul de metileno se realiza una dilución 1/200.**
- Homogeneizar
- Dejar reposar durante 3 minutos
- Llenar la cámara

Uso del 100X para contaminantes

Es un método que nos puede dar una idea del nivel de contaminación, pero sólo si están en grandes cantidades. De otra manera, se recomiendan métodos de recuento en placa.

- 1) Colocar una gota de muestra líquida en un portaobjetos (diluir si es necesario)
- 2) Con la ayuda de un ansa estéril esparcir suavemente la muestra
- 3) Colocar el cubreobjetos
- 4) Colocar una gota de aceite de microscopio y sumergir el aumento en el aceite



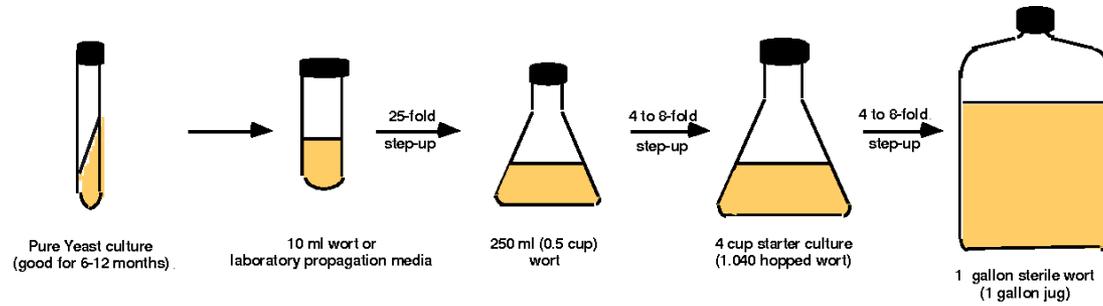
Contaminantes por plaqueo

Requiere de métodos microbiológicos y equipamiento específico



Propagación de levaduras

Escala laboratorio



Escala piloto

