

Re-utilización de levaduras

(Clase 2)



Lic. Sebastián Oddone
ESPECIALISTA EN FERMENTACIONES INDUSTRIALES

Respondemos algunas preguntas...

- 1) una vez que se recuperen las levaduras y se laven, como se almacenan, en lo que se reutilizan? Me refiero a temperatura, medio (agua, mosto), tiempo...
- 2) el recuento se realiza una vez recuperada la levadura o después del lavado? Si se almacenó un tiempo, se debe volver a contar?
- 3) una vez que estuvo la cerveza, cuanto es el tiempo prudente para recuperar la levadura?
- 4) además del recuento es necesario un ensayo de función para evaluar vitalidad? (Producción alcohol, azúcares residuales, etc)

Respondemos algunas preguntas...

5) no entendi bien la fórmula que explicaste para saber el No de levaduras recuperadas a inocular:
 $A_{600} = 0,75 \times L \times \text{mosto} \times 1000 \times \text{°P}$

En tu ejemplo el resultado es 180,000 millones. Eso quiere decir que debo añadir 180 000 millones de las recuperadas?

Yo recuperé y conté 968,000,000 células por ml en mi crema.

Si quisiera hacer un lote de 100L, con 14.25 ° P al sustituir me da este resultado:

$$\begin{aligned} &= 0.75 \times 100 \text{ L} \times 1000 \times 14.25 \text{ °P} \\ &= 1,068,750 \text{ levaduras} \end{aligned}$$

Tengo mal algún punto decimal?? Es que esa cantidad para mí se lee: un millón sesenta y ochomil setecientos cincuenta.

Podrías ayudarme con el cálculo por favor?

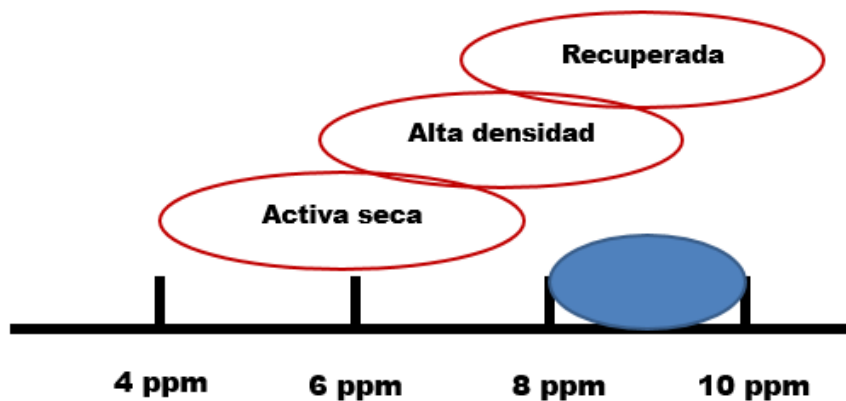
6) entre cada reutilizada, se debe contar las levaduras y análisis de vitalidad?

Nutrientes



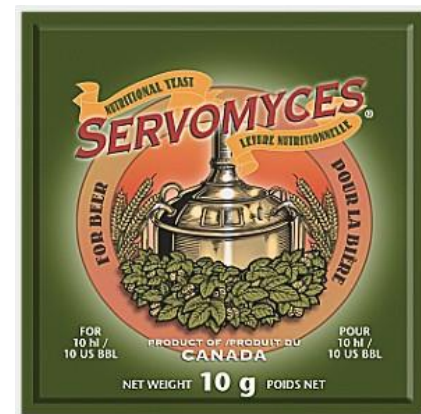
PRODUCT DESCRIPTION	Active yeast enriched in Zinc	Complex nutrient blend containing organic and inorganic nitrogen, minerals (ZN, Mg, Ca) and vitamins.	100% Yeast autolysates blend to provide bioavailable nitrogen, vitamins and minerals.
APPLICATION	Zinc deficient media and propagation	- Re-pitching - Low nutrient wort / high adjuncts - Stuck fermentation: high stress - Poor / variable quality malt	- Specialized alcoholic fermentation with high sugar concentration and potential low nitrogen content. - Balanced nutrition to avoid off flavor production. - Enhanced mouthfeel.
NITROGEN LEVEL	Negligible	1g/hL = 1.6 ppm	1g/hL = 0.6ppm
ZINC LEVEL	1g/hL = 0.6ppm	1g/hL = 0.028ppm	Negligible
RECOMMENDED DOSAGE RATE	1g/hL	4-10g/hL	30-250g/hL depending on application

Nutrientes



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://wyeastlab.com/oxygenation> and Figure 4.1 from *Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation*, White and Zainasheff, 2010



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

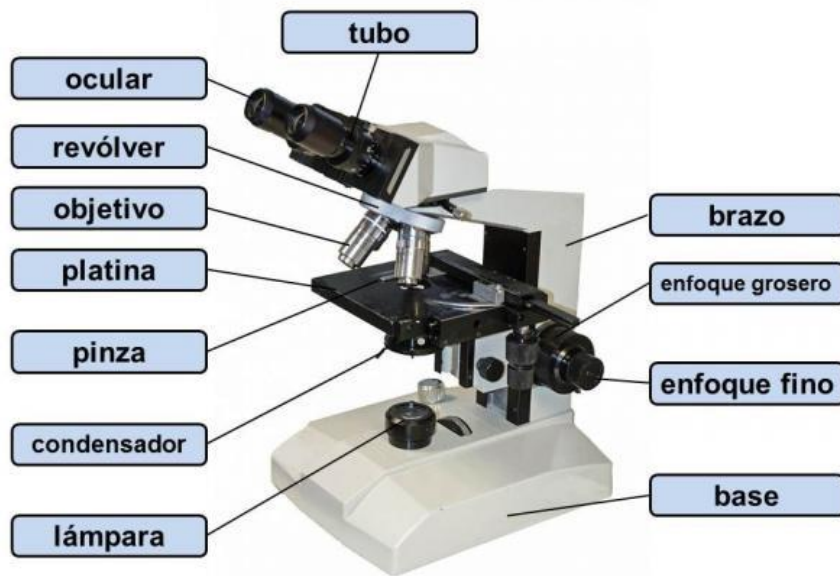


El microscopio

RECuento → Número de células

VIABILIDAD → Diferenciación entre vivas y muertas

Presencia de MO contaminantes (ver más adelante)



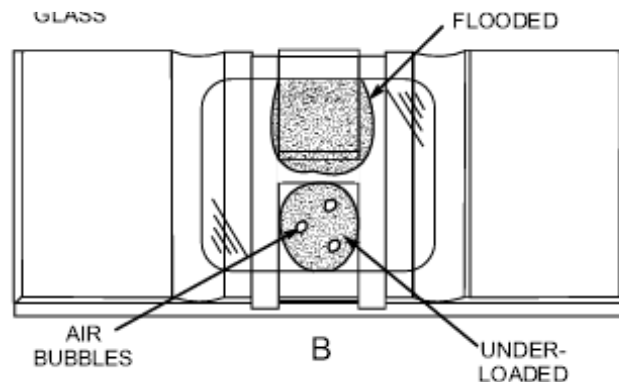
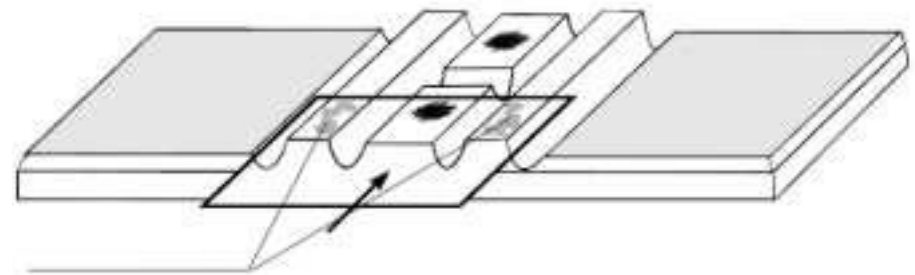
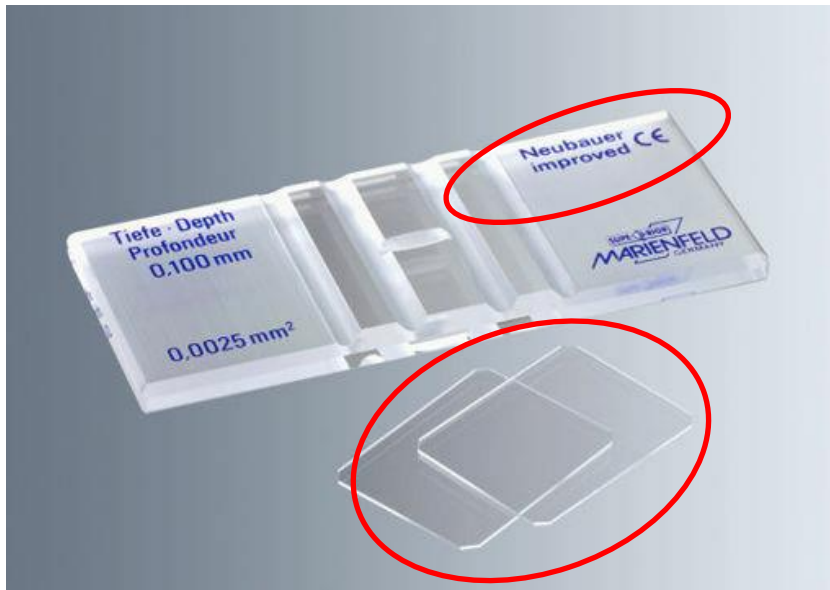
<http://light-microscope.net>

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

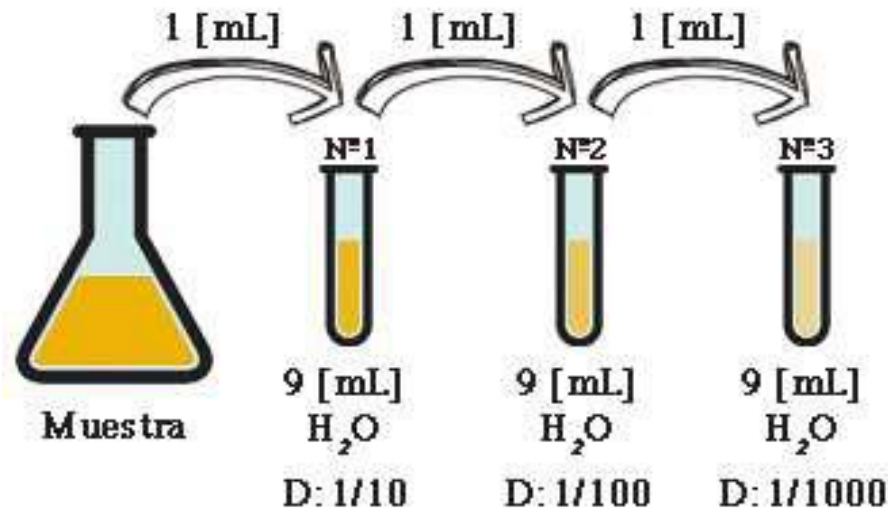
Dispositivo de vidrio que posee dos superficies reticuladas (retículos) para el conteo de las células y dos columnas laterales que poseen una altura de 0,1 mm por encima del retículo



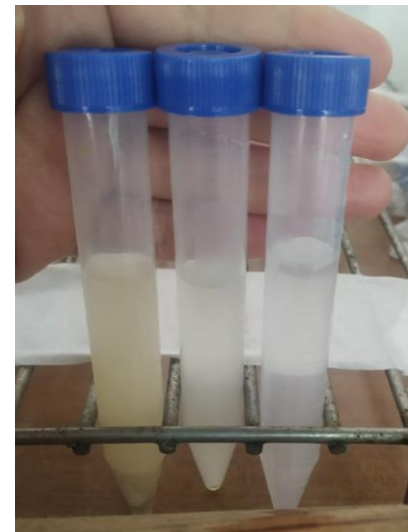
Antes de comenzar el recuento...

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

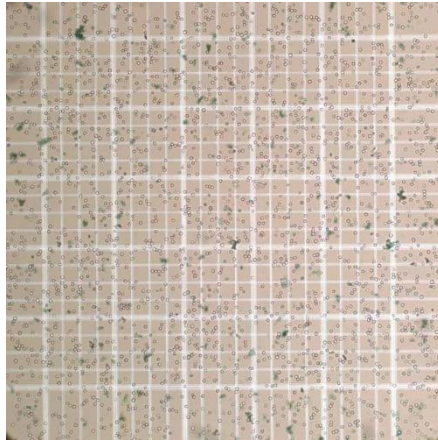


Preparación de diluciones

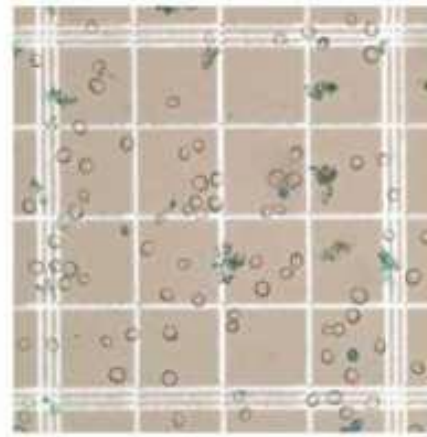


Recuento en cámara de Neubauer

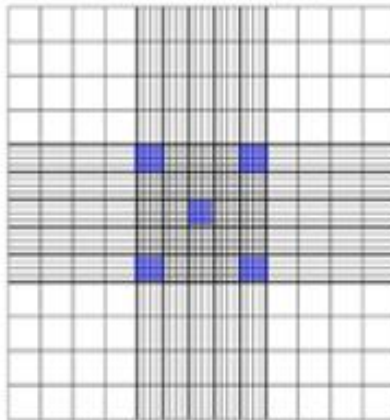
Campo de observación 20 X



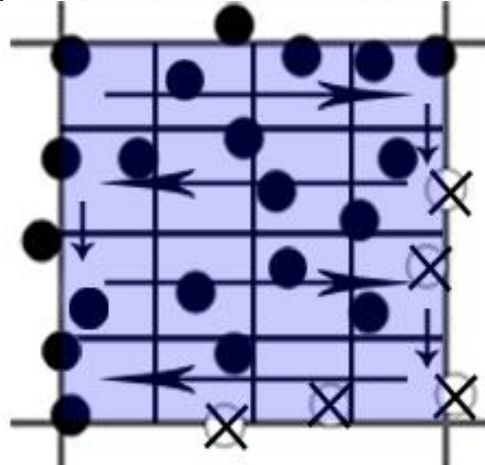
Campo de observación 40 X



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

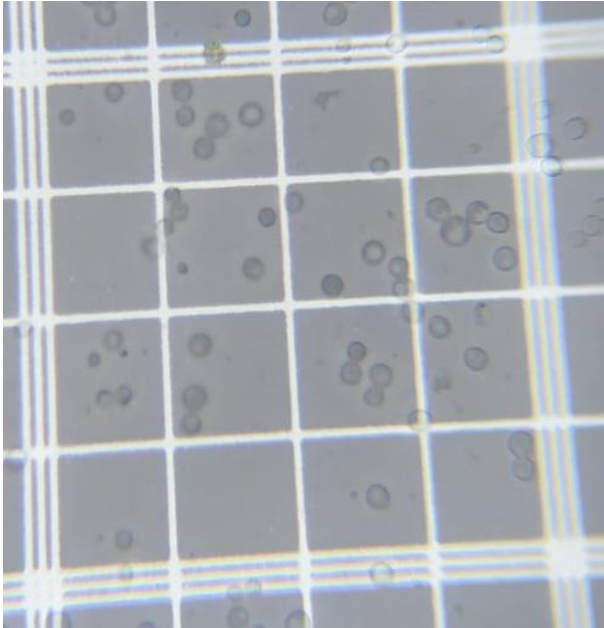


- Por cuadrado, se deben contar aproximadamente entre **30 y 60 células**



- 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:

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

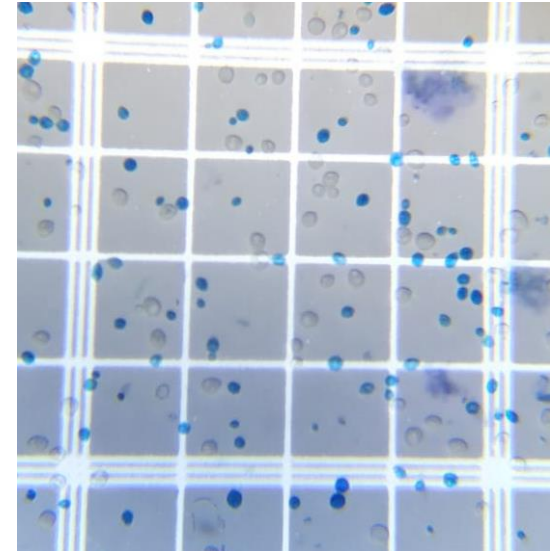
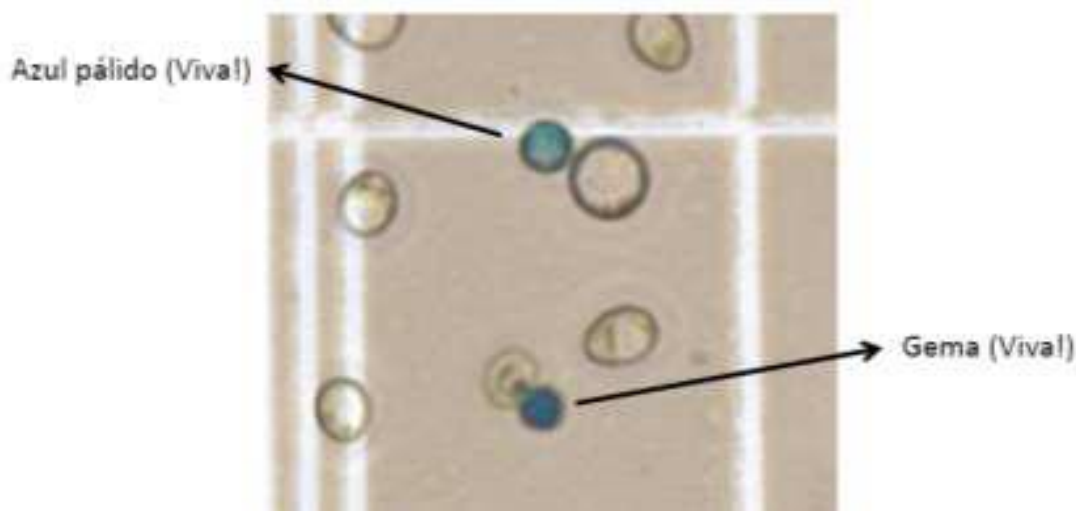
Células/ml = Células totales contadas x 5 x 10.000 x factor de dilución

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

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

Tinción vital con azul de metileno

Evaluación de viabilidad: Diferenciación de vivas y muertas

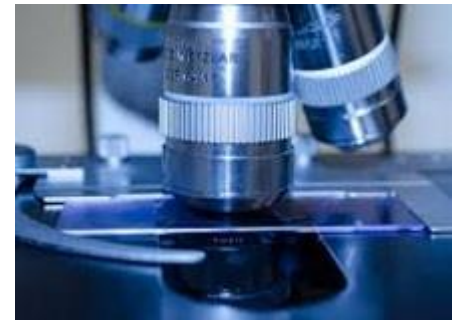
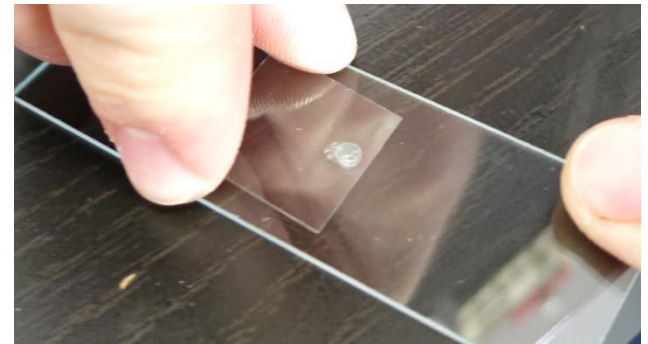


- En un tubo de ensayo, colocar **1 ml** de la dilución preparada anteriormente y agregar **1 ml** del colorante azul de metileno. --- Es importante considerar que, **si se utilizó la dilución 1/100, con el agregado del azul de metileno se realiza una dilución 1/200.**
- Homogeneizar
- Dejar reposar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



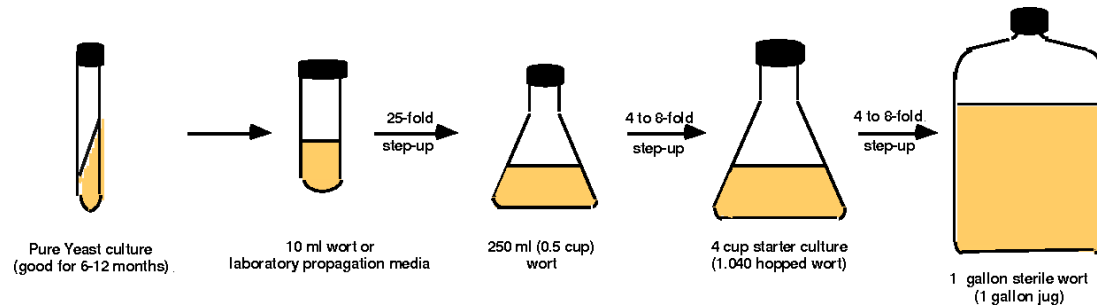
Contaminantes por plaqueo

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