

UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE QUERETARO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

Biblioteca Central

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

Características de la Levadura Empleada
en la Industria Cervecera

T E S I S

Que para obtener el Título de

QUIMICO

P R E S E N T A

Simón de León Barrón

Pls. # - H53576

TS

Class. 664.68

L579 c

:SIMON DE LEON BARRON:

DEDICO LA PRESENTE TESIS QUE ES CIMBOLO DE MI CARRERA...

A MIS PADRES:

SIMON DE LEON G.
TERESA BARRON DE L.

POR BRINDARME SU APOYO Y CONFIANSA
EN MI, CON PROFUNDO CARINO.

A MIS HERMANOS:

JOSE, ALBERTO, VICENTE,
RAUL, MARIO, ISABEL---
FRANCISCO, MARTIN, ---
ANTONIO Y TERESA.

A MI DIRECTOR DE TESIS
Q. JESUS VENEGAS VASQUEZ

CON AGRADECIMIENTO Y
ADMIRACION

A TODOS MIS MAESTROS
CON RESPETO Y GRATITUD

AL H. JURADO

A MIS COMPAÑEROS
POR LA AMISTAD BRINDADA.

A MIS ABUELITOS:

JOSE DE LEON P.
ISABELL GONZALES DE L.

FORTUNATO BARRON P.
MARIA ARTEAGA DE P.

POR HAVER TENIDO LA CONFIANSA DEPOCITADA EN MI, YA QUE
NUNCA LOS HE DEFRAUDADO, CON PROFUNDO RESPETO.

AL SR. MANUEL SILVA ZUNIGA:

POR BRINDARNOS SU APOYO, CONFIANSA Y AMISTAD.
EN LOS MOMENTOS MAS DIFICILES.

AL SR. J. CARMEN PIÑA

POR SU GRAN AMISTAD CON MI FAMILIA
CON GRAN RESPETO

AL SR. JOSE LUIS SAINS R.

POR SU AMISTAD CON MI
PADRE CON RESPETO

C O N T E N I D O

INTRODUCCION

CAPITULO	1.- Generalidades
CAPITULO	II.- Observación microscópica de levaduras
CAPITULO	III.- Método para la determinación de poder fermentativo en levaduras.
CAPITULO	IV.- Método rápido espectrofotométrico para la determinación de la concentración de células de levaduras.
CAPITULO	V.- Recuento de células de levadura.
CAPITULO	VI.- Resultados
CAPITULO	VII.- Conclusiones

I N T R O D U C C I O N

Con el objeto de controlar la calidad microbiológica de un proceso industrial que tiene por finalidad elaborar un producto alimenticio al igual que otras industrias que caen en este campo de producción, celosamente se vigila esta área de la ciencia para lograr una óptima y uniforme calidad en el producto.

La industria cervecera, con sus características propias debido a la naturaleza de sus productos y a los cambios rápidos que se dejan ver en los sistemas de producción, ha avanzado mucho en los métodos de control analíticos, que interpretados en forma adecuada por los cerveceros, serán grandemente beneficiosos para lograr que dichas características se mantengan uniformes y las transformaciones de las materias primas sean llevadas correctamente.

Con el mismo enfoque debe llevarse un control microbiológico desde que se proporciona el mosto para ser enviado a la importante fase de fermentación donde comienzan los problemas para los cerveceros, ya que si no se ejercitan los cuidados que merece, pueden afectar en todas las etapas subsiguientes incluso en el almacenamiento y en el embotellado.

G A P I T U L O I

GENERALIDADES

CONSIDERACIONES GENERALES

Aunque las levaduras, como las bacterias, son organismos unicelulares, no deben considerarse tan íntimamente emparentadas con las bacterias. Por el contrario, pertenecen a la amplia clase de hongos, incluida en un grupo heterogéneo, denominado de levaduras, en virtud de ciertas consideraciones morfológicas.

Sin embargo, incluso basándose en la morfología, no existe definición neta de este grupo, dada la ausencia de una característica común a todas las levaduras.

MORFOLOGIA

En general, las levaduras son mucho mayores que las bacterias, algunas especies son pequeñas, pero las células jóvenes en crecimiento activo de la mayoría de ellas, tienen dimensiones que fluctúan entre 3 y 5 micras de anchura y 5 a 10 micras de longitud.

La célula de levaduras es generalmente ovoide o elipsoida, rara vez filamentosa, cilíndrica o esférica.

La morfología de las levaduras no es tan constante como la de las bacterias; según los medios ambientales, pueden encontrarse variaciones en el tamaño y forma de la misma especie; en algunas especies pueden considerarse como micelios verdaderos o como cadenas de células arborescentes conocidas como pseudomicelios.

La pared celular de las levaduras es rígida y parece formada de un material semejante al que se encuentra en la pared de las células de mohos.

Algunas levaduras forman cápsulas gelatinosas. No se ha registrado en las levaduras, ni motilidad ni producción de flagelos.

El citoplasma de las células maduras de levaduras generalmente contiene vacuolas, gránulos de glucógeno y volutina y gotitas de aceite. En los vacuolos se ve con frecuencia gran cantidad de gránulos. En cada célula se encuentra un núcleo pequeño, pero bien definido.

Los núcleos se dividen por mitosis, permaneciendo la mitad en la célula madre, mientras la otra mitad se desplaza al interior de la célula hija.

R E P R O D U C C I O N

La mayor parte de las células de levaduras se reproducen vegetativamente por un proceso de gemación, como ocurre en los géneros *saccharomyces* y *torulopsis*.

Sobre un lado de la célula de levadura aparece una pequeña protuberancia, los núcleos se dividen, emigrando una mitad hacia el botón o yema, que aumenta gradualmente de tamaño y termina separándose de la célula madre por constricción.

Las células pueden separarse o permanecer unidas. Si las células se multiplican rápidamente, una sola de ellas puede disponer de varios botones, que pueden a su vez formar yemas por sí mismo antes de alcanzar el tamaño de la célula original.

Las masas irregulares resultantes de tal división pueden semejar a un micelio arborescente si las células tienen forma alargada.

La formación de ascosporas suele ocurrir en el interior de una célula cuyo aspecto externo no difiere del correspondiente a otras células.

La célula en su totalidad, se convierte en asca. (saco de esporas) que contiene dos o cuatro de estas, aunque algunas especies formen solo una espora por asca si bien en otras se producen hasta 16 o más.

Si la cepa de levadura es haploide es necesaria la conjugación para formar un núcleo diploide antes de que pueda lograrse la formación de esporas.

Puede consumarse esta conjugación con otra célula del mismo cultivo, o puede ser necesaria la presencia de razas diferentes más o menos de la misma especie. Las cepas diploides de levadura forman ascosporas sin conjugación previa, pero las esporas son usualmente haploides y conjugan por gemación.

Este proceso sexual de conjugación ha hecho posible la cría de cepas de levadura con características deseables mediante suplementos alimenticios y diversas fermentaciones comerciales, y ha sido también de valor en estudios fundamentales de genética, por virtud del rápido ritmo de las levaduras comparado con otras plantas y animales.

Levaduras representativas o típicas. *Saccharomyces*. este género, el mejor conocido es típico de las levaduras ascosporógenas, perteneciendo también al mismo, las especies de mayor importancia económica.

Saccharomyces cerevisiae es la levadura frecuentemente usada para la producción comercial de alcohol y de la mayoría de las bebidas alcohólicas las células son casi esféricas y de tamaño variable, generalmente de unas 6 a 8 micras de diámetro.

La reproducción de tipo asexual se efectúa por gemación y con rapidez inusitada, en condiciones favorables se observa formación de esporas en determinadas circunstancias, en especial si la temperatura es de 25°C con aereación abundante.

Generalmente las células son diploides de manera que la esporulación es usual pero no inmediatamente, producida por conjugación. *Saccharomyces cerviciae*, variedad *ellipsoideus* es la cepa de levadura comunmente usada para la producción de vino por fermentación de los zumos de frutas, es similar a *S. cereviciae* de la que solamente difiere por la tendencia de las células a adoptar forma alargada más elíptica que esférica, se usan a menudo muchas cepas de estas levaduras para la preparación de vinos y cervezas, y con frecuencia pueden aislarse de materiales que fermentan en forma natural.

La importancia económica de *S. cerviciae*, de sus variedades y especies afines radica en su facultad de fermentar rápidamente los azúcares con producción de alcohol y bióxido de carbono.

En presencia de abundancia de oxígeno las células de levadura crecen aeróbicamente, y utilizan la mayor parte del azúcar para construcción de nuevas células.

Bajo estas condiciones se acumula muy poco alcohol; ahora bien, en ausencia de oxígeno las levaduras dan lugar a la fermentación, convirtiendo el azúcar en alcohol etílico y bióxido de carbono. En medio anaerobio el contenido de alcohol de líquido en fermentación alcanza rápidamente concentraciones de 6 a 8% que se eleva a 14 a 15%

siempre que exista suficiente cantidad de azúcar.

Sin embargo las últimas etapas de la fermentación se producen probablemente por enzimas ya elaboradas para este tiempo, pues las concentraciones elevadas de alcohol - inhiben el crecimiento de las levaduras.

TABLA I. Contenido en 100 gr. de substancia comestible en levadura seca, de cerveza.

Agua	7.0 gr
Proteína	46.7 gr
Lípidos	
Totales	1.6 gr
Colesterol	0.68 gr
Carbohidratos	
Totales	37.4 gr
Fibra	0.8 gr
K. calorías	34.8
Vitaminas	
A	0. mg
B ₁	9.69 mg
B ₂	5.45 mg
Componentes inorgánicos	
Sodio	180 mg
Potasio	1900 mg
Calcio	106 mg
Magnesio	0 mg
Hierro	18.2 mg
Fósforo	1892 mg

A= actividad vitamínica derivada de la vitamina A más carotenos.

Levadura de cerveza, contenido de aminoácidos en gramos por 100 gramos de proteínas.

alanina -----	9.2
arginina -----	5.0
ac. aspártico -----	10.6
cistina -----	2.1
ac. glutámico -----	20.2
glicina -----	6.0
histidina -----	4.1
leucina -----	7.5
isoleucina -----	4.5
lisina -----	6.7
metionina -----	1.4
fenilalanina -----	1.9
prolina -----	3.9
serina -----	3.6
treonina -----	8.2
tirosina -----	4.1
valina -----	9.4

C A P I T U L O I I

OBSERVACION MICROSCOPICA DE LEVADURA

R E A C T I V O S

- a) Solución regulada de azul de metileno segun Fink KÜleş
Se prepara de la siguiente manera.
Solución A. disolver 0.1 gr de azul de metileno, en agua-
destilada hasta 500 ml.
Solución B. disolver 13.6 gr de fosfato ácido de potasio
en agua destilada y diluir hasta 500 ml.
Solución C. disolver 2.4 gr de cristales $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. -
en agua destilada y llevar hasta 100 ml.
Solución D. retirar 1.25 ml de la solución B de modo que
a los 498.75 ml restantes se les adicione 1.25 ml de so-
lución C.
Solución E. mezclar 500 ml de la solución A con 500 ml -
de la solución D.
Esta mezcla, es la solución final de azul de metileno.
- b) Azul de metileno, 1:10000 en solución acuosa.
disolver 0.01 gr de azul de metileno en 100 ml de agua
destilada.
- c) Solución de NaOH 0.1 N.

A P A R A T O S

1. microscopio, aumento de 540 X a 750 X
2. lámpara de microscopio, con filtro azul para la luz
del día.
3. disco de conteo Howard, u otro disco ocular para que
el campo sea dividido en areas uniformes.
4. porta objetos y cubre objetos.
5. Vaso pequeño de precipitado, tubo de ensaye, vidrio-
de reloj y agitador de vidrio.

M E T O D O

Observar lo suficiente: sobre la muestra homogénea reci-
bida.

Sabor. (resabio amargo)

Aspecto. (cremoso, reseco, prensada etc.)

EXAMEN MICROSCOPICO

Diluir una pequeña porción de la muestra de la levadura de siembra con solución de azul de metileno, en un vaso pequeño de precipitado, en un tubo de ensaye o en un vidrio de reloj, hasta que se obtenga una suspensión que tendrá de 100 a 200 células de levadura en un campo.

Colocar una gota de la suspensión que fue bien agitada sobre un porta objetos y tapar con un cubre objetos, la gota debe ser regulada de manera que no se formen burbujas de aire y que no queden atrapadas entre el porta y el cubre objetos, ni poner exceso para evitar que salga por las orillas del cubre objetos.

Examinar empleando un aumento de 600 X (540 X a 750X) Observar cuidadosamente los siguientes conceptos.

Forma de las células (redondas, ovales, en forma de peras, alargadas, apiculadas)

Uniformidad de las células (uniformes, medianamente uniforme, algo irregular)

Células muertas. (con paredes rotas o sea membranas celulares arrugadas o sea células plasmolisadas)

(se reportan aproximadamente, como pocas, algunas o numerosas).

Para determinar las células muertas, se puede hacer - por cualquier metodo a). o b). los cuales han sido ampliamente aceptados.

RESUMIENDO

I. preparar una suspensión de levadura de siembra a la que se le adiciona solución de azul de metileno 1:10000 y se-

examina despues de 1 a 5 minutos de contacto con la solución para tinción; todas las células que tñien de color azul, se consideran como muertas.

2. Examinar la suspensión de levadura en la misma forma - que en el inciso anterior, pero empleando la solución de Fink Küles.

Normalmente se emplea la técnica del inciso I.

Observación Microscópica de Bacterias en Levadura de siembra.

METODO

Diluir la muestra de levadura con solución de NaOH-0.1 N empleando un vaso de precipitado, tubo de ensaye o vidrio de reloj, hasta obtener una suspensión que colocando una gota en un porta objetos y vista al microscopio, se aprecien 100 a 200 células por campo.

Si se encuentra demasiado concentrada, es decir, si se excede este número de células, se diluye con un poco - de agua destilada. Al colocar la gota sobre el cubre objetos, no hacerlo en exceso.

Examinar 10 a 15 campos, empleando un aumento de 600 X (540 X a 750 X) y contando las células de levadura y de bacterias en cada campo.

El frotis deberá irse corriendo sistemáticamente, de tal manera que el conteo sea representativo. Contar por - lo menos 1500 células de levadura.

Un ocular de Howar u otro ocular que divida el campo en secciones de areas iguales, es recomendable para facilitar el conteo.

Clasificar las bacterias como, bacilos y cocos. Si se desea, se pueden clasificar los cocos en monococos, diplococos, etc.

Los bacilos, que se encuentran en cadenas, los diploplococos y las tetradas se cuentan como un microorganismo.

Reportar el número de bacilos y cocos en por ciento, es decir, el número de bacterias por 100 células de levadura, aunque comunmente se reportan estos resultados al millar.

Esta manera de hacerlo, facilita tener una clara idea de la contaminación presente.

C A P I T U L O I I I
M E T O D O P A R A L A D E T E R M I N A C I O N D E P O D E R
F E R M E N T A T I V O E N L E V A D U R A S

Método para la determinación del poder fermentativo -
en levaduras.

APARATO

Un simple aparato de fermentación de laboratorio puede ser usado.

Este aparato puede estar constituido por las siguientes partes.

- A) Botellas de fermentación de 250 ml de capacidad de boca angosta Pyrex.
- B) Embudo graduado. L. Sedgwick, Rafter. Un embudo de 500 ml de capacidad es suficiente. El diagrama de este embudo aparece en los métodos estandar para el examen de aguas de desecho. A. P. H. A. 12. ava ed, 1965, pág. 670.
- C) Bulbo de nivel, 500 ml de capacidad.
- D) Bulbo Kjeldhal.
- E) Tubos de goma elásticos o tigon de diametro conveniente

MEDIO

El siguiente medio sintético es sugerido para la prueba de poder de fermentación.

K ₂ HPO ₄ (anhidro)-----	3.2	gr
(NH ₄) HPO ₄ -----	4.0	gr
Dextrosa (anhidra) -----	50.0	gr
Agua destilada para llevar a	1000	ml

Preparación de la muestra de levadura

Recoger una suficiente cantidad de levadura líquida, -mezclar la muestra perfectamente hasta obtener una suspensión homogénea y pasar una muestra a través de una malla metálica del No 100, para la separación de las partículas de trub.

Filtrar la levadura tan rápido cómo sea posible por un largo embudo buchner, usando papel filtro ordinario, y con aplicación de vacío. Continuar la aplicación de vacío hasta que aparezca el queso de levadura seco.

pesar 20 gr de queso de levadura y hacer una suspensión fría en solución salina normal (0.85 x 100 de Na Cl) hacer la mezcla y completar a un volumen de 100 ml. Esta suspensión de levadura es usada en la inoculación del - - sustrato de levadura y para determinar la levadura seca o sólidos de levadura.

DETERMINACION DE PODER FERMENTATIVO

Llenar el embudo graduado (gasómetro) y el nivel del bulbo con solución acuosa de cloruro de calcio al 10 % y que lleva unas gotas de ácido clorhídrico concentrado, y con adición igualmente de unos cristales de cloruro cúprico.

El volumen de la solución usada en el aparato debe ser suficiente para llenar el gasómetro a la marca cero, cuando el líquido superficial en el gasómetro y el nivel del bulbo se mantenga al mismo nivel, adicionar 100 ml de la botella del medio de fermentación.

Pipetear 5 ml. de la suspensión de levadura, bien mezclada en la botella. La suspensión de levadura debe ser continuamente agitada mientras se pipetea.

Inmediatamente después de la inoculación, con precaución conectar el bulbo al bulbo kjeldhal dentro del tubo y colocar la botella de fermentación en baño de agua a 30°C, la botella debe sacudirse cada 10 minutos para desprender el dióxido de carbono producido en la fermentación del medio.

Medir el volumen de gas producido después de 3 horas por el registro del líquido en el gasómetro.

Esto se hace por ajuste del nivel del bulbo, así que la superficie del líquido en ambos, del nivel del bulbo y gasómetro, se encuentre en el mismo nivel.

El gas total que se desprende en 3 horas es medido para calcular el poder de fermentación.

CALCULOS

Poder de fermentación (p. f.) es calculado como el volumen de dióxido de carbono producido en 3 horas por gramo de levadura sólida (seca)

P.F. = $\frac{\text{gas producido en ml. X 1000}}{\% \text{ de levadura s\u00f3lida}}$

Procedimiento para determinar el poder de fermentaci\u00f3n en levadura de cervecera.

MATERIAL

Balanza anal\u00edtica.

Embudo buchner.

Matraz para vacio.

Ba\u00f1o de temperatura constante a 28\u00b0C.

Agitador mec\u00e1nico.

Buretas para absorci\u00f3n de gas con bulbos para niveles.

Pipetas, vasos, papel filtro.

Placa para humedad.

Desecador y estufa para secado.

Soluciones.

CaCl₂ comercial

K₂HPO₄ Q.P.

Extracto de levadura difco.

Dextrosa anhidra Q.P.

T\u00e9cnica.

Colectar aproximadamente 500 ml. de levadura de siembra homog\u00e9nea proveniente de un tanque.

Diluir a 1 lt. con agua fria de la llave.

Agitar bien y entonces transferir la crema a trav\u00e9s de una malla No 100 hasta un embudo buchner al cual previamente se le ha colocado un papel filtro h\u00famedo wettman No 42 y montado sobre un kitasato que est\u00e9 conectado a un sistema de succi\u00f3n.

Se seca el queso de levadura por succi\u00f3n hasta que aparezca quebradizo. Lavar con agua fria mientras se seca-

con pipeta estéril tomar 100 ml. de medio sintético igualmente estéril y 100 ml. de mosto frío y filtrado dentro de matraces o botellas para uso de agitación y aparatos colectores de gas carbónico.

Cubrir con papel aluminio y atemperar aproximadamente 30 minutos el medio sintético es el siguiente:

3.2 gr. de K_2HPO_4

4.0 gr. de $NH_4H_2PO_4$

2.0 gr. de extracto de levadura difco

50.0 gr. de dextrosa anhidra o bien 55 gr. de monohidrato dextrosa, llevar a un lt. con agua destilada.

Esterilizar en autoclave por 20 minutos a 15 lb/in² de presión enfriar inmediatamente. Este medio contendrá - aproximadamente 0.053 % de nitrógeno.

Después que el queso de levadura se encuentra seco - por vacío, pesar 20 gr. dentro de un vaso de 250 ml. y entonces aforar a 100 ml. con agua destilada fría.

Colocar un agitador magnético de teflón dentro del - vaso y disponga la agitación magnética hasta hacer una-suspensión homogénea. Mientras haya agitación pipetear 5 ml. de la crema dentro de una placa para humedad previamente tarada y porciones de 5 ml. de la mezcla atemperada mosto-medio sintético.

Conectar los soportes de muestra (matraces o botellas) a las buretas colectoras de gas, los cuales se llenan con solución de $CaCl_2$ al 10 % ligeramente acidificada con HCl

Lleve la solución de $CaCl_2$ de la botella sobre el nivel en la bureta y anotar la lectura del volumen original.

Colocar el agitador en movimiento y dejarlo exactamente durante 3 horas, verificar varias veces la temperatura del baño durante las 3 horas, al final de las 3 horas, se

quita: el matraz o botella de la pinza del soporte y se agita vigorosamente y se usa el nivel de la botella como anteriormente se anotó el volumen final en la bureta colectora de gas.

Al mismo tiempo colocar la muestra en la placa para la prueba de humedad (pesafiltro) en la estufa a 85°C . y secar durante 24 horas hasta obtener el peso seco de la levadura usada.

El poder fermentativo se reporta como ml. de CO_2 colectados divididos por el % de levadura seca en la muestra por 100.

C A P I T U L O I V
METODO RAPIDO ESPECTROFOTOMETRICO PARA LA
DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE LAS
CELULAS DE LEVADURA

Este método se basa en el hecho de que la cerveza brillante no absorbe radiación alguna en la región cercana al infra-rojo, ya que las partículas en suspensión dispersan las radiaciones en esta longitud de onda en forma normal.

Esto proporciona un método para la medida de la concentración de levaduras en cerveza sin diluir. Guarda mucha semejanza con determinaciones hechas con la cámara de conteo, así es que es un método simple y rápido.

INTRODUCCION

Uno de los métodos útiles para la determinación de la concentración de levaduras es el turbidimétrico que razonablemente es práctico, pero es más complicado.

Cuando las concentraciones de levaduras son menores de 3.0×10^5 células/ml.

Frecuentemente no es necesario conocer con exactitud las concentraciones de levaduras al usar cualquiera de los métodos descritos por el comité de análisis del instituto de cervecería.

A menudo es suficiente determinar concentraciones de levaduras cerca del millón de células/ml. Burns, en un trabajo sobre floculación de levaduras descubrió tal método, el cual ha sido usado con éxito como una estimación rápida rutinaria.

Este método propuesto, puede ser visto como ampliación de procedimiento y que es ligeramente más rápido y da resultados más precisos.

Por esto es necesario disponer de un espectrofotómetro que tenga un rango amplio hasta 1000 milimicrones.

El procedimiento de este método depende del hecho de que la cerveza no absorbe cualquier radiación a una longitud de onda de 1000 milimicrones, pero las suspensiones de levadura sí.

Si las extinciones de las suspensiones de levaduras son graficadas contra sus concentraciones, se obtiene una curva uniforme; a concentraciones tan bajas como 0.5×10^6 células/ml. dá una apreciable densidad óptica (0.13)

La materia amorfa no interfiere, pero su efecto puede ser disminuido tratando la muestra de cerveza con solución de hidróxido de sodio.

EXPERIMENTO

Se hizo una suspensión de levadura al 5 % en agua y diluida para dar un rango de suspensiones aproximadamente de 0.5×10^6 células por ml. a 4×10^6 células por ml.

Las extinciones de estas suspensiones se leyeron en un espectrofotómetro Unicam S.P. modelo 500 con longitud de onda de 1000 milimicrones. En una de las suspensiones se hizo una cuenta utilizando una cámara para conteo con una regla modificada o mejorada de Neubauer.

De estas cuentas se calcularón las células presentes y junto con las extinciones se graficaron, empleando el método que se muestra en seguida; las concentraciones fueron determinadas en muestras de draught pale ale (cerveza de barril fuerte) y draught mild ale (cerveza suave) ambas de fermentación alta.

Estas se verificaron utilizando la cámara para conteo y cuyos resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tipo de cerveza	concentración de levaduras por el método espectrofotométrico. X 10 ⁶ células/ml.	concentración de levaduras por el método cámara de conteo. X 10 ⁶ células/ml.
Draught pale ale (cerveza fuerte)	1.4	1.2
	1.6	1.7
	2.6	2.3
	3.9	3.8
Draught mild ale (cerveza suave)	0.7	0.7
	1.5	1.5
	1.8	1.9
	2.1	2.4
	4.9	4.8

Valores correspondientes a la concentración de levaduras por el método espectrofotométrico y el método de la cámara de conteo y cuya gráfica está representada por el No-2 y 3.

Extinción de la suspensión de levaduras a 1000 milimicrones contra la cuenta de células.

extinciones	conc. de levaduras
.2	1.2
.5	3.2
.7	4.4
.8	5.2
.9	5.9

Valores referentes a la extinción y concentración de levaduras representados en la grafica No.I

C A P I T U L O V
RECuento DE CELULAS DE LEVADURA

APARATOS

a.-Microscopio. Aumento 100 X (si se desea se puede usar un aumento de 440 X).

b.-Hemocitómetro. Cualquiera de los dos, el tipo cerrado con la cuadrícula Thomas, Zeiss, Turk o la original de neubauer, o bien el tipo abierto (Burker) con cuadrícula modificada de neubauer.

c.-Pipeta bacteriológica de 1 ml. un vaso de precipitados de un lt. un matraz volumétrico de 1 lt. de capacidad-

d.-Un agitador mecánico de 200 rpm.

PREPARACION DE LA MUESTRA

Preparar una dilución de levadura 1:400 de cualquiera de las dos siguientes maneras.

1.-Llevar 2.5 gr. de muestra de levadura en crema a un vaso de precipitados de un lt. edicionando 997.5 ml. de agua. Agitar la muestra con un agitador mecánico operándolo a 200 rpm. durante 5 minutos antes de tomar la muestra para el conteo.

2.-Llevar 2.5 gr. de muestra de levadura en crema a un matraz volumétrico de 1 lt. y aforar con agua. Agitar hasta que la suspensión adquiera un aspecto uniforme.

La dilución 1:400 puede ser ajustada si contiene demasiadas o muy pocas células de levaduras, para que de esa manera se logre un conteo exacto.

El índice de conteo de la suspensión debe ser un máximo de 3 así es que 16 cuadritos en el hemocitómetro deberán contener cerca de 48 células.

Colocación y conteo de las células. Thomas zeiss o tipo cerrado, tomar cerca de 1 ml. de la suspensión de levaduras de la parte central del vaso de precipitados utilizando una pipeta bacteriológica de 1 ml.

Colocar la pipeta en la orilla del cubre objetos y dejar caer una gota la cual fluye por atracción capilar, bajo el cubre objetos.

Dejar que la cámara permanezca en reposo de 3 a 5 minutos para que las levaduras sedimenten, entonces proceder a contar lo más rápido posible.

CALCULOS

Cuenta de células en las 4 esquinas de los cuadros - (100 cuadritos) X 40 es igual a cuenta en 1 mm³ de suspensión de levaduras.

Cuenta en 1 mm³ X 1000 X factor de dilución igual a células sobre gr. de levadura original.

Si la dilución es 1:400, el cálculo es el siguiente. células en 1 gr. de levadura igual a cuenta en 4 esquinas de los cuadros X 16000000

Burker o tipo abierto. El procedimiento es el mismo que se siguió en el tipo cerrado.

CALCULOS

células contadas en 80 cuadritos por 5 igual a cuenta en 1 mm³.

Células/gr. de levadura original igual a cuenta en 1 mm³ por 1000 por factor de dilución.

Si el factor de dilución es 400 el cálculo es el siguiente: células/gr. de levadura original igual a células en 80 cuadritos por 20.000 000.

C A P I T U L O VI
RESULTADOS

I. Resultados de la determinación del poder fermentativo en levaduras.

Lectura en la bureta (inicial) - - - - - 475 ml.
 Lectura en la bureta (final) - - - - - 225 ml.
 Diferencia en bureta después de 3 horas - - - - - 250 ml.

HUMEDAD EN LA MUESTRA SECA

En la placa - - - - - 30.3750 gr.
 Placa vacía - - - - - 30.1250 gr.
 Diferencia - - - - - 0.2500 gr.

$$\frac{0.2500}{1} = 0.2500 \times 100 = 25 \%$$

$$P.F. = \frac{250}{25} = 10 \times 100 = 1000$$

Lectura bureta inicial - - - - - 475 ml.
 Lectura bureta final - - - - - 230 ml.
 Diferencia en bureta después de 3 horas - - - - - 245 ml.

HUMEDAD EN LA MUESTRA

Placa con muestra - - - - - 30.3725 gr
 Placa vacía - - - - - 30.1300 gr
 Diferencia en la muestra seca - - - - - 0.2425 gr

$$\frac{0.2425}{1} = 0.2425 \times 100 = 24\%$$

$$P.F. = \frac{245}{24} \times 100 = 1020$$

Thoma Zeiss o tipo cerrado.

Cuenta en 4 esquinas igual a 160

Factor de dilución igual a 400

Células/gr. de levadura igual.

160 X 400 X 40 X 1000

160 X 16 000 000

2560 000 000

2560 X 10⁶ células.

Cuenta en 4 esquinas igual a 158

Factor de dilución igual a 400

Células/gr. de levadura igual.

158 X 400 X 40 X 1000

158 X 16 000 000

2528 000 000

2528 X 10⁶ células.

Cuenta en 4 esquinas igual a 159

Factor de dilución igual a 400

Células/ gr. de levadura igual.

158 X 400 X 40 X 1000

159 X 16 000 000

2544 000 000

2544 X 10⁶ células.

Cuenta en 4 esquinas igual a 162
Factor de dilución igual a 400
Células/ gr. de levadura igual.

162 X 400 X 40 X 1000
162 X 16 000 000
2592 000 000
2592 X 10⁶ células.

Cuenta en 4 esquinas igual a 156
Factor de dilución igual a 400
Células/gr. de levadura igual.

156 X 400 X 40 X 1000
156 X 16 000 000
2496 000 000
2496 X 10⁶ células.

El valor promedio es de 159 células/ gr.

Burker o tipo abierto.

Células de levadura/ 80 cuadros igual a 128

Células/gr. de levadura igual

128 X 50 X 1000 X 400

128 X 20 000 000

2560 000 000

2560 X 10⁶ células.

Células de levadura/80 cuadros igual a 130

Células/gr. de levadura igual

130 X 50 X 1000 X 400

130 X 20 000 000

2600 000 000

2600 X 10⁶ células.

Células de levadura/ 80 cuadros igual a 126

Células/gr. de levadura igual.

126 X 50 X 1000 X 400

126 X 20 000 000

2520 000 000

2520 X 10⁶ células.

Células de levadura/80 cuadros= 129

Células/gr. de levadura=

129 X 50 X 1000 X 400

129 X 20 000 000

2580 000 000

2580 X 10⁶ células.

Células de levadura/ 80 cuadros= 127

Células/gr. de levadura=

127 X 50 X 1000 X 400

127 X 20 000 000

2540 000 000

2540 X 10⁶ células.

No de células de levadura/ml	No de cocimiento.
12 x 10 ⁶	471/472
10 x 10 ⁶	473/474
11 x 10 ⁶	475/476
10 x 10 ⁶	477/478
9 x 10 ⁶	479/480
9 x 10 ⁶	481/482
11 x 10 ⁶	483/484
10 x 10 ⁶	485/486
9 x 10 ⁶	487/488
10 x 10 ⁶	489/490
13 x 10 ⁶	491/492
12 x 10 ⁶	493/494
9 x 10 ⁶	495/496
10 x 10 ⁶	497/498
12 x 10 ⁶	499/500
11 x 10 ⁶	501/502
11 x 10 ⁶	503/504
9 x 10 ⁶	505/506
10 x 10 ⁶	507/508

Valores referentes a la proporción de levadura de siembra y cuya grafica es la núm. 4.

Extinción de la suspensión de levaduras a
1000 milimicrones contra la cuenta de células.

E. 1000

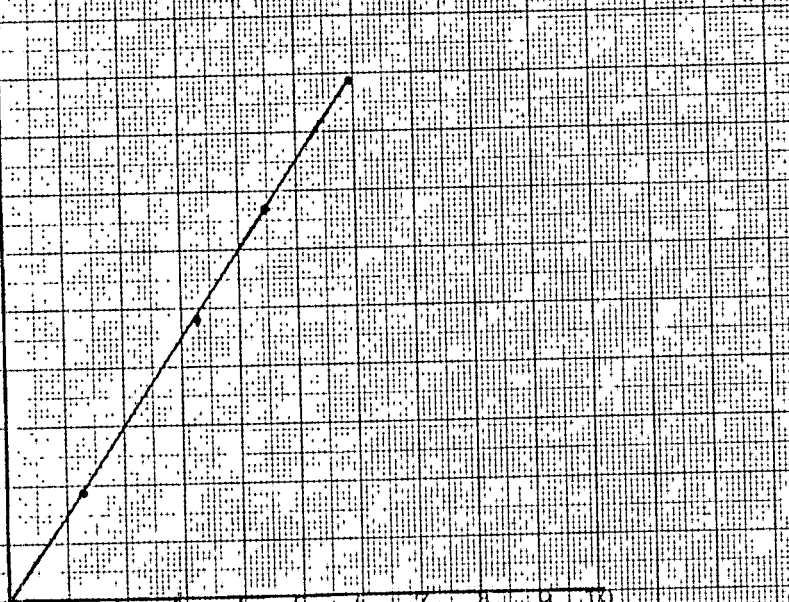
Grafica N.º 1

Extinción de la susp. de levaduras.

1.0
.9
.8
.7
.6
.5
.4
.3
.2
.1
0

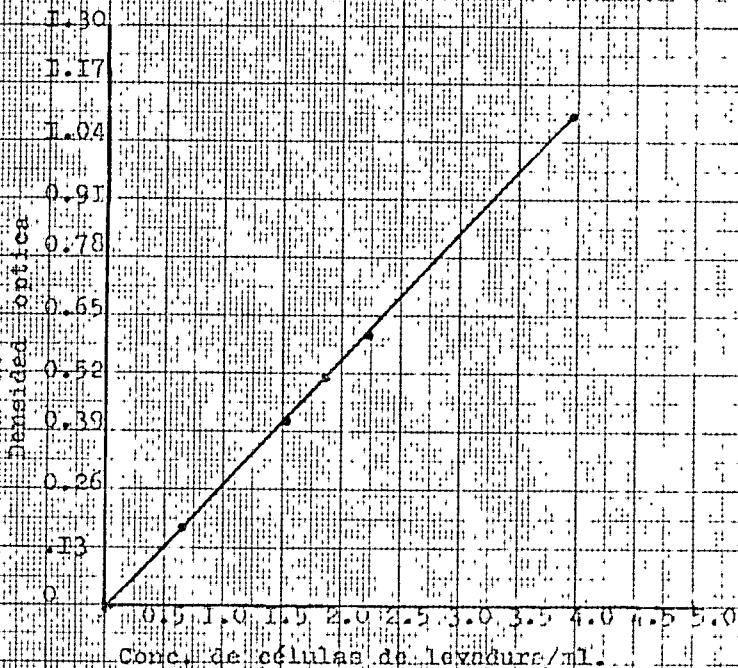
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Conc. de levaduras X 10⁶ células/ml.



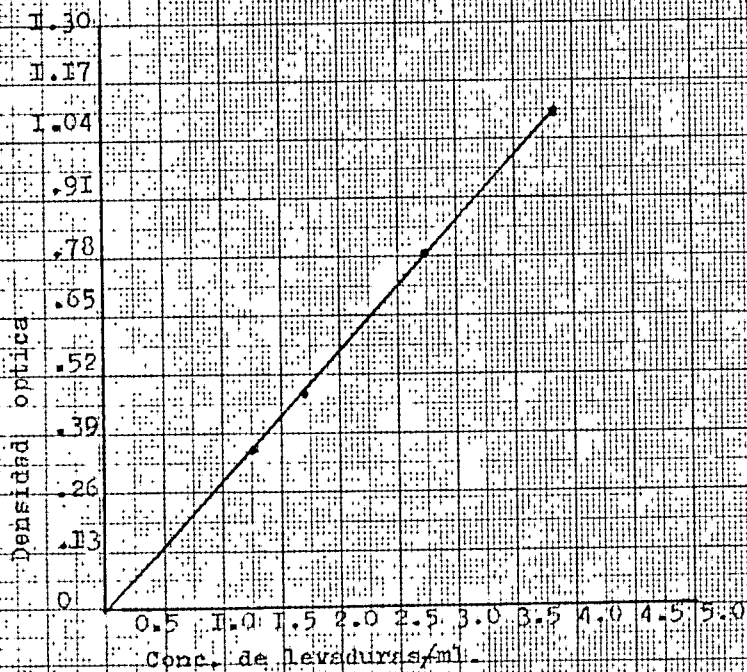
Gráfica correspondiente a las lecturas
obtenidas de cerveza fuerte.

gráfica # 2



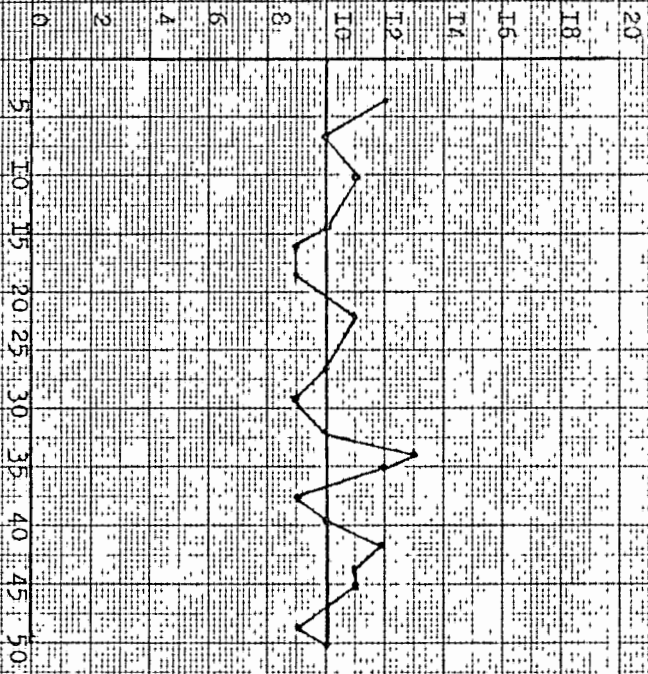
Gráfica correspondiente a los valores
obtenidos en cerveza suave.

Gráfica #3



Gráfica referente a proporción de levadura de
 elembra la cual fue eliborale e gedita a los
 valores obtenidos de las determinaciones de
 conteo de células de levadura.

No de células de levadura/ml.



No de cocimientos.

C A P I T U L O VII
CONCLUSIONES

Por lo que se ve a través de este pequeño estudio sobre las características que debe tener una levadura para ser empleada en la industria cervecera, se deduce la necesidad de llevar a cabo un control minucioso de la levadura de tal manera que de una visión clara de las características que debe tener, para así poder llegar a obtener un producto de optima calidad el cual reuna todas las normas establecidas para la elaboración de cerveza.

I.-El método espectrofotométrico, guarda mucha semejanza con las determinaciones hechas con la cámara de conteo.

Es más usual hacer las determinaciones de las concentraciones de las células con la cámara de conteo ya que es más fácil contar con una cámara de conteo que con un espectrofotómetro y es muy poca la diferencia de resultados entre un método y otro.

2.-El uso de pipeta para dilución de sangre, agitador de vidrio o asa de platino en la preparación de la cámara de conteo no dan la misma reproducibilidad de resultados como la pipeta bacteriológica de 1 ml.

Si se observan burbujas de aire cuando se carga la pipeta, vaciarla y preparar nueva carga.

Un contador de los que se usan normalmente es útil para el conteo.

Es aconsejable el uso de luz artificial logrando un campo obscuro en el microscopio.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Metodos de Analisis Sociedad Americana de Quimica
Cervecera 6ta Edición - 1958
- 2.- Burns, J.A. this Journal¹ - 1937
- 3.- Raibow, G. this Journal - 1968
- 4.- A.S.B.C. Methods Yeast
- 5.- Instructivo A.O. Bright-Line Hemacytometer.

B I B L I O G R A F I A .

Microbiología de las Fermentaciones Industriales.

Jorgensen-Hansen.

Editorial Acribia, Zaragoza 1959, Cap. IX.X. XI.

Fabricación de Mermeladas.

Gorge H. Rauch.

Editorial Acribia-Zaragoza España Zp.466.

Microbiología de Zinsser.

Páginas 4, 1310, 1313, 1314, 1315.

Cuarta Edición. Unión Tipográfica. Editorial Hispano Americana, México.

Técnicas de Microbiología Agrícola.

Girard-Rougieux.

Páginas 132, 203, 251, 243.

Editorial .. Acribia. Zaragoza España 1964.

Técnica de la Fabricación de Conservas Alimenticias.

J. Banlieu

Segunda Edición.

Editorial Sintax. Barcelona, 7