

Universidad Nacional Autónoma de México
FACULTAD DE QUIMICA



ESTUDIO COMPARATIVO DE MEDIOS DE CULTIVO
PARA LA DETECCION DE LEVADURAS SILVESTRES
DE IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA CERVECERA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:
ELOY FLORES LOPEZ

MEXICO, D. F.

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

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

El presente estudio es de interés para la industria cervecera, porque aporta una forma de detectar contaminaciones con levaduras silvestres, que llegan a producir anomalías en la fabricación de cerveza, y por lo tanto, crear graves problemas para estas industrias.

Una levadura silvestre se define como cualquier levadura que no es usada deliberadamente y bajo pleno control. Aun cuando no todas las levaduras silvestres son dañinas, ni producen deterioro en la cerveza, es indeseable su presencia, ya que es un indicio de infección (9).

Entre las levaduras silvestres identificadas como responsables del deterioro de la cerveza se encuentran especies que pertenecen a los géneros

Saccharomyces, Hansenula, Kloeckera, Candida,
Torulopsis, Rhodotorula, Pichia y Brettanomyces.

Han sido estudiados varios medios selectivos para la detección de levaduras silvestres, ninguno de los cuales ha resultado completamente satisfactorio. Esto se debe principalmente a el comportamiento que tiene la levadura lager en cada uno de los medios selectivos. Se han reportado variaciones en el comportamiento de una misma levadura de una fábrica a otra. ²¹

De entre los medios selectivos reportados en la literatura, utilizados para la detección de levaduras silvestres, los más utilizados han sido: el medio de Lin, medio diferencial universal de cerveza agar (UBD), el medio base + lisina y el medio diferencial de Schwartz.

GENERALIDADES

Las levaduras se han explotado durante millones de años para la fabricación de pan y bebidas alcohólicas, aún antes de que se supiera que eran microorganismos y se descubriera la verdadera naturaleza de la fermentación. Su presencia en la cerveza fue detectada por primera vez por Anton van Leeuwenhoek, en 1680; cerca de 200 años después, en 1876, Pasteur presentó sus ideas sobre la fermentación en un trabajo ya clásico "Études sur la bière", en el que postulaba que microorganismos que vivían en condiciones anaeróbicas, eran capaces de desarrollarse y crecer sustituyendo el proceso de la respiración que llevaban a cabo en presencia de oxígeno, por el proceso de fermentación mediante el cual un azúcar se convierte en alcohol y dióxido de carbono, suministrándole de esta manera a las células de levadura la energía que

requerirán para vivir en estas condiciones. ^{23, 24}

Las levaduras están muy difundidas en la naturaleza. Se encuentran en las frutas, los granos y otras materias nutritivas que contienen azúcares, en el suelo (especialmente en los viñedos y en los huertos), el aire, la piel y el intestino de los animales y algunos insectos. Se diseminan por medio de portadores y por el viento. ^{24, 7}

Las levaduras son por lo general, organismos unicelulares que se presentan en formas muy variadas desde las esféricas, ovoides, cilíndricas y elipsoidales hasta las triangulares; la mayoría de las 500 especies de levaduras conocidas, se han clasificado taxonómicamente desde el punto de vista de su reproducción, que puede ser asexual y/o sexual, incluyéndose en tres clases de hongos: - Ascomycetes, Basidiomycetes y Deuteromycetes. ^{23,}

²⁴ A la primera pertenecen las levaduras cuyas

estructuras reproductoras sexuales son las ascosporas. El asca contiene por lo general de una a cuatro esporas, pero a veces su número es de ocho ó más. Las esporas se producen por divisiones sucesivas del núcleo; cada núcleo así formado se rodea de material citoplásmico y después por la pared celular.²⁴

La clase Basidiomycetes se reproduce formando esporas sexuales externas, en una estructura denominada basidio o en un promicelio.

La clase Deuteromycetes incluye levaduras a las que no se les conoce reproducción sexual; se reproducen solamente de forma vegetativa por gemación o fisión.

Las levaduras no tienen poder fotosintético dependiendo por ello estrictamente de la presencia de materia orgánica para desarrollarse; pueden fermentar

tar algunos azúcares, tales como los monosacáridos constituidos por seis átomos de carbono e sus polímeros, los que previamente son degradados a monosacáridos para su utilización; mediante hidrolasas. Así como hay levaduras que metabolizan pocos azúcares, existen algunas como C. utilis que poseen capacidad para metabolizar ciertas pentosas (xilosa y arabinosa) y S. diaztaticum que fermenta inclusive dextrinas simples de la cerveza.

Las levaduras pueden obtener el nitrógeno necesario para la síntesis de sus proteínas a partir de compuestos de origen orgánico e inorgánico (nitritos o nitratos), la mayor parte de las especies pueden aprovechar el ión amonio. Las diferencias en su capacidad para utilizar nitrato o nitrito y la desaminación de los aminoácidos, se aplica para distinguir ciertas razas y especies; las vitaminas que requieren pertenecen en su mayoría al complejo B. Las levaduras crecer

dentro de un amplio intervalo de temperaturas de 0° a 47 °C y la temperatura óptima para la mayoría es de 20 a 30 °C. El rango de pH óptimo para su desarrollo varia entre 3.5 y 6.5 aunque existen excepciones: Schizosaccharomyces está restringida a un pH de 5.45 y Torulopsis pinalopesii de 0.9 a 1.1 cuando crece a 37 °C. En general la mayoría de las levaduras pueden crecer bien dentro de un rango de 3 a 11. 4, 7, 8

Las levaduras utilizadas en la industria cervecera se clasifican en: Levaduras bajas, que se emplean comunmente en la elaboración de la cerveza "lager" y levaduras altas, empleadas en la cerveza inglesa "ale". Las que no pertenecen a estos dos grupos son denominadas "levaduras silvestres".

Una levadura silvestre, se define como cualquier levadura que no es empleada deliberadamente y bajo pleno control de su comportamiento en la fer

mentación.⁹ Entre las identificadas como responsables del deterioro de la cerveza se encuentran especies que pertenecen a los géneros Saccharomyces, Hansenula, Candida, Torulopsis, Rhodotorula, Pichia y Brettanomyces; su presencia puede producir velos biológicos y desarrollo de sabores desagradables. De acuerdo con la literatura, las levaduras silvestres de la especie Saccharomyces son las más difundidas, el 80 % de las contaminantes pertenecen a este género. Para darse cuenta del peligro que representa una contaminación con levaduras silvestres, se ha reportado (9) que una célula de Saccharomyces cerevisiae var. turbidans en 16,000,000 de levaduras lager, producirá velo en la cerveza; Saccharomyces diastaticum es una de las más peligrosas en la cerveza embotellada y no pasteurizada, produce velo en la cerveza, así como sabores desagradables. La presencia de Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus es causante de sabores fenólicos durante la fermenta-

ción o el almacenamiento, razón por la cual es aconsejable que en las cervecerías se cuente con una forma de detectar su presencia.

Las levaduras silvestres pueden ser detectadas, mediante el empleo de medios selectivos, que se dividen en dos grupos.

Grupo I. Esta formado por el medio diferencial universal de cerveza agar (UBD) y un medio base + lisina. Estos son los más adecuados para la detección de levaduras silvestres que no pertenecen al género Saccharomyces. Grupo II. Consta de el medio diferencial de Schwartz (SDM) y el medio de Lin, y son los adecuados para la detección de levaduras silvestres del género Saccharomyces. 17

El medio diferencial universal de cerveza agar, - contiene el antibiótico actidina a una concentración de 2a4 ppm suficiente para impedir el desarrollo de la levadura lager, no así el de las levaduras

silvestres.

El medio base + lisina contiene como única fuente de nitrógeno el aminoácido lisina, el cual no puede ser utilizado por la levadura lager para su crecimiento, por lo contrario las levaduras silvestres si pueden hacerlo.

El medio diferencial de Schwartz aún cuando es muy utilizado en la detección de levaduras silvestres, presenta ciertas dificultades, ya que en este son capaces de crecer tanto las levaduras silvestres como la lager que se emplea en la cervecería y el criterio para diferenciarlas no es muy exacto: Los tipos de colonias desarrolladas por las levaduras se denominan tipo "L" (grandes) y tipo "S" (chicas). Por lo general, las primeras corresponden a las levaduras silvestres y las segundas a las lager; sin embargo esto no siempre resulta cierto, ya que existen algunas especies de levaduras

ras silvestres que desarrollan colonias de un tamaño igual o menor al de las levaduras lager,^{3,14}¹⁵ a las que inclusive se les denomina tipo "Q" indefinidas; por estos motivos para saber que tipo de levadura se encuentra presente es necesario además efectuar pruebas de carácter bioquímico biológico, para realizar su completa identificación. Levaduras como S.willianus, S.fragilis, Hansenula sp., Torulaspota fermenti y otras, no son capaces de crecer en éste medio, lo que demuestra la ineficiencia del mismo. 14, 15

Tratando de mejorar este medio, Y. Lin observó que cuando la levadura lager se inocula en el medio SDM es incapaz de crecer al incubarse a 37 °C por 24 hrs y posteriormente a 30 °C durante 4 días más. El inconveniente de este tratamiento es que afecta de la misma forma a algunas levaduras silvestres que pueden ser detectadas en este medio cuando se emplea una sola temperatura de incubación de 30 °C. Para algunas otras levaduras

se ve reducido su porcentaje de recuperación.¹⁵ -
Por lo tanto, este medio no será utilizado en es
te estudio.

El medio de Lin fue desarrollado por Yishan Lin al observar el efecto que tenía el colorante cris
tal-violeta y una mezcla de fuscina-sulfito sobre el desarrollo de la levadura empleada en la indus
tria cervecera²¹. Estas sustancias fueron añá -
didas a un medio base a una concentración de 0.2
a 4 ppm para el colorante y 0.05 a 0.4 % de la
mezcla de fuscina-sulfito. Las pruebas permitie-
ron establecer que cuando la concentración del co
lorante llegó a 0.7 ppm ninguna de las levaduras-
probadas logró desarrollarse. Cuando solamente se
agregaba al medio la mezcla de fuscina-sulfito to
das crecían y lo hacían con un tamaño en su colo -
nia mucho menor que cuando se emplea el medio base
sin la adición de ninguna de las dos sustancias.

Si ambas substancias se adicionaban al medio base la supresión del desarrollo de la levadura lager se lograba a una concentración de 0.4 ppm. del colorante y 0.1 % de la mezcla de fuscina-sulfito. Encontrando una levadura lager que crecía aún a 20 ppm. del colorante. El medio se designó con la letra A.

Levaduras que provenían de varias cervecerías fueron probadas en el medio A, dando como resultado que cuando el inóculo estaba a una concentración de 2×10^5 células/caja no se obtenía ningún desarrollo. Sin embargo cuando el inóculo se incrementaba a 6×10^6 células/caja si se presentaba desarrollo, concluyendo de esto que la efectividad del medio en parte está dada por la concentración del inóculo. Si se inóculaba en el medio A una mezcla de levadura lager con silvestres a una concentración de 5×10^5 y 300 células/caja respectivamente se presentaba el desarrollo de colonias grandes, que al contarlas eran menos de 300

y alrededor de estas innumerables colonias pequeñas, lo que demostraba que las levaduras silvestres tienden a reducir el efecto supresivo que tiene el medio A sobre las levaduras lager.

Yishan Lin²¹ al estudiar el efecto de varios factores que podrían influir en el desarrollo de las levaduras en el medio A observó que cuando la concentración de fosfato dipotásico no rebasa el 0.1 %, el porcentaje de recuperación de las levaduras silvestres se incrementa. Con esta última modificación cambió el nombre de medio A al de Lin.

Y. Lin concluye en su artículo diciendo que la concentración efectiva de cristal-violeta en el medio no puede ser restringida a un nivel definido, ya que ésta dependerá del tipo de ingredientes empleados en la preparación del medio, así como el tipo de levadura que sea empleada en cada cervecería-

Los medios diferenciales que se han venido mencion

nardo requieren de 5-6 días de incubación a fin de obtener los resultados, esto significa un tiempo relativamente largo y lo que se requiere es obtenerlos lo más rápidamente posible. Esta necesidad dió origen al desarrollo del método de formación de microclonias. Este emplea los mismos medios selectivos, únicamente que a las 24 o 30 hrs de incubación se hace una observación microscópica de la superficie del medio en busca de colonias que empiezan a desarrollarse pero que aún no son visibles.

Harrison¹³ y Lin¹⁴ probaron este método, encontrando que entre el medio que contiene al antibiótico actidina (UED) y el de Lin no existía ningún problema para la detección de levaduras silvestres. Señalan que bajo la observación microscópica cuando el medio fue inculado con mezcla de levadura silvestre y lager se podía apreciar un gran número de células individuales esparcidas sobre la superficie y en algunos lugares pe

queños agrupamientos de células que con el tiempo formarían una colonia. En contraste, cuando se emplea el medio base + lisina las levaduras lager probadas desarrollaron microcolonias dentro de 24 a 30 horas de incubación. Bajo observación microscópica las colonias tenían forma irregular y de varios tamaños, en algunas parecía que se habían fusionado unas con otras. Las levaduras silvestres del género Saccharomyces tuvieron también un desarrollo semejante al de la levadura lager, sin embargo cuando se inoculaban levaduras silvestres que no pertenecen al género Saccharomyces estas crecían más rápidamente que la levadura lager, pudiendo de ésta manera hacerse la diferenciación entre unas colonias y otras. 13,14,20

Como en una contaminación por levaduras silvestres es realmente difícil que estas lleguen a predominar, para poder detectar su presencia resulta necesario inocular en los medios una gran cantidad de células, lo que es posible cuando se tra

ta de muestras de levadura empleada para inoculación de tanques de fermentación, muestras de la misma o bien de cerveza en tanques de reposo, en las que la cantidad presente de levadura es elevada. En muestras de cerveza filtrada y embotellada resulta difícil, porque en estos casos la levadura es muy escasa. Para resolver esta dificultad, se han empleado filtros de membrana con los cuales se pueden filtrar volúmenes relativamente grandes de cerveza, aumentando de esta manera la posibilidad de detectar levaduras silvestres en este tipo de muestras.

La técnica que emplea filtros de membrana utiliza los mismos medios selectivos mencionados en párrafos anteriores e inclusive se puede emplear el método de formación de microcolonias, sin embargo para algunos autores el empleo de filtros de membrana es poco efectivo, por que la eficiencia de cada medio se ve influenciada por el tipo de membrana utilizada. Lín²⁰ considera que una membra-

na de núcleopore de policarbonato es la más indi
cada; otras como millipore-blanca, millipore-ne
gra, etc. permiten el desarrollo de levaduras la
ger en algunos de estos medios, dificultando de -
esta manera la diferenciación entre las colonias-
de levaduras silvestres y lager. ^{2,19,20}

M E T O D O L O G I A

1.- Aislamiento de levaduras silvestres.

1.1.- Se filtraron 100 ml de retorno de embotellado⁺ proporcionado por diferentes cervecerías, empleando membranas millipore, las cuales posteriormente se colocaron en cajas petri con medio UBA (Universal de cerveza agar). y se incubaron a 25 °C por 48 horas.

1.2.- Se realizó una observación microscópica de las levaduras que desarrollaron en el medio anterior, marcando las colonias cuyas células presentaron una morfología diferente a la de la levadura cervecera.

2.0.- Obtención de cultivo puro de las levaduras silvestres.

⁺Cerveza sobrante en las líneas que alimentan a las líneas embotelladoras.

- 2.1.- Se suspendió una cantidad pequeña de levaduras en 5 ml de solución salina isotónica estéril.
- 2.2.- Se efectuaron las siguientes diluciones: 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} .
- 2.3.- Se inocularon 0.2 ml de las dos últimas diluciones en cajas Petri con agar mosto lupulado y se incubaron a 25 °C por 48 h.
- 2.4.- Se efectuó una observación microscópica para confirmar la presencia de levaduras silvestres.
- 2.5.- Las levaduras silvestres se inocularon por estría en tubos de ensayo con agar mosto inclinado y se incubaron a 25 °C por 5 días.
- 2.6.- Las levaduras adecuadamente etiquetadas se refrigeraron para su investigación.

3.0.- Diferenciación de las levaduras cervece
ras y silvestres.

3.1.- Tanto la levadura "lager" como las silvestes
tres aisladas durante los pasos anteriores
res, fueron sometidas a las siguientes
pruebas, que permiten diferenciar a las
contaminantes de las de uso industrial.

3.1.1.- Fermentación de mosto acidificado con -
ácido tartárico. Las levaduras se inocularon
laron en mosto e incubaron a 30 °C durante
te 48 horas, añadiéndose posteriormente
a 30 ml de mosto acidificado al 1.5 %
con ácido tartárico y se incubaron a
30 °C. Una fermentación activa dentro de
48 horas es evidencia de la presencia de
levaduras silvestres.

3.1.2.- Utilización de lisina. Las levaduras -
son lavadas y centrifugadas 3 veces con

agua destilada estéril y 0.3 ml de una suspensión conteniendo aproximadamente 2×10^5 células, se inocularon sobre la superficie del medio agar lisina. Las cajas se incubaron a 25 °C por 5 días. El desarrollo de colonias indica la presencia de levaduras silvestres.

3.1.3.- Desarrollo en presencia de cristal-violeta. Se inocularon cajas petri con agar mosto que contienen 20 ppm de cristal-violeta y se incubaron a 30 °C durante 48 horas. El desarrollo de colonias en el medio indica presencia de levaduras silvestres.

3.1.4.- Desarrollo de las levaduras en el medio diferencial universal de cerveza agar - (URD). Se inocularon las cajas petri que contenían URD (que contiene 4 ppm de actidina), con 2×10^5 células cada una, se incubaron a 15 °C durante 72 horas. El

desarrollo de colonias indica la presen
cia de levaduras silvestres.

3.1.5.- Se consideraron como levaduras silvestres a aquellas que presentaron pseudomicelio o alguna forma particularmente anormal en su morfología, al ser observa
das en el microscopio después de ser cultivadas en agar mosto durante 72 h.

4.- Obtención de un medio selectivo para el aislamiento de levaduras silvestres.

4.1.- Se preparó medio de Lin con diferentes concentraciones del colorante cristalvioleta en un rango de 0.1 a 5.0 ppm - (el medio se distribuyó en cajas petri que se refrigeraron 24 hr posteriormente).

4.2.- Se inocularon las cajas petri que contengan medio de Lin con 0.1 ml (que conte

tenía aproximadamente 5×10^5 células para la levadura lager y 100 para las silvestres) de cultivos de 24 horas, obtenidos de la siguiente manera:

4.2.1.- Se sembraron 4 matraces que contenían 20 ml de mosto lupulado: 3 con cepas silvestres y 1 con levadura lager. Se incubaron durante 24 horas a 25 °C.

4.2.2.- Los cultivos de levaduras se lavaron 3 veces, utilizando solución salina isotónica estéril.

4.2.3.- Las células se suspendieron en 15 ml de solución salina isotónica.

5.- Ajuste de la concentración de los cultivos por investigar.

5.1.- Se contaron las células utilizando un hemocitómetro.

- 5.2.- Se hicieron diluciones hasta obtener una concentración de aproximadamente 5×10^5 células por 0.1 ml para la levadura "la - ger" y de 100 células por 0.1 ml para las levaduras silvestres.
- 5.3.- Las cajas con el medio de Lin (párrafo 4.1) fueron inoculadas e incubadas a 25°C durante 5 días observándolas diariamente.
- 6.- Investigación del efecto del pH del medio de Lin sobre el desarrollo de las levaduras.
- 6.1.- Se preparó medio de Lin con una concentración de cristal-violeta de 2.5 y 3 ppm variando el pH de 6.0 a 8.5 con rangos de 0.25
- 6.2.- Los medios se inocularon con 0.1 ml de cada cultivo obtenido en la forma descrita en el párrafo 4.2.1. y se incubaron a 25°C durante 5 días.

- 7.- Desarrollo de las levaduras en el medio de Lin cuando se encuentran mezcladas levaduras silvestres con lager.
- 7.1.- Se preparó medio de Lin conteniendo una - concentración de cristal-violeta de 3.0 - ppm. y se ajustó el pH a 7.8 ± 0.2 .
- 7.2.- Los medios fueron inoculados tal y como se ilustra en la siguiente tabla, y fueron in cubados a 25 °C durante 5 días, efectuándose se observaciones diariamente.

Concentración de Células por Caja

	Lev. Silvestres	Lev. Lager
Levadura lager	---	5×10^5
Levadura lager mezclada con C ₁	100	5×10^5
Levadura lager mezclada con C ₂	100	5×10^5
Levadura lager mezclada con C ₃	100	5×10^5

C₁, C₂ y C₃ son levaduras silvestres.

NOTA: Los inóculos se obtuvieron de la forma descrita en los párrafos 4.2.1 y 5.0

8.-- Desarrollo de las levaduras silvestres y lager en el medio de Lin a una temperatura de incubación de 30 °C.

8.1.-- Se preparó medio de Lin con una concentración de cristal-violeta de 3.25 ppm y ajustando el pH a 7.8 ± 0.2 (el medio se --

distribuyó en cajas petri y se refrigeró durante 24 horas).

8.2.- Las cajas se inocularon con cultivos (párrafo 4.2.1 y 5.0) de levaduras silvestres y lager, de la forma como se ilustra en la siguiente tabla.

Concentración de Células por Caja

Levaduras	Levaduras Silvestres	Levaduras Lager
"Lager"	---	5×10^5
C ₁	100	---
C ₂	100	---
C ₃	100	---
Lager/C ₁	100	5×10^5
Lager/C ₂	100	5×10^5
Lager/C ₃	100	5×10^5

C₁, C₂ y C₃ son levaduras silvestres.

8.3.- Los medios fueron incubados a 30 °C durante 5 días, observándolos diariamente.

9.- Comparación de la efectividad para la detección de levaduras silvestres, entre los medios de UBD, medio base más lisina y el de Lin.

9.1.- Se prepararon los medios y se distribuyeron en cajas petri y se refrigeraron durante 24 horas.

9.2.- Los medios se inocularon con cultivos (párrafo 4.2.1 y 5.0) de levaduras silvestres en mezcla con lager a una concentración de 100 y 5×10^5 células, respectivamente.⁺

⁺En esta ocasión se probaron 20 levaduras silvestres aisladas y 5 tipificadas,

9.3.- Los medios se incubaron a las siguientes temperaturas durante 5 días:

Medio base con lisina	25 °C
Medio UBD	25 °C
Medio de Lin	25 y 30 °C

10.- Detección de levaduras silvestres por la formación de microcolonias.

10.1.- Se prepararon los medios y se distribuyeron en cajas petri, se refrigeraron durante 24 horas.

10.2.- Los medios se inocularon con medios de cultivo (párrafo 4.2.1 y 5.0) de levaduras silvestres con lager a una concentración de 100 y 5×10^5 células por caja respectivamente, utilizando como controles cajas-inoculadas únicamente con levaduras lager para cada uno de los medios.

10.3.- Los medios se incubaron a las siguientes-
temperaturas:

Medio base más lisina	25 °C
Medio UBD	25 °C
Medio de Lin	25 y 30 °C

Después de 24 y 30 horas de incubación se efectuaron observaciones microscópicas de la superficie de los medios en busca de microcolonias.

R E S U L T A D O S

1.- Se aislaron 25 levaduras, las cuales posteriormente fueron estudiadas para caracterizarlas como silvestres.

TABLA # 1

Resultados de las pruebas para la diferenciación entre levaduras silvestres y lager.

Levaduras	Observación Microscópica a las 48 h. de incubación	Utilización de la lisina	Desarrollo en UBD	Fermentación de Mosto Acidificado con Acido Tartárico	Desarrollo en presencia de Cristal Violeta (20 ppm)
Lager	-	d	-	-	-
C ₁	+	+	-	+	-
C ₂	+	+	-	+	+
C ₃	+	+	+	+	-
C ₄	+	+	-	+	-
C ₅	+	+	-	+	-
C ₆	+	+	-	+	-
C ₇	+	+	-	+	-
C ₈	+	+	-	+	-
C ₉	+	+	-	+	-
C ₁₀	+	-	-	-	-
C ₁₁	+	+	-	d	-
C ₁₂	+	-	-	+	-
C ₁₃	+	-	+	-	-
C ₁₄	+	-	-	d	-
C ₁₅	+	+	-	d	-

Resultados de las pruebas para la diferenciación entre levaduras silvestres y "lager"

Levaduras	Observación Microscópica a las 48 h. de incubación	Utilización de la Lisina	Desarrollo en UBD	Fermentación de Mosto Acidificado con Acido Tartárico	Desarrollo en presencia de Cristal Violeta (20 ppm)
C ₁₆	+	-	-	+	-
C ₁₇	+	+	-	+	-
C ₁₈	+	-	-	-	-
C ₁₉	+	+	-	d	-
C ₂₀	+	+	-	+	-
C ₂₁	+	-	-	-	-
C ₂₂	+	+	-	+	+
C ₂₃	+	-	-	-	-
C ₂₄	+	-	-	+	-
C ₂₅	+	-	-	-	-
Rhodotorula sp.	+	+	-	d	-
S. - Diastaticum	+	+	-	+	-
S. - Fructum	+	-	-	+	-
Torulula sp.	+	+	-	+	-
Torulopsis	+	+	-	d	-

Observación microscópica: (+) Presencia de pseudomicelio ó alguna forma particularmente anormal en la morfología de las células. d: Débilmente positiva.

TABLA # 2

Resultados en la obtención de un medio para el aislamiento -
de levaduras silvestres.

Concentración de Cristal-Violeta en el Medio de Lin en ppm											
Lev.	0.1	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
Lager	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
C ₁	100	98	99	97	95	86	82	77	73	68	66
C ₂	100	99	100	98	98	91	89	87	88	85	79
C ₃	98	96	97	88	82	75	73	68	56	42	39

NOTA: Los resultados están dados en porcentos de recupera -
ción.

(+) Desarrollo de la levadura lager con un número in
contable de colonias.

(0) La levadura lager no presenta desarrollo.

TABLA # 3

Resultado de las investigaciones del efecto del pH del medio de Lin sobre el desarrollo de las levaduras.

a) Concentración del colorante cristal-violeta de 2.5 ppm.

Valores de pH en el Medio											
	6.0	6.25	6.50	6.75	7.0	7.25	7.50	7.75	8.0	8.25	8.50
Lager	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C ₁	85	85	86	84	86	87	86	85	87	84	85
C ₂	89	91	92	90	91	93	90	91	92	90	90
C ₃	73	73	75	74	74	75	75	74	76	75	75

+Incontables.

b) Concentración del colorante cristal-violeta de 3.0 ppm.

Valores del pH en el Medio											
	6.0	6.25	6.50	6.75	7.0	7.25	7.50	7.75	8.0	8.25	8.50
Lager	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C ₁	82	82	83	82	81	80	82	84	83	81	82
C ₂	88	90	91	90	89	89	90	91	92	89	90
C ₃	70	74	72	73	72	73	73	71	72	70	71

(0) La levadura lager no presenta desarrollo.

Los resultados están dados en % de recuperación.

TABLA # 4

Resultados del desarrollo de las levaduras en el medio de Lin al inocular una mezcla de levaduras silvestres y lager.

Levaduras	Inoculo Células/ Caja	RECUPERACION	
		Colonias/Caja	%
Lager	650,000	0	0
C ₁ en mezcla con lager	120	100	83
C ₂ en mezcla con lager	98	89	91
C ₃ en mezcla con lager	112	78	70

NOTA: Concentración de cristal-violeta en el medio
3.25 ppm.

TABLA # 5

Resultado del desarrollo de las levaduras silvestres y lager en el medio de Lin a una temperatura de incubación de 30 °C.

Levaduras	Inoculo Células/caja	RECUPERACION	
		Colonias/Caja	%
Lager	560,000	0	0
C ₁	102	82	80
C ₂	97	86	89
C ₃	95	67	71
C ₁ en mezcla con lager	102	83	81
C ₂ en mezcla con lager	97	85	88
C ₃ en mezcla con lager	95	67	70

TABLA # 6

Resultado de la comparación en la efectividad para la detección de levaduras silvestres, entre los medios de UBD, el medio base más lisina y el de Lin.

<u>Levadura</u>	<u>Lin. a</u> <u>25 °C</u>	<u>Lin. a</u> <u>30 °C</u>	<u>Medio base</u> <u>más lisina</u> <u>25 °C</u>	<u>UBD. a</u> <u>25 °C</u>
Lager	0	0	+	0
C ₁	82	80	52	0
C ₂	93	90	80	0
C ₃	72	70	25	12
C ₄	0	0	79	0
C ₅	25	0	0	0
C ₆	60	58	80	0
C ₇	0	0	64	0
C ₈	0	0	72	0
C ₉	0	0	76	0
C ₁₁	0	0	35	0
C ₁₂	0	34	0	0
C ₁₃	82	78	0	4
C ₁₄	87	84	0	0
C ₁₅	56	50	45	0
C ₁₆	60	20	0	0
C ₁₇	36	0	54	0
C ₁₉	0	0	85	0
C ₂₀	0	79	0	0
C ₂₂	91	82	0	0
C ₂₄	29	0	0	0
<u>Rhodotorula sp.</u>	0	22	18	0
<u>S. Diastaticum</u>	69	24	46	0
<u>S. Fructum</u>	94	90	0	0
<u>Torula sp.</u>	0	0	85	0
<u>Torulopsis sp.</u>	0	0	78	0

+ La levadura lager presenta desarrollo.

Los resultados están dados en % de recuperación.

C O M E N T A R I O S

Cuando en una cerveceria se tiene la sospecha de que existe una contaminación con levaduras silvestres, una observación microscópica de las muestras es de poca utilidad, con excepción de aquellas ocasiones en que estas levaduras se encuentren en gran cantidad y además tengan una diferencia morfológica muy marcada con respecto a la de la levadura "lager" empleada en la cerveceria.

Cuando se tienen cultivos puros de levadura silvestre como los que se obtuvieron para realizar este estudio, resulta fácil apreciar las diferentes formas en la morfología de estas levaduras, encontrando algunas como C₂ que tiene forma cilíndrica y curva, algunas - otras como C₇ llegaron a tener formas completamente irregulares, otras como C₁₀ y C₁₈ lograron una uniformidad en su morfología pero con un tamaño muy pequeño, inclusive se encontraron algunas con una morfología

muy parecida a la que tiene la levadura lager, la que bajo el microscopio se presenta como células grandes, de tamaño más o menos uniforme, ligeramente ovales o redondas. Otras levaduras como C₁₀, C₁₈, C₂₁, C₂₃ y C₂₅ en la prueba de observación microscópica presentaban la formación de pseudomicelio ó anomalías en su morfología y sin embargo en las pruebas para la diferenciación entre levaduras silvestres y lager no obtuvieron resultados positivos en ninguna de ellas, por lo que estas levaduras fueron descartadas para estudios posteriores.

Una observación microscópica es por lo tanto de escasa utilidad para afirmar o negar la presencia de levaduras silvestres contaminantes. Se han tratado de encontrar formas más seguras de hacerlo, entre estas se encuentran algunas pruebas como son: La esporulación de levaduras, la fermentación de mosto que ha sido acidificada con ácido tartárico y la resistencia térmica que tienen algunas de las levaduras silvestres.²¹ Observando los resultados obtenidos en la tabla N^o 1

se puede apreciar que la fermentación de mosto que ha sido acidificado con ácido tartárico fue negativa únicamente cuando se probó la levadura lager y aquellas cepas que fueron descartadas. Por lo que ésta prueba deberá tomarse en cuenta para la detección de levaduras silvestres.

Métodos más rápidos y efectivos han venido desarrollándose mediante el empleo de medios selectivos. Según la Sociedad Americana de Cervecería Química¹ la levadura empleada en la cervecería es incapaz de crecer en un medio en el cual se encuentra presente como única fuente de nitrógeno el aminoácido lisina. Sin embargo observando los resultados que se obtuvieron en este trabajo, se verá que la levadura lager si fue capaz de crecer desarrollando pequeñas colonias como puntitos apenas distinguibles, este comportamiento fue observado por Lin 17, 22 y 21 al efectuar pruebas con levaduras cerveceras. Hace el comentario de que éste desarrollo muy probablemente se deba a impurezas en los reactivos, para comprobarlo, en este estudio se efectuaron los siguientes pasos: se cambió de reas

tivos, se utilizó agua tridestilada en la preparación del medio y se efectuaron cambios en la concentración del inóculo, llegando a disminuirlo hasta 100,000 - células/caja, y sin embargo los resultados siguieron siendo los mismos. Sería conveniente que se efectuara una prueba en la cual no fuera agregada la lisina al medio.

Este pequeño desarrollo que tiene la levadura lager - en este medio no impide hacer una diferenciación clara entre las colonias de estas levaduras y las de las silvestres, ya que el tamaño de estas últimas es mucho mayor que las primeras.

La A.S.B.C. para Control Microbiológico¹ reporta que el antibiótico actidina a una concentración de 4 ppm- en el medio universal de cerveza agar, es suficiente para impedir el desarrollo de la levadura lager, pero no el de las silvestres. Al observar una vez más los resultados obtenidos se puede ver que efectivamente - este medio tiene un efecto altamente supresivo en el desarrollo de la levadura empleado en la cervecería -

pero lo tiene también sobre las levaduras silvestres.

Con el medio de Lin fue necesario efectuar la mayor -
cantidad de pruebas, debido a que ciertos factores co
mo son: La concentración de cristal-violeta, la fres
cura de los ingredientes utilizados en la prepara -
ción del medio, el tipo de Agar empleado y la manera
de como se esteriliza influyen directamente en su -
efectividad para la detección de levaduras silvestres.
21,22

Las pruebas para observar la influencia del pH, en el
medio sobre el desarrollo de las levaduras fueron ne
cesarias ya que no se encontraron referencias sobre -
este punto. Los resultados nos muestran que la única
variación que existe es en el tamaño de las colonias,
las que tienden a ser pequeñas a pHs ácidos y extendi
das en los alcalinos.

C O N C L U S I O N E S

Los medios selectivos más adecuados, para la detección de levaduras silvestres son:

Medio de Lin.- Con una concentración de colorante cristal-violeta de 3.25 ppm e inóculo de 5×10^5 a 1×10^6 células/caja. Este medio demostro tener una eficiencia del 65.4%, la gran mayoría de las levaduras que crecieron lo hicieron con un porcentaje de recuperación por encima del 50 %, y aquellas que no fueron detectadas a 25°C de incubación sí se encontraron a 30 °C y viceversa. Por ello se recomienda usar este medio, duplicando las siembras para incubar la mitad de las placas a 35 °C y el resto a 25 °C; así se asegura una máxima recuperación. Este medio detecta principalmente a las levaduras del género Saccharomyces. Puede emplearse el método de formación de microcolonias y dar resultados positivos al cabo de 24 a 30 horas de incubación.

Medio base + lisina.- Este medio es bueno, siempre - que se tomen en cuenta como levaduras silvestres, solo

aquellas colonias que midan más de 0.5 mm de diámetro. Este medio demostró tener una eficiencia del 61.2% y junto con el anterior hizo posible detectar a todas las levaduras probadas. Este medio detecta principalmente levaduras que no pertenecen al género Saccharomyces.

En este medio no se puede aplicar el método de formación de microcolonias, debido al desarrollo que tiene en este la levadura cervecera y que dificulta la diferenciación entre unas colonias y otras.

COMPOSICION Y PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO DE LIN

Extracto de levadura	0.4	g.
Extracto de Malta	0.2	g.
Peptona	0.2	g.
Dextrosa	1.0	g.
Fosfato Dipotásico	0.1	g.
Cloruro de Amonio	0.05	g.
Mezcla de Fuscina- sulfito	0.1	g.
Agar	2.0	g.
Cristal-violeta	+	ppm.
Agua Destilada	100	ml..

Esterilizar en autoclave a 15 lb. de presión 121 °C, -
repartir en cajas petri y refrigerar de 24 a 48 horas-
antes de su empleo.

⁺NOTA: La concentración deberá ser buscada de acuerdo
al lugar donde será empleado el medio.

Solución de Cristal-Violeta:

Esta solución se prepara disolviendo 0.1136 g. de - cristal-violeta (con un contenido del 88 % de colorante) en 0.5 ml. de alcohol etílico al 95 % y diluido a 100 ml con agua destilada. Esta solución es guardada en refrigeración.

Mezcla de Fuscina-Sulfito:

Se prepara con 4 g. de fuscina básica, 25 g. de sulfito de sodio anhidro, se mezclan perfectamente con 1 g. de dextrina en un mortero, se coloca por 3 días en un desecador, la mezcla se transfiere a un frasco de color ámbar que cierre herméticamente.

MEDIO CON ACTIDINA

Dextrosa	50	g.
Caseina Hidrolisada	5	g.
Exgracto de Levadura	4	g.
Fosfato Monopotásico	0.55	g.
Cloruro de Potasio	0.425	g.
Cloruro de Calcio	0.125	g.
Sulfato de Magnesio	0.125	g.
Cloruro Férrico	0.0025	g.
Sulfato de Magnesio	0.0025	g.
Agar	20	g.
Agua Destilada	1	l.

Disolver 40 mg. de actidina en 100 ml. de etanol al 95 % , y añadir asepticamente 1 ml. de ésta so lución al medio recién preparado, antes de ser - transferido a cajas petri.

MEDIO BASE MAS LISINA

Base de Carbón de Levadura	2.35	g.
Monocloruro de Lisina	0.46	g.
Agar	4	g.

Disolver el monocloruro de lisina y el agar en 100 ml. de agua destilada, esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras de presión. Añadir al medio esterilizado y enfriado a 50 °C la base de carbón de levadura, previamente disuelto en 100 ml. de agua y esterilizado a través de una membrana millipore o algún otro aparato de filtración similar.

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

- 1- American Society of Brewing Chemists,
Subcomitte for Microbiological Controls, 1963

- 2- Barney, M.G., Helbert, J.R.
Comparation of Brands of Membrana Filters for
Recovering Beer Spoilage Microorganism,
A.S.B.C. Journal 1976

- 3- Brenner, M.W.
A Differential Medium for Detection of Wild
Yeasts in the Brewery,
A.S.B.C. Proceiding 1970

- 4- Burdon., Williams,
Microbiología,
Publicaciones Culturales
Tercera Reimpresión, 1976.

- 5- Convención de Maestros Cerveceros de América,
XIX y XX
Estudio sobre Levaduras Silvestres y Bacterias -
Lácticas,
Distrito Federal, Noviembre 1972.
- 6- Chilver, J.M., Harrison, J.
Use of Immunofluorescence and Viability
Stains in Quality Control,
A.S.B.C. Journal vol. 36, 1977.
- 7- Davenport, R.R.
Manual of Lectures on Characteristics and
Significance of Yeasts and Yeast -Like -
Organisms.
September, 1981
- 8- Davis, B.D., Dulbecco, R.
Microbiología,
Editorial Salvat Editores, 1977.

- 9- El Cerveceros en la Práctica
Asociación de Maestros Cerveceros de las Améri-
cas, 1977
- 10- El Embotellador
Como se deben usar y evaluar los métodos para de-
tectar la presencia de levaduras silvestres.
Noviembre _ Diciembre, 1973
- 11- Detection of Wild Yeasts in the Brewery.
Journal of the Institut of Brewing. vol. 77
Jun, 1971
- 12- Hammond, J.R.M.
The Immunofluorescence Staining Technique for the
Detection of Wild Yeasts-Practical Problemas.
Journal of the Institut of Brewing vol. 85
1979.

- 13- Harrison, J., Webb, T.J.B.
Recent Advance in the Rapid Detection of Brewery
Microorganism and Development of Microcolony -
Method
Journal of the Institut of Brewing vol 85,
April, 1979
- 14- Lin, Y.
Detection of Wild Yeasts in the Brewery, Part V,
Rapid Detection,
The Brewers Digest, July 1975
- 15- Lin, Y.
Detection of Wild Yeasts in the Brewery.
The Brewers Digest, March 1974
- 16- Lin, Y.
Detection of Wild Yeasts in the Brewery. A New
Criterion.
The Brewers Digest, May 1973

17- Lin, Y.

Detection of Wild Yeasts in the Brewery
Efficiency of Differential Media,
Journal of the Institut Brewing September,
October vol. 81, 1975

18- Lin, Y.

Detection of Wild Yeasts in the Brewery.
Part VII. Experiences with a variety of
Samples of Brewing Origin,
A.S.B.C. Journal vol. 34, 1976

19- Lin, Y.

Detection of Wild Yeasts in the Brewery
Part. VI Use and Effect of Membrana Filters
A.S.B.C. Proceeding vol. 33, 1976

20- Lin, Y.

Detection of Wild Yeasts in the Brewery
Part VIII. The Use of Membrana Filtration
Technique and Microcolony Method
The Brewer Digest, May 1977

- 21- Lin, Y.
Detection of Wild Yeasts in the Brewery.
Part. III. A new Differential Medium,
A.S.B.C.
- 22- Lin, Y.
Influence of Agar on the Effectiveness of -
Culture Media.
A.S.B.C., Journal, vol. 36, 1977
- 23- Scientific American,
Microorganismos Industriales,
No. 62, Noviembre 1981, pp. 22 a 39
- 24- Felczar. M.J.
Microbiología
Traducción de la segunda edición, editorial
Mc. Graw Will, 1976
- 25- Walsh, R.M.
Detection of Wild Weasts in *Saccharomyces*
carlsbergensis.
Journal of Institut of Brewing vol. 60, 1977

I N D I C E

Objetivo	1
Introducción	2
Generalidades	4
Metodología	20
Resultados	33
Comentarios	40
Conclusiones	45
Composición y Preparación de Medios	47
Bibliografía	51