



Laboratorio Cervecero



Lic. Sebastián Oddone
ESPECIALISTA EN FERMENTACIONES INDUSTRIALES

Seguimiento de la maceración y la cocción

**INSTRUMENTAL
SENCILLO QUE NO
PUEDE FALTAR**

**Reloj, termómetro,
pHmetro,
densímetro,
refractómetro**

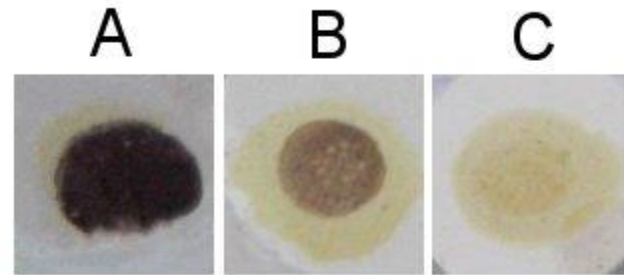


Test de Iodo (¿sirve?)

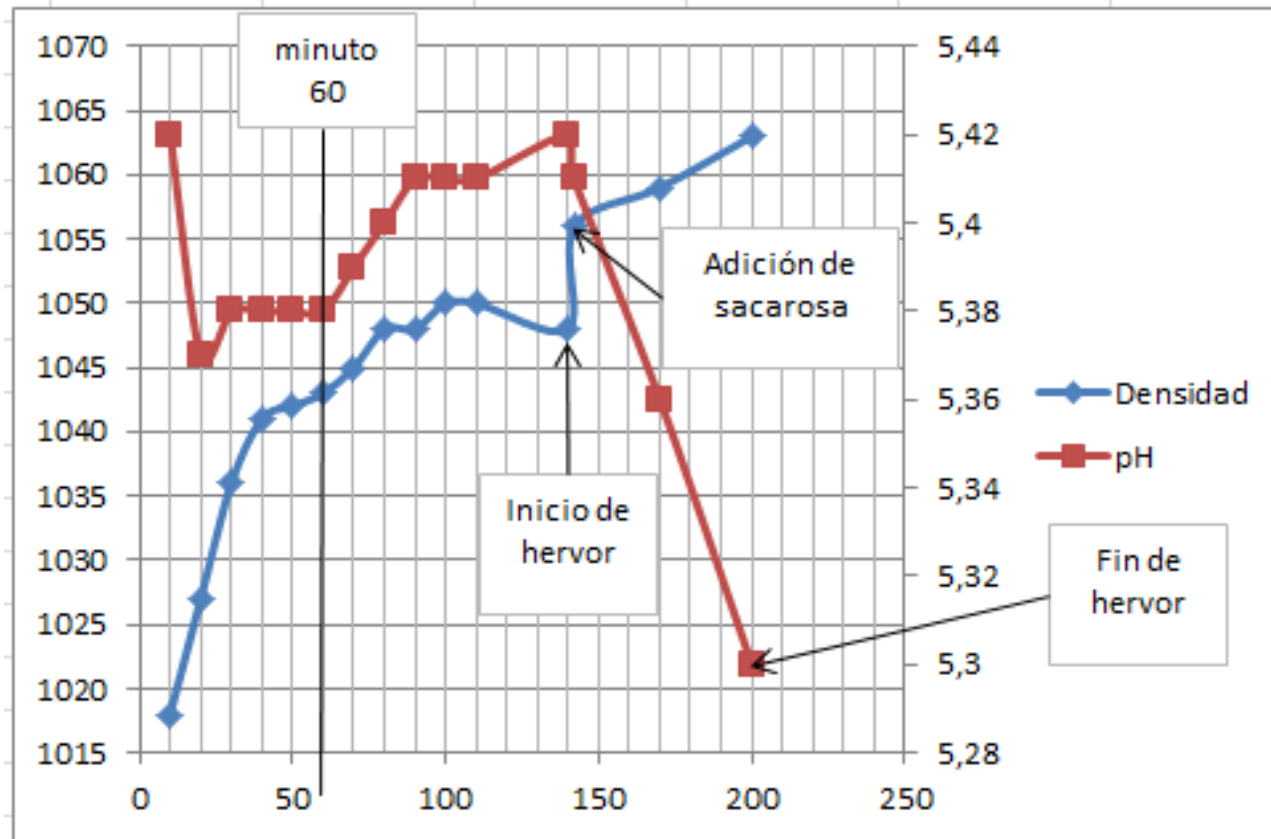
TEST DE IODO

**Usar tintura de
iodo**

**Usar mosto +
grano**



Evolución del macerado



Medición de Oxígeno disuelto

**OXÍGENO
DISUELTO**

**¿En caso de no
contar con
oxímetro?**



Seguimiento de las fermentaciones

EVOLUCIÓN DE LA FERMENTACIÓN

**Densidad, pH,
temperatura**

How to use

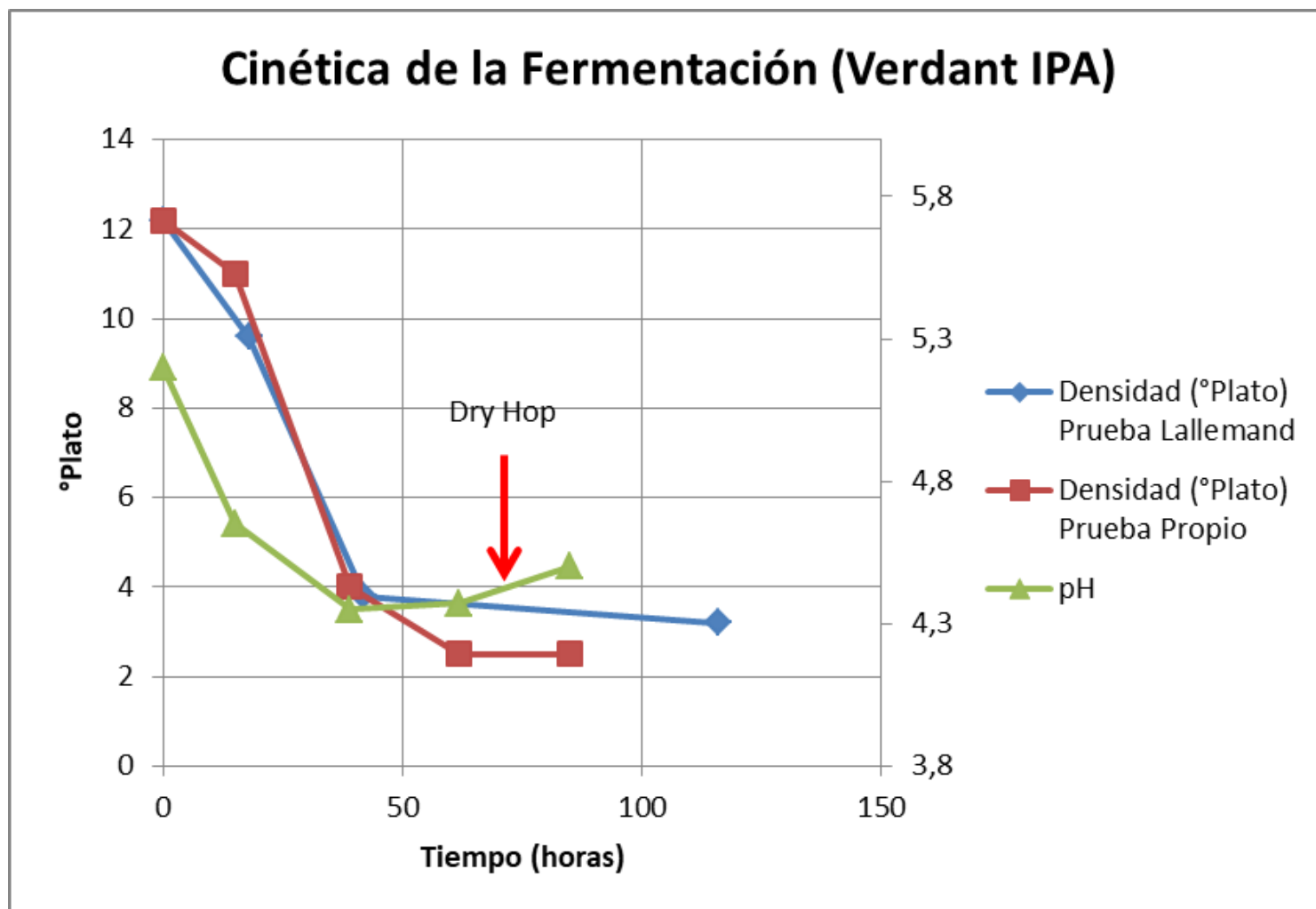
①: Place 2-3 drops of sample on the main prism



②: Close the cover plate and look through the eyepiece



Seguimiento ejemplo

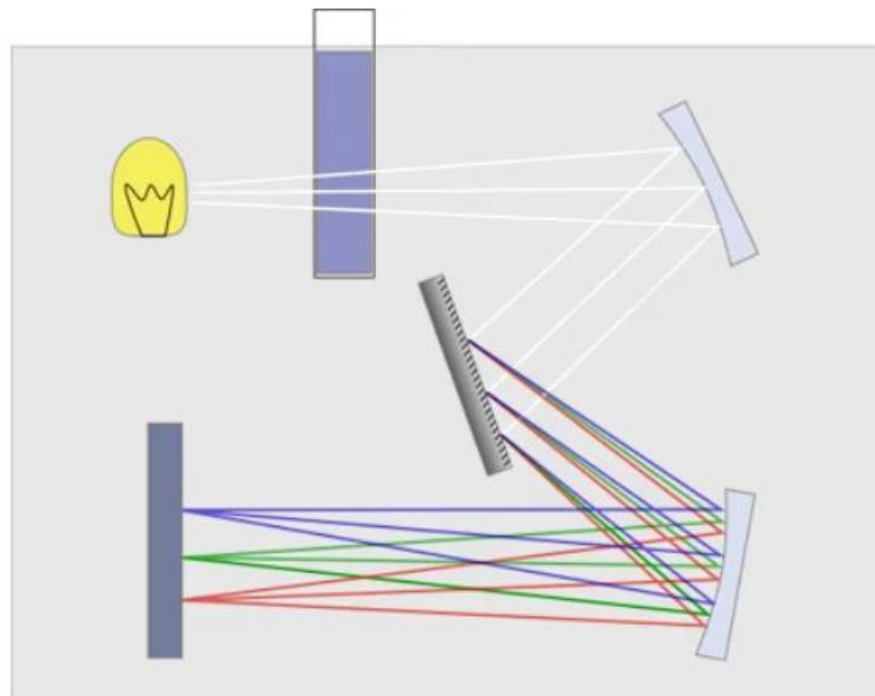


Medición de IBUs

- **Unidades Internacionales de Amargor. Se determinan por espectrometría a 275 nm, y se especifican como mg/litro de iso-alfa-ácidos.**

Sin embargo, el método es inespecífico ya que detecta mezcla de compuestos de amargor similares

Existen otros métodos para determinar los IBUs (HPLC, espectrometría de fluorescencia)



Oxidación del lúpulo (HSI)

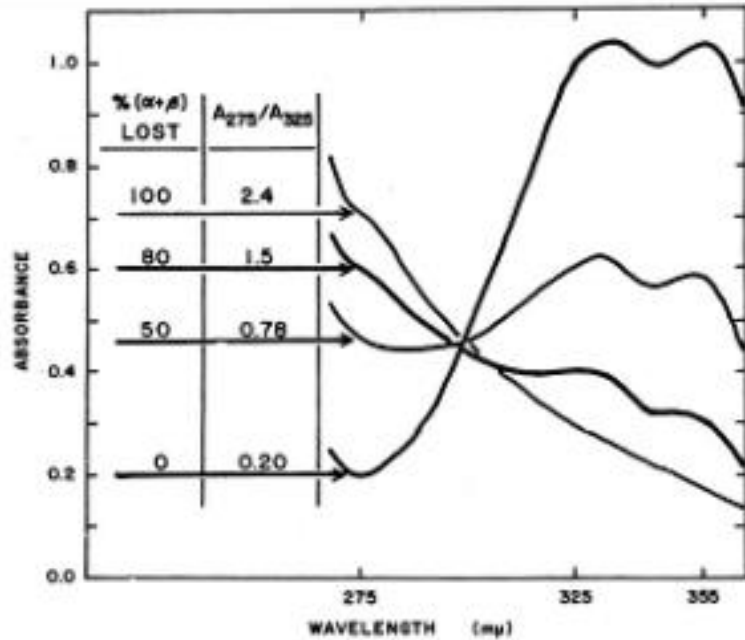
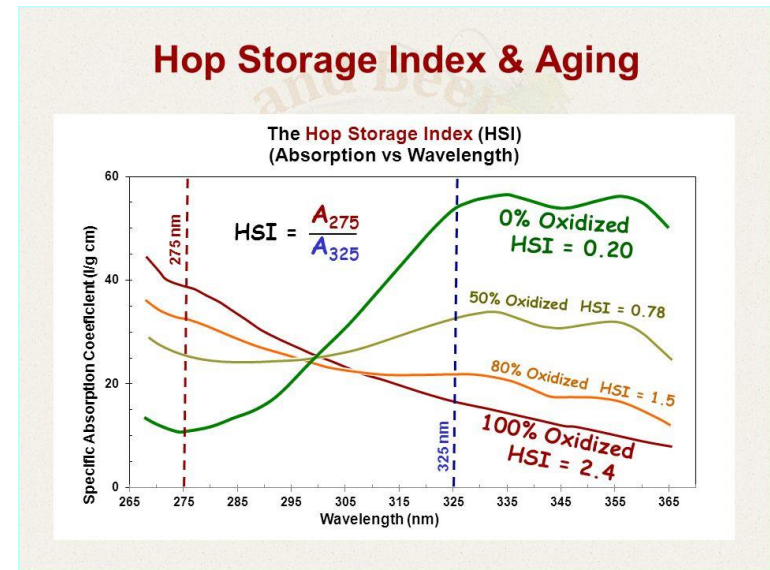


Figure 1. Typical spectra of alkaline methanol solutions obtained from hops in various stages of deterioration. A_{325} decreases as hop acids are oxidized and A_{275} increases as oxidation products accumulate, resulting in proportional increases in A_{275}/A_{325} (Likens et al. 1970).



HSI < 0.30 = good quality

0.30 > 0.40 = acceptable quality but the lower the better

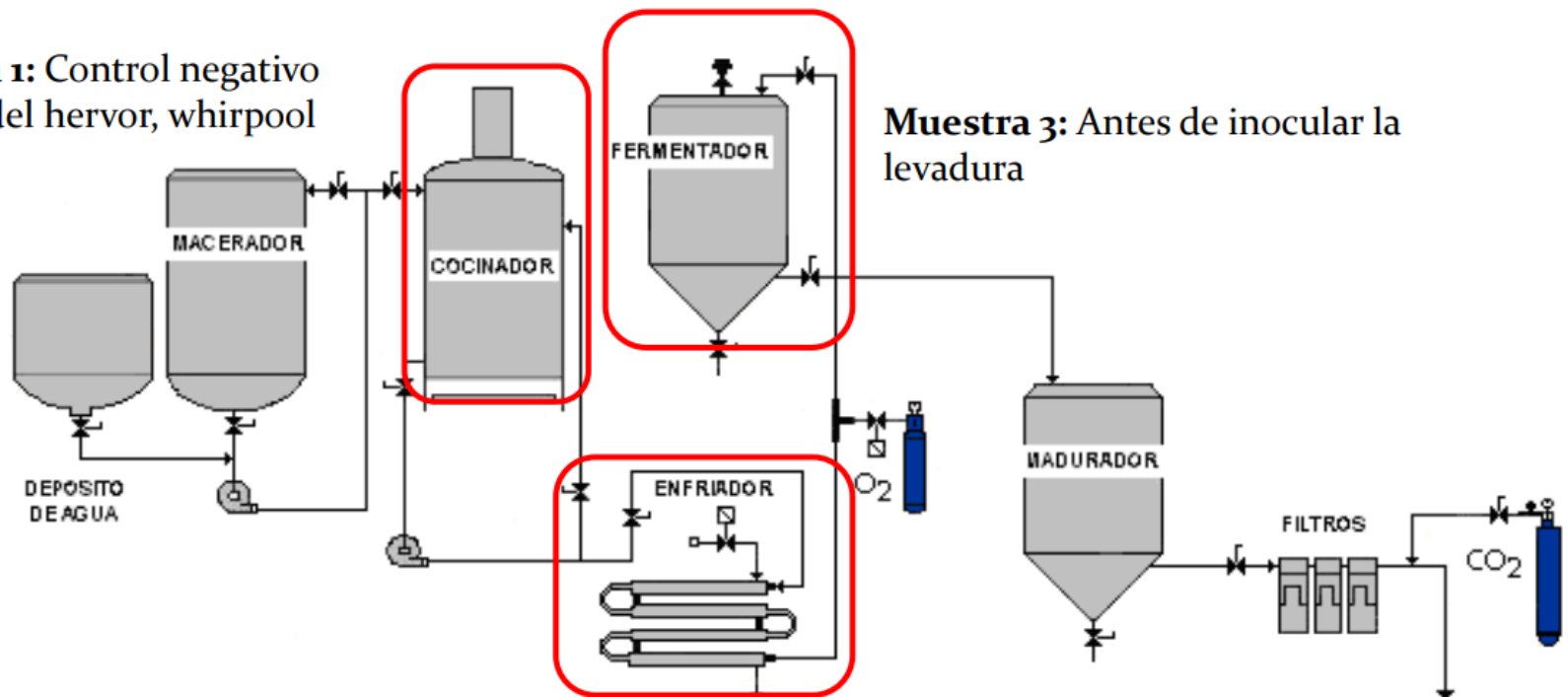
HSI > 0.40 = questionable quality

A medida que se oxidan los alfa-ácidos se van formando humulinonas y huluponas

Test de Mosto Forzado

- ✓ Se toman tres muestras en recipientes estériles.

Muestra 1: Control negativo
Al final del hervor, whirlpool



Aplica a cualquier escala

Muestra 2: Salida del enfriador

ENVASADO

Test de Mosto Forzado

- ✓ Se incuban a 25 – 30°C durante una semana con observación diaria.
- ✓ Se considera positivo cuando se detecta turbidez y/o producción de gas. Siempre comparar con el control (muestra 1)
- ✓ ¿Qué pasa si el control da positivo?.

Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Interpretación
(-)	(-)	(+)	Problema de sanitización y limpieza en mangueras, conectores o fermentador. No reutilizar levadura
(-)	(+)	(+)	Problema de sanitización y limpieza en enfriador y fermentador. No reutilizar levadura
(-)	(-)	(-)	Los protocolos funcionan correctamente

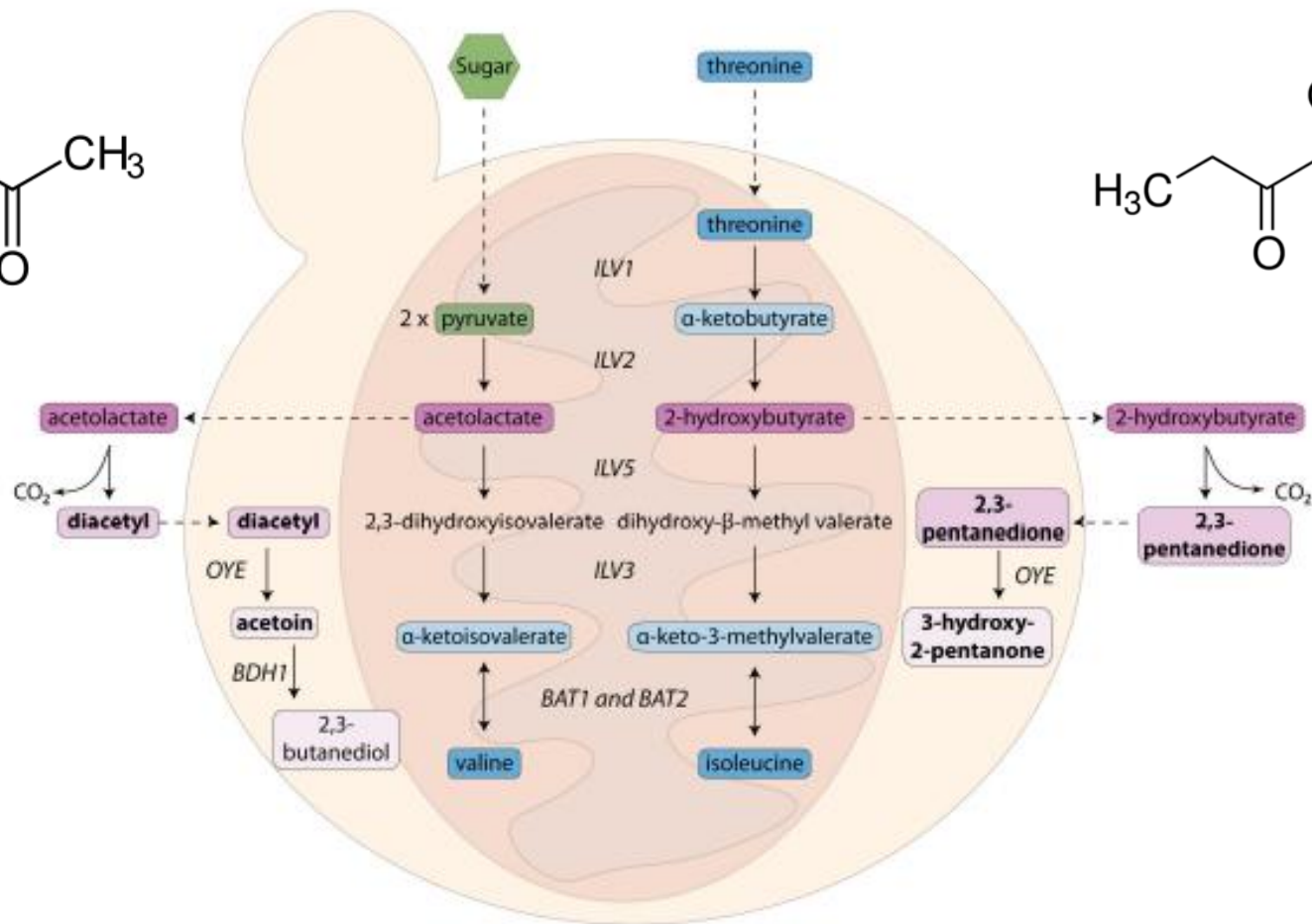
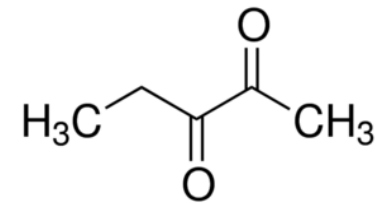
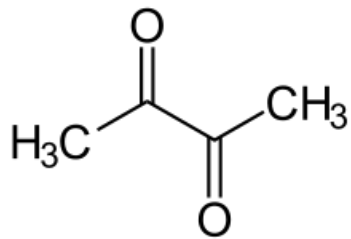
Test de Mosto Forzado

- ✓ Control por seguimiento diario



Día 1	Día 2-3	Día 4-6	Día 7 o en adelante
Contaminación extrema Limpieza a fondo. Seguimiento sensorial del producto, posible pérdida. No mezclar lote	Contaminación alta Revisar protocolos de limpieza. Seguimiento sensorial. No mezclar lote	Contaminación media/baja Revisar protocolos de limpieza. Podría no haber alteraciones sensoriales.	Contaminación nula Seguir trabajando así!

Test de Diacetilo Forzado



Test de Diacetilo Forzado

Toma de muestra antes
de maduración en frío



Muestra 1: Control
Dejar a T_{ambiente}



Muestra 2: Baño maría 60-
70°C durante 20 min

Enfriar. Ambas muestras
deben estar a T_{ambiente}

Hacer análisis sensorial
buscando aromas como
manteca, pochoclo.



Test de Diacetilo Forzado

Muestra 1	Muestra 2	Interpretación
(-)	(+)	Hay precursores de diacetilo. Dar más tiempo a la reabsorción. Verificar temperatura.
(+)	(+)	Descanso incompleto. Posible contaminación
(-)	(-)	No hay precursores de diacetilo

Re-utilización de levaduras

Beneficios:

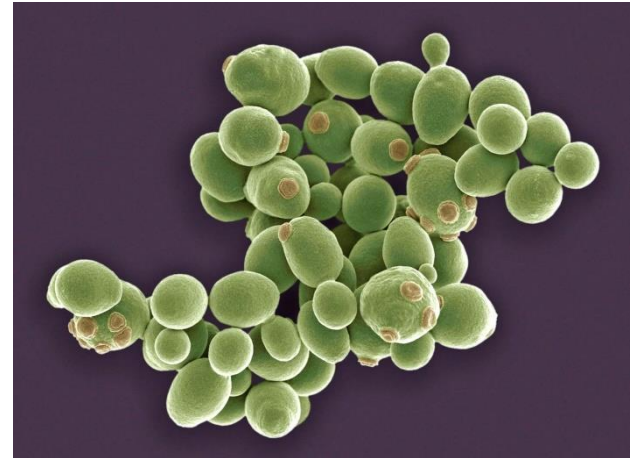
- Ahorro de dinero y desechos
- Mejora la performance en fermentación
- Mejora la floculación
- Mejora la producción de metabolitos de flavor



En este caso es importante:

Que la levadura se encuentre en buen estado:

- Nutrición adecuada
- Temperaturas de fermentación controladas
- Tasa de inoculación apropiada



Cosecha de levaduras

«Top cropping»



«Top cropping» la técnica

Los pasos:

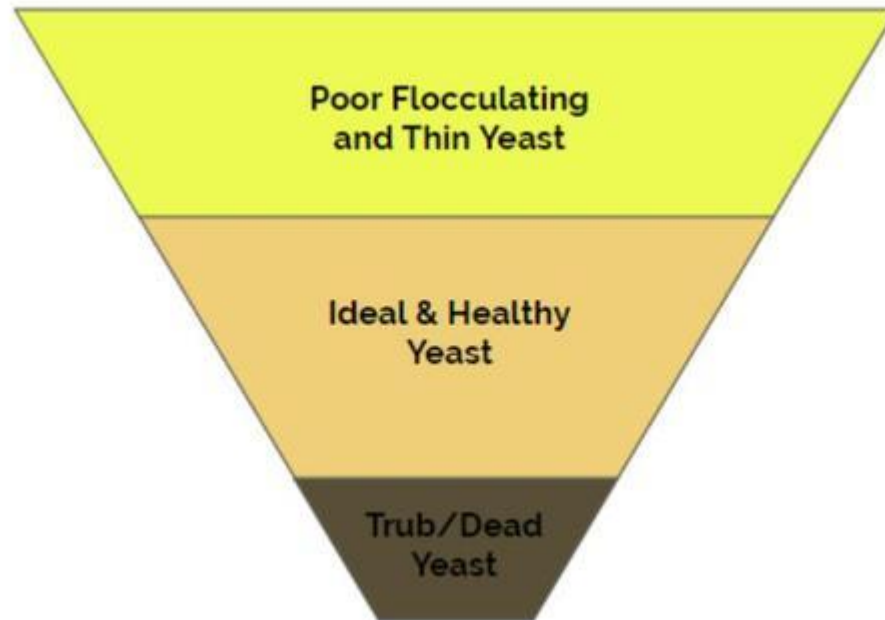
- ✓ Abrir la tapa del fermentador al momento del krausen alto (aprox. al día 1 o 2 de fermentación)
- ✓ Mediante el uso de algún utensilio tipo cucharón, bien sanitizado, retirar parte de la levadura depositada en la parte superior del fermentador.

Ventajas y desventajas:

- ✓ Es una buena alternativa para homebrew con fermentadores planos.
- ✓ La levadura estaría bien activa y mucho más pura ya que a diferencia de la que se encuentra en el fondo no tendría restos de "trub" y levaduras muertas o tantas bacterias.
- ✓ La puedo coleccionar mucho más rápido ya que no hay que esperar que decante al fondo.
- ✓ Una desventaja es que hay que abrir el fermentador con el consecuente riesgo de ingreso de contaminantes y de oxígeno.

Cosecha de levaduras

«Bottom cropping»



«Bottom cropping» la técnica

Cuándo:

- ✓ Cuando haya terminado de fermentar
- ✓ Que se encuentre en el cono
- ✓ Que esté bien viable
- ✓ Todos los puntos dependen de la cepa de la levadura

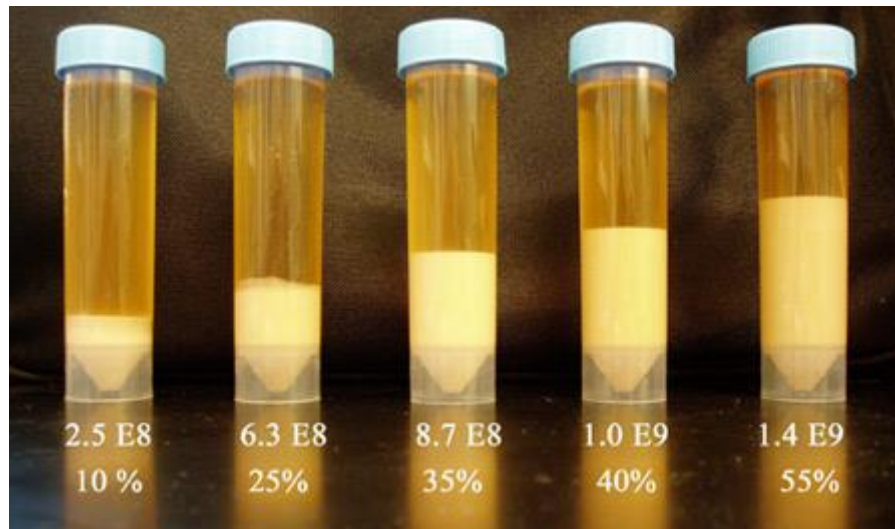
Cómo:

- ✓ Planificando las purgas y haciéndolo lentamente para no canalizar.
- ✓ Recibir en recipiente bien limpio y sanitizado.
- ✓ Re-inocular el mismo día o bien almacenar en frío por 1 semana o máximo 2.
- ✓ En caso de almacenar, luego atemperar antes de inocular.

«Bottom cropping» la técnica

Cuánto:

- ✓ Mantener x 2 horas en frío y luego estimar el porcentaje de sólidos
- ✓ Ejemplo, 40%, 1.000 millones por mililitro



Donde se deriva la regla práctica de 0,8 a 1 kg de crema cada 100 litros de mosto (para ALEs). El doble para Lager.

«Bottom cropping» algunas consideraciones

¿cuántas veces la puedo re-utilizar?, unas 10 veces, aprox.

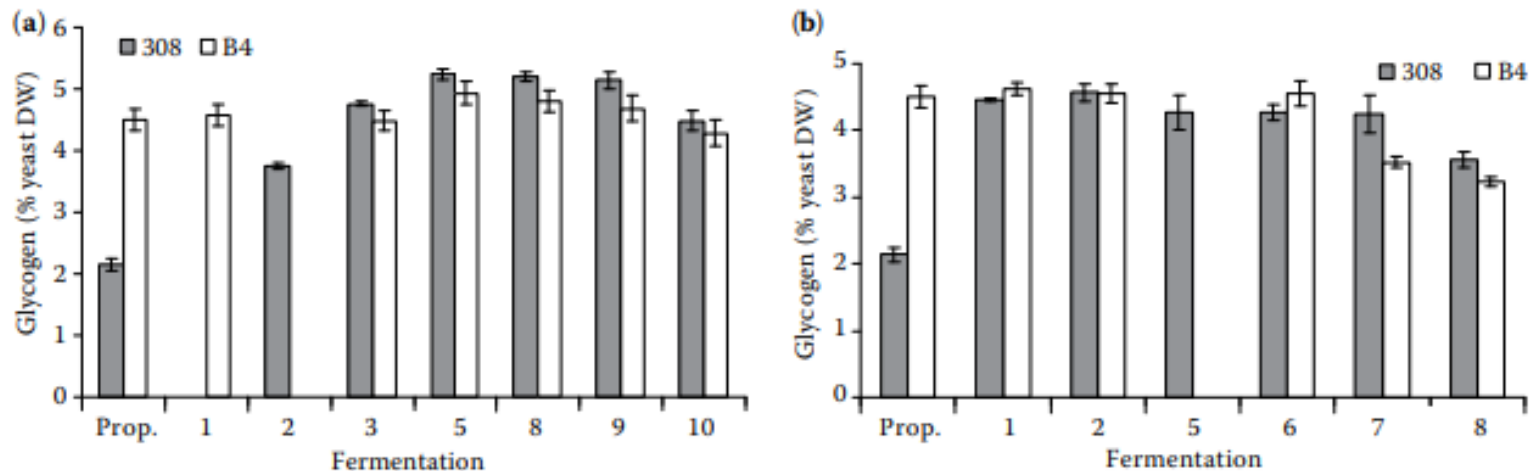


Figure 1. Glycogen content in yeast cells of strains 308 and B4 after propagation and successive fermentation of 10°C (a) and 15°C (b) wort

«Bottom cropping» algunas consideraciones

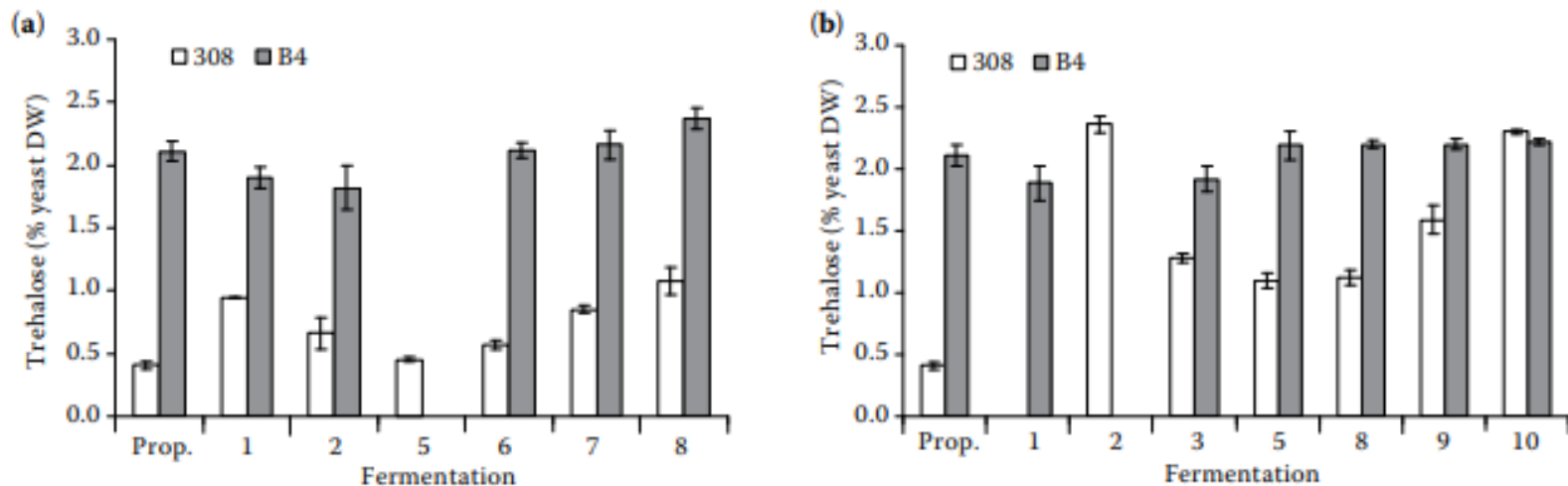


Figure 2. Trehalose content in yeast cells of strains 308 and B4 after propagation and successive fermentation of **15°C** (a) and **10°C** (b) wort

Almacenamiento de levaduras

Durante el almacenamiento:

- ✓ Cuánto menos tiempo mejor
- ✓ Es bueno almacenar bajo cierta presión (menos de 0,3 bares)
- ✓ Evitar presencia de oxígeno
- ✓ Ideal que el mosto no presente un nivel de alcohol mayor a 6%Abv

	Freshly Cropped Yeast	Stored yeast
Glycogen & Trehalose content	↑	↓
Lag Phase	↓	↑
Chance for off flavours	↓	↑
Chance of under attenuation	↓	↑
Diacetyl and Acetaldehyde re-uptake	↑	↓
Risk of higher alcohol production	↓	↑
Cell Viability after fermentation	↑	↓

Resuspender levaduras

¿Cuándo se recomienda?:

- ✓ Cuando partimos de una crema de una cerveza de alto contenido alcohólico, o muy lupulada, o de maltas muy oscuras
- ✓ Cuando trabajamos con fermentadores planos

La técnica:

- 1) Una vez cosechada colocar en un contenedor sanitizado, lo suficientemente grande para contener la crema y 3 o 4 veces más de agua.
- 2) Agregar agua estéril y a temperatura ambiente (dejar un 10% de headspace)
- 3) Agitar el contenedor.
- 4) Dejar quieto unos 10 a 15 minutos, y se estratificará.
- 5) Descartar la parte superior, y utilizar la del centro.

Revitalizar levaduras

¿Cuándo se recomienda?:

- ✓ Cuando se piensa que la levadura está vieja o con poca viabilidad.



La técnica:

- 1) Una vez cosechada o bien si la levadura ya está en un contenedor, agregar un mosto de densidad 1070/80 sobre la crema. Aprox. 50ml por cada litro.
- 2) Mantener a 20 – 24°C por unas 4 a 12 horas, sin agitar ni oxigenar.
- 3) Se formará una crema superior con levadura activa que puede inocularse.

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



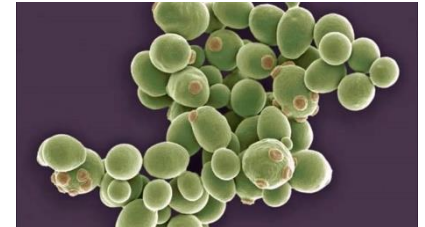
¿Qué cantidad inocular?

Un enfoque desde el recuento

$$L = AoL \times (\text{litros de mosto}) \times 1000 \times (^\circ\text{Plato})$$



$AoL = 0,75 \text{ millones}$ (ALE)
 $AoL = 1,5 \text{ millones}$ (LAGER)



$$L = 0,75 \times 20 \times 1000 \times 12 = 180.000 \text{ millones}$$

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

Microscopía y Recuento

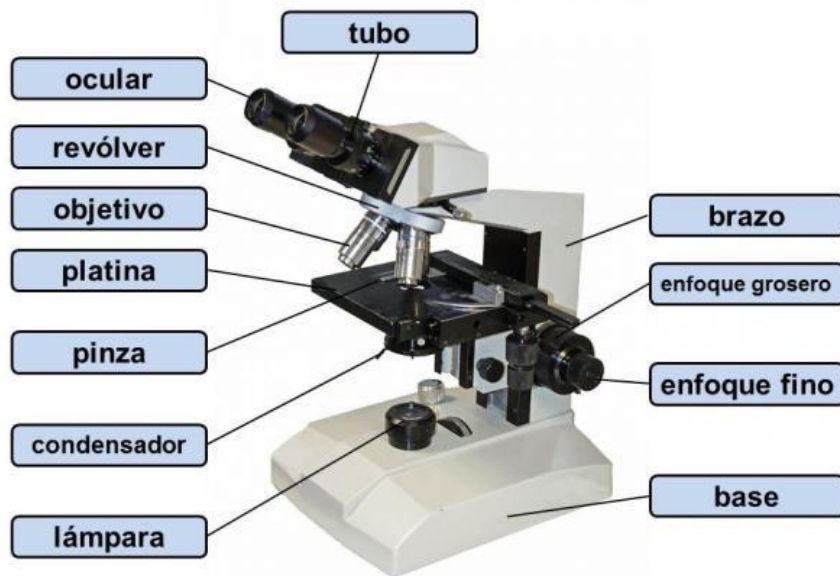


El microscopio

RECuento → Número de células

VIABILIDAD → Diferenciación entre vivas y muertas

Presencia de MO contaminantes (ver más adelante)



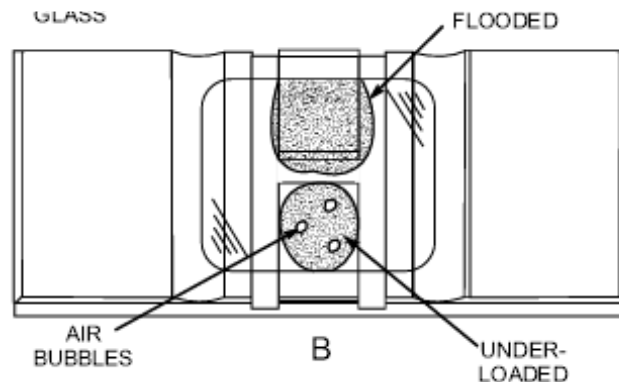
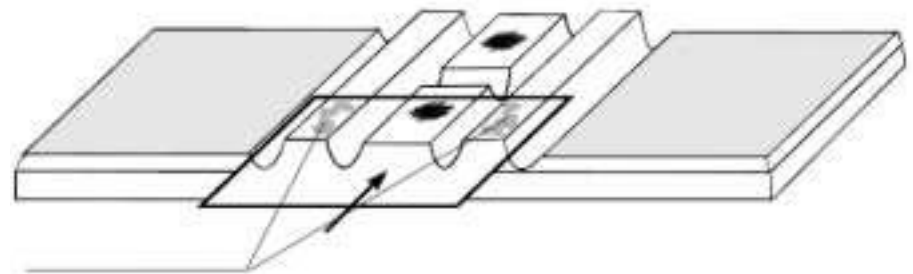
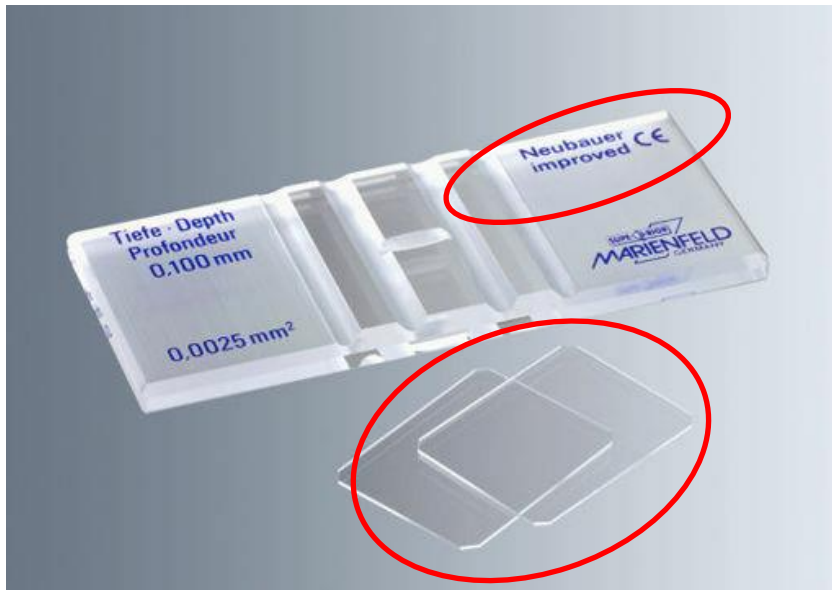
<http://light-microscope.net>

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

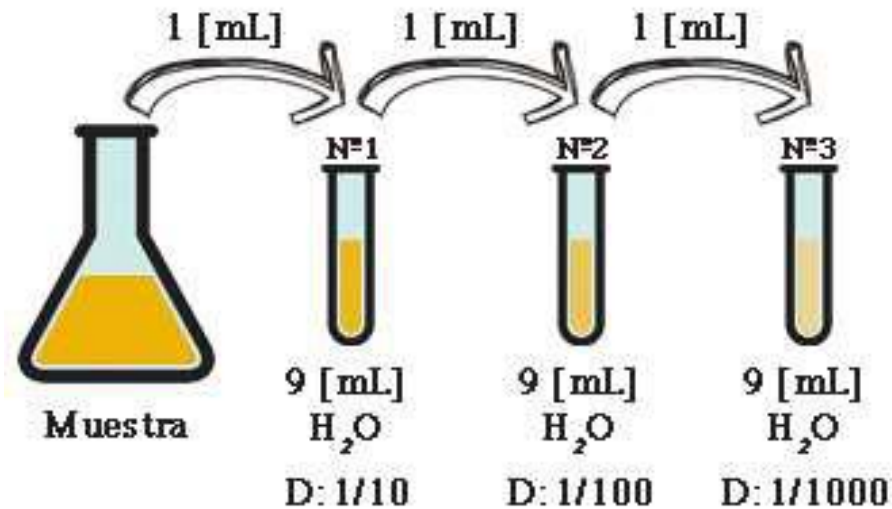
Dispositivo de vidrio que posee dos superficies reticuladas (retículos) para el conteo de las células y dos columnas laterales que poseen una altura de 0,1 mm por encima del retículo



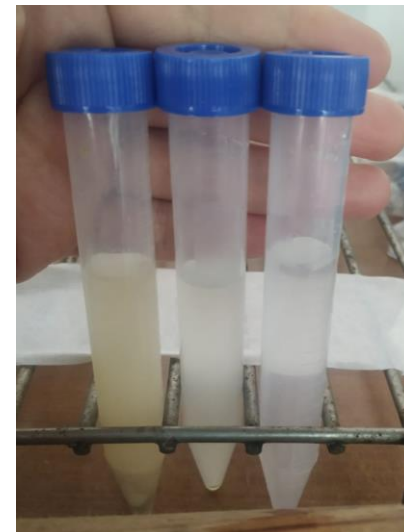
Antes de comenzar el recuento...

Obtención de la muestra (crema de levaduras)

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

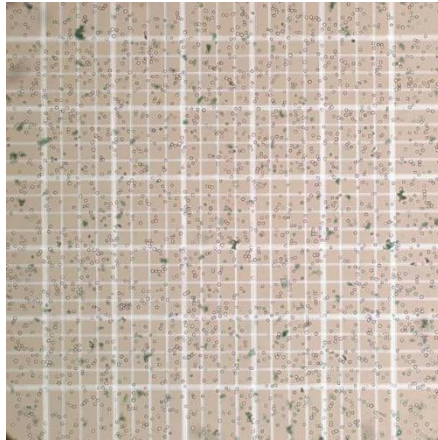


Preparación de diluciones

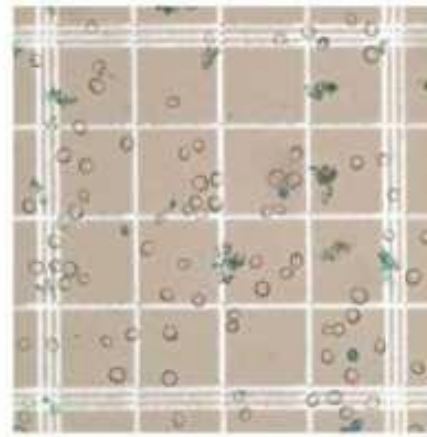


Recuento en cámara de Neubauer

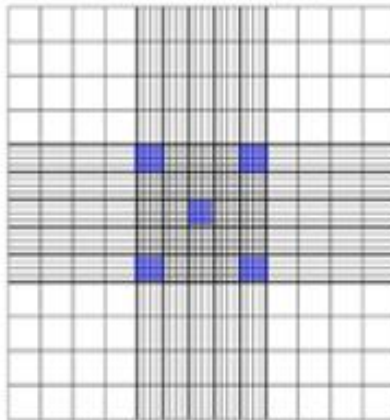
Campo de observación 20 X



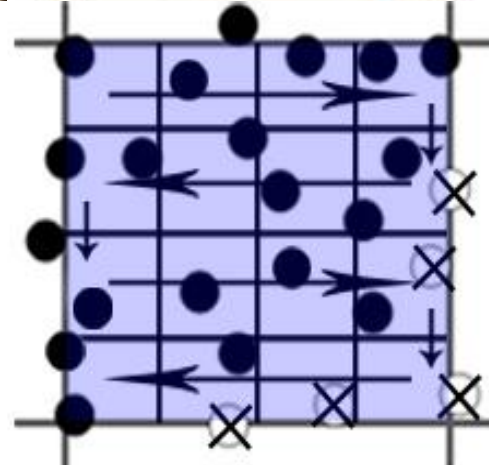
Campo de observación 40 X



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

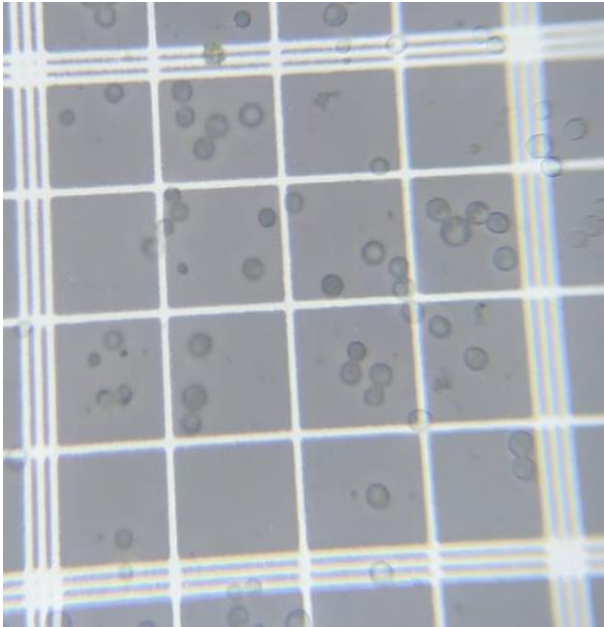


- Por cuadrado, se deben contar aproximadamente entre **30 y 60 células**



- 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:

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

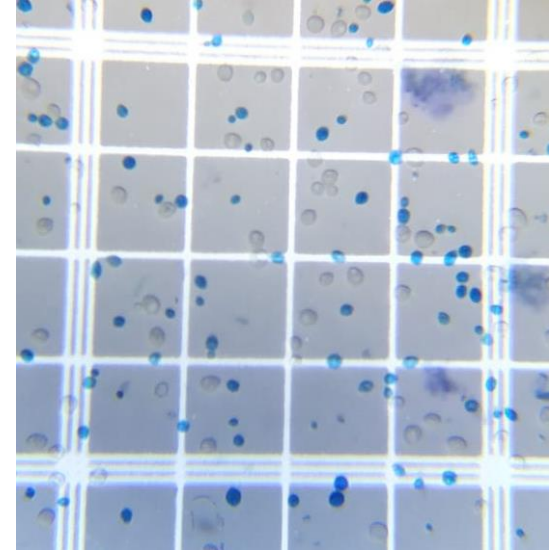
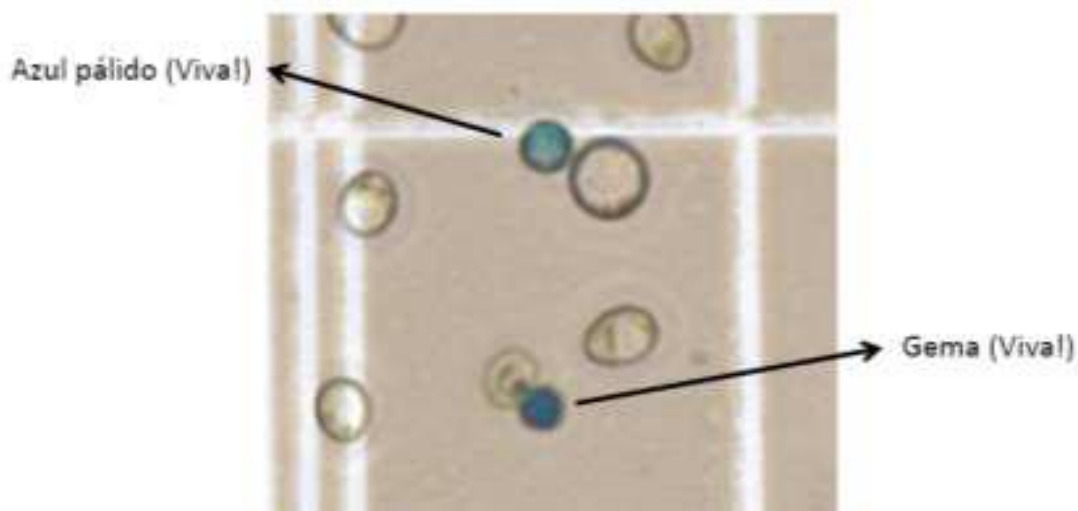
Células/ml = Células totales contadas $\times$ 5 $\times$ 10.000 $\times$ factor de dilución

$$\text{VIABILIDAD \%} = (\text{Cel Totales} - \text{Cel Muertas}) / \text{Cel Totales} \times 100$$

$$\text{VIABILIDAD \%} = (225 - 13) / 225 \times 100 = 94,2\%$$

Tinción vital con azul de metileno

Evaluación de viabilidad: Diferenciación de vivas y muertas

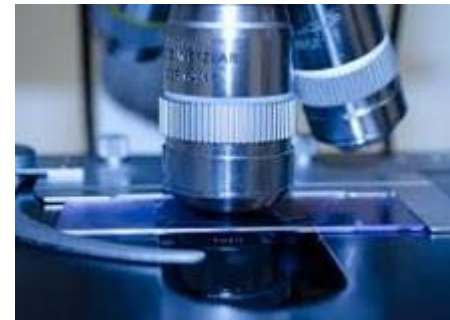
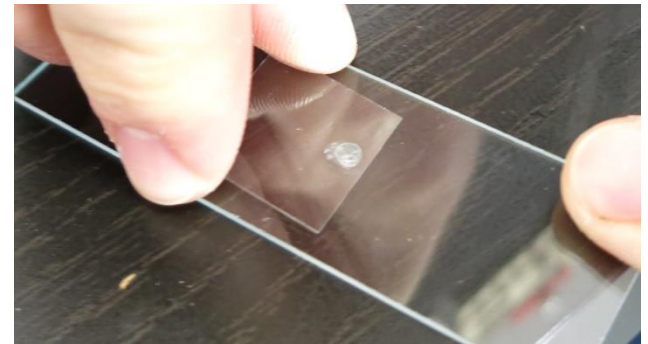


- En un tubo de ensayo, colocar **1 ml** de la dilución preparada anteriormente y agregar **1 ml** del colorante azul de metileno. --- Es importante considerar que, **si se utilizó la dilución 1/100, con el agregado del azul de metileno se realiza una dilución 1/200.**
- Homogeneizar
- Dejar reposar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



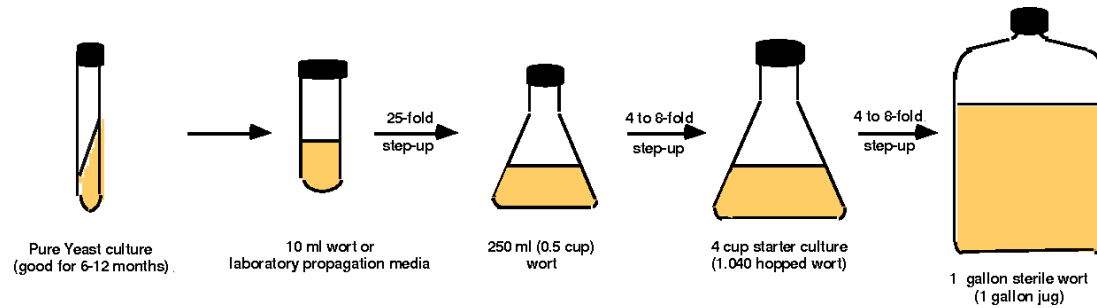
Contaminantes por plaqueo

Requiere de métodos microbiológicos y equipamiento específico



Propagación de levaduras

Escala laboratorio



Escala piloto





Nuestros datos

Canal de YouTube
Capacitaciones El Molino



Nuestra WEB
www.capacitacioneselmolino.com



Instagram

Instagram y Facebook
@capacitacioneselmolino



Consultá por nuestra MEMBRESÍA MENSUAL