

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

**FACULTAD DE QUÍMICA, INGENIERÍA QUÍMICA É INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**

E.A.P. DE INGENIERÍA QUÍMICA

**Optimización de un Método para la Producción
de Biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada en la
etapade Fermentación del Mosto de Cerveza, desde un
nivel deLaboratorio a un nivel Piloto**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Ingeniero Químico

AUTOR

Carlos Alberto Altamirano Cahuancama

ASESOR

Jorge Luis Cardenas Ruiz

Abad Flores Paucarima

Lima – Perú

2013

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

DEDICATORA

A mis padres Dora y Aquilino
por su preocupación permanente en
Mi formación y superación personal.

A mi esposa Rosario por su tolerancia y respaldo
en cada uno de los actos de mi vida.

A mis hijos José y Álvaro, que la presente estimule
el sendero que transiten en sus vidas.

A mis hermanos Jadsón, Marco, Lino por su constante apoyo
y estímulo en cada uno de los actos de mi vida .Mi eterno
afecto y agradecimiento.

Al Dr. Abad Flores Paucarima, Maestro y amigo
por su brillante intelectual y calidad humana mi
admiración y eterno agradecimiento por
servirme de ejemplo como hombre de Ciencia y
formador del pensamiento crítico.

AGRADECIMIENTOS

Mi eterna gratitud:

Dr. ABAD FLORES PAUCARIMA, Catedrático de la UNMSM responsable del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología Facultad de Ciencias Biológicas. Co-Asesor de Tesis.

Dr. JORGE CHÁVEZ PÉREZ, Catedrático y Director del Instituto de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular de la UNALM. Revisor Externo

Mg. GILBERTO SALAS COLOTTA, Catedrático y Director de Escuela de Ing. QUÍMICA de la UNMSM. Presidente del jurado de Tesis.

Mg. LEONCIO REYNA MARIÑAS, Catedrático y Director de Escuela de Ing. QUÍMICA de la UNMSM. Revisor de Tesis.

Ing. QUÍMICO JORGE LUÍS CÁRDENAS RUÍZ, Catedrático de la Facultad de Química Ingeniería Química e Ingeniería Agroindustrial de la UNMSM. Asesor de Tesis

RESUMEN

La Esterilización es un proceso físico por el cual se consigue eliminar la carga microbiana acompañante y sus esporas que contaminan un medio de cultivo e instrumentos de laboratorio así también en la planta de procesos. Las características del material problema a esterilizar son de relevante importancia al momento de elegir entre los distintos métodos de esterilización, que se pueden emplear como son: Esterilización por calor seco, Esterilización por calor húmedo, Esterilización por Radiación Gama y UV, Esterilización por Filtración.

El aislamiento primario de células de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de un cultivo contaminado es una práctica de gran relevancia para obtener un cultivo axénico. Las metodologías que se emplean son los sub cultivos directos, medios selectivos, sustancias químicas inhibitorias o el uso de discos de antibiótico, luego se identifican las unidades formadoras de colonia de *Saccharomyces cerevisiae* por su morfología característica debido a su comportamiento cultural de manera que todos los individuos del mismo cultivo tengan la misma composición genética, es decir un clon de células. Para posteriormente aislarlo y elegir la mejor metodología de conservación de cepas a largo plazo, conservación por congelación, conservación por liofilización o métodos de conservación a corto plazo, para conservar convenientemente el cepario de células de *Saccharomyces cerevisiae*.

Para llevar a cabo de manera óptima la producción del mosto de malta de cebada se utiliza la relación más conveniente de Agua/Malta de cebada (Cuadro 3) Los distintos perfiles de temperatura (Cuadro 4) y la (Figura 17) que actúan sobre la papilla de Agua/Malta de cebada para activar el complejo enzimático (Amilasa-Proteasa) que hidroliza las cadenas lineales y ramificadas de polisacáridos del almidón y de las proteínas. El pH Óptimo (Cuadro 5) que active el complejo enzimático para que las enzimas adquieran la conformación tridimensional que reconozca a su sustrato uniéndose e hidrolizando los enlaces glucosídicos y peptídicos de la malta. El grado de hidrólisis enzimático es función del Tiempo de actividad enzimática (Cuadro 6). Todas estas variables de operación actúan de manera sinérgica para obtener de manera óptima un caldo enriquecido (Cuadro 8) y (Cuadro 9) llamado mosto de malta de cebada.

La propagación de células de levadura a nivel de laboratorio (Figura 21) se realiza en caldo estéril de extracto de levadura, glucosa y peptona (YPG) bajo condiciones aeróbicas empleando aire estéril, control estricto de la temperatura para que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* lo metabolice y sintetice su material celular propagándose en el medio de cultivo. El criterio aplicando de escalamiento (Figura 22)

por lo general es empleando un factor de alrededor de 1:10 para cada trasegado, y una concentración celular de $10-15 \times 10^6$ células/mL.

La dilución sucesiva de una suspensión células de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 28) es un procedimiento que permite bajar la carga de células en un rango que se pueda contar en cámara de Neubauer de manera cómoda y poder reportar de manera confiable el número de células que se encuentran en dicha suspensión celular.

La Tinción vital de Células de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 43) se fundamenta en la Bioquímica y es una técnica rápida que permite discriminar en un cultivo celular entre células que se encuentran en condiciones de vitalidad o activas metabólicamente frente a las células muertas que coexisten en el mismo cultivo celular (Figura 38).

El Recuento de levaduras totales y viables en cámara de Neubauer Improved (Figura 44) es una técnica de conteo celular directo en una celdilla cuadrada subdividida en la cual se deposita un cultivo celular diluido para ser enfocado al microscopio óptico, y proceder al recuento de células y reportar el número de células por campo y así obtener un promedio de células que se encuentran en la suspensión celular, por esta técnica no discriminamos entre células vivas de las muertas, pero si combinamos esta técnica con la de Tinción vital podríamos observar al microscopio las células decoloradas (células vivas) de las células no decoloradas (células muertas) y poder hacer un recuento en cámara de Neubauer y saber cuál es la concentración viable con que se está contando y si esta es óptima para ser utilizado como inóculo en la fermentación del Mosto de malta de cebada a nivel piloto (Figura 45).

La Propagación de levaduras en la planta piloto de Cervecería es una actividad donde confluyen la formación de Ingeniero Químico en sinergia con la Microbiología Industrial para poder diseñar y controlar de manera óptima minimizando los riesgos de contaminación del cultivo celular propagando la Biomasa de levadura hasta alcanzar un volumen del 10% del volumen del mosto de malta de cebada a inocular con una concentración celular de $10-15 \times 10^6$ células vitales/mL para un óptimo proceso fermentativo del mosto de malta de cebada.

INDICE GENERAL

	Pág.
Resumen	V
Índice de cuadros	IX
Índice de figuras	XI
Lista de abreviaturas	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	2
2.1 LA CÉLULA DE LEVADURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.1.1 Dimensión de las Células	3
2.2 CITOLOGÍA DE LA CÉLULA DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
2.2.1 La pared celular	5
2.2.2 Espacio Periplasmático	6
2.2.3 Membrana Citoplasmática	6
2.2.4 El Núcleo Celular	10
2.2.5 Estructura de las Mitocondrias	11
2.3 OTRAS ESTRUCTURAS CITOPASMÁTICAS	13
2.3.1 Las Vacuolas	13
2.3.2 Peroxisomas	13
2.3.3 El Retículo endoplasmático	13
2.3.4 El aparato de Golgi	13
2.3.5 El Citosol	13
2.3.6 El Citoesqueleto	14
2.4 EL MICROSCOPIO ÓPTICO	15
2.5 LAS ENZIMAS	18

2.5.1 Factores que modifican la velocidad de las Reacciones Enzimáticas	17
2.6 METABOLISMO CELULAR OXIDATIVO	20
2.7 VÍAS ANAERÓBICAS	22
2.7.1 Fermentación alcohólica.	22
2.7.2 La fermentación láctica	24
2.8 LA CIENCIA DE LA MACERACIÓN DEL MOSTO DE MALTA	24
2.8.1 Preparación de la malta	24
2.8.2 Producción del mosto de malta.	24
2.8.3 Fermentación	25
2.8.4 Procesamiento final	26
2.9 CONCEPTO DE DESINFECCIÓN Y ESTERILIZACIÓN	31
2.9.1 Desinfección	32
2.9.2 Esterilización	32
2.10 MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN	31
2.10.1 Esterilización por calor seco	31
2.10.2 Esterilización por calor húmedo	32
2.10.3 Esterilización por Radiación Gama y UV	33
2.10.4 Esterilización por Filtración.	33
2.11 CONCEPTO DE CULTIVO PURO	34
2.11.1 Método de aislamiento de Levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
2.11.2 Características culturales de la colonia de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
2.12 METODO DE CONSERVACIÓN DE CEPA	36
2.12.1 Métodos a largo plazo	37
2.12.1.1 Conservación por congelación	37
2.12.1.2 Conservación por liofilización	37
2.12.2 Método de conservación a corto plazo	37

2.13 CULTIVO Y PROPAGACIÓN CELULAR	38
2.13.1 Propagación de levadura en el laboratorio	39
2.13.2 Propagación de levadura en la planta de cervecería	40
2.13.3 Efecto Pasteur	42
2.13.4 Efecto Crabtree	43
2.14 CONCEPTO DE CULTIVO CELULAR VIABLE Y VITAL	43
2.14.1 Evaluación de la viabilidad de un cultivo de células de levadura	43
2.14.2 Evaluación de la vitalidad de un cultivo de células de levadura	44
2.15 MEDIDA DEL CRECIMIENTO Y ENUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS VIABLES	45
2.15.1 Recuento directo	45
2.15.2 Medida de la masa de células	45
2.15.3 Recuento de viables	45
2.15.4 Medida del número de partículas	46
2.15.5 Medida de parámetros bioquímicos	46
2.15.6 Medida de actividad metabólica de las bacterias	46
2.16 TINCIÓN VITAL DE CÉLULAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
2.17 DILUCIÓN SERIADA DE LAS SUSPENSIONES CELULARES	47
2.18 CAMARA DE NEUBAUER IMPROVED PARA EL RECUENTO DE LEVADURAS	48
2.19 CRECIMIENTO DE LA POBLACIÓN CELULAR DEL INÓCULO	49
2.19.1 Ciclo de crecimiento para el cultivo por lotes	49
2.19.2 Cinética de crecimiento en un cultivo intermitente	51
2.20 ECUACIONES DE DISEÑO PARA EL BIORREACTOR IDEAL DISCONTINUO	53
2.20.1 Sistema Fermentativo de Operación por Lotes	54
2.20.2 Ventajas de un Sistema Fermentativo de Operación por Lotes	56
2.20.3 Desventajas de un Sistema Fermentativo de Operación por Lotes	56

3. HIPÓTESIS	57
4. OBJETIVOS	57
4.1 Objetivo general	57
4.2 Objetivos específicos	57
5. METODOLOGÍA	58
5.1 Plan de trabajo	59
5.2 Materiales y Métodos	60
5.2.1 Métodos de esterilización	60
5.2.1.1 Esterilización por calor seco	60
5.2.1.2 Esterilización de medios de cultivo por calor húmedo	60
5.2.1.3 Esterilización por Radiación Gama y UV	61
5.2.1.4 Esterilización por Filtración	61
5.2.2 Aislamiento primario de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	62
5.2.3 Producción de mosto de malta de cebada	65
5.2.4 Propagación de células de levadura a nivel Laboratorio	65
5.2.4 Propagación de levaduras en la planta de Cervecería	67
5.2.5 Dilución de una suspensión de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67
5.2.6 Tinción vital de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	70
5.2.7 Recuento de levaduras totales y viables en cámara de Neubauer Improved	71
5.2.8 Determinación de Azúcares Reductores	77
5.2.8.1 Titulación del Estándar de Glucosa	78
5.2.9 Modelo de regresión simple	79
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	80
6.1 Métodos de esterilización	80
6.1.1 Esterilización de instrumentos por calor seco	80

6.1.2 Esterilización de medios de cultivo por calor húmedo	80
6.1.3 Esterilización por Radiación Gama y UV.	81
6.2 Aislamiento primario de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	81
6.3 Producción de mosto de malta de cebada	83
6.4 Reactivación y propagación de células de levadura a nivel Laboratorio	83
6.5 Dilución de una suspensión de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91
6.6 Tinción vital de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91
6.7 Recuento de levaduras totales y viables en cámara de Neubauer Improved	94
6.8 Propagación de levaduras en la planta piloto de Cervecería	95
7. CONCLUSIONES	104
8. ANEXO	105
8.1 LOS ORGANISMOS SON TRANSFORMADORES DE ENERGÍA	105
8.1.1 La Primera ley de la Termodinámica	106
8.1.2 La Segunda ley de la Termodinámica	107
8.1.3 Desequilibrio Metabólico: Clave de la vida	108
8.1.4 El Adenosín Trifosfato (ATP)	109
8.1.5 La célula puede realizar tres clases principales de trabajo	111
8.2 LAS ENZIMAS	112
8.2.1 Clasificación de las Enzimas	113
8.2.2 Sitio Activo	115
8.2.3 Mecanismo de Acción	116
8.2.4 La Glucólisis	116
8.2.5 Respiración aeróbica	118
8.2.6 Ciclo de Krebs	118
8.2.7 Transporte de electrones o Cadena respiratoria.	120
8.2.8 Fosforilación Oxidativa	121

8.2.9 Hipótesis Quimiosmótica	122
8.3 OTRAS VÍAS CATABÓLICAS	125
8.4 FACTORES FÍSICOS Y QUÍMICOS QUE INFLUYEN EN EL METABOLISMO CELULAR	126
8.4.1 Temperatura	126
8.4.2 Actividad de agua (aw)	127
8.4.3 Potencial de Hidrogeniones (pH)	128
8.4.4 Potencial Redox	129
8.5 MEDIOS DE CULTIVO.	130
8.5.1 En función de su consistencia:	130
8.5.2 En función de sus componentes nutricionales	131
8.5.3 Diseño de un medio de fermentación	131
8.5.4 Requerimientos Nutricionales	132
8.6 MICROBIOLOGÍA Y CONTROL MICROBIOLÓGICO EN LA INDUSTRIA CERVECERA	133
8.7 PRINCIPALES PUNTOS DE CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA	136
8.7.1 En las Materias primas	136
8.7.2 Durante la Fermentación	137
8.7.4 En el Equipo de Dispensado	138
8.8 BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA (BPM)	138
8.8.1 Limpieza e Higiene	139
8.8.2 Control sanitario de personal e instalaciones	140
8.9 ASEGURAMIENTO DE LA SEGURIDAD DE LA CERVEZA	144
8.10 ANÁLISIS DE PELIGROS MEDIANTE EL CONTROL DE PUNTOS CRÍTICOS (APCPC)	146
8.10.1 Materias primas	147
8.10.2 Durante el proceso	151

8.11 SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA	152
8.11.1 Envasado	152
8.11.2 Manejo de aguas residuales	153
8.11.3 Manejo de desechos	153
8.11.4 Sabotajes	154
8.12 ALERGENOS	154
9. BIBLIOGRAFÍA	156

INDICE DE CUADROS

	Pagina
CUADRO 1. Poder de resolución del Microscopio	15
CUADRO 2. Esquema bioquímico del proceso de fermentación	24
CUADRO 3. Tabla de la relación (Agua/Malta) del empaste en el mosto	26
CUADRO 4. Tabla Temperatura óptima para algunos procesos de empaste	26
CUADRO 5. Tabla Valores óptimos de pH en la empaste de infusión	27
CUADRO 6. Tabla de Cambios en los rendimientos con el tiempo de extracción.	27
CUADRO 7. Extractos y extractos de fermentación	28
CUADRO 8. Composición de carbohidratos en el mosto	29
CUADRO 9. Los aminoácidos libres en mosto de cerveza	30
CUADRO 10. Composición de Agar YPG suplementado con antibiótico	35
CUADRO 11. Condiciones de esterilización en auto clave	35
CUADRO 12. Característica cultural de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
CUADRO 13. Materias primas del mosto	58
CUADRO 14. Insumos para el aislamiento y propagación de biomasa	58
CUADRO 15. Plan de trabajo	59
CUADRO 16. Procedimiento de propagación de la levadura en el laboratorio	66
CUADRO 17. Propagación N°1 de Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a nivel laboratorio	85
CUADRO18. Linealización N°1 de la función	86
CUADRO 19. Propagación N°2 de Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a nivel laboratorio	87
CUADRO 20. Linealización N°2 de la función	88
CUADRO 21. Propagación N°3 de Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a nivel laboratorio	89
CUADRO 22. Linealización N°3 de la función	90

CUADRO 23. Tinción vital N°1 de células <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91
CUADRO 24. Tinción vital N°2 de células <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	92
CUADRO 25. Tinción vital N°3 de células <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	92
CUADRO 26. Tinción vital N°4 de células <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	92
CUADRO 27. Tinción vital N°5 de células <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	93
CUADRO 28. Tinción vital N°6 de células <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	93
CUADRO 29. Concentración celular en (células/mL) por el método de Neubaur	94
CUADRO 30. Propagación de Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en Biorreactor de Tanque Agitado	98
CUADRO 31. Linealización de la función	99
CUADRO 32. Propagación de Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en Biorreactor de Tanque Agitado	100
CUADRO 33. Linealización de la función	101
CUADRO 34. Propagación de Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en Biorreactor de Tanque Agitado	102
CUADRO 35. Linealización de la función	103
CUADRO 36. Diferencias entre catalizadores biológicos y químicos	113
CUADRO 37. Vitaminas hidrosolubles, sus coenzimas derivadas y sus funciones	114
CUADRO 38. Clasificación de las Enzimas	115
CUADRO 39. Ecuación de la Glucólisis	118
CUADRO 40. Balance parcial de la respiración	120
CUADRO 41. Resumen de la glucólisis y de la respiración	123
CUADRO 42. Clasificación de los Microorganismos en función de su temperatura Metabólica	126
CUADRO 43. Clasificación de los Microorganismos en función pH	128
CUADRO 44. El efecto bactericida Concentración -Temperatura-Tiempo	142

INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Micrografía de células de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
FIGURA 2. Relación entre área superficial y el volumen celular	4
FIGURA 3. Simplificación de la pared celular de la célula de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
FIGURA 4. Membrana plasmática de la célula de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
FIGURA 5. Molécula de Fosfolípido	9
FIGURA 6. Microfotografía electrónica de una mitocondria	11
FIGURA 7. Esquema de la ultra estructura de una mitocondria	12
FIGURA 8. Componentes estructurales de la célula de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
FIGURA 9. Componentes del microscopio Óptico	16
FIGURA 10. Esquema de un Microscopio Óptico	16
FIGURA 11. Velocidad de reacción enzimática Vs Concentración de sustrato	18
FIGURA 12. Efecto de la temperatura (a) y el pH (b) sobre la actividad enzimática	19
FIGURA 13. Perfil de una reacción en presencia de inhibidor competitivo y sin Inhibidor	19
FIGURA 14. Perfil de una reacción en presencia de inhibidor no competitivo y sin Inhibidor	19
FIGURA 15. Resumen del metabolismo de los glúcidos en células eucariotas	22
FIGURA 16. Esquema de una célula de levadura Cerveza en fermentación.	23
FIGURA 17. Curva de maceración Temperatura Vs. Tiempo	28
FIGURA 18. Tinción del Mosto de cerveza con solución de Yodo en Yoduro	29
FIGURA 19. Absorción de carbohidratos por la Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
FIGURA 20. Cepario de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio Agar YPG	38

	Página
FIGURA 21. Componentes de un equipo Biorreactor a nivel de laboratorio	39
FIGURA 22. Escalamiento del cultivo celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
FIGURA 23. Dos tanques del sistema de propagación levadura cervecera	42
FIGURA 24. Dilución seriada de suspensión celular	48
FIGURA 25. Cámara de Neubauer Improved	48
FIGURA 26. Ciclo de crecimiento intermitente	51
FIGURA 27. Operación del sistema de fermentación por lote	54
FIGURA 28. Estriado por agotamiento sobre agar YPG	64
FIGURA 29. Metodología de la Dilución	69
FIGURA 30. Con número de Objetivo 4x	72
FIGURA 31. Con número de objetivo 10x	73
FIGURA 32. Con número de objetivo 40x	74
FIGURA 33. Sentido de conteo de células en cámara	75
FIGURA 34 Cultivo primario de Células contaminadas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	82
FIGURA 35 Aislamiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en placa Petri Sobre Agar YPG suplementado con antibiótico Tetraciclina	82
FIGURA 36 Cepario e Inoculo de clones de Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	84
FIGURA 37. Propagación de Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Safale S-40 en medio de cultivo Mosto Cervecerero en frasco Carlsberg.	84
FIGURA 38. Grafica Ln N°Cel/ml Vs T(h) a nivel Laboratorio	85
FIGURA 39. Grafica de Concentración [s] Vs T (h) a nivel Laboratorio	86
FIGURA 40. Grafica Ln N° Cel/ml Vs T(h) a nivel Laboratorio	87
FIGURA 41. Grafica de Concentración [s] Vs T (h) a nivel Laboratorio	88

	Página
FIGURA 42. Grafica Ln N°Cel/ml Vs T(h) a nivel Laboratorio	89
FIGURA 43. Grafica de Concentración [s] Vs T (h) a nivel Laboratorio	90
FIGURA 44. Micrografía de la Tinción vital de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	93
FIGURA 45. Muestra de Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre placa	95
FIGURA 46. Birreactor Batch modelo Tanque Agitado de capacidad Operativa de 1hL	96
FIGURA 47. Vista de perfil del Birreactor Batch modelo Tanque Agitado	97
FIGURA 48. Grafica Ln N°Cel/ml Vs T(h) a nivel piloto	98
FIGURA 49 Grafica de Concentración [s] Vs T (h) a nivel piloto	99
FIGURA 50 Grafica Ln N°Cel/ml Vs T(h) a nivel piloto	100
FIGURA 51 Grafica de Concentración [s] Vs T (h) a nivel piloto	101
FIGURA 52 Grafica Ln N°Cel/ml Vs T(h) a nivel piloto	102
FIGURA 53 Grafica de Concentración [s] Vs T (h) a nivel piloto	103
FIGURA 54 Flujo de energía y materia en un ecosistema	106
FIGURA 55 Molécula de (ATP)	109
FIGURA 56 El ciclo del ATP	109
FIGURA 57 Oxido-reducción de la coenzima NAD+	111
FIGURA 58 Tipos de trabajo celular que utilizan ATP	111
FIGURA 59 Perfil de energía de una reacción exergónica	112
FIGURA 60 Mecanismo de acción de una enzima	116
FIGURA 61 Resumen de las dos etapas de la glucólisis	117
FIGURA 62 Esquema simplificado del Ciclo de Krebs	119
FIGURA 63 Diagrama de la cadena respiratoria y de la Fosforilación Oxidativa asociada	121
FIGURA 64 Esquema comparativo de la quimiosmosis en la mitocondria y el cloroplasto.	123

	Página
FIGURA 65 Resumen de la Glucólisis y de la Respiración	124
FIGURA 66 Vías principales del catabolismo y anabolismo en la célula	125
FIGURA 67 Diagrama de flujo de la planta de producción de Cerveza	147

1. INTRODUCCIÓN

Es un reto para el Ingeniero Químico desarrollarse en el campo de la Industria Cervecera en la cual debe mantener un control total del proceso fermentativo orientado o dirigido, que garantice la estabilidad química y microbiológica así como las características sensoriales de la cerveza final, no basta solo con emular las condiciones óptimas de operación. Un problema operacional frecuente es no contar con una metodología para cuantificar adecuadamente el requerimiento de un inóculo de células de *Saccharomyces cerevisiae* su volumen y la concentración de células/mL vitales y viables necesarias para la fermentación óptima de un mosto de malta de cebada. Un defecto en el volumen y concentración del inóculo necesario para fermentar un mosto de malta de cebada, con una baja concentración de células vitales y viables, trae como consecuencia prolongados tiempos de conversión y deficiente fermentación, incompleta o truncada. Un exceso en el inoculo con alta concentración de células vitales y viables, aceleraría el procesos fermentativo pero le transfiere a la cerveza un sabor desagradable por la liberación del material intracelular, como consecuencia de la autólisis que sufre el excesivo número de células de levadura. El proceso de fermentación del mosto de malta de cebada implica un alto riesgo de contaminación por el manipuleo de biomasa celular de levadura empleada como inoculo sobre un mosto de malta de cebada. Las células de *Saccharomyces cerevisiae* contaminadas con bacterias ácido lácticas causan problemas graves de turbidez, olores y bouquet anómalos en la cerveza final, El presente trabajo de Tesis propone como soluciones a estos problemas en el proceso de fermentación durante la producción de cerveza lo siguiente:

- El Ingeniero Químico dedicado a la Industria Cervecera adquiera un conocimiento básico de Microbiología Industrial que le permitan minimizar los riesgos de contaminación microbiológica y concebir a las células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* como micro factorías las cuales bajo condiciones controladas de fermentación, metabolizan el mosto de malta de cebada en un producto final comercialmente llamado cerveza.

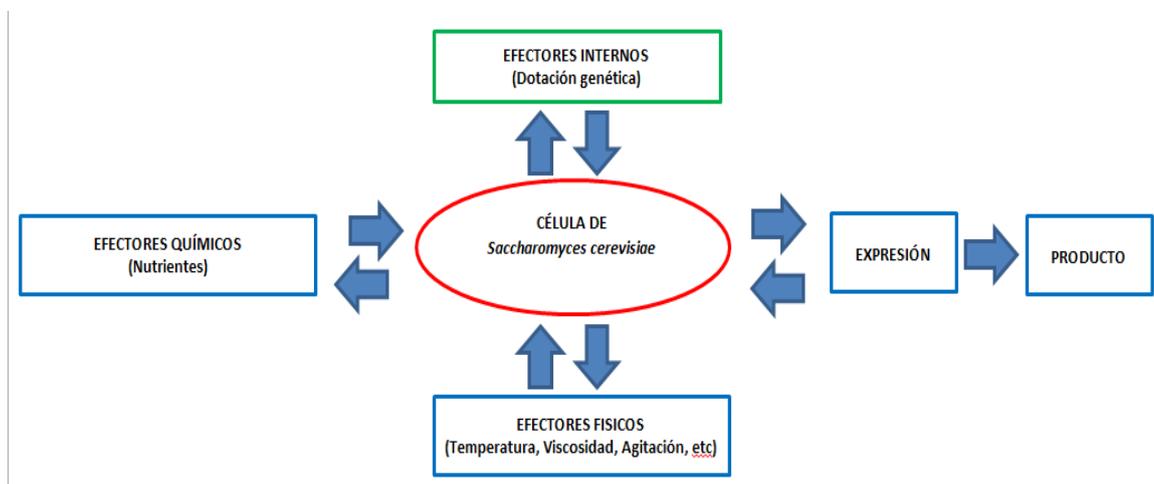
- Estandarizar una técnica de reactivación, escalamiento y método cuantificación de un cultivo Axénico de células de *Saccharomyces cerevisiae* empleada como inóculo para la fermentación óptima del mosto de malta de cebada, en la producción de cerveza. Para la realización del siguiente trabajo de tesis se complementó la formación profesional en Ingeniero Química con una segunda carrera profesional en Biología Microbiología y Parasitología en la misma casa de estudios. Para llevar a cabo el desarrollo experimental se diseñó y construyó dos Biorreactores uno a nivel de laboratorio de 4L de capacidad, tipo Airlift y el segundo Biorreactor con capacidad de 100L tipo Tanque Agitado, para los estudios de reactivación, propagación y escalamientos sucesivos de los cultivos de células de *Saccharomyces cerevisiae*. Dichos equipos se encuentran en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Ciencia Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

2.FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1-LA CÉLULA DE LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*

Las Levaduras comprenden a la actualidad, 39 géneros y 350 especies. Se identifican y clasifican basándose en características morfológicas y fisiológicas. Entre los aspectos morfológicos considerados, se encuentran el tamaño y las formas de las células, en medio sólido y líquido especificados ya que pueden presentar Dimorfismo, el modo de reproducción y si forma velo en la superficie o sedimenta en un medio líquido. Dentro de las características fisiológicas consideradas, se encuentra si puede crecer y fermentar en un determinado carbohidrato y si puede usar o no determinadas fuentes de nitrógeno como los nitratos. Las células de levadura pueden ser ovales, esféricas, tener forma de limón o de cigarro puro, pueden dividirse mediante gemación. La levaduras *Saccharomyces cerevisiae* son hongos unicelulares Eucarióticos, heterótrofos, osmotróficos (no ingieren sus alimentos lo absorben por digestión externa del sustrato empleando exoenzimas) se reproducen por gemación. Los Hongos son un grupo aparte no son consideradas células animales por que presentan pared celular externa que la recubre compuesta polisacáridos de celulosa y quitina, tampoco son consideradas células vegetales ya que carecen de cloroplastos y no realizan fotosíntesis. Una célula de una levadura de cerveza típica tiene, cuando se halla completamente desarrollada entre 8 y 14 μm de diámetro y una masa de materia seca de aproximadamente 40pg. Por tanto 10^{12} células desecadas pesan unos 40g. En vivo prensado, ese número de células pesan unos 200g. TUBB y HAMMOND en (1987)definieron las características más importantes para una levadura de cervecería:

- Una fermentación rápida pero sin exceso de crecimiento en biomasa de la levadura
- Una buena conversión de la maltosa y de la maltotriosa en etanol
- Resistencia al etanol
- Resistencia a la presión osmótica
- Perfiles aromáticos equilibrados y reproducibles
- El carácter de flocular eventualmente
- Una buena estabilidad genética a lo largo del tiempo



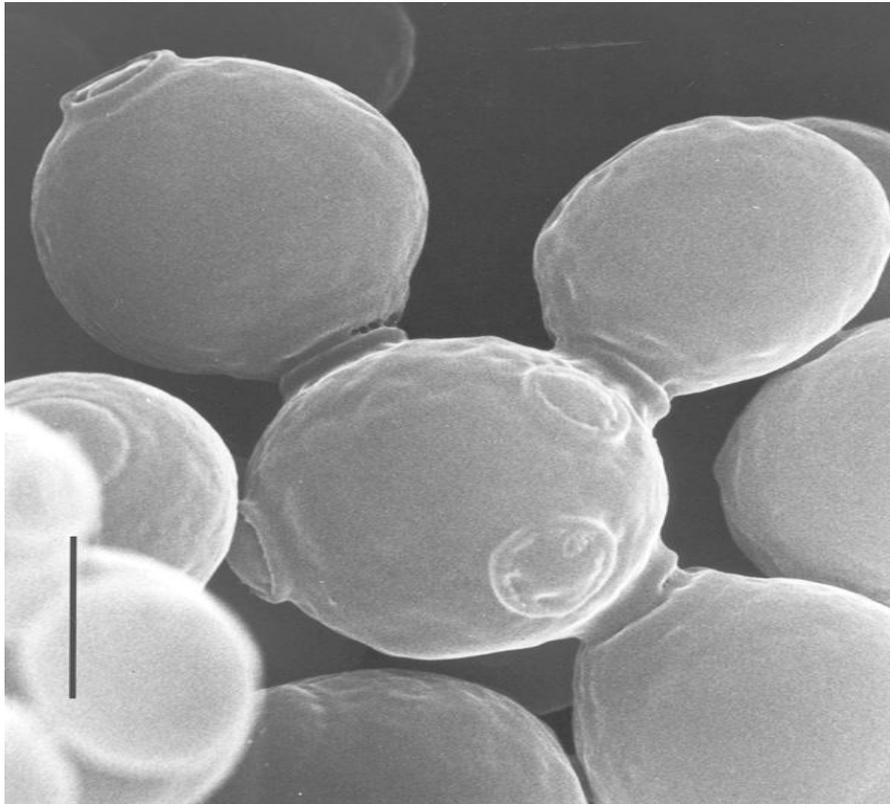


Figura 1 .Micrografía de células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* a mil aumentos (Gracias a Alastair Pringle AnheuserBusch,Inc.) - La barra representa 5 mm. Figura 284 Manual de elaboración de la cerveza

2.1.1 Dimensión de las Células. Las células procariotas presentan tamaños que van desde 0.1- 0.2 μm de ancho sin embargo las dimensiones de un Eucariota de tipo medio, como *Saccharomyces cerevisiae* .A efectos comparativos, una célula Eucariota puede variar de 2 a más de 200 μm De diámetro, por lo tanto las células procariotas son más pequeñas que las Eucariotas. Las células deben captar alimento y otros materiales a través de su membrana plasmática y deben eliminar los productos de desecho, generados en las distintas reacciones metabólicas rápidamente antes de que estos se acumulen hasta niveles tóxicos para la supervivencia celular. Por lo tanto, las células son pequeñas, de modo que en ellas las moléculas recorren distancias cortas, lo que acelera las actividades celulares. Además, a mayor superficie celular, mayor es el transporte de moléculas a través de la membrana, siendo importante para la continuidad de los procesos metabólicos la proporción superficie celular sobre volumen celular. Por lo tanto, el volumen celular aumenta más que su superficie a medida que la célula crece, determinando el límite superior al tamaño de la célula en cuestión. Esta célula sólo podrá iniciar el proceso de división celular (previa duplicación de su ADN) o perecerá.

Con respecto a su tamaño las células pequeñas tiene más superficie relativa disponible respecto de las grandes. Esto se hace más patente en el caso de los cuerpos esféricos en los que el volumen es una función del cubo del radio, mientras que la superficie es una función del cuadrado del radio en relación de la superficie/volumen (S/V) de una esfera puede ser expresado como $3/r$ por lo tanto una célula de radio pequeña pose una relación (S/V) mayor. Por otra parte, debemos recordar que en las células el material Genético (localizado en el núcleo, en células eucariontes), posee un área limitada de influencia sobre el citoplasma circundante, que es el que incrementa marcadamente su tamaño durante el crecimiento celular, siendo otra limitante del tamaño celular la relación núcleo/citoplasma.

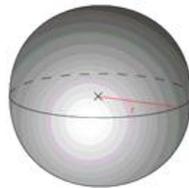


Figura $r_1 \mu\text{m}$

Área de de la superficie $(4\pi r_1^2) = 12.6 \mu\text{m}^2$

Volumen $(4/3 \pi r_1^3) = 4.2 \mu\text{m}^3$

Relación: $\frac{\text{Superficie}}{\text{Volumen}} = \frac{12.6}{4.2} = 3$

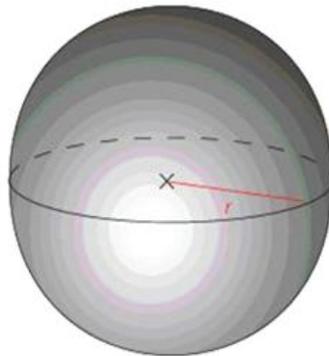


Figura $r_2 \mu\text{m}$

Área de de la superficie $(4\pi r_2^2) = 50.3 \mu\text{m}^2$

Volumen $(4/3 \pi r_2^3) = 33.5 \mu\text{m}^3$

Relación: $\frac{\text{Superficie}}{\text{Volumen}} = \frac{50.3}{33.5} = 1.5$

Figura 2. Relación entre área superficial y el volumen celular. El tamaño del volumen celular implica una disminución de la relación superficie/volumen

2.2 CITOLOGÍA DE LA CÉLULA DE *Saccharomyces cerevisiae*

2.2.1 La pared celular. La pared celular de los hongos posee diferentes constituyentes químicos como polisacáridos, proteínas, lípidos y otras sustancias. La constitución varía entre las diferentes especies. También varía con la edad del hongo, ya que sustancias que pueden estar presentes en las hifas jóvenes, desaparecen en las más viejas o depositar otros materiales y enmascarar la presencia de constituyentes iniciales, también la composición del medio, el pH y la temperatura, influyen en la composición de las paredes de los hongos (Foster, 1949). Una célula de levadura de cerveza cuando se halla plenamente desarrollada tiene, una masa de materia seca, entre 8 y 14 pg. Por tanto 10^{12} células desecadas pesan unos 12g. El examen de microscopía revela que cada célula está rodeada de una pared y que en el interior de la misma se pueden distinguir pocas estructuras salvo una o más vacuolas. Para observar su núcleo y varios otros orgánulos es necesario recurrir a las preparaciones teñidas o a la microscopía de contraste de fases. Las células de *Saccharomyces cerevisiae* presenta una humedad de 70-80% y pared celular similar a las células de los vegetales la cual representa el 30% del peso seco total y tiene un grosor de 100-200nm. Está constituida aproximadamente de un 40% de β glucano, 40% de α mananos, 8% de proteínas, 7% de lípidos, 3% de sustancias inorgánicas, 2% de hexosamina y quitina. El glucano está unido a una proteína y representa el componente estructural más abundante, se halla fundamentalmente en la cara interna de la pared. El manano también se encuentra ligado a la proteína, a veces a través de hexosamina, y tiende a localizarse en la superficie de la célula se encuentra cargada, debido a la presencia de grupos carboxilo y fosfato que al pH de la cerveza, la confieren una fuerte carga neta negativa y tiene hidrofobicidad, la carga negativa se atribuye a las cadenas fosfato localizadas en la pared externa de manoproteínas y puede demostrarse por tinción con Azul de cian. La hidrofobicidad es debida a los lípidos de la pared externa y a los grupos fosforilados del complejo de manoproteínas. También se encuentran grupos amino, pero sólo les confieren regiones locales de carga positiva. Las paredes celulares se pueden disolver mediante el uso de una preparación enzimática mixta. La pared celular es permeada por alguna de las enzimas secretadas por la levadura, el más importante es la Invertasa, que hidroliza la sacarosa antes de que penetre a la célula, entre ellos se encuentra también la fosfatasa. *Saccharomyces carlsbergensis* segrega la melibiosa, pero *Saccharomyces cerevisiae* no. Algunas levaduras segregan cantidades apreciables de proteasas, pero las del género *Saccharomyces* sólo tiene una actividad de este tipo limitada. La superficie celular de la levadura de fermentación alta (ale) está cubierta por pequeñas protuberancias microfibrilares (al parecer de manoproteínas) que les confiere una aspereza que le permite que las células asciendan a la superficie durante la fermentación entre la capa externa de manoproteínas y la capa interna en la que predomina el glucano, existen una serie de capas intermedias compuestas de ambas especies químicos.

Moléculas estructurales de la pared celular α -D-Manosa y β -D-N-Acetilglucosamina

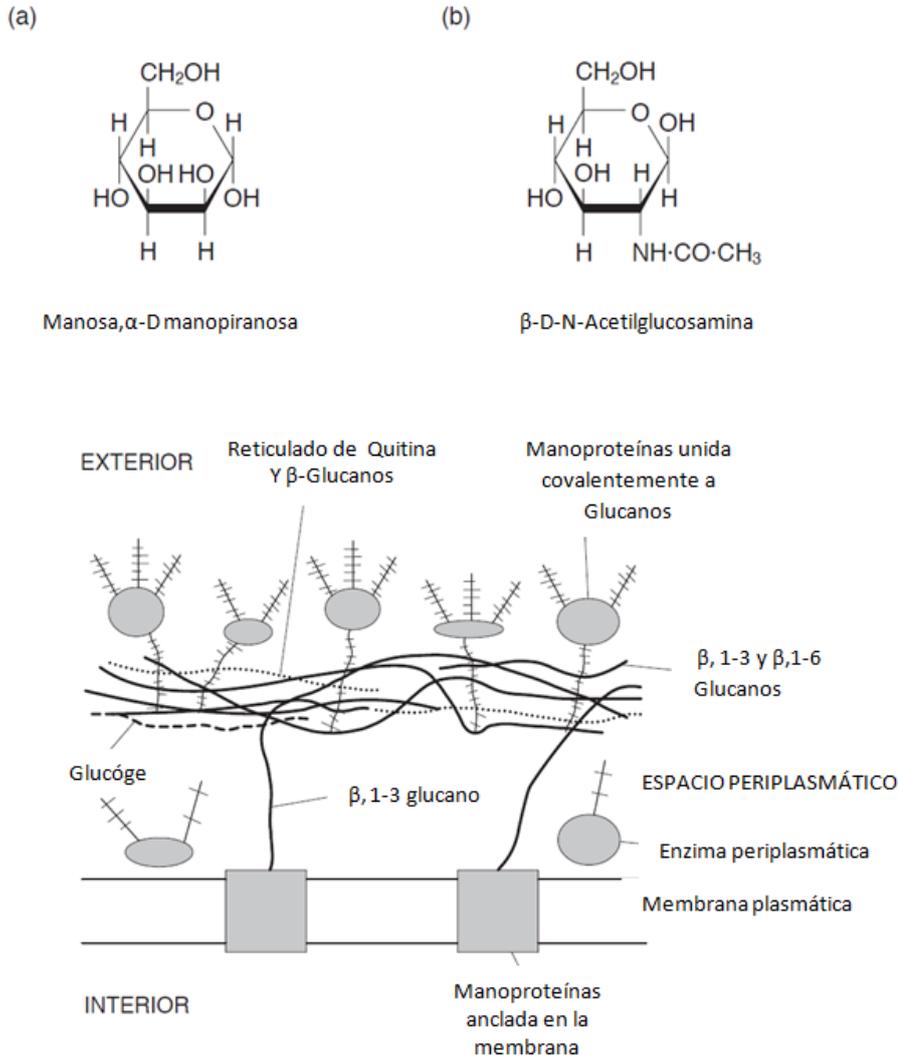


Figura 3. Simplificación de la pared celular de la célula de *Saccharomyces cerevisiae*

2.2.2 Espacio Periplasmático. El espacio Periplasmático es la zona fina entre la superficie externa de la membrana plasmática y la superficie interna de la pared celular. Las proteínas secretadas, que no son capaces de impregnar la pared celular se encuentran aquí. Esto incluye las enzimas como la Invertasa, fosfatasa ácida y melibiosa. Por ejemplo, la sacarosa se descompone en el espacio Periplasmático por acción de la enzima Invertasa en sus componentes fructosa y glucosa.

2.2.3 Membrana Citoplasmática. Estructuralmente está compuesta por una bicapa fosfolipídica. El colesterol está presente en las células animales, pero está ausente, en general, en plantas, hongos y procariontes (salvo micoplasmas). La membrana plasmática también contiene múltiples proteínas con diversas funciones. Podemos

dividirlas en dos grandes grupos:

- a) Proteínas integrales de membrana, atraviesan la membrana de lado a lado
- b) proteínas periféricas de membrana, están en contacto con la membrana, pero no la atraviesan.

Algunas son enzimas reguladoras, otros receptores hormonales. Existen también proteínas transportadoras y canales reguladoras del movimiento de iones y moléculas a través de la membrana plasmática, de allí su enorme especificidad. Otra función importante de la membrana es la comunicación intercelular y el reconocimiento de diversos tipos de molécula (hormonas, virus, anticuerpos, toxinas, etc.) que interactúan con ella. En general esta función es llevada a cabo por glucoproteínas y glucolípidos, que se encuentran solo en el lado externo de la membrana plasmática. Se cree que los glúcidos juegan un importante papel en la adhesión entre células. A esta capa, de glucolípidos y glucoproteínas se la denomina glucocálix. La membrana Celular citoplasmática de *Saccharomyces cerevisiae* es una estructura fina que rodea completamente a la célula. Es una estructura vital de tan sólo unos 8nm. De espesor que constituye labarrera que separa el interior de la célula (el citoplasma) del exterior. Si se rompe la membrana, se destruye la integridad de la célula liberándose al medio los componentes que la integran y produciéndose la muerte celular o autólisis. La membrana citoplasmática actúa también como una barrera muy selectiva, permitiendo que en el interior de la célula se concentren determinados metabolitos y se excreten las sustancias de desecho.

-Composición Química de la Membrana :

La estructura general de la mayoría de membranas biológicas es una bicapa lipídica. Los fosfolípidos poseen tanto regiones altamente hidrofóbicas (ácidos grasos) como regiones relativamente hidrofílicas (glicerol) y pueden presentarse en múltiples formas químicas

distintas debido a la variación en la composición de ácidos grasos y de los compuestos fosforilados que se unen al esqueleto de glicerol. Cuando los fosfolípidos se agregan en soluciones acuosas tienden a formar bicapa de manera espontánea, los ácidos grasos se orientan hacia el interior, manteniéndose en un ambiente hidrofóbico, mientras que las porciones hidrofílicas son expuestas a la fase acuosa la estructura de bicapa en la membrana representa probablemente la organización más estable que puedan alcanzar la moléculas lipídicas en un entorno acuoso. Esta unidad de membrana ,como se denomina, consta de una bicapa fosfolipídica en la que existen proteínas embebidas las principales proteínas de membrana poseen una región altamente hidrofóbica que interacciona con las zonas apolares de los ácidos grasos, y atraviesan las membranas presentes de regiones superficiales tanto en el exterior como en el interior de la célula, la estructura global de la membrana citoplasmática se estabiliza mediante puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Además algunos cationes como el Calcio y el Magnesio también contribuyen a la estabilidad de la membrana a través de las interacciones iónicas con los grupos polares de carga negativa presentes en los fosfolípido.

La capa externa de la membrana citoplasmática contacta con una variedad de proteínas implicadas en la unión del sustrato y el procesamiento de grandes moléculas para el transporte al interior celular (proteínas periplasmáticas) la cara interna de la membrana citoplasmática se orienta hacia el citoplasma e interacciona con proteínas involucradas en reacciones de obtención de energía y otras importantes funciones celulares. A pesar de que las representaciones esquemáticas de la membrana tiene un aspecto rígido la membrana citoplasmática es en realidad bastante fluida, pues los fosfolípidos y las proteínas presentan una considerable libertad de movimiento dentro de la membrana la medida de viscosidad de la membrana demuestran que su viscosidad es semejante a la de los aceites de bajo grado. Por tanto las membranas pueden ser consideradas como mosaico fluido en el existen proteínas globulares con orientaciones específicas que atraviesan la bicapa lipídica, que presenta a la vez una estricta organización y una elevada movilidad. Este tipo de organización confiere importantes propiedades funcionales a las membranas.

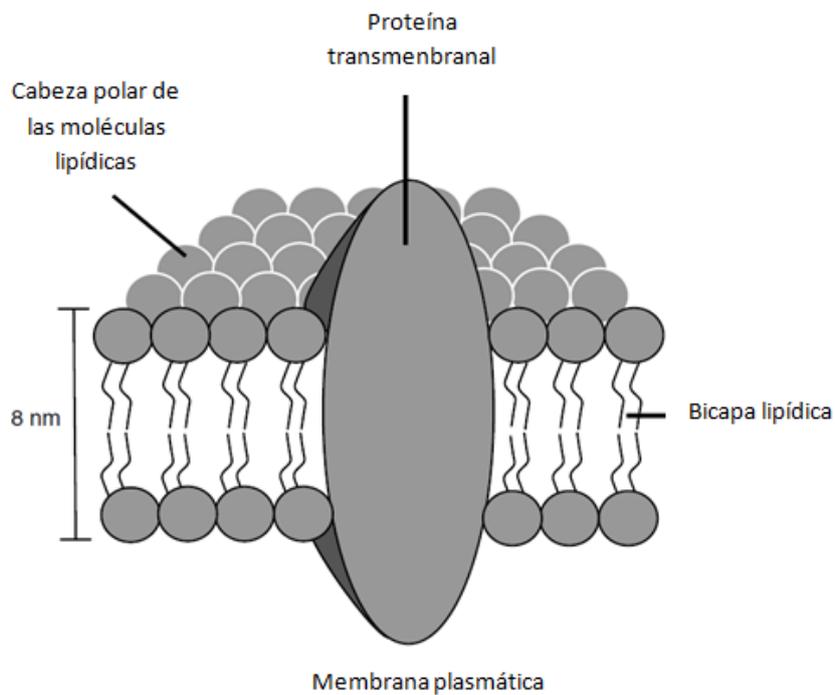


Figura 4. Membrana plasmática de la célula de *Saccharomyces cerevisiae*

Estructura química de Fosfolípido

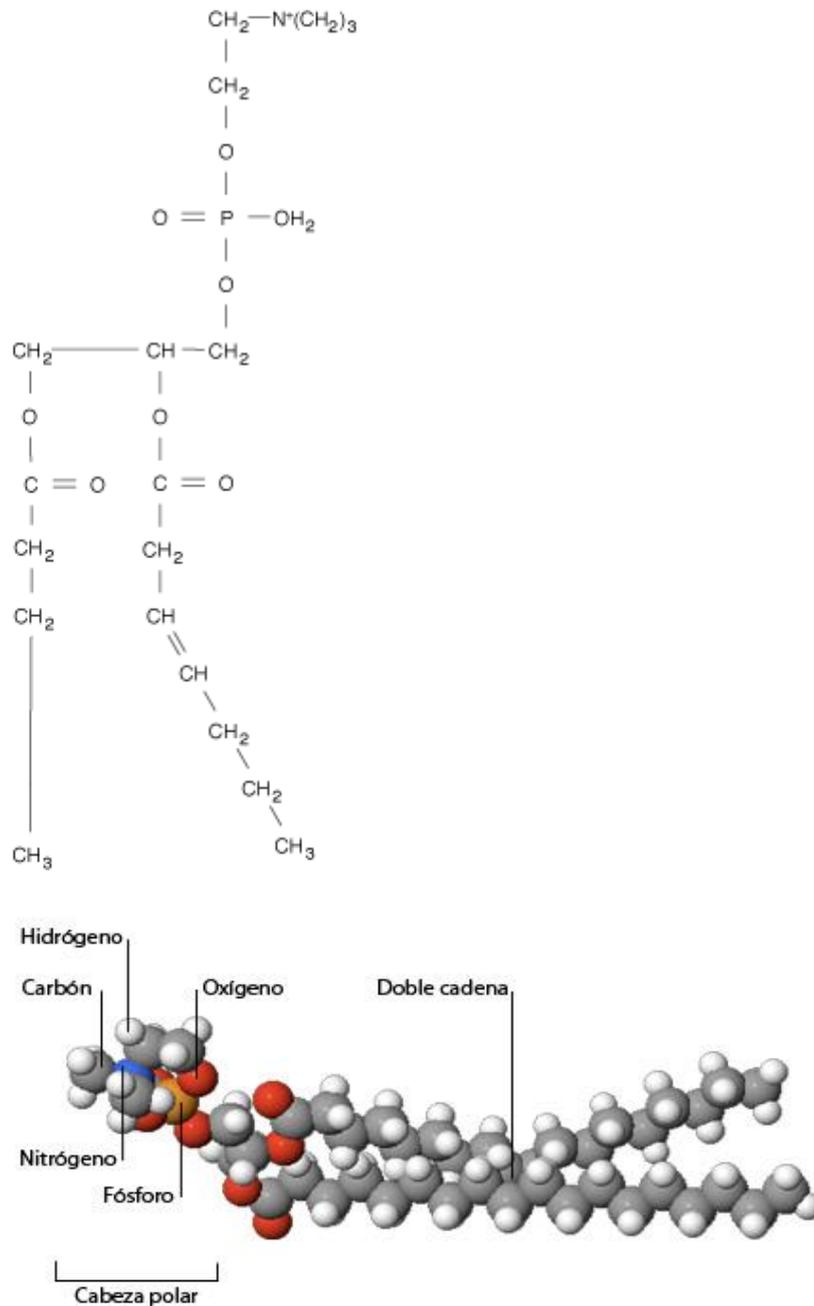


Figura 5. Molécula de Fosfolípido

-Función de la membrana citoplasmática: Desde luego, si la biomenbrana fuera una barrera impermeable por completo, la célula estaría totalmente aislada del medio y los organelos de su interior estarían incomunicados entre sí. Por el contrario si las

membranas fueran del todo permeables todas las sustancias podrían pasar indistintamente de una región a otra.

En realidad no ocurre ninguno de tales extremos. Más bien las propiedades de transporte de membrana son intermedias, se trata de divisiones semipermeables, algunas sustancias pueden atravesarlas pero otras no. Según la sustancia y membrana de que se trate, además la membrana es el lugar donde se asientan muchas proteínas, muchas de las cuales son enzimas o están implicadas de una u otra manera en el transporte de sustancias hacia el interior y hacia el exterior de la célula, también la membrana celular es el sitio donde se produce energía en la célula la membrana puede estar en una forma energéticamente cargada en la que existe separación de los protones (H^+) y de los iones hidroxilo (OH^-) a través de su superficie esta separación de carga es una forma de energía potencial presente en una batería cargada, este estado energético de la membrana se conoce como Fuerza Motriz de Protones (FMP) Es el responsable del mantenimiento de muchas de las funciones celulares que requieren energía, tales como alguna forma de transporte, la movilidad y la biosíntesis de la Moneda energética de la célula es decir el ATP.

En el interior de la célula (el citoplasma) contiene una solución en fase acuosa de sales, azúcares, aminoácidos, vitaminas, coenzimas y una gran variedad de otras sustancias solubles. Las características hidrofóbicas de la membrana le permiten funcionar como una barrera estricta. Aunque algunas pequeñas moléculas hidrofóbicas, pueden pasar la membrana por difusión, las moléculas hidrofílicas y cargadas no lo atraviesan y deben ser transportadas de modo específico. Incluso, una sustancia tan pequeña como el ion de hidrógeno (H^+) no es capaz de pasar la membrana citoplasmática por difusión. El transporte de las sustancias hacia adentro y hacia afuera de las células, así como su traslado entre el citoplasma y las diversas organelas subcelulares (mitocondria, núcleo, etc.) está determinada por la membrana y constituye una de las funciones más importantes de éstas.

2.2.4 El Núcleo Celular. Las diversas partes de una célula eucariótica interactúan de forma integrada. Esto es posible porque existe un centro primordial de control: el núcleo celular. Una membrana doble, la envoltura nuclear (constituida por dos unidades de membrana), controla el transporte, muy selectivo, de sustancias entre el núcleo y el citoplasma. El pasaje se realiza a través de los poros nucleares. La envoltura nuclear posee ribosomas adheridos a la cara citoplasmática y una estructura proteica en su parte interna llamada lamina nuclear, que sirve como esqueleto al núcleo. En el interior del núcleo, se encuentra el material genético (ADN) asociado a proteínas básicas llamadas histonas, formando una estructura fibrilar muy enrollada denominada cromatina y el nucléolo, sitio de ensamblaje de los ribosomas (estructuras esenciales para la síntesis de proteínas, formados por ARN ribosomal y proteína). El ARN ribosómico se sintetiza en el nucléolo, y las proteínas ribosómicas en el citoplasma, para pasar después al núcleo y de allí al nucléolo, donde se unen al ARN ribosomal para formar los ribosomas. Rodeando al núcleo encontramos el citoplasma, coloide donde predominan como constituyentes agua, iones, enzimas y donde se encuentran incluidos los organelos celulares.

El citoplasma se encuentra separado del ambiente exterior por la membrana plasmática.

2.2.5 Estructura de las Mitocondrias. Las mitocondrias están rodeadas por dos membranas, una externa que es lisa y una interna que se pliega hacia adentro formando crestas. Dentro del espacio interno de la mitocondria en torno a las crestas, existe una solución densa (matriz o estroma) que contiene enzimas, coenzimas, agua, fosfatos y otras moléculas que intervienen en la respiración.

La membrana externa es permeable para la mayoría de las moléculas pequeñas, pero la interna sólo permite el paso de ciertas moléculas como el ácido pirúvico y ATP y restringe el paso de otras. Esta permeabilidad selectiva de la membrana interna, tiene una importancia crítica porque capacita a las mitocondrias para destinar la energía de la respiración para la producción de ATP. La mayoría de las enzimas del ciclo de Krebs se encuentran en la matriz mitocondrial. Las enzimas que actúan en el transporte de electrones se encuentran en las membranas de las crestas. Las membranas internas de las crestas están formadas por un 80 % de proteínas y un 20 % de lípidos. En las mitocondrias, el ácido pirúvico proveniente de la glucólisis, se oxida a dióxido de carbono y agua, completándose así la degradación de la glucosa. El 95 % del ATP producido se genera, en la mitocondria. Las mitocondrias son consideradas orgánoides semiautónomos, porque presentan los dos ácidos nucleicos (del tipo procarionte)



Figura 6. Microfotografía electrónica de una mitocondria. Se observan las invaginaciones de la membrana interna que forman las características crestas, que identifican esta Organela.

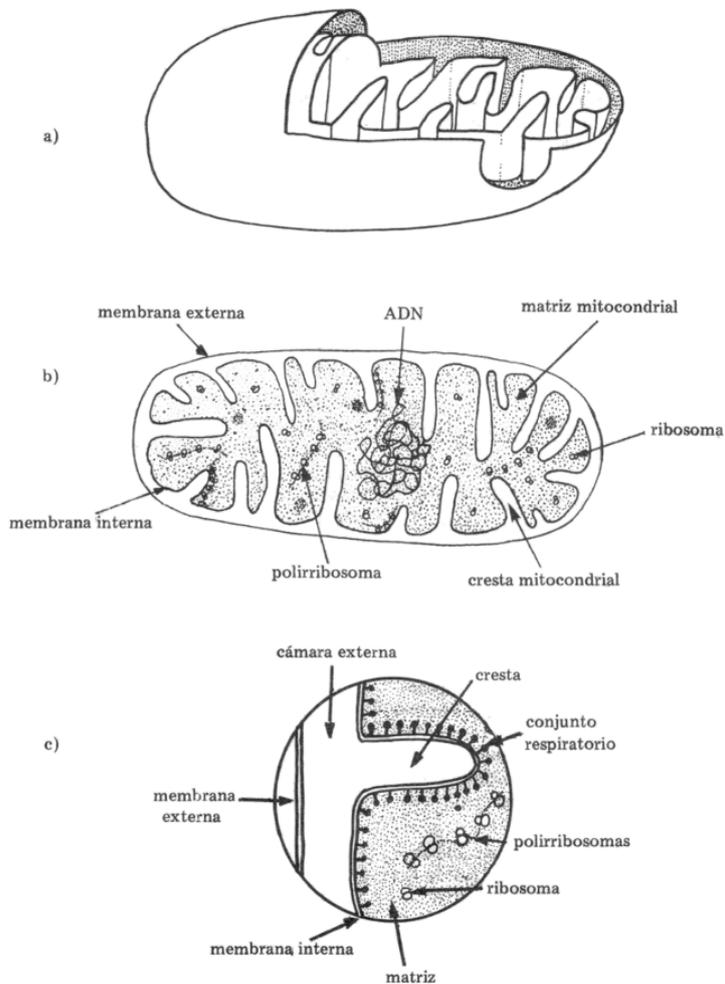


Figura 7. Esquema de la ultraestructura de una mitocondria. (a) Esquema tridimensional, (b) Esquema de un corte al M.E.T. (c) Cresta mitocondrial (detalle).

Como puede apreciarse en la fig.7 (c), las crestas mitocondriales aparecen cubiertas por partículas en forma de hongo, que tienen un tallo más fino que las unen a la membrana. Estas estructuras son las llamadas partículas F1 y representan una porción de la ATPasa especial que interviene en el acoplamiento entre la oxidación y la fosforilación. Las partículas F1 se encuentran en la membrana interna, del lado relacionado con la matriz; le confieren una asimetría característica relacionada con la función de la ATPasa (este punto se verá más detalladamente al referirnos a la hipótesis Quimiosmótica). Para concluir, es importante destacar que el ciclo de Krebs se lleva a cabo en la matriz mitocondrial; mientras que el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa se producen a nivel de las crestas mitocondriales. Ingreso al ciclo de Krebs.

2.3 OTRAS ESTRUCTURAS CITOPASMÁTICAS

2.3.1 Las Vacuolas. Las Vacuolas son parte de un sistema intramembranoso que incluye el retículo endoplasmático, y son fácilmente visibles con el microscopio de luz. Ellos sirven de almacenes dinámicos de nutrientes y ofrecen un lugar para la degradación de las macromoléculas. También son claves en las proteínas intracelulares. El tráfico de las levaduras. La forma y el tamaño de las vacuolas durante el ciclo celular. Las células maduras contienen grandes vacuolas que se fragmentan en pequeñas vesículas en la formación de yemas, se inicia más tarde el ciclo celular, las pequeñas vacuolas se funden para formar producir una vacuola única en la célula madre e hija. Las vacuolas están delimitadas por una sola membrana llamada tonoplasto que contiene proteasas e hidrolasas, y que tiene metabolitos como aminoácidos. El retículo endoplasmático, el complejo de Golgi y vesícula, esta secuencia permite el transporte de las proteínas solubles y unidas a la tanto para secreción extracelular y para el manejo de vacuolas.

2.3.2 Peroxisomas. Los Peroxisomas son vesículas rodeadas por una sola membrana. Los Peroxisomas en las levaduras realizan una variedad de funciones y son también los sitios de los ácidos grasos, y de los ácidos hidrolíticos de degradación celular, El número y el volumen de Peroxisomas es variable y depende de las condiciones externas.

2.3.3 El Retículo endoplasmático. El retículo endoplasmático es un orgánulo grande formado por una red de túbulos y sacos comunicados entre sí, que se extiende desde el núcleo. Interviene en las funciones relacionadas con la síntesis de proteínas, metabolismo de lípidos y algunos esteroides así como el transporte intracelular, está conformado por el Retículo endoplasmático rugoso por el alto número de Ribosomas adheridos a su membrana, el Retículo endoplasmático liso no tiene Ribosomas y participa en el metabolismo de lípidos.

2.3.4 El aparato de Golgi. Son sáculos aplanados rodeados de membrana y apilados unos encima de otros, cuya función es completar la fabricación de algunas Proteínas. Funciona como una planta empaquetadora, modificando vesículas del Retículo endoplasmático rugoso.

2.3.5 El Citosol. El Citosol es la sede principal de la síntesis de proteínas y de la degradación. El citosol está contenido dentro de la membrana plasmática y rodea al Núcleo, representando más de la mitad del volumen celular y está conformado de Ribosomas libres y de proteosomas que son los responsables de la digestión de las proteínas que pueden ser perjudiciales para la célula, el citosol junto con los organelos excepto el núcleo constituye el citoplasma

2.3.6 El Citoesqueleto. El citoesqueleto es un entramado tridimensional de Proteínas que provee soporte interno en las células, organiza las estructuras internas de la misma e interviene en los fenómenos de transporte, tráfico y división celular, consta de microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos.

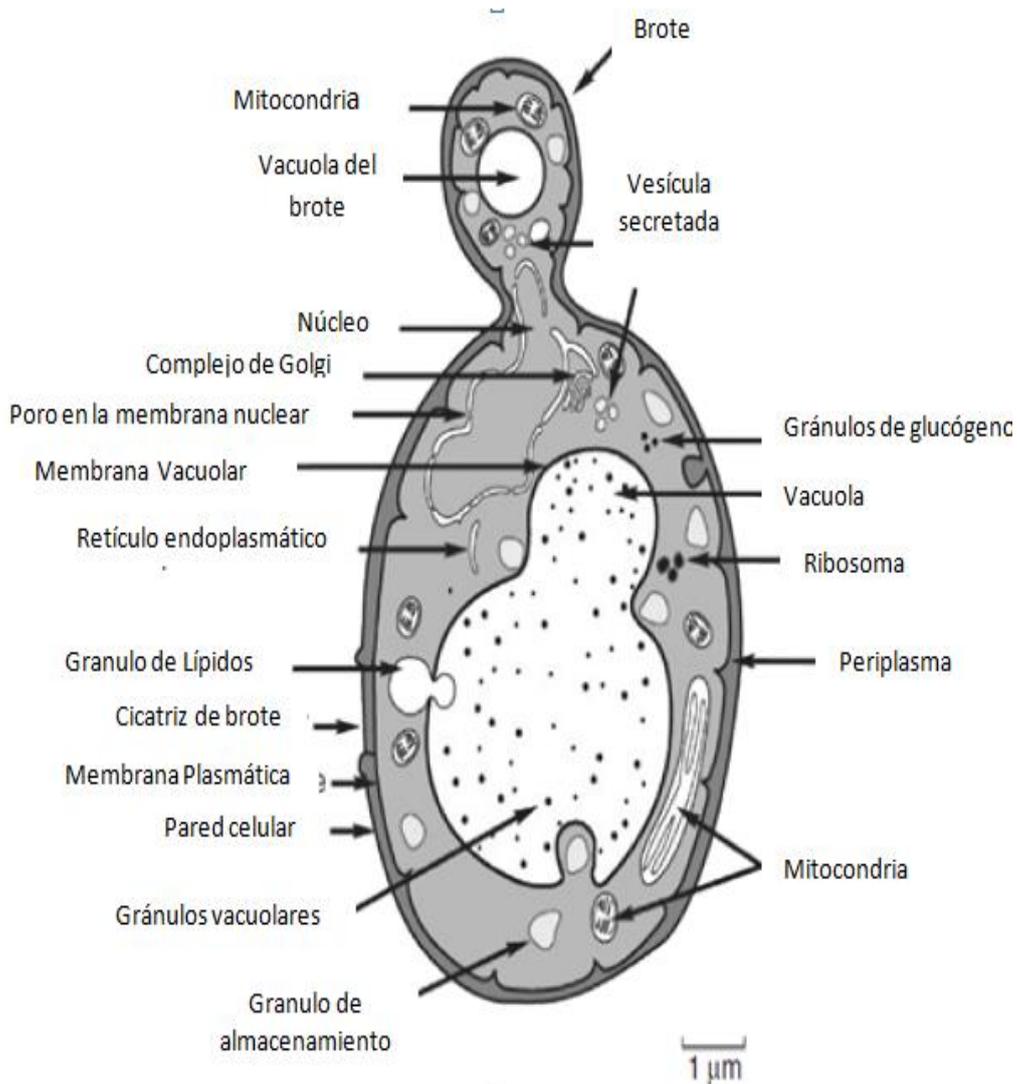


Figura 8. Componentes estructurales de la célula de *Saccharomyces cerevisiae*

2.4 EL MICROSCOPIO ÓPTICO.

El descubrimiento y estudio temprano de la microbiología progresó con la invención y mejora de los microscopios en el siglo XVII. Los microscopios de varios tipos son aún herramientas indispensables para el estudio de las células. Los microscopios primeramente usados en el Renacimiento tanto como los que son utilizados en los laboratorios hoy, son *microscopios ópticos*. La luz visible pasa a través de la muestra y de las lentes de vidrio por donde la luz es refractada (“doblada”) de tal manera, que la imagen del espécimen es amplificada cuando se proyecta en el ojo. Dos valores importantes en microscopia son el *aumento* y el *poder de resolución*. Entendemos por aumento a las dimensiones aparentes de los objetos comparados con su tamaño real. El poder de resolución es la medida de la nitidez de la imagen; es la capacidad del instrumento para brindar imágenes distintas de dos puntos cercanos. El microscopio óptico nunca puede resolver detalles menores a 0,2nm, la medida de una pequeña bacteria. Esta resolución es limitada por la longitud de onda de la luz visible usada para iluminar la muestra. Los microscopios ópticos o de luz pueden aumentar efectivamente alrededor de 1000 a 1500 veces el tamaño de la muestra real; si se incrementase el aumento la imagen proyectada sería borrosa. La mayoría de las mejoras en microscopia de luz del comienzo de este siglo ha involucrado nuevos métodos para aumentar el contraste. Sin estas técnicas sería imposible para el ojo humano el conocimiento del mundo celular. La mayoría de las organelas son demasiado pequeñas para ser visualizadas por la microscopia de luz. El poder de resolución está inversamente relacionado con la longitud de onda (λ) de la radiación que un microscopio usa y un haz de electrones tiene longitudes de onda mucho más cortas que la luz visible.

Cuadro 1. Poder de resolución del Microscopio

En cualquier tipo de microscopio, el *poder de resolución* depende de la longitud de onda (λ) y de la *apertura numérica (AN) del objetivo* (la capacidad de coleccionar la luz). Así, el límite de resolución, que es la distancia mínima que debe existir entre dos puntos para que puedan ser discriminados como tales, y responde a la siguiente ecuación:

$$\text{Límite de resolución} = 0,61 \lambda / AN$$

A su vez,

$$AN = n \cdot \text{seno } a$$

Donde, n es el índice de refracción del medio que atraviesa el haz y a es el ángulo de apertura nótese que el límite de resolución es inversamente proporcional al poder resolutivo del instrumento, de modo tal que cuanto mayor sea éste, menor será el límite de resolución conseguido.

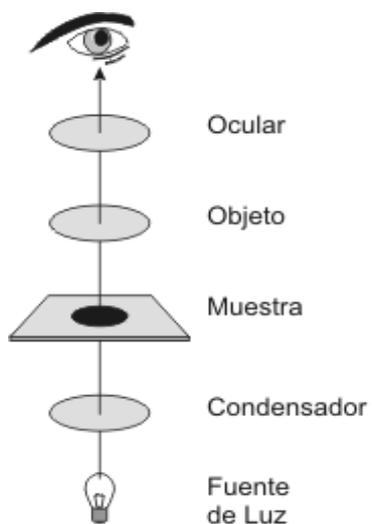


Figura9.Componentes del microscopio Óptico

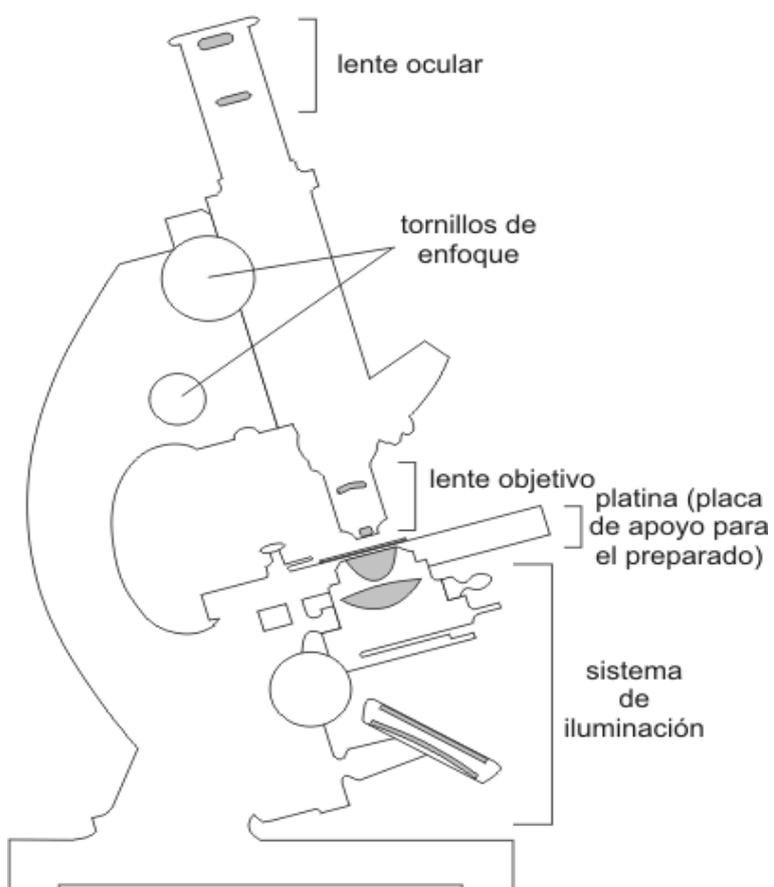


Figura 10 Esquema de un Microscopio Óptico

2.5 LAS ENZIMAS

Todas las reacciones que se efectúan en los seres vivos son catalizadas por enzimas. Estas hacen posible que las reacciones metabólicas se desarrollen a un ritmo razonable, compatible con la vida.

El término catalizador se emplea para referirse a cualquier sustancia que acelera el transcurso de una reacción química, sin intervenir en ella ni como reactivo ni como producto. El catalizador no provoca la reacción solo afecta la velocidad con que ocurre la misma. Esto es posible porque los catalizadores disminuyen la energía de activación como lo indica el siguiente gráfico

2.5.1 Factores que modifican la velocidad de las Reacciones Enzimáticas.

Una determinada reacción química ocurre solo en condiciones termodinámicas favorables, esto es cuando la energía de los reactivos o sustratos es mayor que la energía de los productos. La velocidad con que dicha reacción ocurrirá depende de distintos factores como ser la cantidad de reactivo o sustrato que interviene, la temperatura, el pH, etc.

Como hemos mencionado, las enzimas aumentan la velocidad de las reacciones químicas, sin embargo no las provocan, por lo tanto la concentración de enzimas es otro de los factores que modifican la velocidad de la reacción así como también aquellas sustancias que pueden inhibir la acción de la enzima (inhibidores).

1. Concentración de sustrato.-En general a medida que aumenta la cantidad de reactivos o sustratos la velocidad también aumenta. En el caso de las reacciones químicas conviene aclarar que la velocidad se mide como cantidad de producto formado por unidad de tiempo, las unidades serán: g/s, mol/s, mol/min, etc. De este modo cuanto más reactivo tenemos, más producto se formará. En el caso de las reacciones catalizadas por enzimas, el efecto de la cantidad de sustrato es el siguiente:

A medida que aumenta la cantidad de sustrato la velocidad aumenta en forma lineal (zona proporcional), luego si bien la velocidad continúa aumentando ya no lo hace en forma lineal (zona mixta) hasta que finalmente la reacción alcanza una velocidad máxima que es constante, se vuelve independiente de la cantidad de sustrato (zona de saturación). Esto ocurre debido a que los sitios activos de las enzimas se encuentran todos interactuando con las moléculas de sustrato, por lo tanto hasta que no finalice la reacción la enzima no puede unirse a otro sustrato.

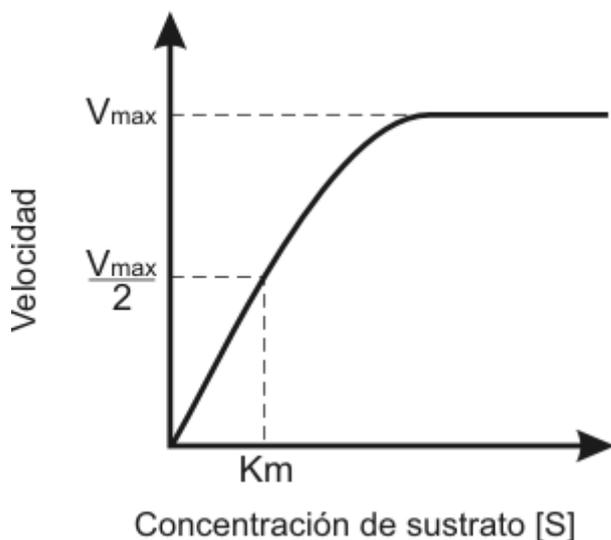


Figura 11. Velocidad de reacción enzimática Vs Concentración de sustrato

- 2. Concentración de enzimas.**-La concentración de enzimas es otro de los factores que modifica la velocidad, cuanto mayor cantidad de enzima este presente, mayor será la velocidad que se alcanzará, debido a que necesito más cantidad de sustrato para alcanzar la saturación.
- 3. Temperatura.**-En general las reacciones ocurren más rápidamente cuando se le otorga calor, ya que el aumento de la temperatura hace que aumente la energía cinética de las moléculas y de esta manera reaccionen con facilidad. Cuando las reacciones están catalizadas por enzimas se produce primero un efecto complementario, es decir, la velocidad va aumentando conforme al aumento de temperatura, sin embargo la velocidad llega a un punto óptimo a partir del cual la velocidad comienza a decaer. No nos olvidemos que las enzimas son proteínas, por lo tanto son susceptibles a la desnaturalización, es decir que la velocidad decae porque las enzimas pierden su actividad biológica como consecuencia de la desnaturalización. Algunas enzimas son termoestables, es decir su actividad biológica permanece aún a temperaturas mayores a 90 °C.
- 4. pH.**-El gráfico de actividad en función del pH es similar al de la temperatura, es decir a pH extremos las proteínas se desnaturalizan, por lo tanto la actividad biológica decae. Algunas enzimas no varían su actividad con el pH sino que esta se mantiene constante en un amplio rango. Otra tendrá el pH óptimo ácido o básico teniendo en cuenta el medio en donde actúan.

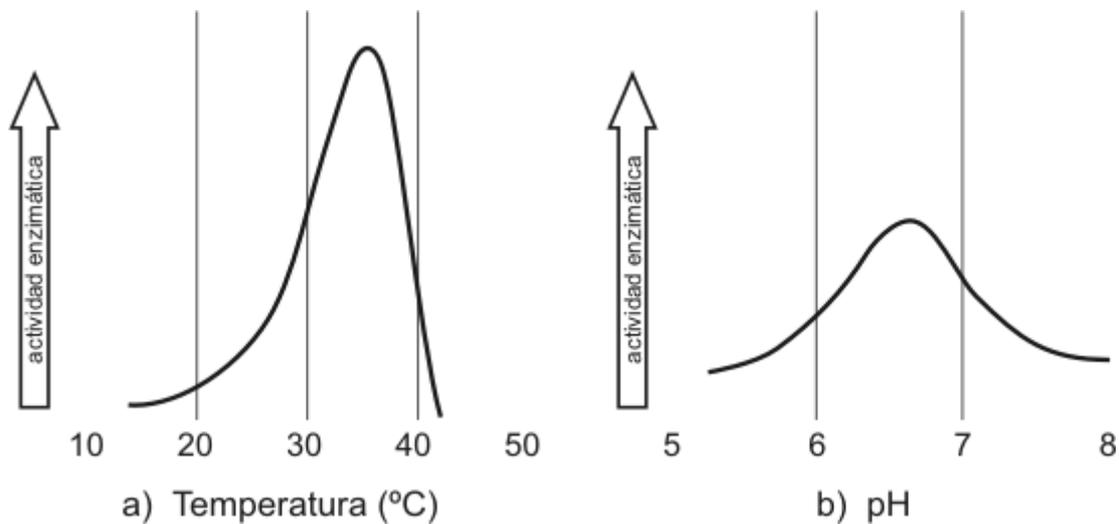


Figura 12. Efecto de la temperatura (a) y el pH (b) sobre la actividad enzimática

5. **Inhibidores.**-Aunque hay muchos ejemplos de inhibidores, los mecanismos de inhibición pueden ser de dos clases: reversibles e irreversibles, también hay mecanismos intermedios.

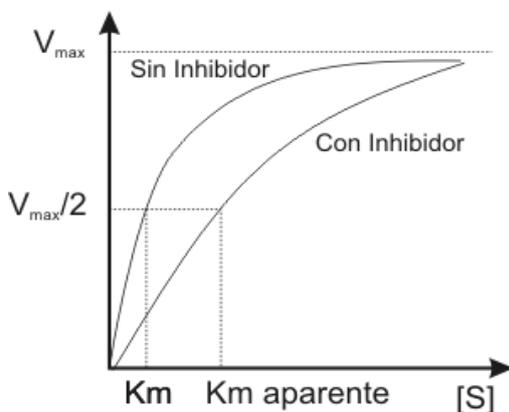


Figura 13. Perfil de una reacción en presencia de inhibidor competitivo y sin inhibidor

5.1. **Inhibidores irreversibles:** estos inhibidores se enlazan con fuerza a la enzima, generalmente se unen covalentemente a algún aminoácido del sitio activo. Existen algunos inhibidores que se conocen como sustrato suicida, que se enlazan al centro activo y químicamente se transforma en una especie reactiva que modifica en forma irreversible al aminoácido del sitio activo.

5.2. **Inhibidores reversibles:** este tipo de inhibidores se disocian fácilmente de las enzimas, dentro de este grupo encontramos los inhibidores competitivos y los no competitivos.

5.2.1 **Los inhibidores competitivos:** compiten con el sustrato por el sitio activo de la enzima, y si aumentamos la cantidad de sustrato, el efecto inhibitor se revierte

alcanzándose la velocidad máxima.

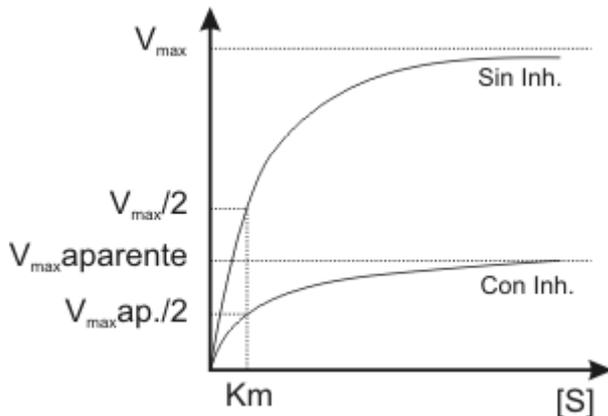


Figura 14. Perfil de una reacción en presencia de inhibidor no competitivo y sin inhibidor

5.2.2. Los inhibidores no competitivos: se enlazan a un sitio distinto del sitio activo, de manera que el inhibidor se puede unir a la enzima libre o bien al complejo enzima sustrato, pero en ninguno de los casos obtendremos productos. El efecto de estos inhibidores no se revierte por el agregado de mayor cantidad de sustrato, de manera que se llega a una velocidad máxima menor que si no tuviera el inhibidor. No es raro observar algunos inhibidores a los cuales no se les puede comprobar el mecanismo exacto de inhibición, siendo en algunos casos un tipo de inhibición mixta.

2.6 METABOLISMO CELULAR OXIDATIVO

El proceso por el cual las células degradan las moléculas orgánicas alimenticias llamada (Sustrato) para obtener energía recibe el nombre de Respiración celular. La respiración celular es una reacción exergónica, donde parte de la energía contenida en las moléculas de alimento es utilizada por la célula para sintetizar ATP. Decimos parte de la energía porque no toda es utilizada, sino que una parte se pierde. Aproximadamente el 40% de la energía libre emitida por la oxidación de la glucosa se conserva en forma de ATP. Cerca del 75% de la energía de la nafta se pierde como calor de un auto; solo el 25% se convierte en formas útiles de energía. La célula es mucho más eficiente. La respiración celular es una combustión biológica y puede compararse con la combustión de carbón, bencina, leña. En ambos casos moléculas ricas en energía son degradadas a moléculas más sencillas con la consiguiente liberación de energía. Tanto la respiración como la combustión son reacciones exergónicas. Sin embargo existen importantes diferencias entre ambos procesos. En primer lugar la combustión es un fenómeno incontrolado en el que todos los enlaces químicos se rompen al mismo tiempo y liberan la energía en forma súbita; por el contrario la respiración es la degradación del alimento con la liberación paulatina de energía. Este control está ejercido por enzimas

específicas. En segundo lugar la combustión produce calor y algo de luz. Este proceso transforma energía química en calórica y luminosa. En cambio la energía liberada durante la respiración es utilizada fundamentalmente para la formación de nuevos enlaces químicos (ATP). La respiración celular puede ser considerada como una serie de reacciones de óxido-reducción en las cuales las moléculas combustibles son paulatinamente oxidadas y degradadas liberando energía. Los protones perdidos por el alimento son captados por coenzimas. El oxígeno interviene en la síntesis de esteroides y del ácido nicotínico, si estos compuestos están presentes en el medio las levaduras pueden desarrollarse en anaerobiosis total. En el caso contrario para la supervivencia de la levadura es necesario 0.0015mg. de oxígeno por gramo de biomasa para llevar a cabo la síntesis de esteroides. La respiración ocurre en distintas estructuras celulares. La primera de ellas es la glucólisis que ocurre en el citoplasma. La segunda etapa dependerá de la presencia o ausencia de O_2 en el medio, determinando en el primer caso la respiración aeróbica (ocurre en las mitocondrias), y en el segundo caso la respiración anaeróbica o fermentación (ocurre en el citoplasma). La oxidación de la glucosa es una fuente principal de energía en la mayoría de las células. La primera fase de este proceso es la glucólisis, en la cual la molécula de glucosa (6C), se escinde en dos moléculas de ácido pirúvico (3C). Este paso produce un rendimiento neto de 2 moléculas de ATP y dos moléculas de NADH. La segunda fase de la degradación de la glucosa es la respiración aeróbica que ocurre en tres etapas: ciclo de Krebs, transporte de electrones y fosforilación oxidativa. En ausencia de O_2 el ácido pirúvico de la glucólisis se convierte en etanol o ácido láctico mediante fermentación. En el curso de la respiración las moléculas de ácido pirúvico se fraccionan en grupos acetilos; los cuales ingresan al ciclo de Krebs. En este ciclo los grupos acetilos se oxidan por completo a CO_2 , se reducen cuatro aceptores de electrones (tres NAD^+ y Un FAD) y se forma GTP. La etapa final de la respiración es el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa (se dan acopladamente). En este paso intervienen una cadena de transportadores de electrones que transportan los electrones de alta energía aceptados por el NADH y el $FADH_2$ viajando cuesta abajo hacia el oxígeno. En tres puntos de su descenso por toda la cadena transportadora, se liberan grandes cantidades de energía que impulsan el bombeo de protones hacia el espacio intermembranoso de la mitocondria. Esto crea un gradiente electroquímico a través de la membrana interna. Cuando los protones atraviesan el complejo ATP sintetasa hacia la matriz, la energía liberada se utiliza para sintetizar moléculas de ATP. Este mecanismo por el cual se cumple la fosforilación oxidativa se conoce como hipótesis Quimiosmótica

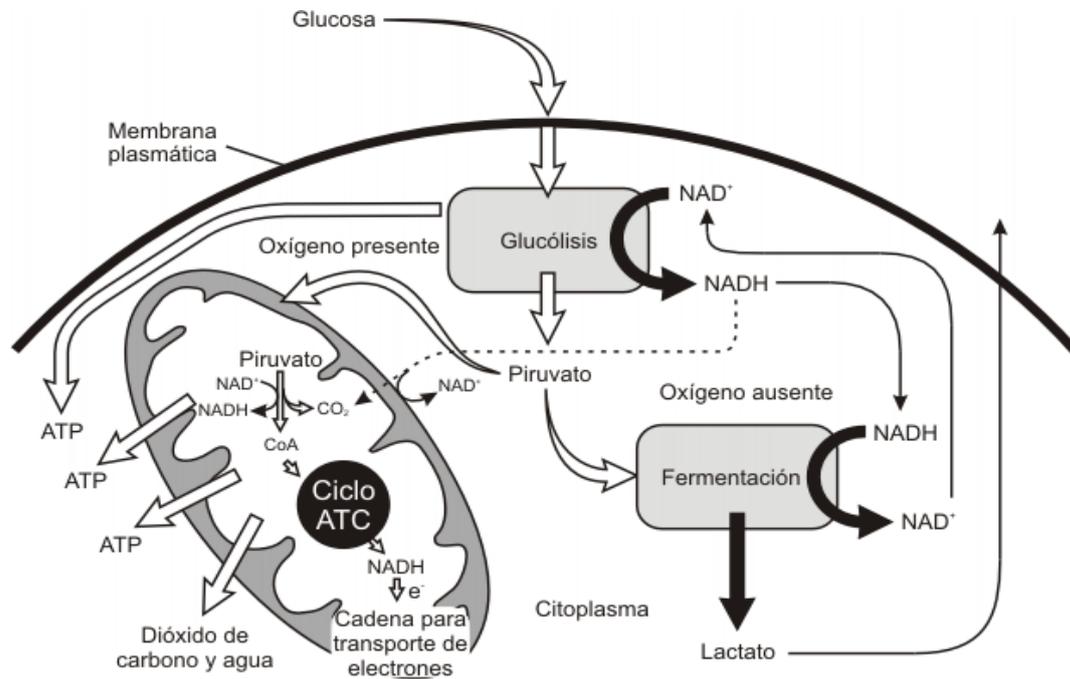


Figura 15. Resumen del metabolismo de los glúcidos en células eucariotas

2.7 VÍAS ANAERÓBICAS

El ácido pirúvico puede tomar por una de varias vías. Dos son anaeróbicas (sin oxígeno) y se denomina fermentación alcohólica y Fermentación láctica.

A la falta de oxígeno, el ácido pirúvico puede convertirse en etanol (alcohol etílico) o ácido láctico según el tipo de célula. Por ejemplo, las células de las levaduras pueden crecer con oxígeno o sin él. Al inocular células de *Saccharomyces cerevisiae* sobre un mosto cervecero y almacenarlos en forma anaerobia, las células de levaduras convierten el mosto en cerveza al convertir la glucosa en etanol. Cuando el azúcar se agota las levaduras dejan de fermentar y en este punto la concentración de alcohol está entre un 5-8 %según sea la concentración de azúcares y de la cepa de levadura utilizada. La formación de alcohol a partir del azúcar se llama fermentación.

2.7.1 Fermentación alcohólica. El ácido pirúvico formado en la glucólisis se convierte anaeróbicamente en etanol. En el primer caso se libera dióxido de carbono, y en el segundo se oxida el NADH y se reduce a acetaldehído. Otras células, como por ejemplo los glóbulos rojos, las células musculares y algunos microorganismos transforman el ácido Pirúvico en ácido láctico. En el caso de las células musculares, la fermentación láctica, se produce como resultado de ejercicios extenuantes durante los cuales el aporte de oxígeno no alcanza a cubrir las necesidades del metabolismo celular. La acumulación del ácido láctico en estas células produce la sensación de cansancio muscular que muchas veces acompaña a esos ejercicios.

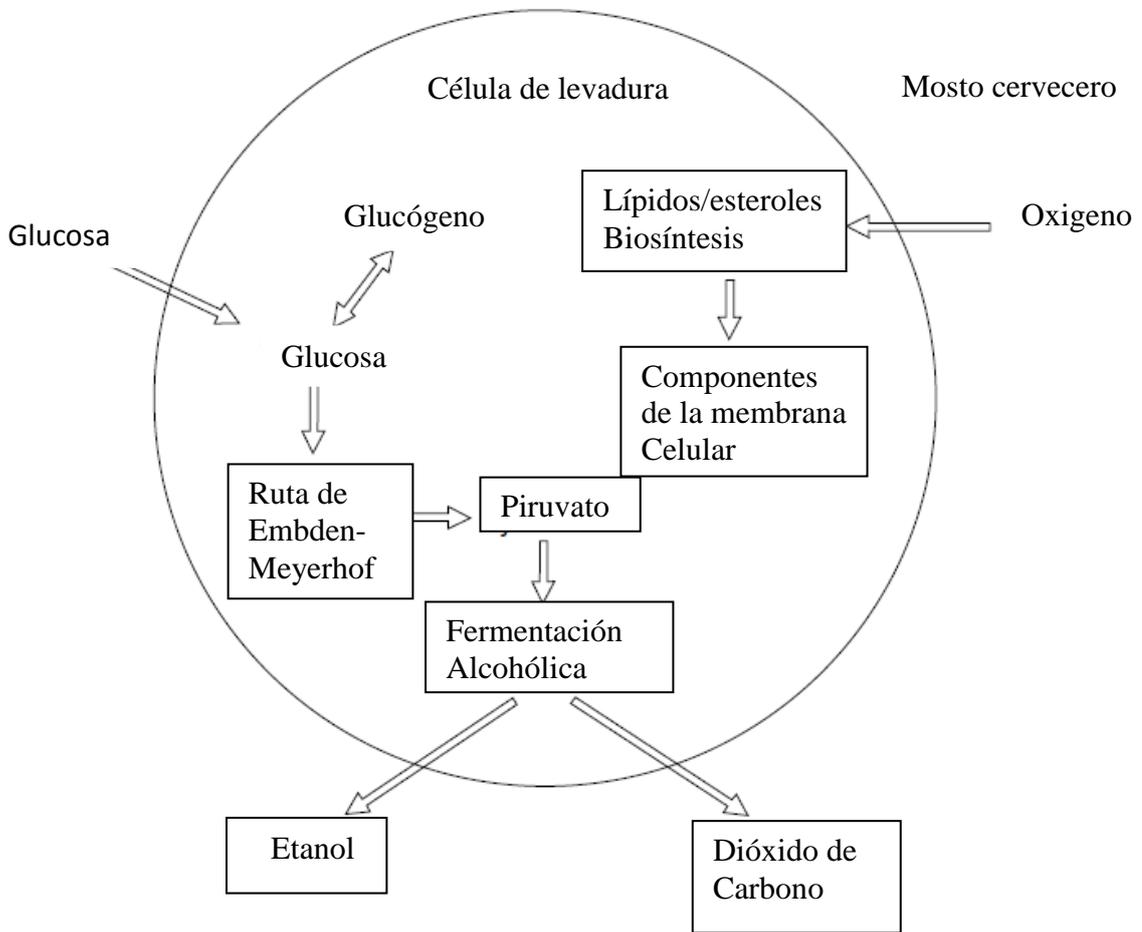
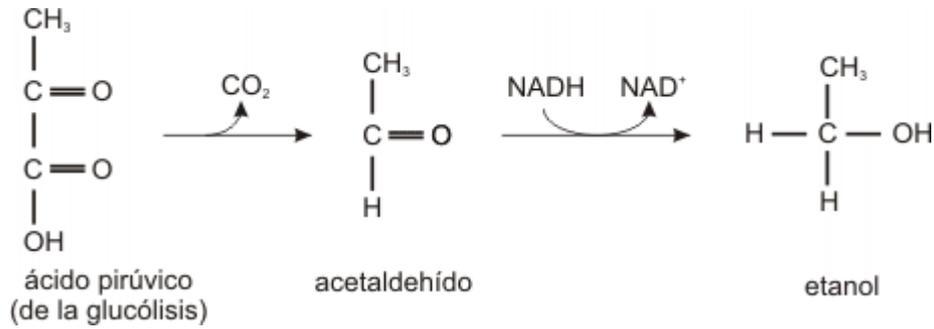
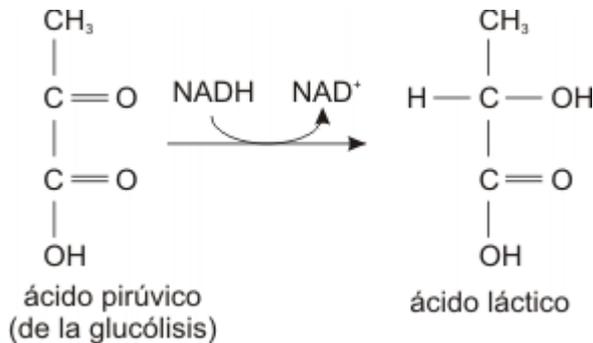


Figura 16. Esquema de una célula de levadura Cerveza en fermentación. de la glucosa en la hierba de asimilar para producir subproductos de la fermentación de etanol y CO₂, el oxígeno se asimila a la producción de membrana

2.7.2 La fermentación láctica. En esta reacción el NADH se oxida y el ácido pirúvico se reduce transformándose en ácido láctico.



La fermentación sea ésta alcohólica o láctica ocurre en el citoplasma.

Cuadro 2.Esquema bioquímico del proceso de fermentación

- A) Alcohólica : 2 ácido pirúvico + 2 NADH \rightarrow 2 etanol + 2 CO₂ + 2 NAD⁺
- B) Láctica : 2 ácido pirúvico + 2 NADH \rightarrow 2 ácido láctico + 2 NAD⁺

La finalidad de la fermentación es regenerar el NAD⁺ permitiendo que la glucólisis continúe y produzca una provisión pequeña pero vital de ATP para el organismo.

2.8LA CIENCIA DE LA MACERACIÓN DEL MOSTO DE MALTA

2.8.1 Preparación de la malta.-Tiene como objetivo obtener un paquete rico en enzimas azúcares fermentesibles y polisacáridos. Para hacer esto, el grano de cebada tiene que ser puesto a germinar a una temperatura de 10 a 16 °C, una humedad de 42 a 46 % y un tiempo de 60 horas. Después, la cebada germinada se seca usando aire caliente iniciando con un calentamiento suave hasta alcanzar la temperatura final dependiendo de las características que se deseen en la malta. Normalmente las temperaturas de secado para maltas lager son de 55 a 70 °C y de 60 a 95 °C para maltas ale. Finalmente se realiza la molturación de los granos tostados de la malta

2.8.2 Producción del mosto de malta. Los granos enteros de malta son sometidos a la etapa de molturación para obtener sémolas y harinas acompañada de la cascara que se debe ser conservada lo más enteras posible, para ser utilizadas como medio filtrante en el proceso de obtención del mosto. La malta ya molida se mezcla con agua formando la pasta (Cuadro3) y en ocasiones se adicionan entre un 10 y 20% de otros tipos de granos no germinados como fuentes de almidón, tales como el arroz o el maíz, que proporcionan un sabor más ligero. La mezcla se calienta gradualmente empleando una distribución de temperaturas, tiempo y pH que

figuran (Cuadros 4,6,5) con la finalidad de activar de forma óptima un consorcio de enzimas como las proteasas, las β -glucanasas la β -amilasa y la α -amilasa que se encuentran en la malta para hidrolizar los componentes de la malta, formando una papilla nutritiva. La solución se filtra y al líquido obtenido se le añade el lúpulo. Finalmente la solución se somete a ebullición por una hora aproximadamente para obtener el mosto. Las proteasas hidrolizan las proteínas de la malta, dando como resultado la formación de péptidos y aminoácidos, que más adelante, durante la fermentación servirán como nutrientes para la levadura. Las β -glucanasas hidrolizan los glucanos presentes en la cebada; la degradación de estos polímeros es importante para disminuir la viscosidad del mosto. La β -amilasa hidroliza la amilosa y la amilopectina originando maltosa y dextrinas. Las amilasas que se activan entre 60 y 70 °C hidrolizan los enlaces $\alpha(1-4)$ de la amilosa y la amilopectina en diferentes puntos del polímero sin acercarse a los puntos de ramificación y a los extremos de la cadena. Al llevarse la cocción del mosto se cubren 7 objetivos tecnológicos:

- (1) Concentración de sólidos en el mosto.
- (2) Extracción de los componentes del lúpulo.
- (3) Inactivación de las enzimas de la malta.
- (4) Esterilización del mosto.
- (5) Eliminación de compuestos volátiles indeseables.
- (6) Formación de los compuestos responsables del aroma, sabor y color de la cerveza mediante reacciones de Maillard.
- (7) Coagulación de proteínas y favorecimiento de la reacción entre taninos y proteínas para la formación de compuestos insolubles que precipitan clarificando así el producto.

Después de enfriar y filtrar la solución se oxigena el mosto con aire estéril hasta una concentración de 8-9 ppm de oxígeno disuelto. El mosto sirve como sustrato para el crecimiento de las levaduras y en la producción de etanol. Así mismo es fuente de precursores de aroma y sabor.

2.8.3 Fermentación. En la elaboración industrial de cerveza se emplean dos clases diferentes de fermentación:

- (1) Fermentación alta.- aplicada a la elaboración de cerveza tipo "ale". Durante esta fermentación las levaduras forman un aglomerado que flota en el líquido o pueden flocular a inicios de la fermentación y hundirse el líquido.
- (2) Fermentación baja.- aplicada a la elaboración de cerveza tipo "lager". En este tipo de fermentación las levaduras floculan al finalizar la etapa, en aglomerados que floculan y sedimentan en el líquido. Estas fermentaciones operan bajo condiciones de tiempo y temperatura diferentes, sin embargo en ambas la fermentación se lleva a cabo en dos pasos: la fermentación primaria llamada simplemente "fermentación" y la fermentación secundaria ó "maduración". Durante la fermentación el mosto se somete a temperaturas que van desde 15 a 22°C para cervezas "ale" y desde 7 a 15°C para cervezas "lager". En esta etapa las levaduras metabolizan los carbohidratos del mosto para la generación de etanol y CO₂ predominantemente. El

proceso de maduración consiste en someter al mosto fermentado a bajas temperaturas que van desde 4 a 10°C por un tiempo de 5 a 10 días. La maduración proporciona a la cerveza sus características finales de olor, color, sabor y brillantez.

2.8.4 Procesamiento final. Una vez concluida la maduración, la cerveza es clarificada, carbonatada, envasada y pasteurizada para su embalaje y distribución. Influencia de la relación (Agua/Malta) del empaste en el mosto de macerados, hechos a 60°C (140 EF), con una duración de 180 min. (Datos de Windisch, Kolbach y Schild, a través de Hopkins y Krause, 1947)

Concentración de la masa (Agua/Malta)	2:1	2.7:1	4.0:1	5.3:1
Extracto(malta% de materia seca)	71.7	77.0	80.0	79.9
Extracto fermentable(malta% de materia seca)	52.3	56.3	58.5	57.8
Extracto fermentable(extracto% del total)	72.9	73.1	73.1	72.3
Nitrógenosoluble enforma permanente(% de maltaseca)	0.57	0.56	0.54	0.53
Nitrógenofomol(malta% de materia seca)	0.22	0.21	0.20	0.19

Cuadro 3.

Temperatura óptima para algunos procesos de empaste, llevada a cabo por 2-3 h. Los datos de diversos las fuentes (Briggs et al, 1981;.Hind, 1950; Hopkins y Krause, 1947). Los valores pueden ser sustancialmente diferentes en diferentes condiciones de maceración

Proceso	Temperatura°C
Mayor extracción (sobre todo para convertir el almidón)	65-68
Más rápido sacarificación (dextrinización)	70
Mayor rendimiento de azúcares reductores	60-63
Mayor rendimiento de extracto fermentable	65
Porcentaje más alto de fermentación (%)	63
Mayor rendimiento de nitrógeno soluble en forma permanente (Mash veces una temperatura de 1-3 h. Superior. Óptimos para purés más concentrado)	50-55 (60)
Mayor rendimiento de formol-nitrógeno	50-55
Más alto PSN menos N-formol	55-60
Mayor rendimiento de los buffers ácidos	45-55
Máxima actividad de la amilasa	70
Máxima actividad de la amilasa	60
Máxima actividad de la amilasa	40
Máxima actividad de la fitasa	50-60

Cuadro 4.

Tabla Valores óptimos de pH en la empaste de infusión isotérmico hecho con maltas pálidas una duración de 1 ± 2 h. a 65,5 °C (150 EF). Datos de diversas fuentes.

Medida de lo posible lastemperaturas(puré de temperatura, m, y el mosto frío, w), en la que los valores de pH fueron determinados se indican

Característica	pH óptimo
Menor tiempo de sacarificación (dextrinización)	5.3 m±5.7 w
Mayor extracto obtenido	5.2±5.4 m
Mayor extracto de una decocción	5.3 m±5.6 m
La hierba de la mayoría de los fermentable	5.1±5.3 m; 5.4±5.6 w
Papilla imposible filtrar	<4.7
α-Amilasa actica del mosto (+ Ca ²⁺)	5.3 m±5.7w
β-Amilasa active del mosto	5.1±5.3
Máximo rendimiento de PSN	4.4±4.6 m; 4.9±5.1 w
Rendimiento máximo de formol-N	4.4±4.6 m, 4.9±5.2w
Máxima actividad de la proteasa (depende del sustrato)	4.3 m; 4.6±5.0 m
Máxima actividad de la fitasa	Sobre 5.2m
Carboxipeptidasa la máxima actividad	4.8±5.7

Cuadro 5

Cambios en los rendimientos con el tiempo de extracción y de nitrógeno soluble de forma permanente (PSN) en empastes hechos a dos temperaturas diferentes (datos de HT Brown, a través de 1950 Hind,)

Tiempo (min.)	15	30	60	90	120	180
Masa a 49°C						
Extracto (%)	20.3	24.8	28.8	30.3	34.0	37.1
PSN (%TN)	24.6	28.0	32.2	34.6	36.5	39.0
Masa a 65.5°C						
Extracto (%)	63.4	67.1	69.4	69.7	69.7	69
PSN (%TN)	27.7	30.7	32.9	33.7	34.6	34.6

Cuadro 6.

Extractos y extractos de fermentación, obtenido en empastes isotérmicos durante diferentes períodos de incubación. (Datos de Windisch,

KolbachundSchild, a través deHopkinsyKrause, 1947

Masa periodo (min.)	15	30	60	120	180
60°C					
Extracto (%)	50.2	53.4	57.2	60.7	62.2
Extracto fermentable (%)	36.0	39.0	43.1	47.9	50.2
65°C					
Extracto (%)	60.6	62.2	62.8	63.6	63.6
Extracto fermentable (%)	44.2	46.6	48.5	50.7	51.7
70 °C					
Extracto (%)	61.2	62.5	62.9	63.4	63.6
Extracto fermentable (%)	40.9	42.0	41.6	42.2	42.7

Cuadro 7.

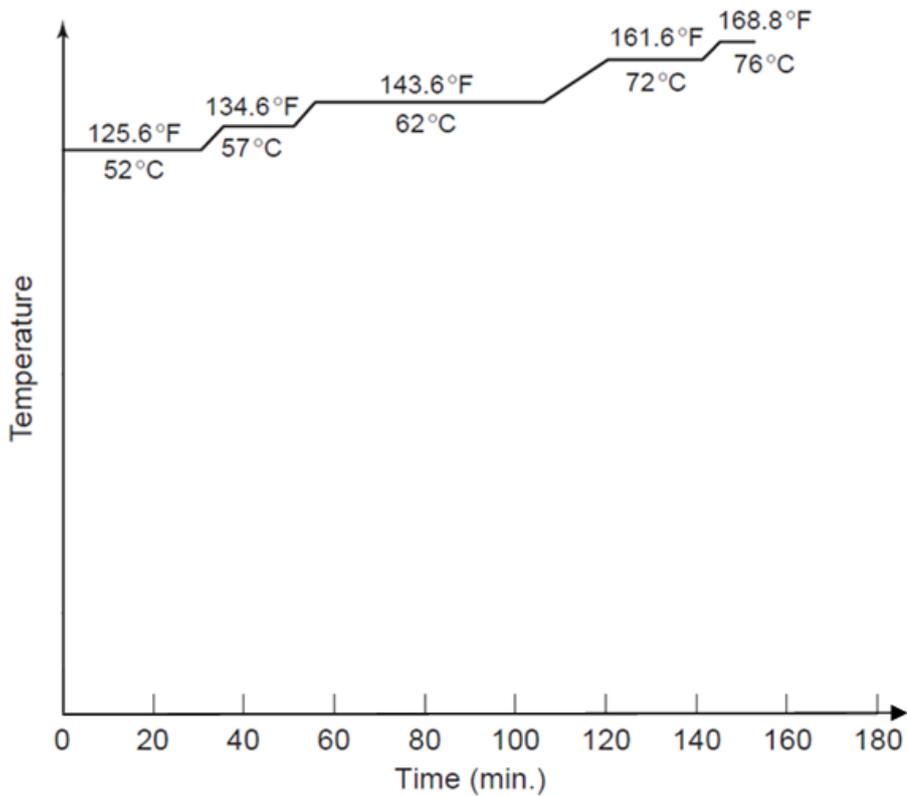


Figura 17. Curva de maceración Temperatura Vs. Tiempo

Tinción de polisacáridos de la maceración de la malta antes (color azul) y después de la hidrólisis enzimática (coloración anaranjado) con solución de yodo en solución

de yoduro



Figura 18

Composición de carbohidratos en el mosto (resultados expresados en g/100 ml) (MacWilliam, 1968)		
Mosto	Tipo lager	Tipo ale
Densidad inicial	1,043	1,040
Azúcar		
Fructosa	0.21	0.97
Glucosa	0.91	
Sucrosa	0.23	0.60
Maltosa	5.24	3.91
Maltotriosa	1.28	1.30
Total de azúcares ferm.	7.82	6.78
Maltotriosa	0.26	0.53
Azúcares superiores	2.13	1.95
Total de dextrinas	2.39	2.48
Total de azúcares	10.26	9.26
Azúcar (% total de extracto)	91.1	
Fermentabilidad	76.7	73.2

Cuadro 8

Los aminoácidos libres en mosto y cerveza (mg/100 ml) (Sandegren et al., 1954)		
Nitrógeno y aminoácidos	Mosto	Cerveza
Total de nitrógeno	88.0	62.6
Bajo en nitrógeno soluble en alcohol molecular	63.4	50.7
Total de α amino nitrógeno	42.7	21.0
Soluble en alcohol amino nitrógeno	37.6	18.2
Alanina	9.8	7.7
γ - Amino ácido butírico	8.3	9.6
Arginina	13.8	3.0
Ácido aspártico	7.0	1.6
Ácido glutámico	6.4	0.8
Glicina	2.3	2.1
Histidina	5.7	2.8
Isoleucina	6.2	2.1
Leucina	18.1	4.7
Lisina	14.9	2.2
Fenilalanina	13.7	4.4
Prolina	45.7	31.8
Treonina	5.9	0.3
Tirosina	10.6	5.9
Valina	11.9	6.8
Serina + Asparragina mM en 100 mL	168.6	7.9
Amoniaco	2.4	1.7

Cuadro 9

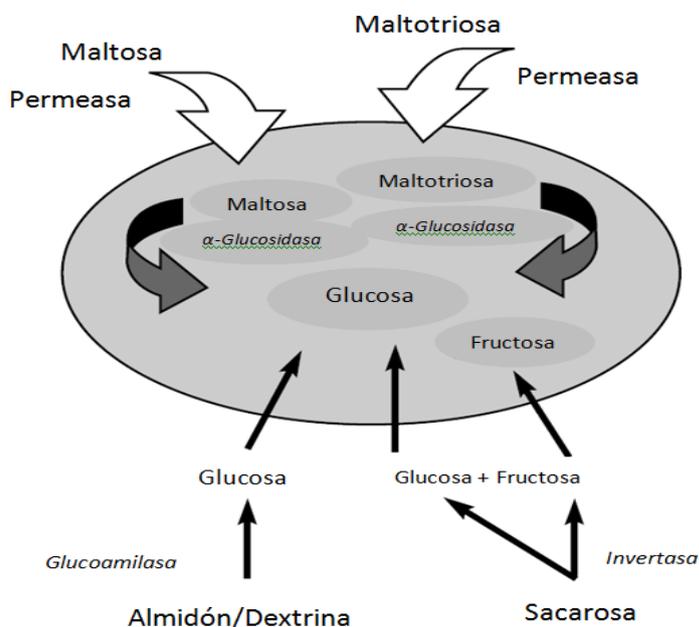


Figura 19. Absorción de carbohidratos por la Levadura *Saccharomyces cerevisiae*

2.9 CONCEPTO DE DESINFECCIÓN Y ESTERILIZACIÓN

Controlar el crecimiento microbiano implica matar microorganismos o inhibir (sin matar) el crecimiento de los mismos. Para esto se utiliza agentes físicos y químicos. El nombre de los agentes que matan células llevan el sufijo “cida” como por ejemplo bactericida, germicida, fungicida, viricida, etc. En cambio, el de los agentes que inhiben el crecimiento de las células lleva el sufijo “statico” como bacteriostático, fungistático, tuberculostático, etc.

2.9.1 Desinfección: Se refiere a la eliminación de virus y microorganismos pero no a sus esporas en o sobre el material. El proceso para la desinfección implica el uso de agentes químicos denominados Desinfectantes sobre objetos inanimados debido a que estos agentes son tóxicos para los tejidos vivos. Se pueden aplicar desinfectantes a mesas, pisos, utensilios, etc. son ejemplo de desinfectantes los hipocloritos (lejía) formaldehído al 8% cloruro de mercurio, compuestos fenólicos (fenol al 5%) sulfato de amonio y compuestos de amonio cuaternario a 0,25 – 1,6%

2.9.2 Esterilización: Se refiere a la destrucción completa o eliminación de toda forma de vida en o sobre un material o sustancia que está siendo esterilizada. No hay grados de esterilizaciones es incorrecto decir que algo está “un poco estéril” o “muy estéril” un objeto o sustancia esta estéril o no lo está. Los procedimientos para la esterilización involucran el uso del calor, radiación, remoción física de células, y sustancias químicas.

2.10 MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN

2.10.1 Esterilización por calor seco. La esterilización por calor seco destruye los microorganismos oxidando sus constituyentes químicos, desnaturalizando las proteínas y los ácidos nucleicos de las células así como fragmentos de la membrana celular, se aplica a materiales que deben permanecer secos y que no se alteren a la temperatura y tiempo de esterilización tales como placas petri, pipetas, tubos de ensayo, matraces balones, y otros de vidrio refractario. También se esteriliza por calor los materiales de metal como pinzas, tijeras, espátulas, etc. No se pueden esterilizar por este método los materiales de goma de plástico, las soluciones, medios de cultivo, ni material orgánico.

Debido a que el calor seco no es tan eficiente se requiere aplicar altas temperaturas y periodos de tiempo más largos. Así se necesitan 160°C durante 2 horas ó 180°C durante 1 hora en el horno de convección. Otra forma de aplicar calor seco incluye la incineración para objetos y material orgánico que deben ser destruidos y el flameado pasando materiales o instrumentos pequeños, como asas de siembra, pinzas o espátulas de Drigalsky, a través de la llama de un mechero Bunsen.

2.10.2 Esterilización por calor húmedo. Esterilización con vapor saturado y a presión. Este es el método de esterilización más eficiente y efectivo. Se hace en un equipo llamado autoclave. Los autoclaves operan manejando dos variables importantes: temperatura y presión y tiempo. Habitualmente se emplea 121°C /15 psi (lb_f/in^2) por 15 minutos. Pueden usarse tiempos mayores si la carga de material o volúmenes a esterilizar son grandes. Su efectividad se debe a que la alta presión que se usa incrementa la temperatura del vapor de agua lo cual favorece la capacidad de matar al microorganismo incluyendo las esporas que son sumamente termodúricas. El vapor a 100°C tiene 7 veces más calor que el agua a la misma temperatura por que se requiere más cantidad de calor, para convertir el agua en vapor que para hacerla hervir. El calor húmedo mata a los microorganismos desnaturalando sus proteínas esenciales. El autoclave es ideal para esterilizar desechos biológicos peligrosos, vestimentas quirúrgicas, materiales de vidrio de jébe o goma, medios de cultivo, soluciones, entre otros. Sin embargo, determinados materiales de plástico y ciertos instrumentos médicos (por ejemplo endoscopios de fibra óptica), no pueden autoclavarse y se esteriliza con agentes químicos y gases.

El TDT tiempo de muerte térmica (del inglés thermal death time) es el tiempo requerido para matar una población microbiana conocida en una suspensión específica a una temperatura particular. Cuando se incrementa la temperatura disminuye TDT y viceversa es preferible realizar el proceso a alta temperatura por cortos periodos de tiempo. Las condiciones ambientales también influyen en el TDT. Cuando el pH es muy ácido o muy básico el TDT disminuye. Las grasas y aceites hacen más lenta la penetración del calor incrementando el TDT. Los TDT son importantes porque miden la efectividad y rapidez de un proceso de esterilización. El autoclave a 121°C /15 lb por 15 minutos excede al TDT de la mayoría de microorganismos. Otro concepto importante es el valor de D (tiempo de reducción decimal) que es el tiempo necesario para matar el 90% de una población bacteriana en condiciones específicas. Esto significa que un valor D, el proceso de esterilización reducirá el número de bacterias en un exponente o logaritmo. Por ejemplo si el valor D para la bacteria dada es de 2 minutos, significa que le tomara 2 minutos en reducir la población de 10^3 a 10^2 o que le tomara 4 minutos en reducir de 10^3 a 10^1 , o que serán 20 minutos para reducirla de 10^{10} a 1 célula bacteriana (10^0). La temperatura del proceso se puede indicar como un subíndice: D_{121} . El autoclave consta de una cámara de doble pared que se llena de vapor saturado libre de aire y se mantiene a la temperatura indicada y a la presión indicada durante el periodo de tiempo determinado. El tiempo de funcionamiento para la esterilidad depende de la naturaleza del material que se va esterilizar, del tipo de envase y del volumen del material. Una temperatura de 100°C es la suficiente para matar a todas las formas bacterianas de 2 a 3 minutos, excepto a las esporas, para matar a éstas se requiere una temperatura de 121°C/15 psi por 15 minutos. El autoclave se puede sustituir por la olla de presión.

2.10.3 Esterilización por Radiación Gama y UV. Las ondas de radiación electromagnéticas transmiten energía, por ejemplo, los rayos X, rayos gamma, luz ultra violeta (UV), luz visible, luz infra roja, la energía que posee la radiación electromagnética es proporcional a la frecuencia de la radiación (ondas por segundo). Por esta razón la irradiación de materiales y sustancias con rayos gamma y UV es una herramienta poderosa para el control del crecimiento microbiano y esterilizar. Las microondas no matan por sí mismo al microorganismo sino el calor que generan. La radiación gamma mata porque genera iones dañinos para la salud como el ión superóxido (O_2^-) y radicales libres de hidroxilo (OH^-). Se usa los radioisótopos de cobalto-60 las endosporas con las formas más resistentes a la radiación como control. La luz UV a una longitud de onda de 220 a 300 nm mata a los microorganismos dañando su ADN debido a que se forman enlaces covalentes entre timinas adyacentes formándose los dímeros de Timina. Las endosporas son más resistentes en tanto que las células vegetativas que se están multiplicando activamente son las más susceptibles. Las lámparas UV y los materiales a esterilizar deben estar limpios y no cubiertos para una adecuada esterilización.

Los parámetros que deben estandarizarse para la adecuada esterilización de un material dado son las distancias de la lámpara UV hacia el material a esterilizar y el periodo de tiempo o tiempo de exposición. Las persona que realiza este trabajo deben de proteger los ojos y la piel por gafas o cascos de protección, guantes, mandil, para evitar que la luz UV quemé la córnea o la piel o promueva cáncer a la piel. Este método de esterilización es adecuado para materiales que se dañan por el calor por ejemplo: plásticos, equipos médicos, entre otros. La esterilización por rayos gamma, de medicamentos, alimentos como frutas verduras, granos, carnes está aprobado por la FDA (Food and Drug Administration)

2.10.4 Esterilización por Filtración. Implica separar o excluir físicamente a todos los microorganismos del líquido o gases, al pasarlo a través de filtros de membrana con poros de 0,2 micras de diámetro para retener virus en el caso de los líquidos y a través de filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air) en el caso de los gases y el aire. Para la esterilización por filtración principalmente de soluciones de compuestos que se desnaturalizan con el calor se aplican filtros de membrana con poros de 0,45 micras de diámetro para retener bacterias por filtración de los antibióticos, aminoácidos, vitaminas, factores de crecimiento, carbohidratos, proteínas, sueros, etc. Los filtros de membrana son de varios tipos, los hay de nitrocelulosa, acetato de celulosa, policarbonato y PVDF (Polyvinylidene fluorur) o Fluoruro de polivinilo.

2.11 CONCEPTO DE CULTIVO PURO

Se denomina cultivo puro (axénico) al que contiene sólo un tipo de microorganismos es decir descende de una sola célula. Los cultivos puros supone unas condiciones no naturales se inician a partir de colonias aisladas UFC, de manera que todos los individuos del mismo cultivo tengan la misma composición genética (un clon de células). Los cultivos puros de células se *Saccharomyces cerevisiae* son esenciales para tener el control de la fermentación etanólica ,dirigiendo su metabolismo bajo condiciones controladas hacia los productos deseados como etanol y dióxido de carbono, ácidos orgánicos (volátiles y no volátiles),alcoholes fusel,ésteres, aldehídos y cetonas etc, que forman parte del aroma y bouquet de la cerveza.Es necesario obtener un cultivo puro a partir de una placa de aislamiento primario, que suele ser un cultivo mixto. En algunas ocasiones es fácil seleccionar las colonias aisladas para sus subcultivos (volver a sembrar las colonias previamente aisladas a partir de una muestra) pero en otras pueden presentarse colonias muy amontonadas (cultivo confluyente) de tal manera que es muy difícil elegir colonias individuales aisladas .Ante esta situación hay varias estrategias:

- El subcultivo directo: Consiste en tocar con cuidado, la superficie de la colonia deseada con el asa de siembra (en punta si las colonias están muy cerca entre sí) y estriar una nueva placa para el aislamiento.
- El uso de medios selectivos: Consiste en subcultivar la colonia de interés sobre un agar que inhibirá el crecimiento de las colonias no deseadas.
- El uso de sustancias químicas inhibitoras incorporadas dentro del Agar (análogo a un medio selectivo) que consiste en subcultivar la colonia de interés sobre un Agar que contenga antibióticos o sustancias químicas que inhibirán el crecimiento de las colonias no deseadas.
- El uso de discos de antibióticos (análogo a una placa de Agar que contiene antibiótico, pero más flexible) que consiste en subcultivar la colonias de interés sobre la superficie de una placa con Agar y ubicar un disco impregnado en antibiótico diseñado para inhibir las bacterias no deseadas.

2.11.1 Método de aislamiento de Levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. El aislamiento de células de *Saccharomyces cerevisiae* partir de un cultivo mixto se realiza empleando la técnica de Estriado sobre Agar YPG (extracto de levadura ,peptona ,glucosa) suplementado con antibiótico, implica la separación de células de una asada de muestra de cultivo mixto, física y espacialmente estriándola sistemáticamente sobre una superficie de Agar YPG suplementado para la formación de colonias aisladas UFC (Unidad formadora de colonia).El éxito en obtener colonias aisladas está en función de la cantidad y densidad (población microbiana) del inóculo, lo cual a veces es difícil de juzgar .El crecimiento explosivo de las células de *Saccharomyces cerevisiae* permite producir un gran número de

ellas a partir de una única célula inicial, los microorganismos no deseados se denominan contaminantes, como bacterias que acompañan a las células de levadura en el cultivo mixto estas son eliminados por el antibiótico suplementado al Agar en las condiciones de crecimiento adecuadas, luego tras un periodo de incubación de 48 a 72 horas a temperatura de 22-25°C, se produce una colonia observable a simple vista y formada por individuos iguales (unclon de células). Las colonias se forman durante el periodo de incubación, en el que las células microbianas individuales se reproducen rápidamente las colonias aparecen en un lapso de 18 a 24 horas.

Composición de Agar YPG suplementado con antibiótico:

Componente	peso en g.
Extracto de levadura	3,0
Peptona	10.0
Glucosa	20.0
Agar	18.0
Tetraciclina	10 ⁻³ L (1g/10gH ₂ O)
Agua desionizada	1000.0

Cuadro 10.

Medio dosificado a un pH 6,8

Antibiótico: Tetraciclina (Tetraciclina, pastilla 1g en 10 mL de agua desionizada estéril, disolver y tomar 1mL para 1L de medio) conservar en refrigeración

Condiciones de esterilización en auto clave :

Condiciones de esterilidad	
Temperatura	121°C
Presión	15 lb/pul ²
Tiempo	15 minutos

Cuadro 11.

2.11.2 Características culturales de la colonia de *Saccharomyces cerevisiae*. Los conceptos de cultivo primario, colonia, identificación presuntiva. Son de gran importancia para poder aislar y seleccionar una unidad formadora de colonia de *Saccharomyces cerevisiae* de un cultivo mixto de microorganismos o también llamado cultivo primario.

1) Una colonia de células de *Saccharomyces cerevisiae*.- es una masa de millones de células procedentes de una única célula, un clon celular que puede verse a simple vista llamada unidad formadora de colonia UFC.

2) Identificación presuntiva.- También llamada preliminar lo primero que se realiza es la inspección de las colonias para determinar sus características morfológicas las características que se deben describirson: tamaño, forma, borde, textura de la superficie, aspecto, elevación, apariencia de la luz transmitida, y a la luz reflejada, consistencia y pigmentación.

Característica cultural de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Tamaño UFC	3-5mm
Forma	Circular
Borde	Entero
Superficie	Lisa
Aspecto	Butiroso (como mantequilla)
Elevación	Convexa
Luz transmitida	Opaca (no hay transmisión)
Luz reflejada	Brillante
Consistencia	Blanda
Pigmentación	Crema- blanco

Cuadro 12.

2.12 METODO DE CONSERVACIÓN DE CEPA

Es importante conservar con viabilidad durante un periodo de tiempo las cepas de microbios aislados, se denomina Cepario a la colección de cultivos de un laboratorio.

Los cultivos de microorganismos para con determinadas características son esenciales para la mayoría de los ensayos de microbiológicos, los cultivos de referencia o controles de alta calidad son utilizados en un amplio número de determinaciones. Por todo esto solo una sola colección de cultivo bien mantenida es un requisito indispensable para las buenas prácticas de laboratorio. Los microorganismos tiene una tendencia inherente a mutar cuando se le subcultiva con frecuencia. La conservación está encaminada al mantenimiento de las cepas durante largos periodos de tiempo sin que se produzcan cambios en éstas. Hay varios métodos para conservar microorganismos dependiendo el tiempo que se les desee mantener viables y de sus características fisiológicas. Se tiene métodos de largo plazo, métodos de corto plazo.

2.12.1 Métodos a largo plazo. Son los métodos que se utilizan para poder conservar los microorganismos, por un periodo largo de tiempo en años de tal manera que al ser requeridos para aprovechar sus propiedades enzimáticas, son capaces de reaccionar metabólicamente.

2.12.2 Conservación por congelación. Se congelan las células en suspensión en un líquido o caldo de cultivo crecido (joven) con un agente crioprotector (50% de glicerol para congelar a -20°C y al 14- 20% para congelar a -70 ó -80°C) Los crioprotectores más usados son el glicerol y el dimetilsulfónico (DMSO) cuando se usa el glicerol debe tenerse la precaución de mezclar las dos fases (glicerol/caldo) con una micropipeta. Mediante este método las células no disponen de agua en forma líquida por lo tanto no hay crecimiento. Cuando se quiere trabajar con células así conservadas, se recuperan, subiendo la temperatura. Este es el mejor método de conservación desde todos los puntos de vista. La viabilidad de los microorganismos es de varios años, Las desventajas son la de requerir congeladores que son costosos y el riesgo que haya algún fallo del sistema eléctrico que produzca una subida no deseada de la temperatura durante el almacenamiento. El almacenamiento a largo plazo se puede lograr también empleando temperaturas criogénicas con nitrógeno líquido a 196°C .

2.12.3 Conservación por liofilización. La liofilización consiste en la eliminación del agua de una sustancia congelada por sublimación del hielo al vacío. Este proceso consta de tres etapas, la pre congelación del producto para asegurar una estructura completamente congelada; el secado primario con el que se elimina la mayor parte del agua por sublimación; y el secado secundario con el que se remueve el agua que queda ligada. En las células conservadas por este método no hay crecimiento puesto que la actividad de agua es cero igual que la congelación, pero a diferencia de la primera, los líofilos no tiene agua en medio debido a la sublimación. Para este proceso se emplean los aparatos llamados liofilizadores. Este es un método muy renovable por su comodidad en el almacenamiento, pues una vez liofilizado las cepas, éstas se pueden almacenar a una temperatura ambiente de $18-20^{\circ}\text{C}$ o bien en refrigeración $4-6^{\circ}\text{C}$. El éxito de la liofilización para la preservación de los microorganismos no sólo depende de los pasos de esta técnica (congelación y deshidratación) sino también de las características físico químicas del medio de suspensión, el tipo de microorganismos, el estado fisiológico del cultivo las condiciones del cultivo, la concentración de microorganismos, entre otros.

2.12.4 Método de conservación a corto plazo. Son los que se utilizan cuando no se requiere la viabilidad por mucho tiempo o cuando no se pueden emplear los métodos anteriores por falta de los equipos necesarios o porque la cepa microbiana no soporta dichos tratamientos. Conviene tener en cuenta que nunca se debe usar un único método de conservación, sino varios. La conservación de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* se realiza en tubos de ensayo con tapa que contiene Agar

YPG o Agar Papa Dextrosa APD en plano inclinado sobre el cual se siembra la suspensión de células por estriado, en condiciones de esterilidad y se conserva a temperatura de 4°C por un periodo de tiempo de 4-6 meses

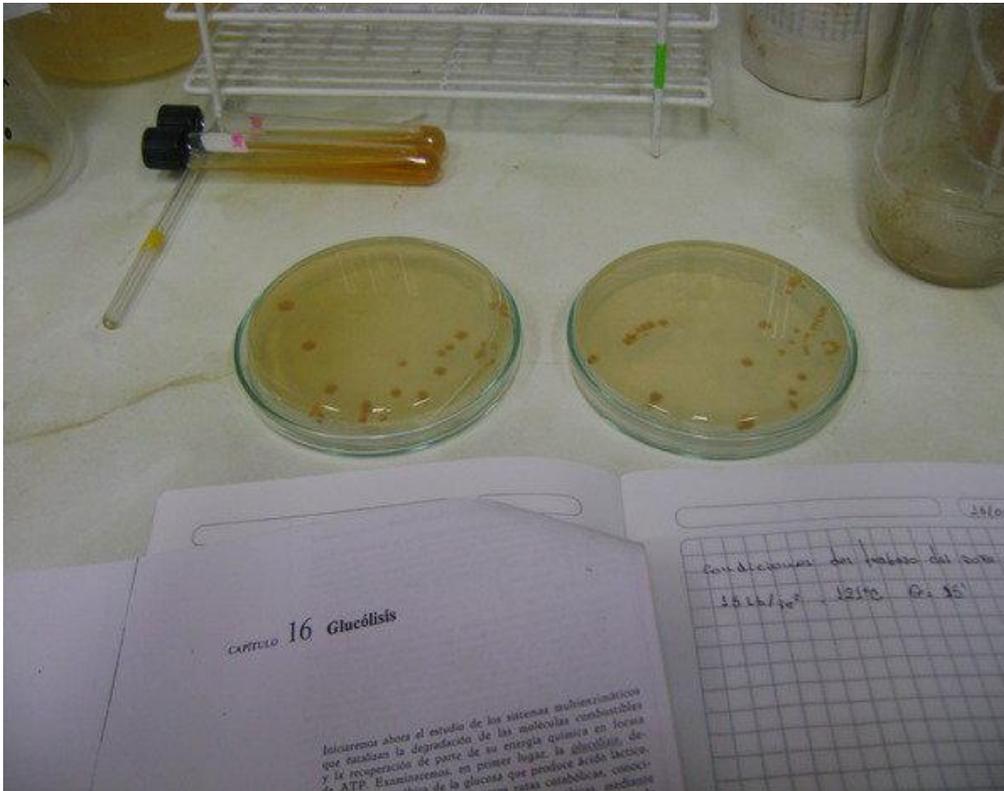


Figura 20 Cepario de células de *Saccharomyces cerevisiae* en medio Agar YPG

2.13 CULTIVO Y PROPAGACIÓN CELULAR

El cultivo de microorganismos, consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada. En general, podemos distinguir cultivos líquidos y sólidos en función de las características del medio y cultivos discontinuos y continuos en función de la disponibilidad de nutrientes en el medio. Se entiende por crecimiento celular al aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. Por tanto, no nos referimos al crecimiento de un único microorganismo que denominaremos ciclo celular, sino al demográfico de una población. En este tema nos centraremos en el crecimiento celular de levaduras, el estudio que se hace puede servir también para entender el crecimiento poblacional de bacterias y de otros hongos. Denominamos ciclo celular al proceso de desarrollo de una célula de levadura aislada. A lo largo del ciclo celular tiene lugar la replicación del material genético, la síntesis de componentes celulares. Las poblaciones de levaduras crecen de forma explosiva acumulando grandes números en un periodo de tiempo muy reducido, entender cómo se produce el crecimiento microbiano es importante para poder controlarlo y además poder potenciar sus beneficios y aplicaciones.

2.13.1 Propagación de levadura en el laboratorio.- El objetivo de la propagación de células de levadura a nivel de laboratorio consiste en obtener un volumen de cultivo puro con una concentración celular óptima para ser utilizado en la primera escala de fermentación cervecera. El proceso se realiza utilizando técnicas tradicionales microbiológicas. Esta etapa es de suma importancia, asegurando de que el cultivo que provee el laboratorio es puro (Axénico) y libre de contaminación para poder ser utilizado en la fase de producción. Para generar en el laboratorio la propagación celular de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* es necesario realizar una serie de cultivos intermedios, un escalamiento de medio de cultivo progresivamente creciente. Un protocolo típico se muestra en la figura 36. Realizando el escalamiento aplicando por lo general un factor alrededor de 1:10 entre cada cultivo. El medio de cultivo adecuado para esta etapa de propagación es el caldo estéril de extracto de levadura, glucosa y peptona (YPG). Todo el proceso toma alrededor de dos semanas. El crecimiento de las células de levadura en el medio nutritivo es estimulado por la continua aireación estéril y por un agitador magnético requerido para alcanzar una óptima tasa de transferencia de oxígeno, alcanzándose una concentración celular por el método de Recuento de células de levadura en cámara de Neubauer dentro del rango de $150-200 \times 10^6$ células/mL con una vitalidad y viabilidad superior al 98% en el medio de propagación destinado como inóculo o estárter.

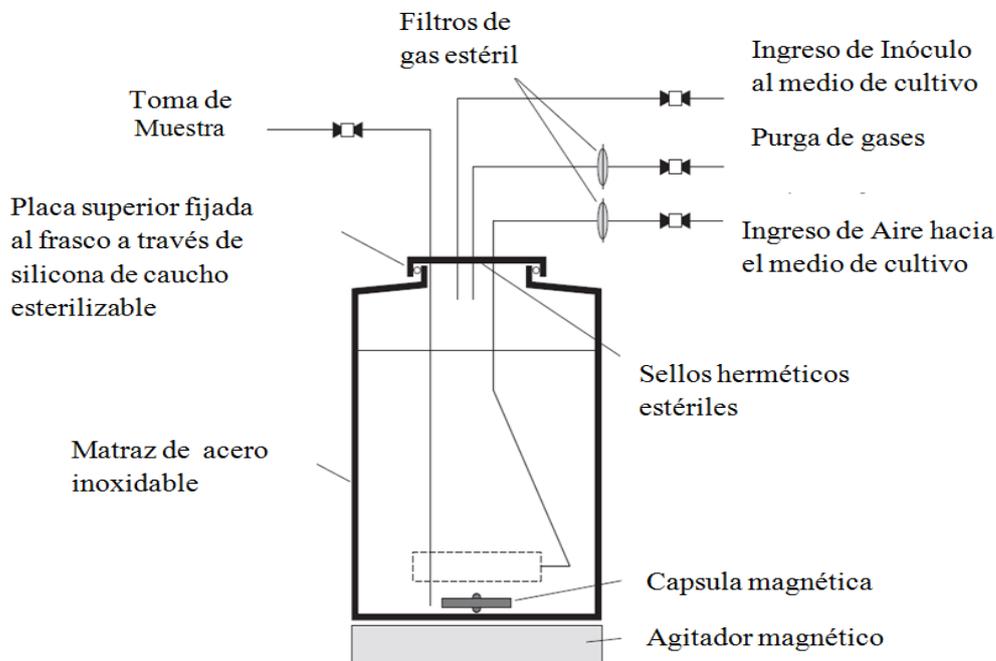


Figura 21. Componentes de un equipo Biorreactor a nivel de laboratorio. Para llevar a cabo la fase de propagación celular de *Saccharomyces cerevisiae*. El equipo tiene un volumen de operación de 3L y un volumen total de 4L

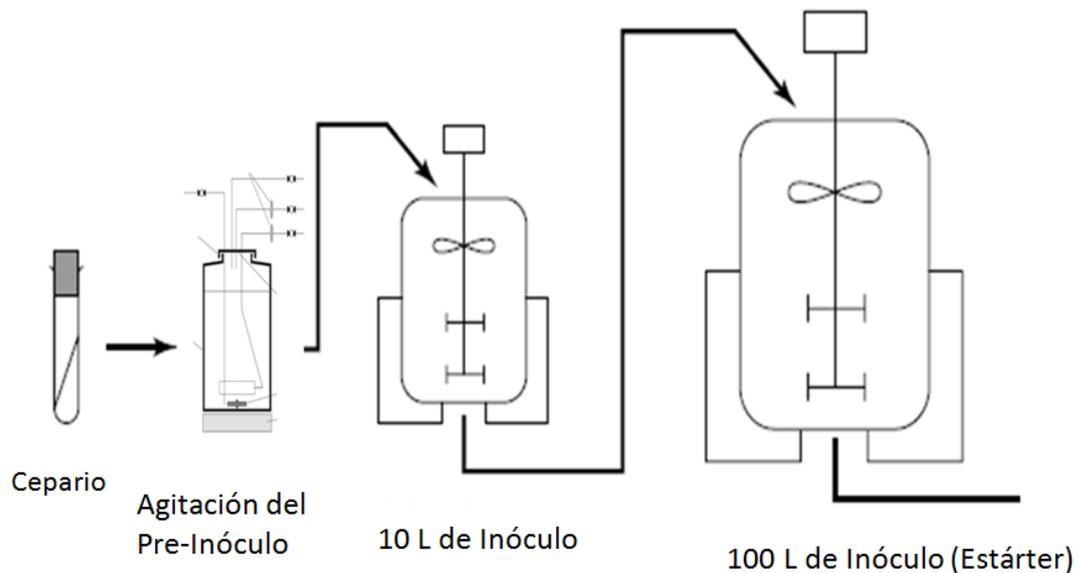


Figura 22. Escalamiento del cultivo celular de *Saccharomyces cerevisiae*

2.13.2 Propagación de levaduras en la planta de Cervecería.-El estárter, inóculo o cultivo semillero proporcionada por el laboratorio, en un depósito pequeño es propagado a través de una nueva serie de trasegados y escalando el volumen de cultivo hasta que la Biomasa de levadura alcance el volumen y la concentración celular adecuada para un óptimo proceso fermentativo del mosto de malta de cebada. Desde un punto de vista microbiológico la propagación está lleno de riesgos, Cualquier contaminación en esta etapa tendrá profundas consecuencias adversas. El diseño de la planta, su funcionamiento y su acabado interior debe cumplir los más altos estándares de higiene. En la planta de producción de cerveza La propagación celular de *Saccharomyces cerevisiae* deben estar ubicadas dentro de una habitación diseñada para minimizar el riesgo de contaminación. El acceso está limitado a los servicios esenciales del personal, todas las superficies internas están hechas de materiales higiénicos, el aire de la habitación es filtrado y la atmósfera interna se mantiene bajo una presión ligeramente positiva. El mosto utilizado como medio de propagación celular durante el escalamiento, preferiblemente debe ser de la misma calidad que el utilizado en la fermentación industrial, donde la levadura debe coincidir en características con el mosto empleado al inicio, en el cual está produciendo sus metabolitos deseados. Esto generalmente no es esencial en la fase de propagación de la levadura a nivel de laboratorio. La levadura no debe ser propagada con mostos de alta gravedad (Cahill y Murray, 2000). Para las cepas de cerveza ale y lager se propagado en 7,5, 11,5 y 17,5 mostos PE. Teniendo en cuenta que las células en crecimiento activo son los más sensibles y que el etanol es tóxico disminuyendo la Viabilidad Celular.

El crecimiento de la levadura es estimula por las líneas equipadas con filtros microbiológicos de suministro de aire u oxígeno estéril al sistema, líneas de escape o purga, puertos para el muestreo y la inoculación, capaz de operar en condiciones asépticas. El rendimiento de la primera fermentación debe estar dentro del rango normal en términos de duración y el grado de crecimiento de la levadura, la cerveza resultante debe estar dentro de los parámetros de especificación. Estos objetivos no siempre se logran, los Propagadores tradicionales operan sobre el principio microbiológico de que la levadura en la medida de lo posible, está en las mismas condiciones fisiológicas en cada proceso fermentativo, este supuesto asegurará que el nuevo ciclo de propagación de células de levadura producirá el rendimiento estándar de fermentación anterior. Cuando se transfiere el primer mosto, la concentración de células de levadura generalmente es baja no más de lo que se obtiene a partir de un mosto convencional de fermentación (típicamente, $50 - 60 \times 10^6$ células por ml). Los rendimientos bajos de concentración celular asociados con los sistemas tradicionales de propagación, requieren normalmente varios pasos para generar suficiente biomasa de células para iniciar la primera fermentación. Por otra parte los factores de escalamiento hacia arriba, entre cada fase, son modestos no más de 1:5. Un régimen típico requiere cuatro etapas de 1.5, 6.0, 30.0 y 150 hl, respectivamente, para generar la biomasa de levaduras suficiente para inocular hasta 800 HL (500 barriles Reino Unido) de mosto cervecero. La duración de todo el proceso, incluyendo la fase de laboratorio, demanda varias semanas de trabajo el proceso es lento y el uso de múltiples fermentadores eleva el coste de instalación, mantenimiento y de operación, los riesgos de contaminación son proporcionales al número de fermentadores, Para satisfacer la creciente demanda de biomasa celular en las grandes fábricas cerveceras ha sido necesario introducir métodos para incrementar el rendimiento de la levadura y acelerar el proceso. El cultivo de la levadura a una temperatura superior a la utilizada durante la fermentación acelera el proceso de propagación. Los altos rendimientos de biomasa se pueden obtener asegurando las condiciones totalmente aeróbicas. La propagación del inóculo aeróbico se realiza por lo general en un rango de temperatura de 20–25 °C produciendo una Biomasa de concentración celular de levadura de 180- 220x10⁶células / mL. La fase de crecimiento requiere un periodo de tiempo de 24 - 48 horas en completarse. Todas las condiciones operativas son orientadas a asegurar en el medio de cultivo las más altas tasas de transferencia de oxígeno que pueda lograrse. Esto requiere del control de dos condiciones operativas. En primer lugar, un sistema para suministrar oxígeno estéril al mosto de cerveza donde se propaga la levadura, por lo general un anillo de aspersión y en segundo lugar, una eficiente agitación mecánica para asegurar que el oxígeno se dispersa y solubilice por todo el cultivo de propagación. Las características esenciales de los equipos se muestran en la (figura 23). El volumen de operación debe estar alrededor de 8 hl. El segundo recipiente debe estar dimensionado para lograr la tasa de concentración celular deseada en la primera fermentación. Por ejemplo, una propagación celular en un tanque con un volumen de operación de 100 hL y un recuento de células de 200×10^6 células/ml generaría la levadura

suficiente para inocular 1.300 hL de mosto con una concentración celular final de 15×10^6 células / ml. En contraste con las tradicionales grandes plantas de propagación los factores de escalamiento para la propagación celular pueden utilizarse típicamente 1:10 a 1:20.

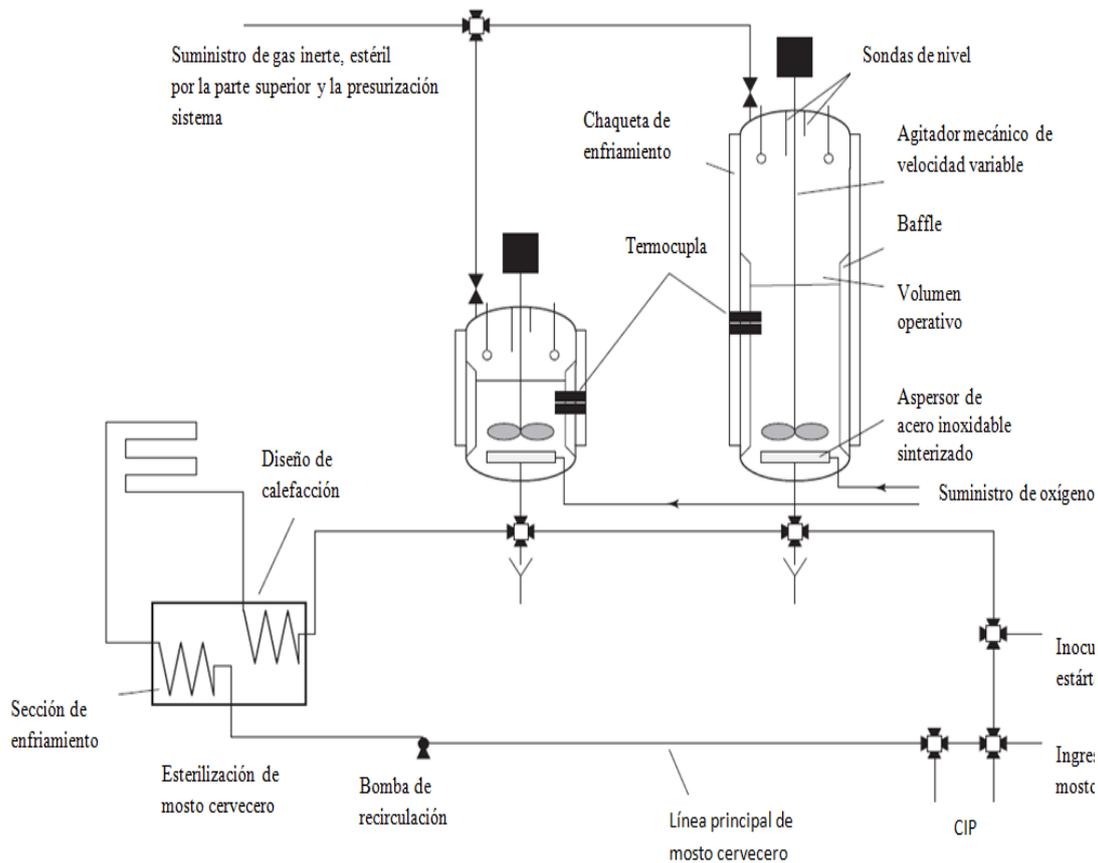


Figura 23. Dostanques del sistema de propagación levadura cervicera. Las capacidades desde trabajo decada tanque es de 5BRL (8HL) y 85 BRL (136hl), (tomado deBoulton yQuain, 1999).

2.13.3 Efecto Pasteur. Aclarada definitivamente la cuestión del origen de la fermentación y ya establecido que las levaduras a partir de una cantidad dada de azúcar y bajo condiciones aeróbicas, forman aproximadamente veinte veces más biomasa celular que bajo condiciones anaeróbicas. El hallazgo de que el oxígeno reprime la fermentación etanólica, es conocido como "Efecto Pasteur", es un ejemplo modelo de la regulación metabólica. El proceso de fermentación de la glucosa por las levaduras es un proceso anaeróbico; no obstante, las levaduras son aeróbicas. Bajo condiciones anaeróbicas las levaduras fermentan de una forma muy intensa pero casi no crecen. Con la aireación se reduce la fermentación en favor de la respiración. En algunas levaduras la fermentación puede reprimirse casi totalmente mediante una aireación intensa. Louis Pasteur descubrió este efecto hace ya más de cien años en sus investigaciones acerca de los procesos de fermentación. Desde el punto de vista

energético la célula apuntan a un mecanismo extraordinariamente inteligente, en condiciones anaeróbicas solo se forman 2 moles de ATP por cada mol de glucosa mientras que en condiciones aeróbicas se forman 38 moles de ATP por mol de glucosa. La célula se ajusta pues a la efectividad en la producción de energía en ambas condiciones mediante la regulación en la transformación del sustrato.

2.13.4 Efecto Crabtree. Descubierta por el bioquímico Crabtree de Herberto, es un efecto contrario al efecto Pasteur, describe el fenómeno por el cual la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en presencia de altas concentraciones externas de glucosa en un medio aerobio, realiza el ciclo de la Glucólisis como fuente de energía produciendo etanol con una mínima producción de biomasa. El aumento de las concentraciones de glucosa en el medio reprime la síntesis de RNAm de los genes involucrados en la en la respiración y el metabolismo oxidativo, interrumpiendo el siguiente catabolismo energético, el ciclo de los ácido tricarboxílicos, reduciendo la necesidad del Fosforilación Oxidativa vía el sistema del transporte de electrón, ruta metabólica que produce cantidades apreciables de ATP y por lo tanto disminuye el consumo del oxígeno. El fenómeno se cree haberse desarrollado como mecanismo de la competición (debido a la naturaleza antiséptica del etanol). La presencia de azúcares asimilables superiores a 0.16 g/l produce inevitablemente la formación de alcohol en el proceso de crecimiento de levadura *Saccharomyces cerevisiae* aún en presencia de exceso de oxígeno. Es por ello que la producción de levadura se debe llevar a cabo con sistemas de "Batch" alimentado con alimentación programada de azúcares para maximizar la formación de biomasa e impedir la formación de alcohol. Es otro ejemplo de la influencia de un efector externo o de naturaleza química sobre la actividad metabólica de un microorganismo

2.14 CONCEPTO DE CULTIVO CELULAR VIABLE Y VITAL

2.14.1 Evaluación de la viabilidad de un cultivo de células de levadura. El método clásico para la evaluación de la viabilidad microbiológica de un inóculo se realiza en placa sobre un soporte sólido en el cual se siembra un determinado volumen del cultivo celular (Suspensión celular) y luego de un período de incubación, se contabiliza las colonias resultantes. Cada colonia es un clon de células que se deriva de una célula viva individual. Por lo tanto, la proporción de colonias formadas en relación con el número total de células presentes en la muestra original, proporciona una medida de la viabilidad. Es posible acelerar el procedimiento mediante el conteo de micro-colonias por su comportamiento cultural sobre placas diapositivas, sin embargo, el mejor método es el de incubación que se necesita varias horas para obtener un resultado confiable. (ASBC Comité de análisis de 1981, Pierce, 1970). Estos procedimientos requieren mucho tiempo para satisfacer las necesidades de elaboración de la cerveza, una respuesta rápida es esencial. Un métodos rápidos para la evaluación de viabilidad en la industria de la cerveza se basan en el uso de colorantes vitales, el procedimiento más comúnmente utilizado es la tinción de azul de metileno, aunque muchos otros han utilizado otros

colorantes vitales como , cristal violeta, el azul de anilina Rodamina B y eosina Y (King et al, 1981;. Evans y Cleary, 1985;. Koch et al,1986; Hutcheson et al, 1988). En particular, una prueba como la tinción de azul de metileno es de gran utilidad como base de una simple decisión de utilizar o no un determinado lote de levadura como inóculo. Las pruebas de este tipo también puede ser útil, siempre y cuando la viabilidad es alta (> 90%) en el establecimiento de un factor de corrección para asegurar que las tasas viables lanzando por todos los fermentaciones son los mismos. Estas pruebas son menos útiles en la identificación de las variaciones fisiológicas en levadura de inóculo, que pueden producir inconsistencias en el desempeño de la fermentación y la cerveza de calidad. Con respecto a las células de levadura, no existe una definición única que abarque la viabilidad.

Características de las células viables:

- (1) la capacidad de proliferación celular (la progresión del ciclo celular);
- (2) la capacidad de crecimiento celular (metabolismo anabólico)
- (3) metabolismo detectable en reposo (captación de oxígeno y la evolución de dióxido de carbono);
- (4) la posesión de la integridad de la membrana (la asimilación de control selectivo de la exógena metabolitos y excreción de los productos derivados).

2.14.2 Evaluación de la vitalidad de un cultivo de células de levadura. Es obvio que en el seno de una población de células de levadura empleadas como inóculo no todas las células poseen las mismas características de Viabilidad, pero todavía tienen un papel activo en la fermentación. Porejemplo, la célula pierde por cualquier razón la capacidad de reproducción, sin embargo, todavía puede contribuir a la fermentación por la asimilación de nutrientes y la producción hacia el mosto de los componentes de la cerveza. No está claro qué parte de estas poblaciones es detectados por las pruebas de viabilidad estándar. También se puede argumentar de que las pruebas sobre la placa o diapositivas para la determinación de la viabilidad de un inóculo celular, son consideradas como un método estándar de referencia, la prueba como tal, que se aplica al inóculo de células de levadura no equivale necesariamente a un crecimiento posterior y rendimiento óptimo de la fermentación. Las pruebas simples de viabilidad no son capaces de proporcionar información sobre posibles diferencias en el estado fisiológico de la fracción viable de la población de levaduras.

Estas diferencias podrían abarcan todo el espectro de las células que coexisten en el mismo inóculo, a través de las células que se encuentran muy estresadas y también muertas hasta las que se encuentran en una condición fisiológica que permitan la "super-performance" en la fermentación. Por ejemplo, las células que contienen esteroides con alta concentración

se puede predecir que tiene la capacidad de realizar más ciclos de reproducción durante la fermentación, que aquellos con niveles basales de

Esteroides. Varias pruebas de vitalidad se han propuesto, presentando información de la condición fisiológica de toda la población de células de levadura dentro de una suspensión. La Vitalidad una elección desafortunada de la terminología, debido a

que no tiene sentido estricto, otros científicos la consideran sinónimo de viabilidad. Por supuesto, se da a entender un método que identifica las células de levadura que produce un rendimiento vigoroso de rápida fermentación en términos de crecimiento de la levadura y etanol. Pero la definición más precisa y útil es de "Pruebas de predicción de fermentación". Sin embargo, la prueba de vitalidad se ha convertido en parte de la literatura cervecera establecida.

Los requisitos de las pruebas de vitalidad son:

- (1) Debe ser rápido
- (2) Debe ser sencillo
- (3) Utilizar los aparatos disponibles en el laboratorio cervecera típica.

Los resultados de tales pruebas son útiles para llegar a una decisión simple que permita la selección preferente de un tipo de inóculo adecuado y de los requerimientos de oxigenación del mosto cervecero, lo que proporcionara un rendimiento óptimo del proceso de fermentación.

2.15 MEDIDA DEL CRECIMIENTO Y ENUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS VIABLES

La importancia de conocer la densidad de un cultivo celular radica en que nos ayuda a lograr óptimos resultados en la fermentación porque nos permite predecir la cinética de crecimiento y por medio de esto podemos determinar cuál es el tiempo necesario para obtener los metabolitos deseados. Existen diferentes sistemas para detectar y medir el crecimiento de microorganismos. Los principales se enumeran a continuación:

2.15.1 Recuento directo. Se emplea la cámara de Neubauer Improved esta cámara se utiliza para conteo celular y viabilidad de las levaduras así como el uso de las fórmulas correspondientes en cada caso. Es un proceso sencillo pero requiere de una determinada paciencia para no equivocarse y conseguir un buen resultado.

2.15.2 Medida de la masa de células. El sistema se basa en que las células en suspensión dispersan la luz causando la turbidez del cultivo. La turbidez depende de la masa en

Suspensión por tanto, midiendo esta absorbancia se puede estimar aquella. Este es el parámetro de medida más fácil de usar en los cultivos de laboratorio. La densidad de células debe ser del orden de 10^5 /ml.

2.15.3 Recuento de viables. Consiste en sembrar un volumen determinado de cultivo o muestra sobre el medio de cultivo sólido adecuado para estimar el número de viables contando el número de colonias que se forman puesto que cada una de estas deriva de una célula aislada. Para que la medida sea correcta desde el punto de vista estadístico, es necesario contar más de 300 ufc. En ciertas ocasiones en las que la densidad de microorganismos es demasiado baja, éstos se pueden recolectar por filtración a través de una membrana (de 0.2 μm de tamaño de poro) y posterior colocación de la membrana en un medio de cultivo adecuado para que se formen las colonias.

2.15.4 Medida del número de partículas. Usando contadores electrónicos de partículas, estos sistemas no nos indican si las partículas corresponden a células vivas o muertas; pero nos pueden dar una idea del número de las partículas.

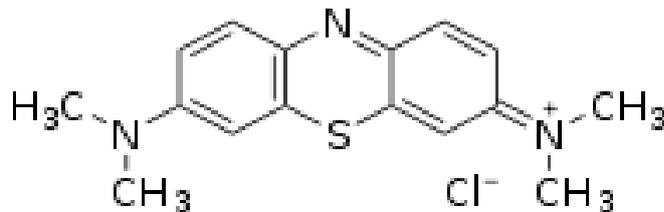
2.15.5 Medida de parámetros bioquímicos: tales como la cantidad de ADN, ARN, Proteínas, peptidoglicano, etc. por unidad de volumen de cultivo.

2.15.6 Medida de actividad metabólica de las bacterias: como que respiran producen una disminución del potencial Redox del medio en que se encuentran como consecuencia del consumo de oxígeno (utilización de colorantes sensibles a oxidación y reducción tales como el azul de metileno)

2.16 TINCIÓN VITAL DE CÉLULAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

Un cultivo celular el cual será empleado como estérter para la inoculación en el mosto cervecero, se observa a simple vista como una suspensión densa y homogénea compuesta de biomasa celular. Es de importancia relevante cuantificar el número de células vivas con las que se cuenta para poder ser utilizada como un inóculo para fermentación de un mosto cervecero. Al ser llevada una muestra de inóculo al microscopio no se puede discriminar por observación directa entre células vivas o muertas. Es necesario emplear la técnica de Tinción vital con azul de metileno la cual se fundamenta en reacciones Bioquímicas intracelulares específicamente en una Organela llamada mitocondria siendo esta la central energética de la célula, donde se lleva a cabo la oxidación de los sustratos oxidables por el Oxígeno molecular. El flujo de electrones en la cadena transportadora donde participa el sistema citocromo, se encuentra presente en microorganismos aerobios, es una técnica confiable de discriminar entre una célula viva de otra muerta. El citocromo oxidasa activa la oxidación del citocromo reducido cediendo un electrón al oxígeno molecular el que a su vez actúa como un aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones el oxígeno es el aceptor final del hidrógeno, reduciéndolo a dos moléculas de agua. El azul de metileno, es una sal básica, es un indicador de Oxido-Reducción, en estado oxidado es de color azul (azul de metileno) en estado reducido incoloro (Azul de leucometileno). Cuando se agrega como sustrato artificial, el colorante sintético reducible azul de metileno sobre las células de *Saccharomyces cerevisiae* vivas y muertas estas quedan teñidas de color azul, el cual sustituye al aceptor natural de electrones en cualquier parte de la cadena transportadora de electrones, actuando como reductores del citocromo c del sistema citocromo oxidasa en las células vivas de *Saccharomyces cerevisiae*, reduciendo y decolorando la tinción azul de metileno. Las levaduras muertas no generan flujo de electrones en la cadena transportadora, por lo tanto seguirán

teñido de color azul. Un cultivo Celular para ser considerado como estándar o inóculo la tasa recomendada de levaduras como mínimo es del 85% de células vivas. El azul de metileno cuyo nombre científico es cloruro de metiltionina es un compuesto heterocíclico aromático con fórmula molecular $C_{16}H_{18}ClN_3S$



Molécula de azul de metileno

Composición de la solución Azul de Metileno al 1% (w/v)

Azul de metileno..... 0,3g

Alcohol etílico..... 30 mL

2.17 DILUCIÓN SERIADA DE LAS SUSPENSIONES CELULARES

Para poder realizar un conteo celular en cámara de Neubauer de una suspensión la cual tiene una alta densidad celular se debe realizar la técnica de diluciones seriadas para evitar las estimaciones erróneas y crecimientos confluentes en placas. También es importante que cuando se hacen cultivos en placa petri el número de colonias no sea demasiado bajo para que el cálculo sea estadísticamente significativo. En la práctica el número de colonias por placa oscila entre 30 y 300 para obtener el número apropiado de colonias casi siempre se diluye la muestra. Como raramente se sabe de antemano que el número de células viables, normalmente se hace más de una dilución, lo más frecuente es realizar diluciones decimales de la muestra. Para hacer una dilución 10^{-1} se mezclan 0.5 mL de muestra con 4.5 mL de diluyente o 1 mL de muestra con 9 mL de diluyente, si se necesita una dilución de 10^{-2} se pueden mezclar 0.05 mL de la muestra con 4.95 mL de diluyente o 0.1 mL con 9.9 mL por otra parte, una dilución de 10^{-2} se puede hacer de modo seriado haciendo dos diluciones de tipo 10^{-1} . En la mayor parte de los casos se realizan dichas diluciones hasta alcanzar la dilución deseada. Así si se quiere dilución 10^{-6} se puede lograr haciendo diluciones sucesivas de 10^{-2} o seis diluciones de 10^{-1} . Procedimiento para determinación de viables usando las diluciones seriadas de la muestra y el método de vertido en placa, el líquido usado para hacer las diluciones es una solución salina equilibrada. El factor de dilución es el inverso de la dilución en muestras de 0.1 mL

caso de siembra por extensión puede ser necesario más diluciones para extender

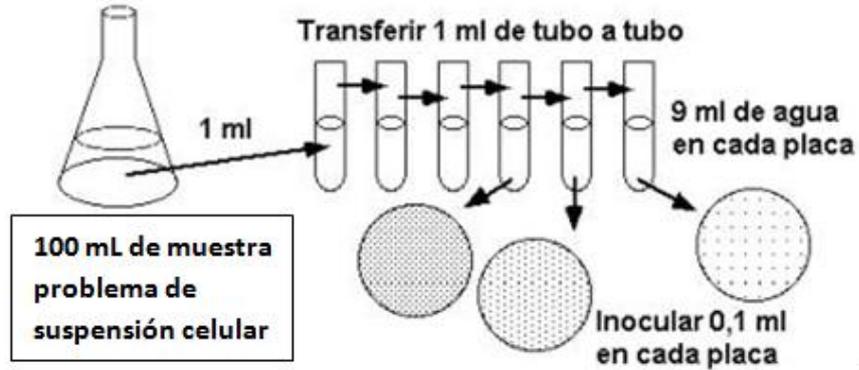


Figura 24. Dilución seriada de suspensión celular

2.18CAMARA DE NEUBAUER IMPROVED PARA EL RECuento DE LEVADURAS

Consiste en la observación al microscopio de volúmenes muy pequeños de suspensiones de células. Se usan unos portaobjetos especiales denominados cámaras de Neubauer Improved. Está diseñada de manera de contener una cantidad fija de suspensión celular líquida. Consta de un cuadrado central de 1 mm de lado dividido en 25 cuadraditos. Cada uno de ellos está, a su vez, dividido en 16 cuadrados. Se coloca un cubreobjetos sobre la zona cuadrículada, apoyado sobre dos hombros laterales de manera que cuando hay un buen contacto entre ellos, queda una distancia de 0.1 mm entre el cubreobjetos y la cámara. Esto determina que el líquido quede contenido en un volumen de 0.1 mm^3 . Para que la medida sea correcta es necesario que la densidad de células sea del orden de 10^5 células/ml.

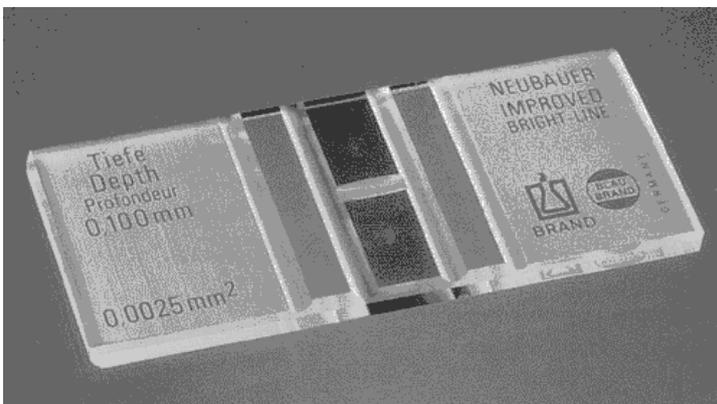


Figura 25. Cámara de Neubauer Improved.

2.19 CRECIMIENTO DE LA POBLACIÓN CELULAR DEL INÓCULO

El crecimiento se define como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de un organismo. Un aumento en el número de células microbianas de una población, también se puede medir como un incremento de la masa celular, la velocidad de crecimiento es el cambio en el número de células o en la masa celular experimentado por unidad de tiempo. Durante el ciclo de división celular, todos los componentes estructurales de la célula se duplican. El intervalo para la formación de dos células a partir de una supone una generación, y el tiempo transcurrido para que esto ocurra se llama tiempo de generación, por lo tanto el tiempo de generación es el tiempo que se requiere para que la población se duplique, razón por la cual a veces el tiempo de generación se llama tiempo de duplicación. Durante cada generación, tanto el número de células como la masa celular se duplican.

2.19.1 Ciclo de crecimiento para el cultivo por lotes. En un cultivo Batch o intermitente en sistema cerrado o cultivo en medio no renovado puesto que no se añade medio nuevo de cultivo, también conocido como cultivo monofásico. Si se inoculan microorganismos unicelulares en un medio fresco esterilizado y se mide la densidad del número de células con respecto al tiempo se puede observar que hay una curva de crecimiento típica, no aplicable a una célula aislada sino a poblaciones de células. Esta curva de crecimiento puede dividirse en distintas fases llamadas fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte.

A) Fase de latencia: Cuando se inocula una población microbiana en un medio fresco, por lo general el crecimiento no comienza inmediatamente sino sólo tras un periodo de tiempo que constituye la fase de latencia, la cual puede ser breve o larga dependiendo de la procedencia del cultivo y de las condiciones de crecimiento. Si un cultivo exponencial se inocula en el mismo medio y en las mismas condiciones de cultivo, no se experimenta un retraso y el crecimiento exponencial se inicia inmediatamente. Sin embargo si el inóculo se toma de un cultivo viejo, (fase estacionaria) y se inocula en el mismo medio se observa normalmente un retraso aunque todas las células del inóculo sean viables, es decir sean capaces de reproducirse. Este se debe con frecuencia a que las células carecen de varios componentes esenciales para dividirse y se requiere tiempo para la síntesis. También se aprecia un retraso cuando las células del inóculo han sido dañadas parcialmente con calor, radiaciones y compuestos tóxicos debido al tiempo requerido para recuperarse y reparar los daños. La fase de latencia también ocurre cuando se transfiere una población de un medio rico a otro más pobre. Para que ocurra crecimiento de un medio de cultivo particular, las células deben tener un equipo enzimático completo que permita la síntesis de metabolitos esenciales ausentes en el medio. Al pasar a otro medio, se necesita tiempo para la síntesis de las nuevas enzimas.

- B) Fase de aceleración:** En esta fase el número de células vitales y viables se reproducen hasta alcanzar una tasa máxima de división
- C) Fase exponencial:** Las poblaciones microbianas muestran un modelo típico de crecimiento. El modelo del incremento de la población, en el que en cada periodo fijo de tiempo se duplica el número de células, se denomina crecimiento exponencial. En general las células en crecimiento exponencial están en el estado fisiológico más sanos y por ello, las células tomadas en el punto medio del crecimiento exponencial son a menudo las más indicadas para estudios enzimáticos y estructurales. La mayoría de los microorganismos unicelulares crecen exponencialmente pero estas velocidades son muy variables siendo estas velocidades influenciadas por las condiciones ambientales (Temperatura, Composición del medio de cultivo, etc.) así como por las características genéticas del organismo. Cuando en un sistema de coordenadas se representa aritméticamente el número de células de un experimento en función del tiempo transcurrido, se obtiene una curva cuya pendiente aumenta de manera constante. Sin embargo es difícil obtener información sobre el crecimiento a partir de ese tipo de curvas. Si representamos el número de células en una escala (\log_{10}) y el tiempo en una escala aritmética (resultando una gráfica semilogarítmica) obtenemos una línea recta. Esta función lineal es un indicador inmediato de que las células están creciendo exponencialmente además, las gráficas semilogarítmicas son adecuadas y simples de usar para determinar tiempos de generación a partir de una serie de resultados.
- D) Fase de desaceleración:** Después de que el crecimiento celular alcanzara una tasa máxima de crecimiento es seguida por la desaceleración de la tasa de crecimiento y la tasa de división.
- E) Fase estacionaria:** En un sistema de cultivo cerrado, en medio no renovado o monofásico, como por ejemplo un tubo o un matraz, el crecimiento exponencial no se puede prolongar de modo indefinido. Es obvio que algo debe pasar mucho antes de ese tiempo que limite el crecimiento de la población. Lo que generalmente sucede es que :
- A) Un nutriente esencial del medio de cultivo se usa y llega a ser un factor limitante del crecimiento
- B) Acumulación en el medio de fermentación de algunos productos de desecho hasta niveles inhibitorios que hacen que cese el crecimiento exponencial.
- Frecuentemente ocurren ambas cosas. Al producirse esto, la población alcanza la fase estacionaria, donde no hay aumento ni descenso neto en el número de células. Aunque no suele haber crecimiento en la fase estacionaria, muchas funciones celulares continúan como el metabolismo

energético y algunos procesos biosintéticos. En algunos casos puede ocurrir un lento crecimiento en la fase estacionaria, algunas células de la población crecen pero otras mueren y los dos procesos se equilibran de modo que no hay aumento ni disminución neta del número de células.

- F) Fase de muerte:** Si una población se incuba después de que la población haya alcanzado la fase estacionaria, las células pueden continuar vivas y metabólicamente activas, pero también pueden morir. Si ocurre esto último, se dice que la población está en fase de muerte. En algunos casos la muerte se acompaña de una lisis celular. La fase de muerte de la curva de crecimiento también es exponencial, no obstante la mayoría de los casos de velocidad de muerte celular es mucho más lenta que la velocidad de crecimiento exponencial.

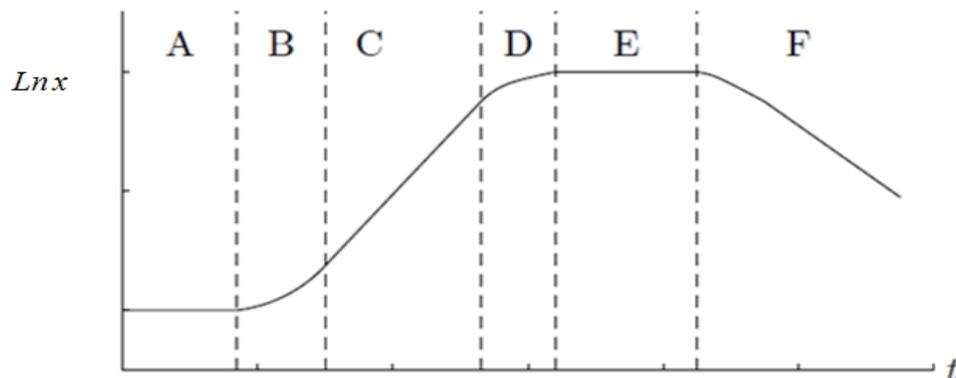


Figura 26. Ciclo de crecimiento intermitente

X = Representa la concentración celular (número de células/mL)

t = Periodo de incubación en horas

2.19.2 Cinética de crecimiento en un cultivo intermitente

Crecimiento logarítmico o exponencial:

Suponiendo que se utiliza un inóculo activo puede acortarse el tiempo de la fase de latencia y la velocidad de crecimiento de las células aumenta progresivamente. Transcurrido un periodo de tiempo, las células crecen a una velocidad máxima constante, a esta etapa se denomina fase logarítmica o exponencial y puede describirse por la ecuación:

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot X \dots \dots \dots (1)$$

Dónde:

X = es la concentración de células (mg/mL)

t = es el tiempo de incubación(h)

μ = es la velocidad específica de crecimiento(h^{-1})

Al integrarse la ecuación (1) se transforma en :

$$X_t = X_0 \cdot e^{\mu t} \dots \dots \dots (2)$$

Dónde:

X_0 es la concentración de células en el tiempo "0"

X_t es la concentración de células después de un tiempo "t" en horas

Tomando logaritmos naturales en la ecuación (2) se obtiene:

$$\ln X_t = \ln X_0 + \mu t$$

El crecimiento microbiano unicelular es auto catalítico, de modo que la velocidad de crecimiento celular es proporcional a la concentración de células ya presente. El crecimiento de un microorganismo en un cultivo puede describirse también mediante el simple cálculo algebraico usando el término de tiempo de duplicación t_d , que es el tiempo necesario para dividir una célula. Si en un medio de cultivo se inoculaba una célula viable y esta célula creciera a velocidad máxima sin pasar por la fase de latencia, el crecimiento secuencial del número de células que se observaría sería: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128...etc. Este crecimiento secuencial puede representarse expresando el número de células en base dos. Entonces el resultaría: $2^1, 2^2, 2^3, 2^4, 2^5, 2^6, 2^7, 2^8$ etc. Los exponentes (o potencias o índices) en dicha serie representa el número de generaciones que han ocurrido, por lo que después el número de generaciones que han ocurrido, por lo que después de "n" generaciones el número de células del cultivo será 2^n . Si el medio se inocula con N_0 células, el número de células, N_t presente después de "n" generaciones sería:

$$N_t = N_0 \cdot 2^n \dots \dots \dots (3)$$

$$N_t = N_0 \cdot 2^{t/t_d} \dots \dots \dots (4)$$

Al tomar logaritmo en base 2 la ecuación(4) se transforma en :

$$\log_2 N_t = \log_2 N_0 + t/t_d$$

Luego entonces

$$t_d = \frac{t}{\log_2 N_t - \log_2 N_0}$$

Aunque el término de tiempo de duplicación se utiliza relativamente poco, puede ser útil para convertir la velocidad específica de crecimiento en el tiempo de duplicación para lograr una mejor apreciación el significado de estos valores. La ecuación que deriva del tiempo de duplicación utilizando el término número de células puede obtenerse también usando el término concentración de células. Entonces:

$$t_d = t \frac{\ln 2}{\ln \frac{X_t}{X_0}}$$

Ya se ha mostrado que:

$$\ln X_t = \ln X_0 + \mu t$$

Si en esta ecuación $t = t_d$, entonces $X_t = 2X_0$

$$\ln 2X_0 = \ln X_0 + \mu t_d$$

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_d} \quad \text{y} \quad t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Por lo tanto

$$\mu = \frac{0.693}{t_d}$$

De donde la velocidad específica de crecimiento de 1 h^{-1} equivale a un tiempo de duplicación de 0.693 horas. La velocidad máxima es una característica propia de cada microorganismos.

2.20 ECUACIONES DE DISEÑO PARA EL BIORREACTOR IDEAL DISCONTINUO

Modelamiento de la tasa de crecimiento celular para un Biorreactor perfectamente agitado, discontinuo e isotérmico. La utilización del sustrato y la formación de Biomasa celular de células de *Saccharomyces cerevisiae*. Efectuando un balance de materia referido. Un sistema fermentativo se define como el volumen de reacción limitado por un contenedor físico (Biorreactor). Donde se lleva a cabo la degradación biológica anaerobia de moléculas orgánicas mediante la acción de ciertas enzimas que actúan directamente o como componentes de ciertas bacterias y levaduras. En el sistema de fermentación por lote inicialmente se añade al Biorreactor una solución rica en nutrientes (concentración de sustrato, S_0) la cual se inocula con microorganismos (concentración de Biomasa, X) que producen un determinado producto de interés (concentración de producto, P). A medida que procede la fermentación se tiene un estado no estacionario de los componentes del sistema (S , X y P). La multiplicación celular cesa por limitación de nutrientes y/o

acumulación de productos tóxicos de excreción celular. Una vez que se ha alcanzado el nivel deseado de fermentación (S, X, P), el Biorreactor se vacía, se lava, se esteriliza y el proceso se repite. Los cambios en los componentes del medio de fermentación dentro del Biorreactor producen a su vez cambios en el metabolismo. El comportamiento del crecimiento de la levadura en el tiempo se representa por una curva de crecimiento (Figura 41).

2.20.1 Sistema Fermentativo de Operación por Lotes

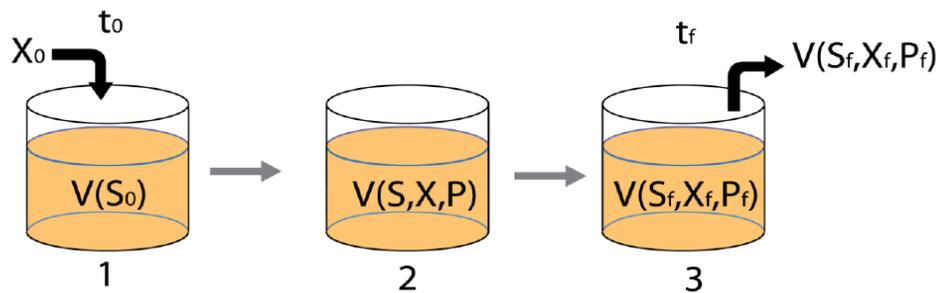


Figura 27. Operación del sistema de fermentación por lote.

Balance de Biomasa:

Acumulación = Entrada – Salida + Crecimiento neto

$$V \left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{acumulación}} = 0 - 0 + V \left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{crecimiento}} \quad [1]$$

Definiendo:

$$\frac{dX}{dt} \left(\frac{1}{X} \right) = \mu \quad [2]$$

Y Dividiendo entre V se tiene

$$\left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{acumulación}} = \left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{crecimiento}} = \mu X \quad [3]$$

Dónde:

- V= volumen del medio en el Biorreactor
- X= concentración de microorganismos (Biomasa)
- t= tiempo
- μ = velocidad específica de crecimiento celular

Balance de Sustrato:

$$\textit{Acumulación} = \textit{Entrada} - \textit{Salida} - \textit{Consumo}$$

$$V \left(\frac{dS}{dt} \right)_{\text{acumulación}} = 0 - 0 - V \left(\frac{dS}{dt} \right)_{\text{consumo}} \quad [4]$$

Definiendo:

$$\frac{dS}{dt} \left(\frac{1}{X} \right) = q_s \quad [5]$$

Y Dividiendo entre V se tiene

$$\left(\frac{dS}{dt} \right)_{\text{acumulación}} = - \left(\frac{dS}{dt} \right)_{\text{consumo}} = -q_s X \quad [6]$$

Dónde:

S= concentración de sustrato

q_s = velocidad específica de consumo de sustrato**Balance de Producto:**

$$\textit{Acumulación} = \textit{Entrada} - \textit{Salida} + \textit{Síntesis neta}$$

$$V \left(\frac{dP}{dt} \right)_{\text{acumulación}} = 0 - 0 + V \left(\frac{dP}{dt} \right)_{\text{síntesis}} \quad [7]$$

Definiendo:

$$\frac{dP}{dt} \left(\frac{1}{X} \right) = q_p \quad [8]$$

Y Dividiendo entre V se tiene :

$$\left(\frac{dP}{dt} \right)_{\text{acumulación}} = \left(\frac{dP}{dt} \right)_{\text{síntesis}} = q_p X \quad [9]$$

Dónde:

P = concentración de producto y

q_p = velocidad específica de formación de producto.

2.20.2 Ventajas de un Sistema Fermentativo de Operación por Lotes:

Dentro de las principales ventajas de un proceso por lote se tienen: bajo riesgo de contaminación, flexibilidad operacional cuando el fermentador se utiliza para distintos productos, manejo eficiente entre lote y lote y costos de operación bajos.

2.20.3 Desventajas de un Sistema Fermentativo de Operación por Lotes:

Las principales desventajas de este modo de operación son tiempos muertos largos que se presentan al momento de vaciar, limpiar y esterilizar el Biorreactor para la siguiente fermentación; adicionalmente, este proceso requiere de mucha mano de obra. Dado que se trata de un proceso no estacionario requiere de un mayor cuidado por parte de los operadores. Por otra parte el control y optimización del proceso se vuelven complejos y existe el riesgo de mayor variabilidad entre lotes.

3. HIPÓTESIS

Es posible optimizar el proceso fermentativo del mosto de malta de cebada en la producción de cerveza empleando un inóculo axénico de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, con una concentración óptima de células vitales y viables, bajo condiciones controladas y dirigidas que gobiernen el proceso fermentativo.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Estandarizar la metodología idónea en la reactivación, propagación y escalamiento óptimo de la biomasa de células *Saccharomyces cerevisiae*, y los fundamentos de Bioprocesos que controlan y dirigen el metabolismo celular en la etapa de fermentación del mosto de cerveza, desde un nivel de laboratorio a un nivel piloto.

Objetivos específicos

- 1.- Adquirir conocimientos Bioquímicos y Microbiológicos básicos para la comprensión del Bioproceso de reactivación y propagación de células de *Saccharomyces cerevisiae*
- 2.- Adquirir los conocimientos básicos de Enzimología, para controlar las condiciones de la hidrólisis enzimática óptima, en la producción del mosto cervecero.
- 3.- Determinar una metodología que nos permita conservar de manera aséptica y estable genéticamente el cepario de células de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
- 4.- Determinar una metodología que nos permita cuantificar la concentración de células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* vitales y viables y poder discriminar entre células vivas de las muertas.
- 5.- Determinar a nivel de laboratorio la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de generación de la biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones óptimas las cuales serán replicadas a nivel piloto.
- 6.- Determinar una metodología que permita la reactivación, propagación y el escalamiento óptimo del inóculo de células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación del mosto de malta cebada desde el nivel de laboratorio a nivel piloto.

5.- METODOLOGÍA

Para llevar a cabo los experimentos de producción de mosto se emplearon las siguientes materias primas mostradas en la tabla

Materias primas	Marca
Malta de cebada	MalteríaCargill
Lúpulo	Cascade 6.1% a.a (Ácidos alfa)
Agua tratada	-----
Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Safale S-40

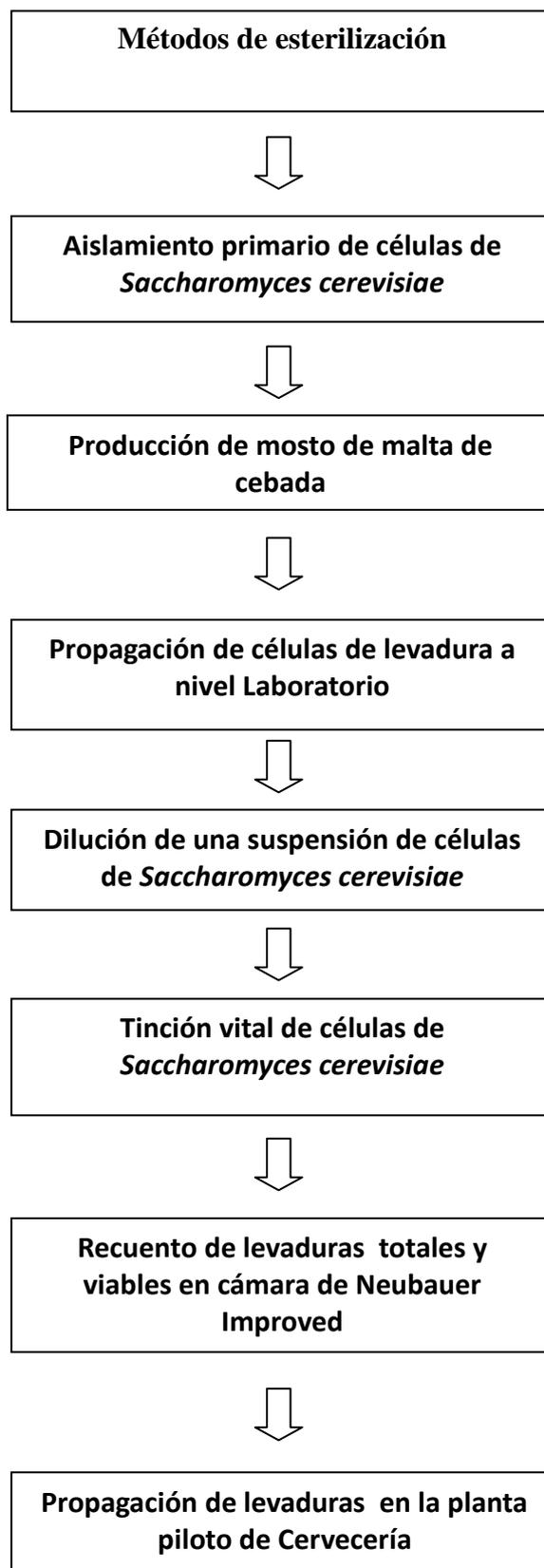
Cuadro 13.

Para la composición de los medios de cultivo de asilamiento y propagación celular de Biomasa se utilizó los siguientes insumos:

Insumos y medios de cultivo	Marca
Peptona	Merck
Glucosa	Merck
Extracto de levadura	Merck
Agar	Merck
Tetraciclina	Merck
Alcohol al 90%	Merck
Ácido fosfórico al 80%	Merck
Solución de azul de lactofenol	Merck
Caldo YPG	Merck
Solución Azul de Metileno al 1%	Merck

Cuadro 14.

5.1 Plan de trabajo



Cuadro 15
5.2 Material y método

5.2.1 Métodos de esterilización

5.2.1.1 Esterilización de instrumentos por calor seco

Materiales y equipos:

- Mechero Bunsen
- Horno de convección con rango desde temperatura ambiente hasta 250 ó 300°C
- Materiales de vidrio y de metal debidamente preparados.

Procedimiento:

1.- El material a esterilizar se deberá poner en el horno frío, teniendo en cuenta las siguientes recomendaciones:

Cada unidad deberá quedar separada de los vecinas, los materiales no deberán estar en contacto con las paredes, piso ni techo del esterilizador para evitar que el papel o los tapones de algodón se quemen. La carga no deberá superar el 80% de la capacidad total de la cámara interior del horno.

2.- Encender el horno y verificar que los instrumentos de medición de tiempo (1 hora) temperatura(180°C) se encuentren en posición correcta .Esperar que la temperatura llegue a los 180°C o según se halla seleccionado.

3.- Cuando se alcance la temperatura seleccionada, se comenzara a descontar el tiempo de esterilización, en este caso 1 hora .Cumplido el tiempo de exposición apagar el horno. El material se sacará del horno una vez que este se haya enfriado.

4.- Durante el proceso de esterilización no deberá abrirse la puerta del horno, de lo Contrario se tendrá que reiniciar el proceso. Además, el cambio brusco de temperatura podría romper el material de vidrio.

5.2.1.2 Esterilización de medios de cultivo por calor húmedo

Materiales y equipos:

- Materiales de vidrio o metal
- soluciones y medios de cultivo debidamente preparados.
- Auto clave

Procedimiento:

1).- Colocar el agua destilada o desionizada necesaria para el auto clave hasta la marca indicada.

2).- Introducir el material a esterilizar evitando de que este toque las paredes.

3).- Cerrar correctamente el autoclave ,cuidado de dejar abierta la válvula de salida

de vapor por donde será expulsado el aire contenido dentro y que será desplazado por el vapor que se va a producir .Si el aire no fue eliminado totalmente de la autoclave , el manómetro aumentará a 15 libras pero la temperatura no habrá alcanzado los 121°C

4).- Cerrar la válvula cuando la salida de vapor es continua. Cuando el termómetro indique 121°C mantener la temperatura durante 15 minutos para que se efectúe la esterilización .Transcurrido este tiempo se corta la fuente de calor.

5).- Dejar enfriar hasta que el manómetro indique cero. Abrir la válvula de salida de vapor para expulsar el vapor restante .Abrir el auto clave y retirar el material.

6).-Si el material no está en estado líquido la válvula se puede abrir rápido para dejar salir el vapor, pero si es líquido la rápida pérdida de presión los hace hervir o pueden saltar los tapones por lo que es mejor dejar unos minutos a que se enfríe

7).-Trasladar los medios de cultivo hacia la incubadora por un periodo de tiempo de 24 horas para la respectiva prueba de esterilidad.

5.2.1.3Esterilización por Radiación Gama y UV

Materiales y equipos:

- Materiales de plástico y otros que se deterioran con el calor como el guante, gradillas micropipetas.
- Cabina de seguridad con lámpara UV con longitud de onda germicida (220-300nm)
- Gafas y casco protector

Procedimiento:

- 1.- Verificar que la lámpara UV esté apagada.
- 2.- Colocar el material a esterilizar limpio en la cabina de seguridad.
- 3.- Cerrar la cabina y encender la alampara UV.
- 4.- Dejar exponer el material a la luz UV durante el tiempo estandarizado en el laboratorio en función de la distancia entre el material y la lámpara a menor distancia se requiere menor tiempo de exposición
- 5.- Debe anotarse en un registro el tiempo que estuvo encendido la lámpara de UV cada vez que se le utilice .Este registro es importante porque la lámpara tiene un periodo de vida medio y pasado este tiempo hay que reemplazar la lámpara.
- 6.- Apagar la lámpara y trabajar con la muestra con mucha asepsia.

5.2.1.4Esterilización por Filtración

Materiales y equipos:

- Solución a ser esterilizada
- Sistema de filtración con embudo de 300ml, membrana de 0,2 micras
- Porta filtro de membrana

- Matraz Kitasato estéril.
- Tubos de ensayo estéril
- Bomba de vacío
- Manguera para conectar el Kitasato a la bomba de vacío.
- Mechero Bunsen.

Procedimiento:

- 1.- Colocar la membrana estéril en el porta filtros del embudo con una pinza
- 2.- Poner el embudo sobre un kitasato estéril ajustando con el tapón de jebes.
- 3.- Colocar 100ml a ser esterilizado en el embudo
- 4.- Encender la bomba de vacío y dejar que la presión negativa permita que el líquido del embudo fluya hacia el frasco estéril. Terminando la operación apagar la bomba de vacío.
- 5.- Trabajar de manera aséptica con el líquido esterilizado.

5.2.2 Aislamiento primario de células de *Saccharomyces cerevisiae*

Materiales y equipos:

- Muestra problema (Suspensión de Células de *Saccharomyces cerevisiae* contaminada)
- Peptona
- Glucosa
- Extracto de levadura
- Agar
- Tetraciclina
- Agua desionizada
- Alcohol al 90%

1.2 Materiales de Laboratorio:

- Balanza
- Baguetas
- Erlenmeyer de 250 mL
- Mechero bunsen
- Auto clave
- Cámara incubación
- Espátula
- Etiquetas
- Gotero con ácido fosfórico
- Gotero con una solución de azul de lactofenol
- pH metro
- Algodón
- Probeta graduada 100 mL

- Propipeta
- Reloj
- Placas petri de 100x15
- Asa de siembra
- Cámara de Siembra
- Pipeta graduada de 1 mL al 0,01
- Rotulador
- Encendedor

Procedimiento:

- 1.- Desinfectar la cámara de de incubación con algodón humedecido en alcohol
- 2.- Esterilizar las placas Petri desinfectadas y envueltas el papel kraft por el método de calor seco a 180 °C por 1 hora y luego enfriar
- 3.- En función del volumen requerido del medio, suspender en el matraz de 250 mL las cantidades calculadas de cada componente en agua desionizada.
- 4.- Calentar con agitación suave hasta su completa disolución
- 5.- Hervir durante un minuto.
- 6.- Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos
- 7.- Enfriar a una temperatura entre 45-50 °C
- 8.- Disolver 1 gramo de antibiótico tetraciclina en 10mL de agua desionizada estéril, tomar 1mL de la solución para 1L de medio. Conservar en refrigeración
- 9.- En condiciones de esterilidad adicionar por incorporación la solución de tetraciclina y agitar
- 10.- En condiciones de esterilidad vaciar en placas Petri estériles por triplicado la solución de Agar YPG suplementado con antibiótico aproximadamente 20mL del medio por cada placa.
- 11.- Llevar las placas a la cámara de incubación a temperatura de 25°C por espacio de 48 horas. Se espera que no exista crecimiento en las placas (Prueba de esterilidad)
- 12.- Flamear el asa de siembra hasta que todo el alambre de nitrógeno (o de platino) se torne rojo
- 13.- Enfriar el asa de brevemente por unos 10 segundos cerca de la zona de esterilidad
- 14.- Destapar el tubo o recipiente que contiene la muestra cerca de la zona estéril del mechero
- 15.- Introducir el asa en el tubo o recipiente para sacar una alícuota de la suspensión
- 16.- En condiciones de esterilidad depositar el inóculo en un extremo de la placa en el área del primer cuadrante
- 17.- Sembrar por el método de estriado por agotamiento haciendo estrías paralelas de ida y vuelta a lo largo de la placa cubriendo aproximadamente un tercio de ella. Este es el primer cuadrante.
- 18.- Flamear el asa y dejar enfriar (como el paso 1y2) girar la placa y volver a hacer una nueva serie de estrías paralelas, a través y en ángulo con respecto a las estrías

del primer cuadrante .este es el segundo cuadrante.

19.- Flamear el asa y dejar enfriar (como el paso 1y2) girar la placa y volver a hacer una nueva serie de estrías paralelas, a través y en ángulo con respecto a las estrías del segundo cuadrante. Este es el tercer cuadrante.

20.- Flamear el asa y dejar enfriar (como el paso 1y2) girar la placa y estriar nuevamente arrastrando las células al tercer cuadrante .este es el cuarto cuadrante. El objeto de este procedimiento es reducir el número de células que se están diseminando en cada serie sucesiva de estrías (evitar el crecimiento confluyente), diluyendo de manera efectiva la concentración de células en el cuarto cuadrante las células deben estar lo suficientemente separadas como para distinguir colonias bien separadas.

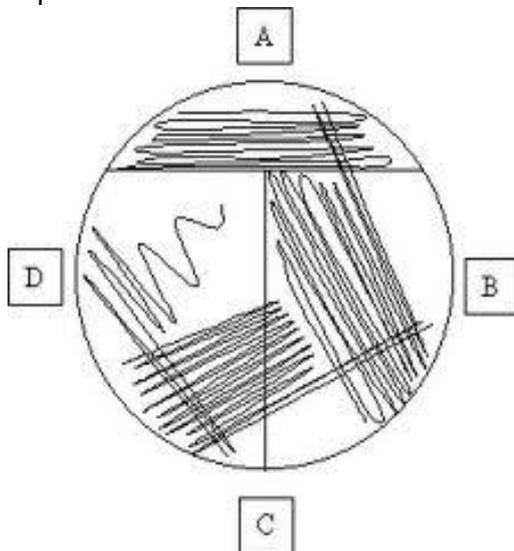


Figura 28. Estriado por agotamiento sobre agar YPG

Para el crecimiento del cultivo estriado por agotamiento se incuban las placas a 25°C durante 48 horas

21.- Transcurrido el tiempo de incubación se procede al aislamiento presuntivo de las colonias empleando el criterio de comportamiento cultural.

22.- Realizar la tinción con azul de lactofenol, para relacionar la morfología celular al microscopio con las características morfológicas de las colonias.

23.- Las colonias típicas son transferidas a caldo YPG e incubadas de 18 – 24 horas

5.2.3 Producción de mosto de malta de cebada

Materiales y equipos:

- Harina de malta de cebada
- Agua
- Recipiente de acero inoxidable de 20 litros con falso fondo perforado
- Cocina
- Lúpulo
- Enfriador de mosto
- Oxigenador de mosto
- Termómetro
- Agitador manual
- pH metro
- Filtro de aire de 0.45micras de porosidad
- Compresor de aire
- Cronómetro
- Solución de Iodo

Procedimiento:

Para la producción del mosto cervecero se procede como en el punto 2.11.2 y la (Figura 30)Temperatura vs. Tiempo.

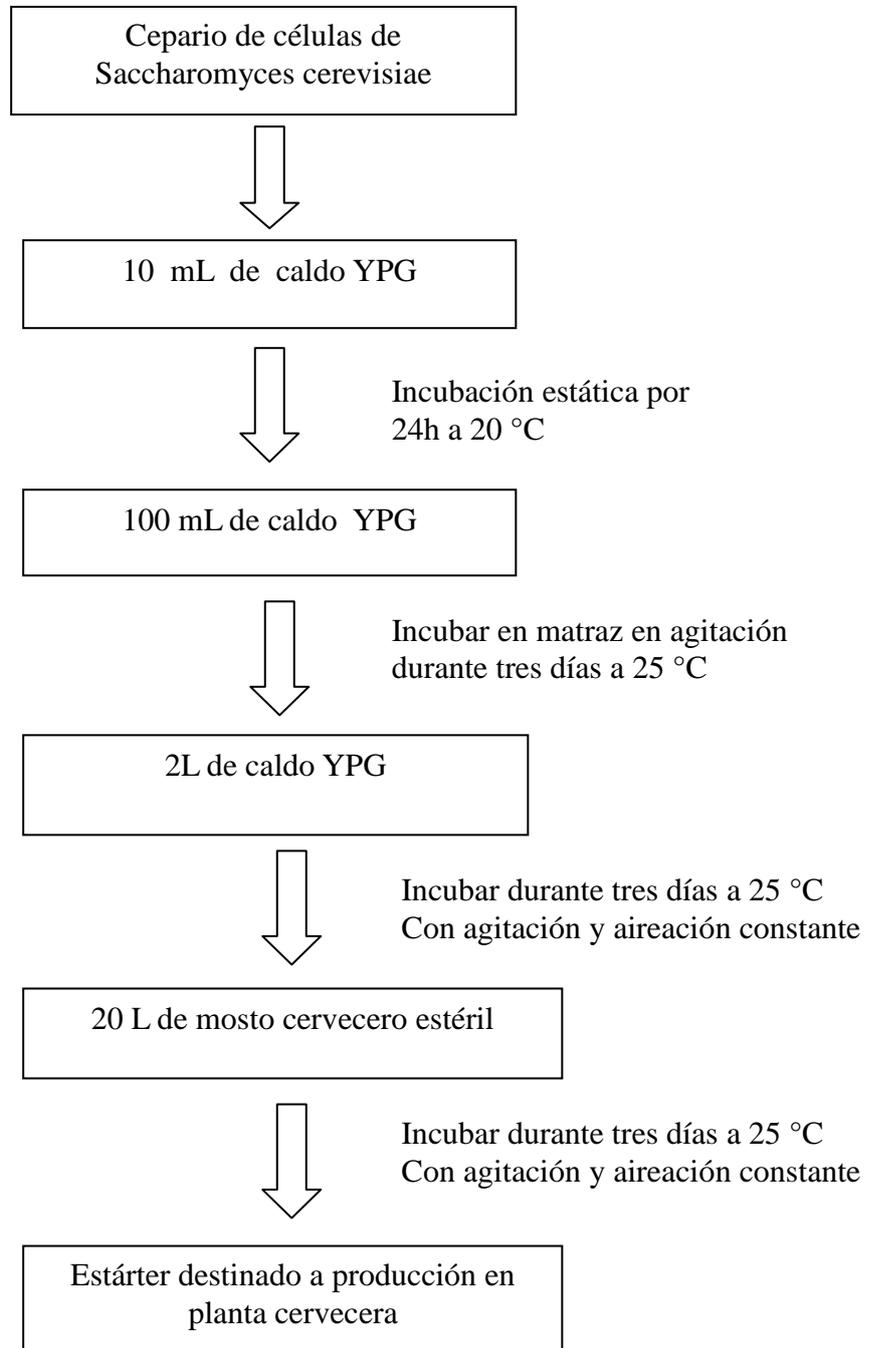
5.2.4Propagación de células de levadura a nivel Laboratorio

Materiales y equipos:

- 1.- Cepa de *Saccharomyces cerevisiae*
- 2.- Asa de siembra
- 3.- Mechero a gas
- 4.-Camara de siembra
- 5.- Alcohol de 96º
- 6.- Algodón antiséptico
- 7.-Caldo YPG
- 8.- Matraz Erlenmeyer
- 9.- Shaker agitador
- 10.- Biorreactor a nivel piloto
- 11.- Filtros bacteriológico de 0.45 micras de porosidad
- 12.- Mangueras sanitarias de siliconas
- 13.- Flujómetro
- 14.- Manómetro
- 15.- Compresor de aire
- 16.- pH metro

Procedimiento:

La célula de levadura es propagada a partir de un tubo de ensayo llamado cepario que contiene un medio de cultivo sólido llamado Agar YPG (Extracto de levadura 5 g / L, peptona 10 g / L, glucosa 20 g / L, Agar 18g/L).



CUADRO 16

Procedimiento de propagación de la levadura en el laboratorio. En un medio semi-definido (YPG: extracto de levadura 5 g / L; peptona 10 g / L; glucosa 20 g / L).

5.2.4 Propagación de levaduras en la planta de Cervecería

La propagación y escalamiento de la Biomasa de células de levadura se realiza en la planta de producción como se indica a continuación.

Materiales y equipos:

- 1.- Cultivo estándar vital y viable para su propagación y escalamiento en planta
- 2.- Medio de cultivo Mosto de malta obtenido por los procedimientos descritos en los puntos
- 3.- Biorreactor a nivel planta
- 4.- Filtros bacteriológico de 0.45 micras de porosidad
- 5.- Mangueras sanitarias de siliconas
- 6.- Flujómetro
- 7.- Manómetro
- 8.- Compresor de aire
- 9.- Mechero bunsen
- 10.- Agua de enfriamiento
- 11.- Termómetro
- 12.- pHmetro

Procedimiento:

Para llevar a cabo la propagación y escalamiento de la biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* se procede como en el punto número

5.2.5 Dilución de una suspensión de células de *Saccharomyces cerevisiae*

Materiales y equipos:

- Suspensión celular de células de *Saccharomyces cerevisiae*
- Batería de tubos de ensayo de 15*100
- Solución salina fisiológica S.S.F
- Pipeta de 1mL
- Pipeta de 10mL
- Propipeta
- Gradilla
- Matraz Erlenmeyer de 250mL

Procedimiento:

- 1.- Tomar 100mL aproximado de una muestra homogeneizada de suspensión celular del estárter de *Saccharomyces cerevisiae* en un matraz de 250mL
- 2.- Distribuir en cada tubo de ensayo 9mL de S.S.F
- 3.- Agitar la muestra
- 4.- Tomar 1mL de esta suspensión celular
- 5.- Descargar con la ayuda de la pipeta, 1mL de suspensión celular de la muestra en el primer tubo de ensayo de la batería de tubos de ensayo con 9mL de S.S.F para tener la primera suspensión de (1/10) también de 10^{-1}
- 6.- Agitar la suspensión celular por 3 minutos
- 7.- Tomar con la pipeta 1mL de la dilución de 10^{-1} y llevarlo al segundo tubo y descargarlo, agitándolo por 3 minutos para obtener la dilución (1/100) también 10^{-2}
- 8.- Tomar con la pipeta 1mL de la dilución de 10^{-2} llevarlo y descargarlo, al tubo tres agitándolo por 3 minutos para obtener la dilución (1/1000) también 10^{-3}
- 9.- Con la ayuda de una pipeta Pasteur (micro pipeta) tomar una muestra de la última dilución 10^{-3} y llevarlo a la cámara de Neubauer para realizar el conteo de las células de *Saccharomyces cerevisiae* y realizar los cálculos para estimar la concentración celular del estárter. Si luego de este procedimiento de dilución la muestra de células en la cámara de Neubauer se observa muy concentrada y dificulta el conteo se realiza las diluciones siguientes necesarias para poder realizar el conteo celular con mayor exactitud.

Esquema de la dilución seriada de una suspensión celular

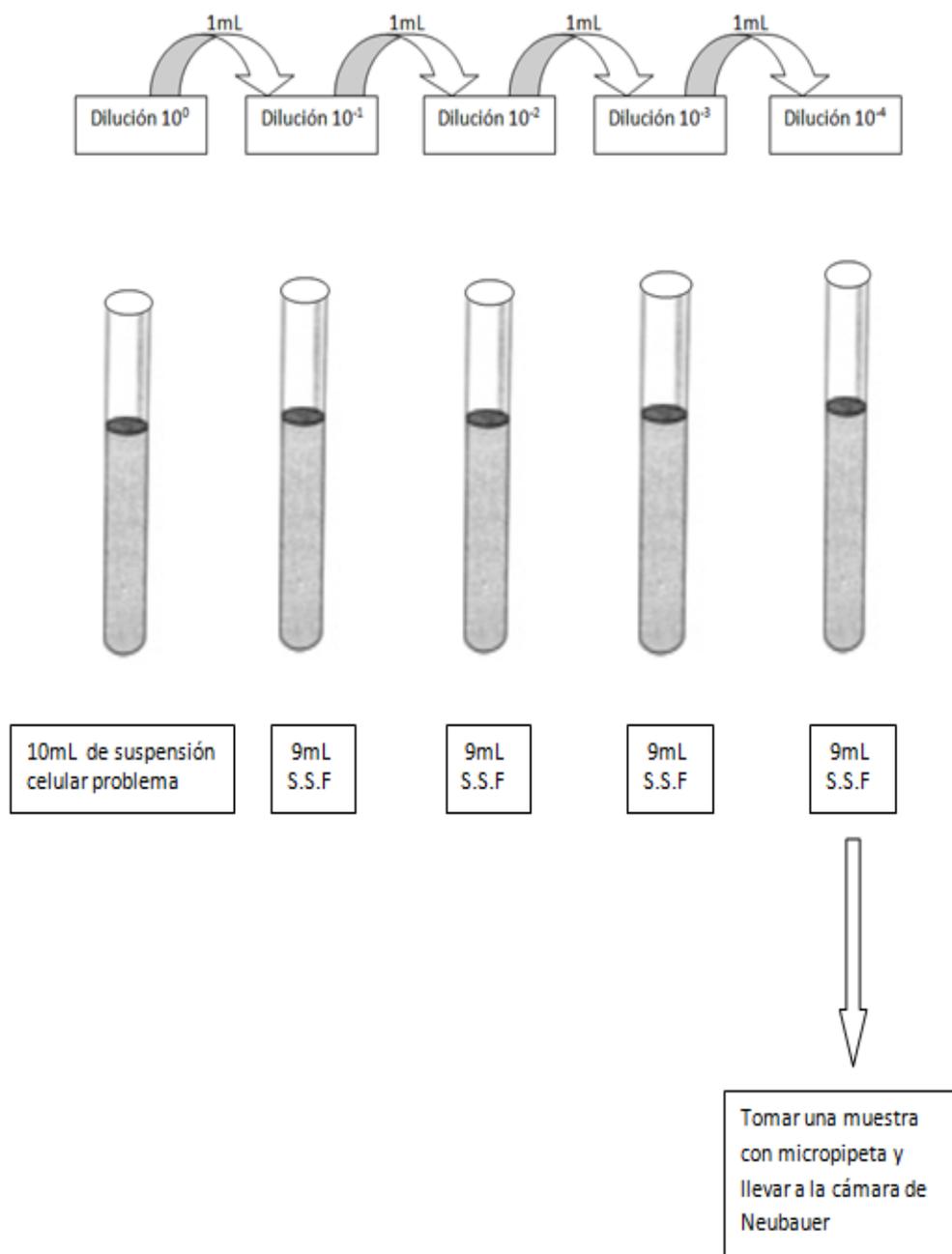


Figura 29. Metodología de la Dilución

5.2.6 Tinción vital de células de *Saccharomyces cerevisiae*.-

Materiales y equipos:

- Solución Azul de Metileno al 1% (w/v)
- Muestra problema de en un cultivo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*
- Asa de siembra
- Placa porta objetos
- Microscopio óptico
- Gotero para la solución de Azul de Metileno

Procedimiento:

- 1.- Realizamos un homogeneizado de la suspensión celular problema
- 2.- Tomar una asada de la muestra homogeneizada
- 3.- Depositar la muestra sobre una placa portaobjetos
- 4.- Adicionar una a dos gotas de la solución de Azul de metileno sobre la muestra
- 5.- Esperar un periodo de tiempo de 3 a 5 minutos
- 6.- Llevar la muestra teñida la microscopio y observar el prepara a un aumento de 40x
- 7.- Realizar el conteo de células coloreadas y decoloradas.

Aclarante: Lacto fenol de Amann

- Ácido fénico cristalizado..... 10g
- Ácido láctico..... 10mL
- Glicerina..... 20mL
- Agua destilada..... 10MI

Preparación: Disolver el fenol con agua destilada, con ayuda de calor suave, añadir luego el ácido acético y la glicerina.

Colorante: Azul de lactofenol

- Lacto fenol de Amann..... 100mL
- Azul de algodón..... 0.05mL

Preparación: Agregar al lactofenol, el azul de algodón y agitar con una bagueta

5.2.7 Recuentode levaduras totales y viables en cámara de Neubauer Improved

Materiales y equipos:

- Muestra problema (Suspensión de Células de *Saccharomyces cerevisiae*)
- Cámara de recuento de Neubauer Improved
- Microscopio Óptico
- Micro pipeta
- Laminilla
- Algodón
- Agua desionizada
- Alcohol
- Papel limpia lentes

Procedimiento:

- 1.- Lavar la cámara de Neubauer y la laminilla con agua destilada y alcohol 96%
- 2.- Secar bien con papel limpia lentes.
- 3.- Homogeneizar removiendo bien el cultivo en donde residen las levaduras
- 4.- Tomar con un micro pipeta una muestra
- 5.- Poner la punta del micro pipeta en una de las dos ranuras de la cámara y por capilaridad, las levaduras se distribuirán en la cámara
- 6.- Poner encima de la cámara la laminilla
- 7.- Si se crea una cámara de aire repetir la operación desde el principio.
- 8.- Fijar la cámara de recuento en la platina del microscopio para realizar la observación microscópica
- 9.- Esperar tres minutos antes de contar para que las levaduras se depositen en la cámara

-Llevar la cámara al microscopio y enfoque el cuadro de conteo con el Objetivo de 4X. Observará lo siguiente:

El volumen de la cámara de Neubauer es de $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0.1\text{mm} = 0.1\text{mm}^3$

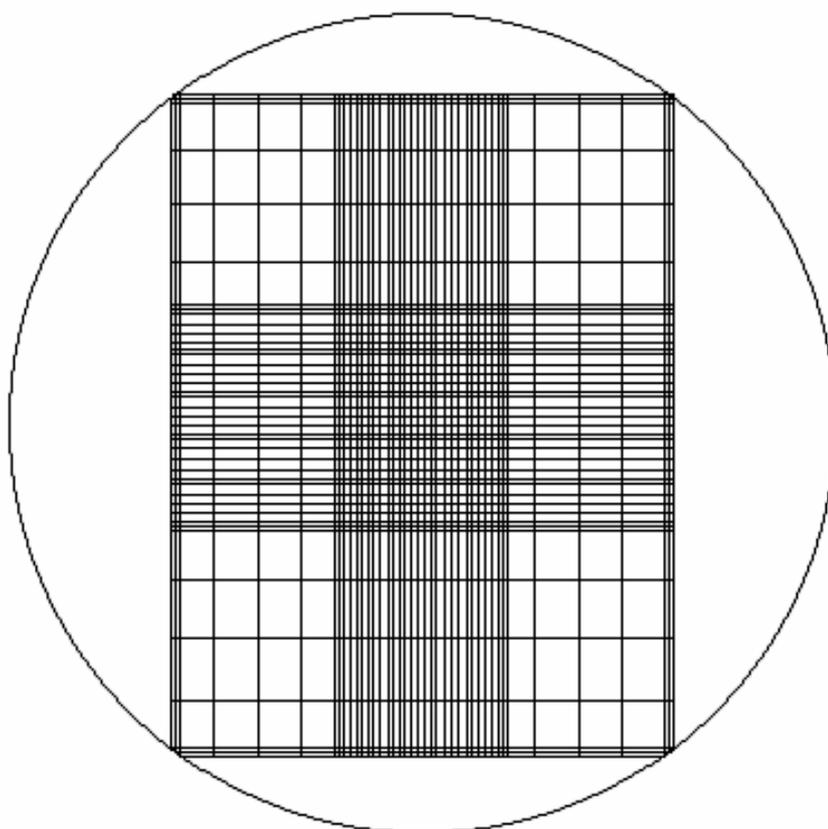


Figura 30. Con número de Objetivo 4x

- Las células de levaduras que va a contar son pequeñas, ubicarse en la cuadrícula central y pasar al ocular de 10X. Se visualizará de la siguiente manera:

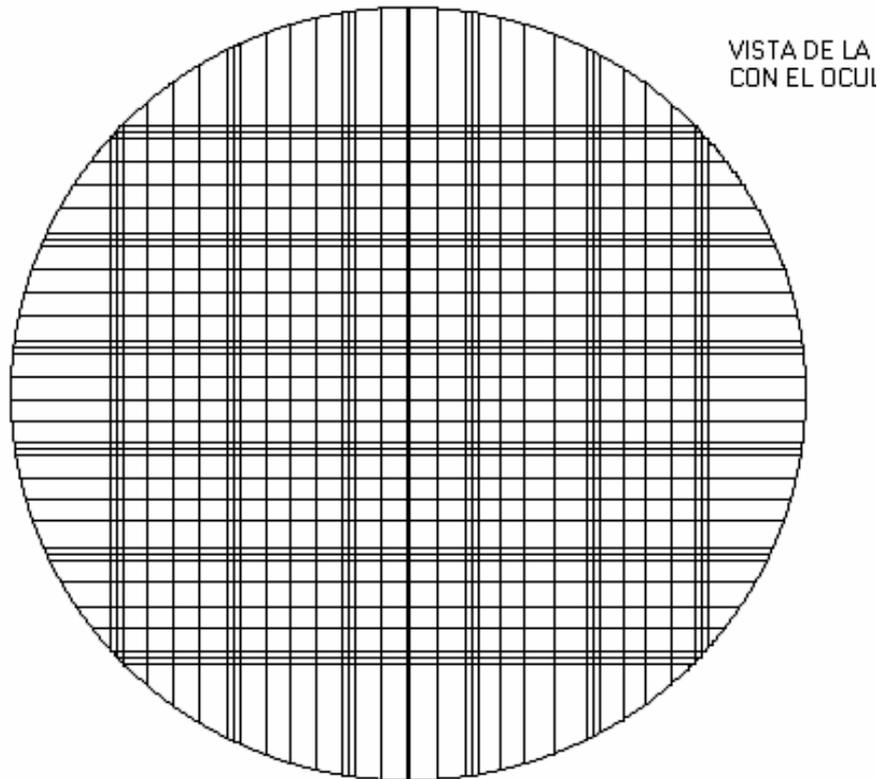


Figura 31. Con número de objetivo 10x

- 25 Cuadros medianos: 0.2 mm x 0.2 mm
 - 1 Cuadro grande central 1mmx1mm(formado por 400 cuadros pequeños):
1mm²/400 cuadros con una profundidad de 0.100 mm
- En esta cuadrícula se visualizan 25 cuadros, de los cuales se cuentan las células presentes en 5 campos, generalmente se cuentan los cuadros de las esquinas y el central, lo que garantiza un conteo aleatorio

- Para realizar el conteo se pasa al ocular de 40X, donde se visualiza cada una de los campos y con ayuda del carro del microscopio se desplaza la cuadrícula hasta contar en todos los cuadros. El conteo en estos campos de la cámara se conoce como AP (alto poder). Con el lente de 40X cada cuadro se ve de la siguiente manera

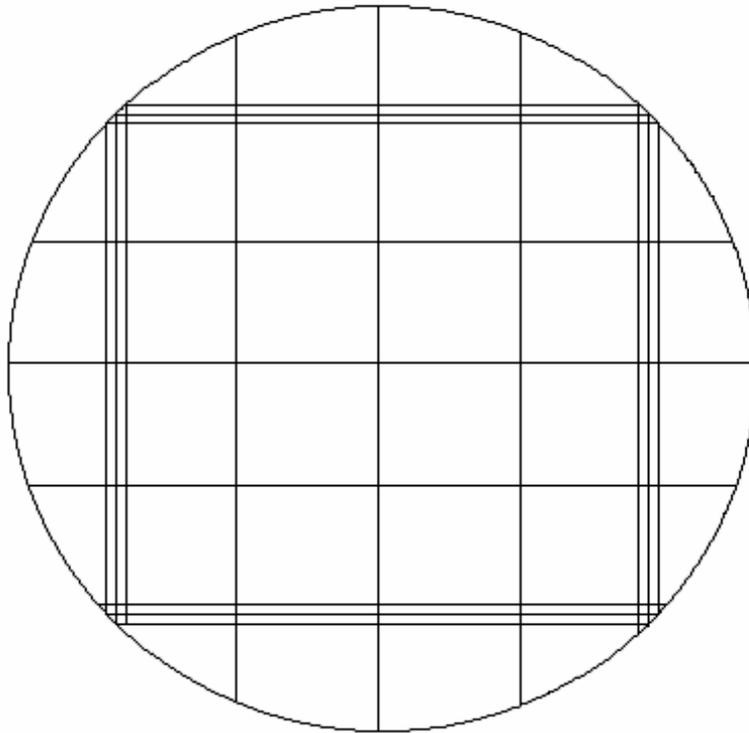


Figura 32. Con número de objetivo 40x

- 1Cuadro de 0.2 mm x 0.2 mm = 16 cuadros pequeños de 0.05 mm x 0.05mm = 0.0025 mm²

- Líneas separadoras: 0.025 mm

Las células se cuentan cuadro por cuadro y se hace un total. Se recomienda realizar el conteo siguiendo las flechas para evitar que se cuenten las células dos veces o que no se cuenten. Alrededor de cada cuadrícula se observa que hay tres líneas que delimitan el cuadro, que son fundamentales en el momento del conteo ya que definen cuales células son contables o cuales están fuera del campo de conteo. Las células que no tocan la segunda línea son contables, si la tocan o están encima de ella no se incluyen. Gráficamente se puede apreciar la forma correcta de conteo. Las células que tiene una "X" son las que no se deben contar.

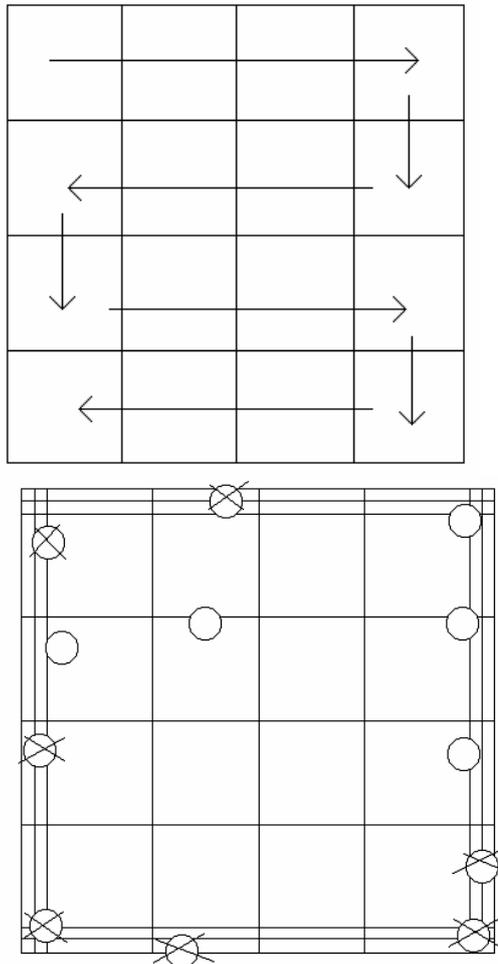


Figura 33. Sentido de conteo de células en cámara

- Se coloca 1 mL de la muestra en un tubo de ensayo. Cuando se trata de cuantificar muestras muy concentradas ($D.O > 1.5$) será necesario preparar diluciones seriadas de la misma con solución salina isotónica.
- Lavar cuidadosamente la cámara de Neubauer sin frotar la zona brillante del centro y el portaobjetos. Secar con papel suave. Colocar el portaobjetos sobre la zona central limitada por dos excavaciones laterales, donde se aprecian una zona cuadrículada a simple vista.
- Homogeneizar perfectamente la muestra en un vórtex, tomar inmediatamente una muestra con una pipeta Pasteur de punta fina y depositar una gota entre la cámara y el cubreobjetos por el borde de la cámara. Dejar que la muestra se distribuya por capilaridad, evitando el exceso que dificultará la evaluación precisa de la población microbiana.
- Dejar reposar durante 5 minutos, colocar la cámara en la platina del microscopio y localizar con el objetivo seco débil (4X) la zona cuadrículada que se muestra en la Fig-1

- Localizar el cuadro central grande (C1) que miden 1.0 mm por lado, que se encuentra dividido en 5x5 cuadros pequeños de 0.2mm por lado (C2) limitados por triple línea separadora que miden 0.025 mm. Estos cuadros pequeños a su vez se encuentran divididos en 16 cuadros más pequeños (C3) de 0.05 mm de lado.

- Hacer la cuantificación de células con el objetivo seco fuerte (40X), contando el número de células que se localicen en el cuadro C1, los cuadros de menor tamaño C2 sirven de guía para el cómputo. Se empieza a contar desde la parte superior de los cuadros C2 y se continúa hasta la base. Si las células tocan los límites de los cuadros C2; deberán contarse solamente aquellas que toquen la parte superior y el lado derecho del cuadro. Si las células tocan la parte inferior o el lado izquierdo no se cuentan. Este método reduce las posibilidades de contar la misma célula dos veces.

- Cuente hasta cerca de 200 a 250 células antes de determinar el número de células por mL En el proceso de contar se pueden presentar tres situaciones diferentes que a continuación se explican:

a).- Si hay de 200 a 250 células por cuadro grande (C1), multiplicar directamente $\times 10^4$ para reportar el número de células por mL.

b).- Con menos de 200 células por cuadro grande (C1), será necesario contar algunos de los cuadros de las esquinas (miden 1x1 mm de lado y divididos en 4x4). De esta manera se cuantificarán más de 200 células. Después dividir el número total de células entre el número de cuadros empleados y sacar el valor promedio por cuadro grande. Después multiplicar este valor por $\times 10^4$ para reportar el número de células por mL.

c).- En el caso de que se observen más de 200 células por cuadro grande (C1), se Deberán contar las células de los cuadros de menor tamaño (C2) hasta contar cerca de 200 células. Dividir este valor entre el número de cuadros usados para la cuenta para sacar el valor promedio por cuadro C2. Multiplicar este valor promedio por 25 para obtener el número de células aproximado en un cuadro grande (C1) y después multiplicar $\times 10^4$ para reportar el número de células por mL.

- El factor de 10^4 por el cual se debe multiplicar el número de células por cuadro grande (C1) es porque este cuadrado contiene un volumen de 0.1 mm^3 (mide 1mm por lado y la cámara tiene una profundidad de 0.1 mm).

Células/cuadro C1 (25cuadros C2) = # células/ $0.1 \text{ mm}^3 \times 10^4$ = # células/mL

- En el caso de que el # de células sea muy grande, la suspensión deberá diluirse y se hará la corrección como sigue:

Células/mL en la muestra diluida \times (factor de dilución) = # células/ mL en la suspensión original.

- Relación para determinar el número de células /mL:

X levaduras . # cuadros cámara . 1000 mm^3 . FD = X millones de lev /mL

Y cuadros Volumen cámara 1 cm³ (o 1 mL)

FD: factor de dilución es la inversa de la dilución de la suspensión celular.

Contabilizar levaduras viables (% levaduras viables):

- 1- Mezclar una gota pequeña de colorante con una gota pequeña de mosto en fermentación en el porta objetos normal.
 - 2- Se tapa con un cubre objetos
 - 3- Se visualiza en un microscopio
 - 4- Las levaduras teñidas están muertas y las no teñidas están vivas. Se visualizan 3 campos en la diagonal del cubre como muestra la fig. 6. Se cuentan todas las levaduras
 - 5- contenidas en cada campo y se hace una lista de vivas y muertas y a partir de aquí se calcula el porcentaje de viables.
 - 6- Para el cálculo del % de viables se cuentan las vivas respecto el total
- Nota 1: El colorante empleado es el azul de metileno hay que tener en cuenta que se hace más difícil el conteo porque mancha mucho de azul la solución por lo que habrá que diluirlo antes de mezclarlo con la muestra a analizar. Por simple recuento. Los colorantes tiñen las levaduras vivas y muertas.
- Solución salina fisiológica: Es una solución a la compuesta por cloruro de sodio disuelto en agua en una concentración del 0,87%, la cual es sometida a condiciones de esterilidad en auto clave. (T 125°C, Presión 15lb_f/in², Tiempo 15 minutos)

5.2.8 Determinación de Azúcares Reductores.

La determinación de azúcares reductores se realizó por el método de Fehling usando azul de metileno como indicador:

- 1.- Inicialmente se tomaron 10 mL de mosto fermentado
- 2.-Se llevaron a un aforo de 100 mL con agua desionizada
- 3.- La mezcla se colocó en una bureta.
- 4.- En un matraz Erlenmeyer se colocaron 5 mL de solución A de Fehling y 5 mL de solución B de Fehling
- 5.- Añadir 2 gotas de azul de metileno y 20 mL de agua desionizada

6.- La solución se llevó a calentamiento con agitación

7.- Iniciada la ebullición se agregó gota a gota el mosto fermentado hasta que se alcanzó un color rojo ladrillo

8.- Se tomó la lectura del volumen utilizado y se sustituyó en la ecuación (α) para determinar el contenido de azúcares reductores en g/L

$$X = \frac{1000 \times TE}{G'} \times FD \quad (\alpha)$$

9.- En la ecuación (β), TE tiene un valor de 0.0484

10.- Se determinó de la titulación del estándar de glucosa G' es el gasto del mosto fermentado y FD el factor de dilución.

5.2.8.1 Titulación del Estándar de Glucosa

1.- Se preparó una solución estándar de glucosa, 2 en 1000 y se colocó en una bureta.

2.- En un matraz Erlenmeyer se colocaron 5 mL de solución A de Fehling, 5 mL de solución B, 2 gotas de azul de metileno y 20 mL de agua desionizada.

(i) *Solución A de Fehling.* Se preparó una solución al 3% de sulfato cúprico cristalizado.

(ii) *Solución B de Fehling.* Se preparó una solución al 15% de sal de Rochelle (tartrato de sodio y potasio) en solución acuosa al 5% de NaOH.

3.- La solución se calentó con agitación y una vez iniciada la ebullición se agregó lentamente la solución estándar de glucosa hasta que se alcanzó un color rojo ladrillo.

4.- El volumen de estándar de glucosa gastado (G) fue de 24.2 mL y se sustituyó en la ecuación (β) para determinar el valor de la titulación del estándar de glucosa (TE).

$$TE = \frac{2 \times G}{1000} = \frac{2 \times (24.2)}{1000} = 0.0484 \quad (\beta)$$

5.2.9 Modelo de regresión simple

Modelo de regresión simple este modelo utiliza una sola variable numérica independiente **T**(explicativa) para predecir la variable numérica dependiente **Ln**(respuesta) se busca un Modelo razonable para los datos, supondremos que **Ln**es una variable aleatorio cuyo valor depende entre otras cosas del valor **T** cuyo modelo es:

$$Ln_i = B_0 + \mu * T_i$$

Para estimar los valores de **B₀** y **μ** utilizamos la técnica de mínimos cuadrados.

$$\mu = \frac{n * \sum_{i=1}^n T_i * Ln_i - \left(\sum_{i=1}^n T_i\right) * \left(\sum_{i=1}^n Ln_i\right)}{n * \sum_{i=1}^n (T_i^2) - \left(\sum_{i=1}^n T_i\right)^2}$$

$$B_0 = \frac{\sum_{i=1}^n Ln_i - \mu * \sum_{i=1}^n T_i}{n}$$

Dónde:

- Ln_i** =Concentración de células (g/L)
- T**= Tiempo de incubación (h)
- μ** = Velocidad específica de crecimiento (h⁻¹)
- B₀**= Ln del numero de células al inicio.
- n** =Número de datos

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Métodos de esterilización

En la industria cervecera las operaciones de limpieza y desinfección son prácticas habituales en los lugares y equipos que se encuentran en contacto íntimo con el mosto de malta y con la cerveza, pero las operaciones relacionadas a la reactivación y propagación de biomasa de células de *Saccharomyces cerevisiae* adicionalmente a las operaciones de asepsia mencionados es de importancia relevante contar con una operación adicional de esterilización para que los instrumentos y medios de cultivo empleados se encuentren exentos de carga microbiana contaminante (Bacterias, hongos y levaduras) que infecte, evitando la contaminación y propagación ya que al encontrarse en el medio de cultivo se corre el riesgo de proliferar y desplazar a las células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que deseamos propagar.

6.1.1 Esterilización de instrumentos por calor seco

Este método es empleado cuando se requiere eliminar toda la carga microbiana acompañante incluido sus esporas que pueden ser eliminados de los instrumentos de vidrio y de metal bajo condiciones de temperatura y tiempo de 160 °C por dos horas o de 180 °C por una hora, los tiempos largos de esterilización por este método en comparación con el método de calor húmedo se deben a que la capacidad calorífica del aire es 0,29 kcal/m³ °C mucho menor con respecto a la capacidad calorífica del vapor de agua de 1000 kcal/m³ °C. Para poder tener la seguridad de que se está operación cumplió su objetivo se realiza un control de calidad se toma un instrumento o material de vidrio de manera aleatoria y se vierte medio de cultivo en condiciones de esterilidad y se lleva a la incubadora a 37 °C por 24 horas.

6.1.2 Esterilización de medios de cultivo por calor húmedo

Este método permite eliminar la carga microbiana y esporas contaminantes de instrumentos y medios de cultivo que no soportan esterilización por calor seco el cual presenta la temperatura más alta y podría caramelizar la glucosa o también formando la reacción de Maillard entre los azúcares y las proteínas indisponiendo estos nutrientes para el metabolismo de la levadura. Por este método se esteriliza los medios de cultivo agar YPG y caldo YPG que se emplean para el aislamiento y propagación de cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* los cuales deben encontrarse en condiciones de esterilidad para no propagar carga microbiana contaminante. Este método combina condiciones de presión temperatura y tiempo de 121 °C /15 psi (lb_f/in²) por 15 minutos respectivamente. Para verificar que los medios de cultivo se encuentran esterilizados se toma una muestra aleatoria del cultivo y se lleva a la incubadora a 37 °C por 24 horas.

6.1.3 Esterilización por Radiación Gama y UV.

Los medios de cultivo YPG suplementados con vitaminas y tetraciclina, las cuales se caracterizan por ser en su mayoría termolábiles como la Riboflavina, Acido nicotínico, Biotina, utilizados para la reactivación de cepas de levadura las cuales debido a las condiciones de conservación y periodos de guarda prolongados se encuentran metabólicamente afectadas para poder reactivarse con un medio de cultivo simple. Para poder esterilizar estos medios sin emplear tratamiento térmico (Calor seco y calor húmedo) se recomienda la esterilización por radiación UV con una longitud de onda de 254nm fijando una distancia de 30 cm entre la lámpara de radiación con respecto de la muestra, e irradiando por intervalos de 15 segundos hasta eliminar la carga microbiana acompañante, esto es posible gracias a que la radiación UV daña a los microorganismos a nivel del ADN formando dímeros de timina evitando así su transcripción y traducción de información genética para su replicación.

6.2 Aislamiento primario de células de *Saccharomyces cerevisiae*

El método de aislamiento de células de *Saccharomyces cerevisiae* de un cultivo celular que presentaba contaminación bacteriana se empleó el método de estriado por agotamiento sobre agar YPG suplementado con antibiótico Tetraciclina. Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas y son bacteriostáticas para muchas bacterias gram positivas y gram negativas. Actúan a nivel del ribosoma bacteriano, pero para que las mismas tengan acceso a éste es necesario su difusión pasiva por la membrana celular exterior a través de los poros hidrófilos, en el caso de la doxiciclina y la minociclina, que son más lipofílicas, pasan directamente por la doble capa de lípidos, pero en todos los casos se requiere de un segundo proceso dependiente de energía que transporta activamente todas las tetraciclinas a través de la membrana citoplasmática interna. Una vez en el interior de la célula bacteriana inhiben la síntesis de proteínas y se ligan a la subunidad 30S de los ribosomas, impiden el acceso del aminoacilRNA al sitio aceptor del complejo RNAmribosoma, y esto tiene como consecuencia la no adición de aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento. Una vez eliminada la carga microbiana acompañante se procede a identificar las unidades formadoras de colonia de *Saccharomyces cerevisiae* por su característico comportamiento cultural para posteriormente hacer una resiembra sucesiva en placa hacia otro medio de cultivo de YPG y ser conservado como un Cepario.



Figura34. Cultivo primario de Células contaminadas de *Saccharomyces cerevisiae*

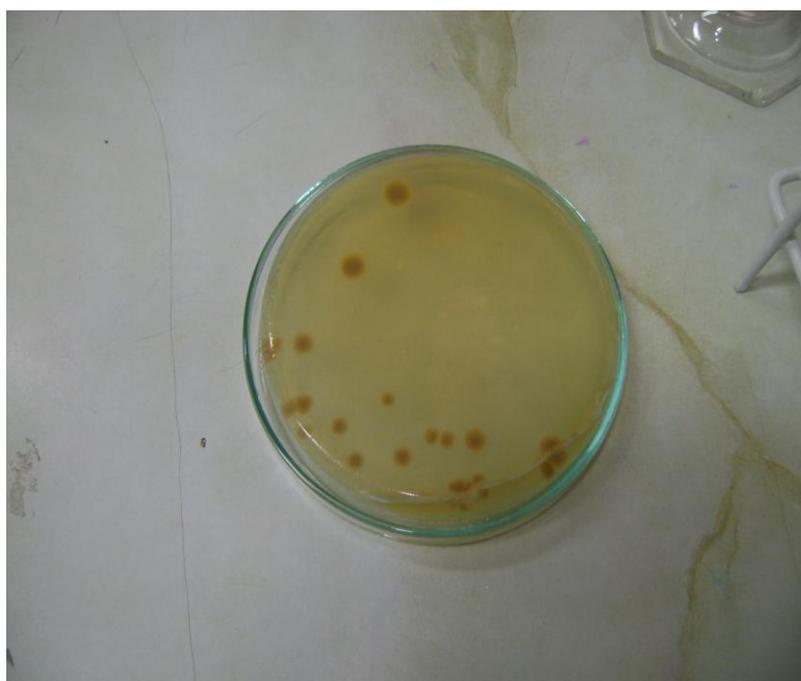


Figura 35. Aislamiento de *Saccharomyces cerevisiae* en placa Petri sobre Agar YPG suplementado con antibiótico Tetraciclina

6.3 Producción de mosto de malta de cebada

En esta etapa el objetivo principal es obtener un caldo fermentesible un medio de cultivo complejo (Azúcares fermentesibles y no fermentesibles oligosacáridos proteínas, oligopéptidos aminoácidos, vitaminas, minerales etc.) Compuesto del hidrolizado enzimático de la mezcla agua y harina de malta, posteriormente es lupulizado, esterilizado, enfriado y oxigenado para dar las condiciones adecuadas para una buena propagación celular y un correcto metabolismo fermentativo, produciendo como producto de su catabolismo etanol y CO₂.

Durante la etapa de hidrolización del mosto de malta de cebada se corre el riesgo de propagación de la carga microbiana acompañante por lo que se debe trabajar con periodos de maceración no muy prolongados, el oxigenado del mosto es de importancia relevante para que las levaduras sintetizen ácidos grasos y esteroides necesarios para la síntesis de su material celular para la propagación de biomasa y una ruta metabólica fermentativa correcta con menos producción de alcoholes de fusel y esteroides que van en detrimento de la calidad de la cerveza.

6.4 Reactivación y propagación de células de levadura a nivel Laboratorio

El objetivo en esta etapa es reactivar a partir de un cepario de células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y propagarlo a nivel de laboratorio en caldo YPG para obtener un pre inóculo axénico en condiciones óptimas de vitalidad y viabilidad, el cual será utilizado para la propagación y escalamiento a nivel de producción en planta. Esta etapa es muy delicada requiere de personal capacitado para minimizar el riesgo de contaminación del cultivo y la propagación de carga microbiana que originaría contaminación de la fermentación y el enquistamiento de estos en las porosidad del equipo ocasionando un grave peligro para las instalaciones y producciones futuras.



Figura 36. Cepario e Inoculo de clones de Células de *Saccharomyces cerevisiae*



Figura 37 Propagación de Células de *Saccharomyces cerevisiae* Safale S-40 en medio de cultivo Mosto Cerveceros en frasco Carlsberg.

Propagación N°1 de Células de *Saccharomyces cerevisiae* nivel laboratorio
 Cinética de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Safale S-04 en medio de cultivo Mosto Cervecerero en frasco Carlsberg.

T= 18 °C; pH = 5.5; VVM= 1.5; Volumen (L)= 2; Tiempo (Horas)= 24

T (Hrs)	Peso seco (g/L)	Ln P. Seco	Nº Células/mL	Ln Nº Cel/mL	Azúcares reductores totales (g/L)
0	0.275	-1.2910	3.60×10^5	12.7939	9.85
2	0.280	-1.2730	3.75×10^5	12.8347	8.60
4	0.350	-1.0498	8.50×10^5	13.6530	8.13
6	0.580	-0.5447	2.40×10^6	14.6910	6.80
8	1.200	0.1823	6.10×10^6	15.6238	4.60
10	1.800	0.5878	8.61×10^6	15.9684	4.45
12	1.96	0.6729	1.10×10^7	16.2134	2.96
14	2.100	0.7419	1.40×10^7	16.4546	1.10
22	2.350	0.8544	1.60×10^7	16.5881	0.60
24	2.450	0.8961	1.78×10^7	16.7059	0.20

Cuadro 17

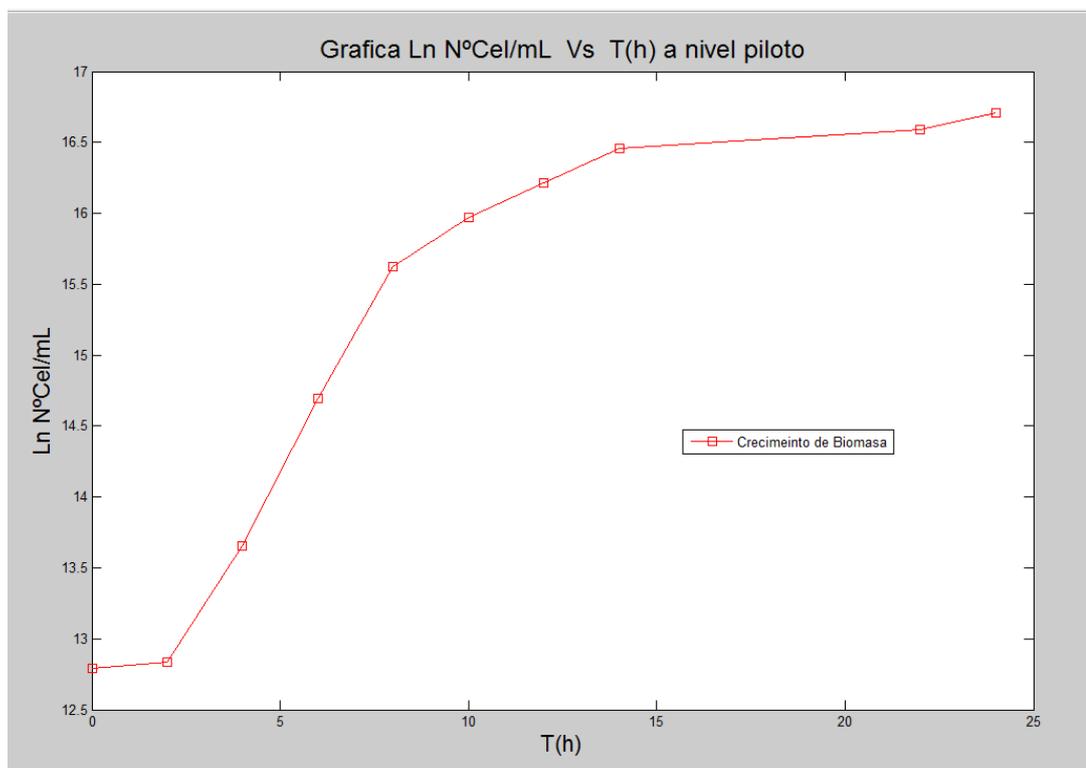


Figura 38

Linealizamos la función en los puntos:

T (Hrs)	Ln _i N ^o Cel/mL	T _i * Ln _i	T _i ²
2	12.8347	25.6694	4
4	13.6530	54.612	16
6	14.6910	88.146	36
8	15.6238	124.9904	64
Σ(T_i) = 20	Σ(Ln) = 56.8025	Σ(T_i * Ln_i) = 293.4178	Σ(T_i²) = 120

CUADRO 18

$$\mu = \frac{4*293.4178 - 20*56.8025}{4*120 - 20^2} = \frac{37.6212}{80} = 0.470265 \text{ h}^{-1}$$

$$B_0 = \frac{56.8025}{4} - \frac{20}{4} = 9.200625$$

$$\text{Ln } i = 9.200625 + 0.470265 * T_i$$

Calculo del tiempo generacional: $t_d = \frac{\text{Ln } 2}{\mu}$

$$t_d = \frac{0.693}{0.474} = 1.47 \text{ h}$$

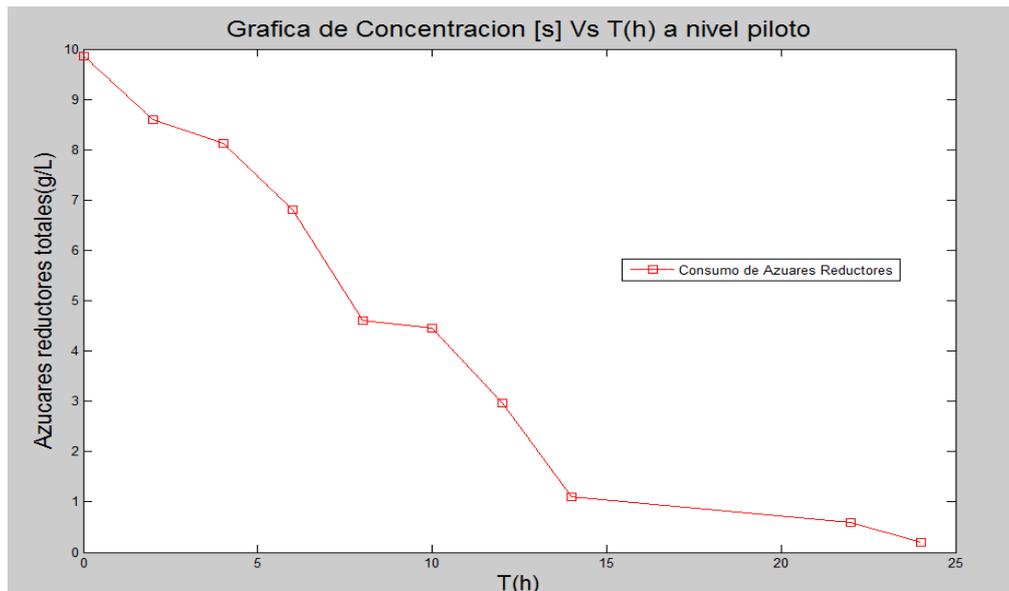


Figura 39

Propagación N°2 de Células de *Saccharomyces cerevisiae* nivel laboratorio
 Cinética de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Safale S-04 en medio de cultivo Mosto Cervecerero en frasco Carlsberg.

T= 18 °C; pH = 5.5; VVM= 1.5; Volumen (L)= 2; Tiempo (Horas)= 24

T (Hrs)	Peso seco (g/L)	Ln P. Seco	Nº Células/mL	Ln Nº Cel/mL	Azúcares reductores totales (g/L)
0	0.255	-1.3665	3.38×10^5	12.7249	9.85
2	0.267	-1.3205	3.55×10^5	12.7799	8.61
4	0.365	-1.0079	8.30×10^5	13.6292	8.15
6	0.605	-0.5025	2.55×10^6	14.7516	6.70
8	1.259	0.2303	6.35×10^6	15.6640	4.58
10	1.690	0.5247	8.15×10^6	15.9135	4.43
12	1.929	0.6570	1.15×10^7	16.2579	2.65
14	2.072	0.7285	1.35×10^7	16.4182	1.41
22	2.30	0.8329	1.60×10^7	16.5881	0.61
24	2.39	0.8713	1.71×10^7	16.6369	0.22

Cuadro 19

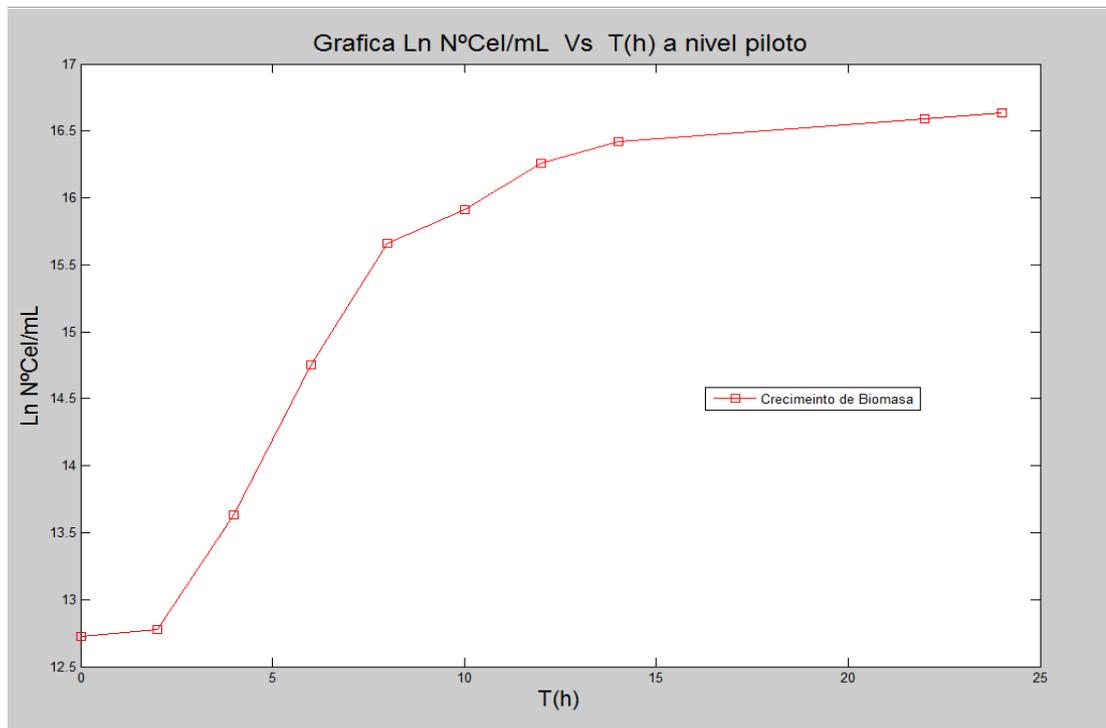


Figura40

Linealizamos la función en los puntos:

T (Hrs)	Ln _i N° Cel/mL	T _i * Ln _i	T _i ²
2	12.7799	25.5598	4
4	13.6292	54.5168	16
6	14.7516	88.5096	36
8	15.664	125.312	64
Σ(T_i) = 20	Σ(Ln) = 56.8247	Σ(T_i * Ln_i) = 293.8982	Σ(T_i²) = 120

CUADRO 20

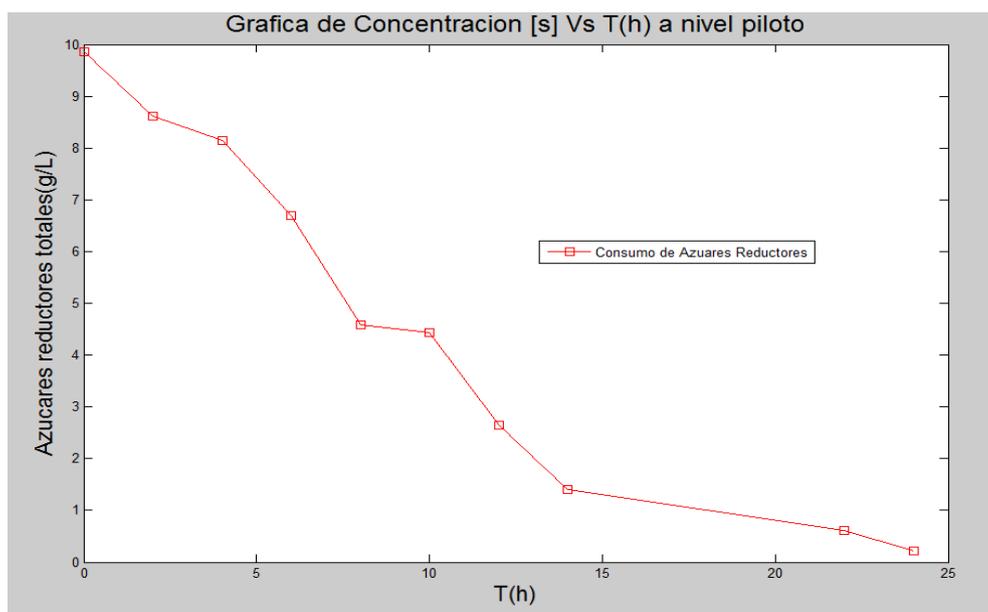
$$\mu = \frac{4 * 293.8982 - 20 * 56.8247}{4 * 120 - 20^2} = \frac{39.0988}{80} = 0.488735h^{-1}$$

$$B_0 = \frac{56.8247}{4} - \frac{20}{4} = 9.206175$$

$$Ln_i = 9.206175 + 0.488735 * T_i$$

Calculo del tiempo generacional: $t_d = \frac{Ln 2}{\mu}$

$$t_d = \frac{0.693}{0.488} = 1.42 \text{ h}$$



Figura

Propagación N°3 de Células de *Saccharomyces cerevisiae* nivel laboratorio

Cinética de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Safale S-04 en medio de cultivo Mosto Cervecerero en frasco Carlsberg.

T= 18 °C; pH = 5.5; VVM= 1.5; Volumen (L)= 2; Tiempo (Horas)= 24

T (Hrs)	Peso seco (g/L)	Ln P. Seco	Nº Células/mL	Ln Nº Cel/mL	Azucares reductores totales (g/L)
0	0.263	-1.3356	3.56×10^5	12.7657	9.85
2	0.276	-1.2874	3.70×10^5	12.8213	9.01
4	0.368	-0.9997	8.55×10^5	13.6589	8.13
6	0.605	-0.5025	2.55×10^6	14.7516	7.03
8	1.174	0.1604	5.95×10^6	15.5989	4.76
10	1.850	0.6152	8.85×10^6	15.9959	3.65
12	2.058	0.7217	1.20×10^7	16.3004	2.27
14	2.290	0.8286	1.55×10^7	16.5564	0.73
22	2.400	0.8755	1.70×10^7	16.6487	0.40
24	2.425	0.8858	1.75×10^7	16.6777	0.25

Cuadro 21

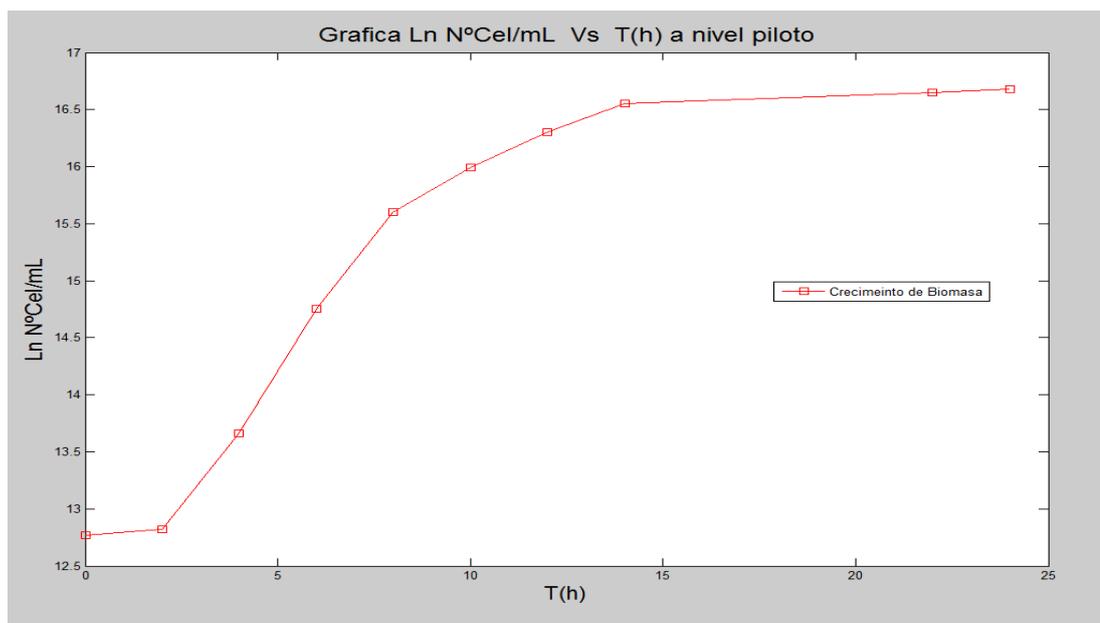


Figura 42

Linealizamos la función en los puntos:

T (Hrs)	Ln _i Nº Cel/mL	T _i * Ln _i	T _i ²
2	12.8213	25.6426	4
4	13.6589	54.6356	16
6	14.7516	88.5096	36
8	15.5989	124.7912	64
Σ(T_i) = 20	Σ(Ln) = 56.8307	Σ(T_i * Ln_i) = 293.5790	Σ(T_i²) = 120

Cuadro 22

$$\mu = \frac{4 \cdot 293.5790 - 20 \cdot 56.8307}{4 \cdot 120 - 20^2} = \frac{37.7020}{80} = 0.471275 \text{ h}^{-1}$$

$$B_0 = \frac{56.8307}{4} - \frac{20}{4} = 9.207675$$

$$\text{Ln } i = 9.207675 + 0.471275 \cdot T_i$$

Calculo del tiempo generacional: $t_d = \frac{\text{Ln } 2}{\mu}$

$$t_d = \frac{0.693}{0.471} = 1.471 \text{ h}$$

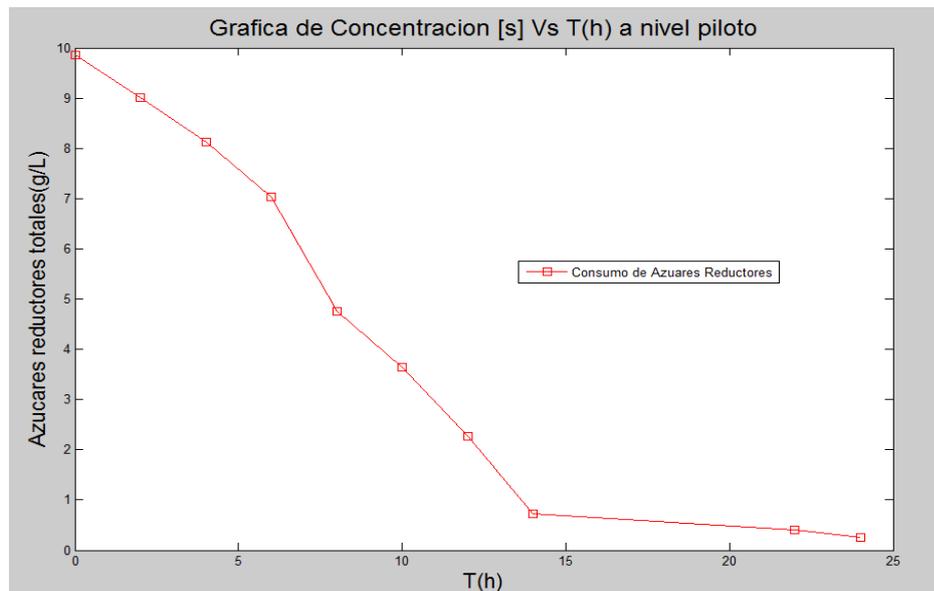


Figura 43

6.5 Dilución de una suspensión de células de *Saccharomyces cerevisiae*

La dilución de un cultivo de células de *Saccharomyces cerevisiae* es un método utilizado para poder disminuir la concentración celular en diez veces en cada dilución, que nos permita tener un número de células que puedan ser contabilizadas realizando el recuento de estas en cámara de NeubaurImproved. En caso de no realizar la dilución de un cultivo concentrado de células no se podría observar individualmente al microscopio a 40x de aumento, solo se alcanzaría a ver una masa difusa.

6.6 Tinción vital de células de *Saccharomyces cerevisiae*

La tinción vital con azul de metileno es uno de los métodos rápidos para poder discriminar entre una célula viva de otra muerta las células vivas al ser teñidas de color azul por el colorante son reducidas y decoloradas a azul de leucometileno las células muertas permanecen teñidas de color azul, es de mucha importancia conocer la concentración de células vitales y viables con la que se cuenta en un cultivo, el conocer el peso de biomasa de un inóculo no es suficiente ya que podemos tener cadáveres de células que no tienen ninguna actividad metabólica y por el contrario se convertiría en un foco de contaminación para la fermentación del mosto de malta de cebada, retrasando la fermentación o deteniéndola debido a la inhibición por exceso de sustrato y la poca concentración de células viables inoculas.

Cuadro del conteo de células viables teñidas con el colorante vital Azul de metileno por el método de Neubaur de una suspensión de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* la cual fue diluida hasta 10^{-2}

Células Vivas	Células Muertas
15	0
20	0
48	2
35	0
35	1
Total: 150	Total: 3

Cuadro 23.

Porcentaje de células viables:

$$\frac{150}{150 + 3} \times 100 \% = 98\% \text{ De células viables}$$

Células Vivas	Células Muertas
19	0
18	0
20	1
36	0
33	1
Total: 126	Total: 2

Cuadro 24. Porcentaje de células viables:98.43%

Células Vivas	Células Muertas
28	1
23	0
41	1
20	0
37	1
Total: 149	Total: 3

Cuadro 25. Porcentaje de células viables:98.02

Células Vivas	Células Muertas
29	1
20	0
48	2
35	0
35	1
Total: 167	Total: 3

Cuadro 26. Porcentaje de células viables:98.23

Células Vivas	Células Muertas
41	1
33	0
48	1
39	1
41	1
Total: 202	Total: 3

Cuadro 27. Porcentaje de células viables: 98.05%

Células Vivas	Células Muertas
49	1
23	0
48	1
37	0
35	1
Total: 192	Total: 3

Cuadro 28. Porcentaje de células viables: 98.46%

El cultivo celular cumple con el requerimiento establecido de tener una concentración mayor o igual al 98% de células viables, por tanto puede ser utilizado como inóculo del mosto de malta para la fermentación

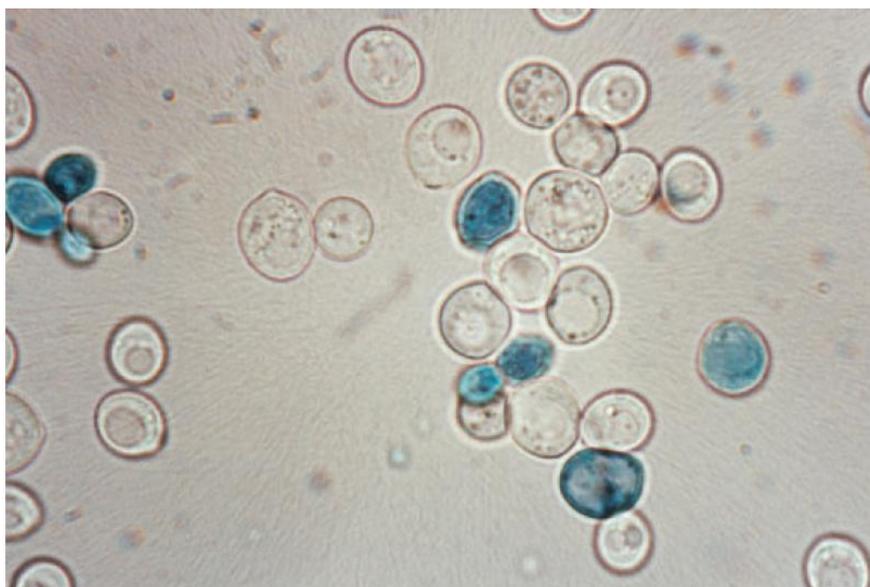


Figura 44 Micrografía de la Tinción vital de células de *Saccharomyces cerevisiae* a 40X

6.7 Recuento de levaduras totales y viables en cámara de Neubauer Improved

Este método nos permite contar las células que se encuentran contenidas en un volumen de recámara de 0.1mm^3 tomado de una suspensión celular llamada inóculo o estárter que será inoculado en el mosto de malta de cebada. En esta etapa de conteo se adiciona el colorante Azul de metileno para cuantificar el número de células vitales y viables que se encuentra en la muestra de suspensión celular. Este método es muy práctico y rápido para discriminar entre un inóculo de otro. Este método es mucho más rápido para cuantificar células viables y vitales en comparación con el método de recuento en placa de unidades formadoras de colonia que requieren de 24-48 horas de incubación a 25°C .

Calculo la concentración celular en (células/mL) por el método de Neubaur de una suspensión de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* la cual fue diluida hasta 10^{-2}

16 cuadros de $0.05\text{mm} \times 0.05\text{mm}$ c/u	Número de células por campo
Campo 1 extremo superior izquierdo	14
Campo 2 extremo superior derecho	15
Campo 3 central	13
Campo 4 extremo inferior izquierdo	14
Campo 5 extremo inferior derecho	14

Cuadro 29.

- Calculo del promedio de células por cuadrado:

$$\text{Media } \frac{14+15+13+14+14}{5} = 14 \text{ levaduras en 16 cuadros de } 0.05\text{mm} \times 0.05\text{mm c/u}$$

Reemplazando valores en la relación (1)

$$\frac{14 \text{ levaduras}}{16 \text{ cuadrados}} \times \frac{400 \text{ cuadrados}}{0.1\text{mm}^3} \times \frac{1000\text{mm}^3}{1 \text{ cm}^3 \text{ (o 1mL)}} \times 10^2 = 3.5 \times 10^8 \text{ de células/mL}$$

- Respuesta:

La concentración celular de la suspensión de *Saccharomyces cerevisiae* es de 3.5×10^8 de células/mL en la muestra.

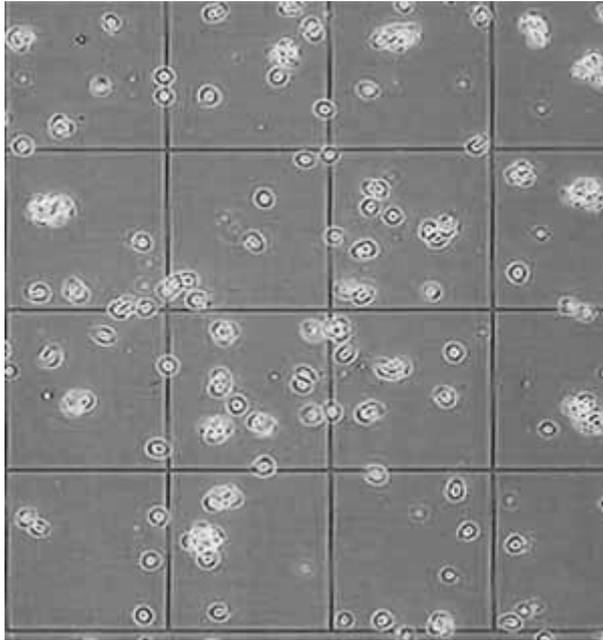


Figura 45

6.8 Propagación de levaduras en la planta piloto de Cervecería

Esta operación requiere de fundamentos netamente de ingeniería química para poder propagar células de levadura en grandes volúmenes donde los conocimientos de transferencia de masa y de calor son preponderantes. En nuestra experiencia se llegó a propagar células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* a partir de un cultivo preinóculo de 2L con una concentración celular de $15-18 \times 10^6$ células para ser propagada en un Biorreactor de 100 L. Para alcanzar la misma concentración celular que el preinóculo, el cual será utilizado como inóculo o estárter para iniciar la fermentación de 1000 L de mosto de cerveza.



Figura46 Birreactor Batch modelo Tanque Agitado de capacidad operativa de 1hL Ubicado en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM .Responsable Dr. Abad Flores Paucarima



Figura 47 Vista de perfil del Birreactor Batch modelo Tanque Agitado de capacidad operativa de 1hL Ubicado en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

Cinética de crecimiento N^o4 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Safale S-04 sobre medio de cultivo Mosto Cervecerero en Biorreactor de Tanque Agitado.

T= 18°C; pH = 5.5; VVM= 1.5; Volumen (L)= 100; Tiempo (Horas)= 24

T (Hrs)	Peso seco (g/L)	Ln P. Seco	N ^o Células/mL	Ln N ^o Cel/mL	Azúcares reductores totales (g/L)
0	0.250	-1.3863	3.65x10 ⁵	12.8077	9.85
2	0.278	-1.2801	3.70 x10 ⁵	12.8213	9.23
4	0.315	-1.1552	6.13 x10 ⁵	13.3261	8.36
6	0.465	-0.7657	1.63 x10 ⁶	14.3041	7.47
8	1.500	0.4055	4.25 x10 ⁶	15.2624	5.70
10	1.880	0.6313	7.36 x10 ⁶	15.8116	4.52
12	2.030	0.7080	1.25 x10 ⁷	16.3412	3.70
14	2.230	0.8020	1.50x10 ⁷	16.5236	2.03
22	2.400	0.8755	1.70x10 ⁷	16.6487	0.75
24	2.550	0.9361	1.80x10 ⁷	16.7059	0.30

Cuadro 30

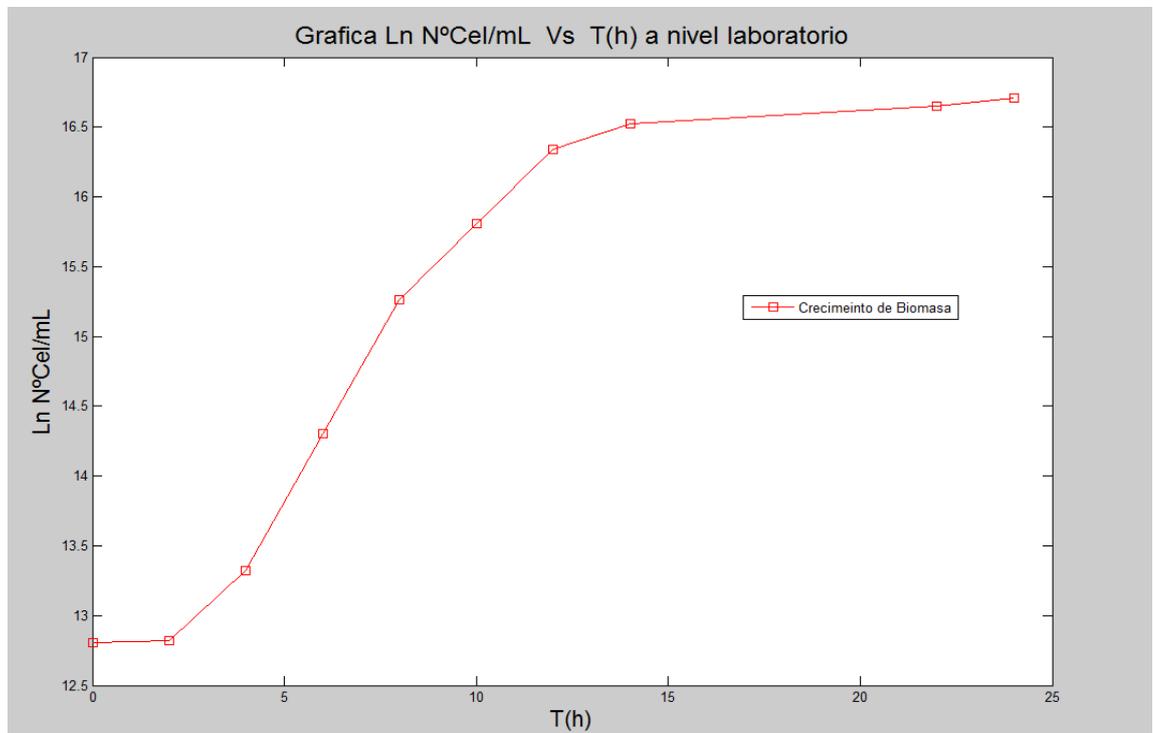


Figura 48

Linealizamos la función en los puntos:

T (Hrs)	Ln _i N ^o Cel/mL	T _i * Ln _i	T _i ²
2	12.8213	25.6426	4
4	13.3261	53.3044	16
6	14.3041	85.8246	36
8	15.2624	122.0992	64
Σ(T_i) = 20	Σ(Ln) = 55.7139	Σ(T_i * Ln_i) = 286.8708	Σ(T_i²) = 120

Cuadro 31

$$k_1 = \frac{4 \cdot 286.8708 - 20 \cdot 55.7139}{4 \cdot 120 - 20^2} = \frac{33.20519}{80} = 0.41506 \text{ h}^{-1}$$

$$B_0 = \frac{55.7139}{4} - \frac{20}{4} = 11.4284$$

$$\text{Ln } i = 11.4284 + 0.41506 \cdot T_i$$

Calculo del tiempo generacional: $t_d = \frac{\text{Ln } 2}{\mu}$

$$t_d = \frac{0.693}{0.415} = 1.67 \text{ h}$$

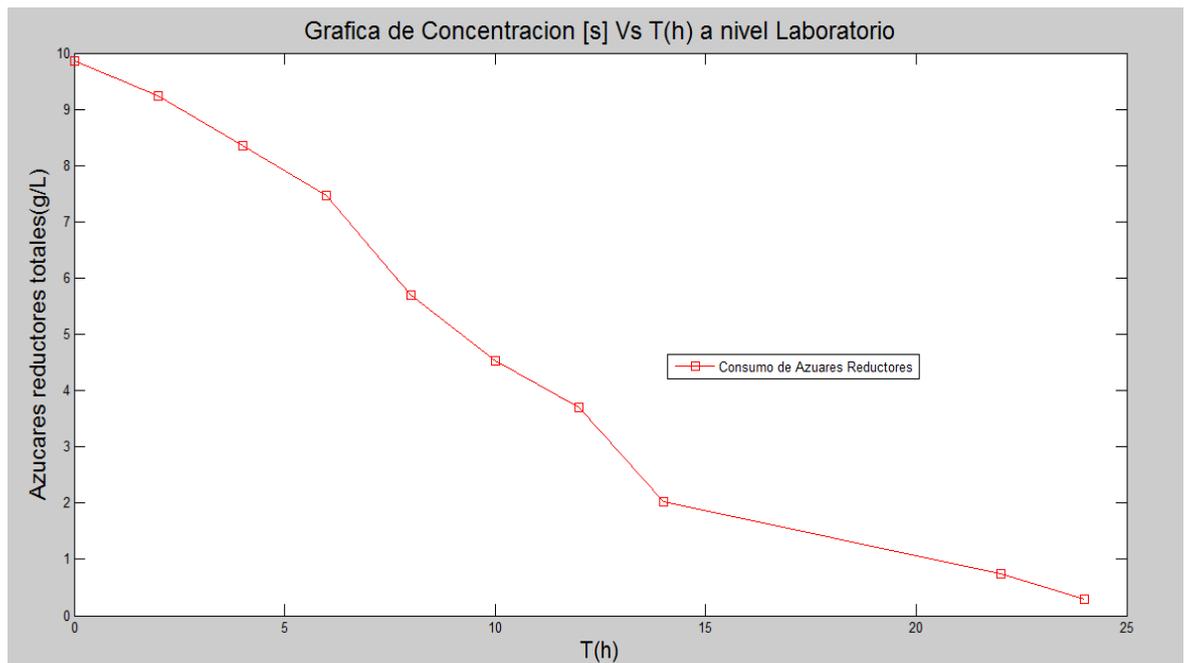


Figura 49

Cinética de crecimiento N°5 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Safale S-04 sobre medio de cultivo Mosto Cervecerero en Biorreactor de Tanque Agitado.

T= 18°C; pH = 5.5; VVM= 1.5; Volumen (L)= 100; Tiempo (Horas)= 24

T (Hrs)	Peso seco (g/L)	Ln P. Seco	Nº Células/mL	Ln Nº Cel/mL	Azúcares reductores totales (g/L)
0	0.255	-1.3665	3.36×10^5	12.7249	9.85
2	0.267	-1.3205	3.55×10^5	12.7799	9.23
4	0.365	-1.0079	8.30×10^5	13.6292	8.38
6	0.605	-0.5025	2.55×10^6	14.7516	7.42
8	1.259	0.2303	6.35×10^6	15.6640	5.64
10	1.690	0.5247	8.15×10^6	15.9135	4.505
12	1.929	0.6570	1.15×10^7	16.2579	3.540
14	2.072	0.7285	1.35×10^7	16.4182	2.03
22	2.30	0.8329	1.60×10^7	16.5881	1.01
24	2.39	0.8713	1.69×10^7	16.6428	0.22

Cuadro 32

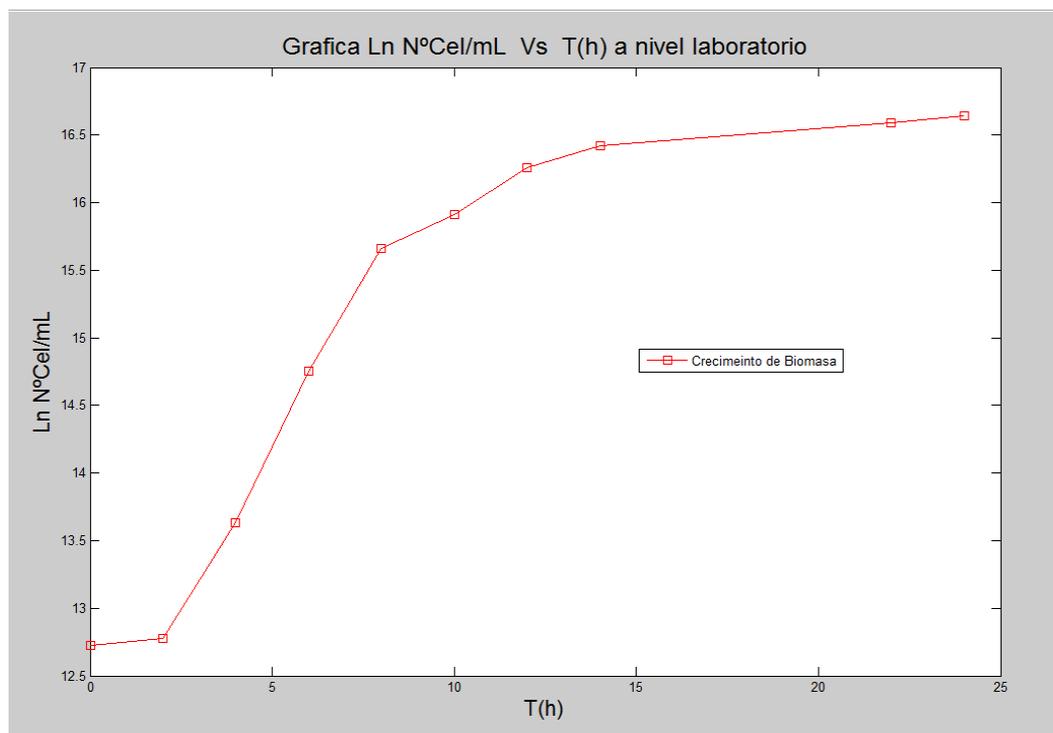


Figura 50

Linealizamos la función en los puntos:

T (Hrs)	Ln _i N ^o Cel/mL	T _i * Ln _i	T _i ²
2	12.7799	25.5598	4
4	13.6292	54.5168	16
6	14.7516	88.5096	36
8	15.664	125.312	64
Σ(T_i) = 20	Σ(Ln) = 56.8247	Σ(T_i * Ln_i) = 293.8982	Σ(T_i²) = 120

Cuadro 33

$$\mu = \frac{4 * 293.8982 - 20 * 56.8247}{4 * 120 - 20^2} = \frac{39.0988}{80} = 0.488735 \text{ h}^{-1}$$

$$B_0 = \frac{56.8247}{4} - \frac{20}{4} = 9.206175$$

$$\text{Ln } i = 9.206175 + 0.488735 * T_i$$

Calculo del tiempo generacional: $t_d = \frac{\text{Ln } 2}{\mu}$

$$t_d = \frac{0.693}{0.488} = 1.42 \text{ h}$$

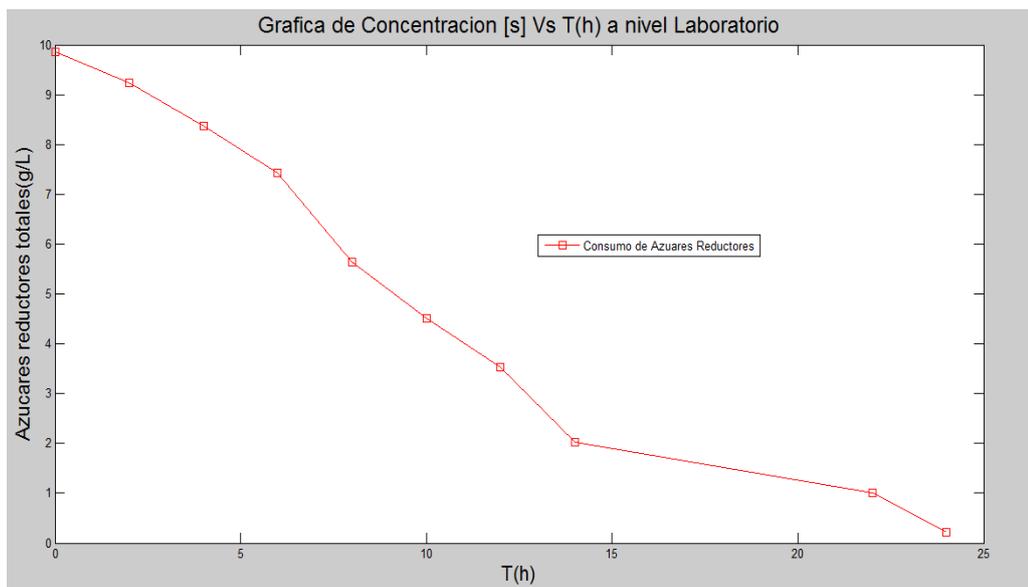


Figura 51

Cinética de crecimiento N°6 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Safale S-04 sobre medio de cultivo Mosto Cervecerero en Biorreactor de Tanque Agitado.

T= 18°C; pH = 5.5; VVM= 1.5; Volumen (L)= 100; Tiempo (Horas)= 24

T (Hrs)	Peso seco (g/L)	Ln P. Seco	Nº Células/mL	Ln Nº Cel/mL	Azúcares reductores totales (g/L)
0	0.260	-1.3471	3.50×10^5	12.7657	9.85
2	0.268	-1.3168	3.70×10^5	12.8213	8.60
4	0.322	-1.1332	8.55×10^5	13.6589	8.13
6	0.615	-0.4861	2.55×10^6	14.7516	6.80
8	1.512	0.4134	5.95×10^6	15.5989	4.60
10	1.954	0.6699	8.85×10^6	15.9959	4.45
12	2.174	0.7766	1.20×10^7	16.3004	2.96
14	2.185	0.7816	1.55×10^7	16.5564	1.10
22	2.425	0.8858	1.70×10^7	16.6487	0.60
24	2.550	0.9361	1.78×10^7	16.6947	0.20

Cuadro 34

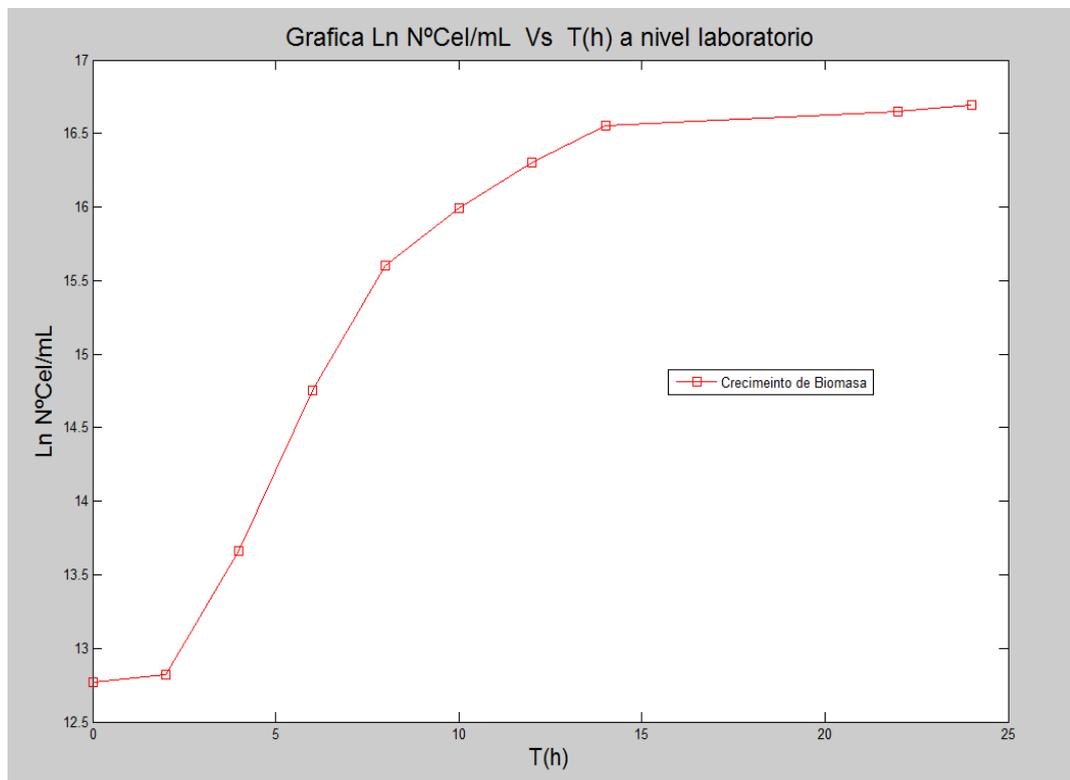


Figura 52

Linealizamos la función en los puntos:

T (Hrs)	Ln _i N ^o Cel/mL	T _i * Ln _i	T _i ²
2	12.8213	25.6426	4
4	13.6589	54.6356	16
6	14.7516	88.5096	36
8	15.5989	124.7912	64
Σ(T_i) = 20	Σ(Ln) = 56.8307	Σ(T_i * Ln_i) = 293.5790	Σ(T_i²) = 120

Cuadro 35

$$k = \frac{4 * 293.5790 - 20 * 56.8307}{4 * 120 - 20^2} = \frac{37.7020}{80} = 0.471275 h^{-1}$$

$$B_0 = \frac{56.8307}{4} - \frac{20}{4} = 9.207675$$

$$Ln_i = 9.207675 + 0.471275 * T_i$$

Calculo del tiempo generacional: $t_d = \frac{Ln 2}{k}$

$$t_d = \frac{0.693}{0.471} = 1.47 \text{ h}$$

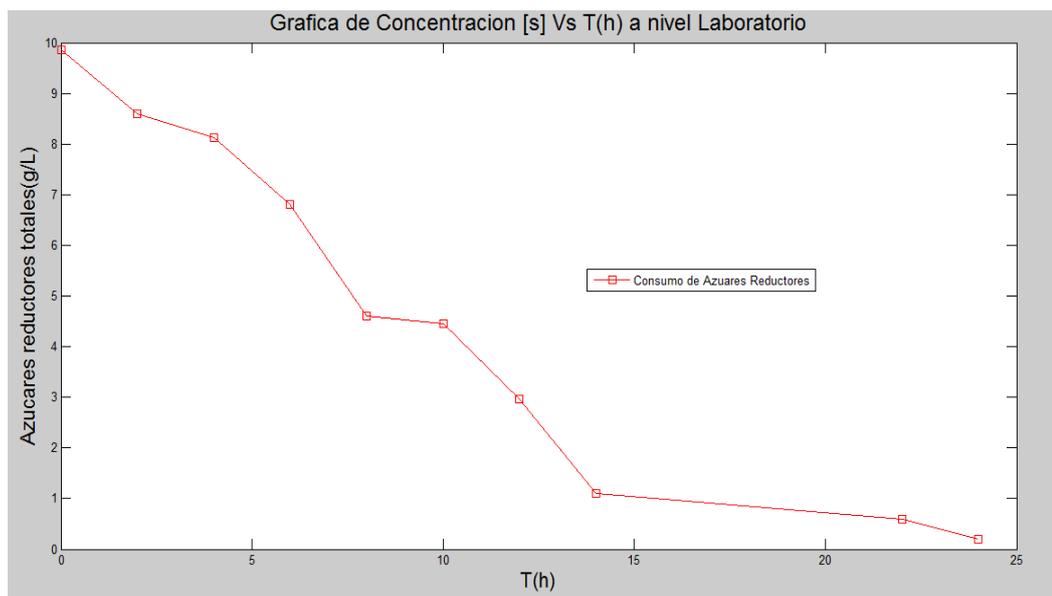


Figura 53

7 CONCLUSIONES

1.- Las células de levadura durante el periodo de conservación en cepario sobre agar YPG su actividad metabólica celular así como la capacidad de la levadura ***Saccharomyces cerevisiae*** para sintetizar y expresar su capacidad enzimática intra y extracelular de manera eficiente quedan inactivadas. Esta es la razón por la cual al reactivar las células de levadura ***Saccharomyces cerevisiae*** de su etapa de dormancia toman un tiempo aproximado de 2-3 horas llamado etapa Lag.

2.-El proceso de hidrólisis del mosto de malta de cebada (Malta de Cebada molturada-Agua) requiere de un complejo enzimático conformado por enzimas proteolíticas y enzimas Amilolíticas que alcanzan su máxima actividad catalítica bajo un perfil de Temperatura, pH, Tiempo, óptimos. Para alcanzar un alto peso de mosto de 13-14% de azúcares totales con una fermentabilidad (Atenuación) del 78-80% el cual será metabolizado por las células de ***Saccharomyces cerevisiae***

3.- El método recomendable de conservación de las células de ***Saccharomyces cerevisiae*** es preservarlo en un cepario de células en un tubo de ensayo con tapa que contiene un medio sólido de agar YPG en plano inclinado sumergido en glicerol a una temperatura de 4°C el cual debe ser renovado cada tres meses por resiembra sucesiva en placa para asegurar en todo momento contar con un cepario puro exento de carga microbiana contaminante.

4.- La metodología rápida y confiable para identificar y cuantificar el número de células vitales y viables es realizar la tinción vital en cámara de Neubauer Improved. Con una solución al 1% (w/v) de Azul de Metileno en una suspensión celular verificando si, la cadena transportadora de electrones se encuentra activa (Célula viva) decolorada o desactivada (Célula muerta) teñida para proceder al recuento.

5.- La velocidad específica promedio a nivel de Laboratorio es de 0.476 h^{-1} mayor al promedio de la velocidad específica a nivel piloto que fue de 0.458 h^{-1} esta diferencia se debe a que al trabajar en volúmenes pequeños en el laboratorio las condiciones se acercan más a la idealidad. Con un tiempo generacional de 1.453 h a nivel laboratorio menor al tiempo generacional a nivel piloto que fue de 1.52 h es decir que a nivel laboratorio las levaduras se reproducen más rápido

6.- La operación de reactivación, propagación y escalamiento de células de levadura ***Saccharomyces cerevisiae***. Comprende dos etapas bien diferenciadas la primera es la reactivación y propagación a nivel de laboratorio y la segunda etapa corresponde a la propagación y el escalamiento a nivel piloto para alcanzar la concentración celular necesario, hasta alcanzar un volumen de inóculo o estarter del 10% del volumen de mosto de malta a inocular con una concentración celular de $15-18 \times 10^6$ de células/mL con una vitalidad y viabilidad mayor al 98% para el escalamiento, de

nivel de laboratorio a nivel piloto.

8 ANEXOS

8.1 LOS ORGANISMOS SON TRANSFORMADORES DE ENERGÍA

La célula viva se asemeja a una industria química donde miles de reacciones ocurren dentro de un espacio, en este caso, un espacio microscópico. Por ejemplo, los azúcares son convertidos en aminoácidos y viceversa. El glucógeno es ensamblado a partir de miles de moléculas de glucosas; las proteínas a partir de aminoácidos. Por otro lado, estos polímeros serán hidrolizados cuando las necesidades de la células así lo requieran.

El metabolismo (del griego “metabole”, cambio) es la totalidad de los procesos químicos de un organismo. El metabolismo es “el mapa de rutas” de miles de reacciones químicas que ocurren en la célula. Las *enzimas* dirigen dichas rutas metabólicas, acelerando diferencialmente reacciones determinadas.

Como un todo, el metabolismo maneja las fuentes de materia y energía de la célula. Algunas rutas metabólicas liberan energía por ruptura de los enlaces químicos de moléculas complejas a compuestos más simples. Estos procesos de degradación constituyen el catabolismo celular o vías catabólicas. Por otro lado, existen vías anabólicas o reacciones químicas del anabolismo, las que consumen energía para construir moléculas de mayor tamaño y complejas a partir de moléculas más simples. Las vías metabólicas se interceptan de tal forma que la energía liberada de reacciones catabólicas (*reacciones exergónicas*) puede utilizarse para llevar a cabo reacciones anabólicas (*reacciones endergónicas*). Así, la transferencia de energía del catabolismo al anabolismo se denomina acoplamiento energético.

La energía ha sido definida como la capacidad de realizar trabajo, de producir una modificación en la materia. Puede adoptar la forma de calor, luz, electricidad movimiento, etc.

Se reconocen dos clases principales de energía:

- 1.- *Energía potencial*
- 2.- *Energía cinética*

Energía Potencial.- Es la capacidad de realizar trabajo en virtud de la posición o el estado de una partícula. Por ejemplo, una piedra en la cima de una montaña tiene energía potencial, a medida que rueda por su ladera, la energía potencial se transforma en cinética. La energía derivada en última instancia del sol, se almacena en las moléculas de los alimentos como energía química. Esta última es un tipo de energía potencial. Luego dentro del organismo, se producen reacciones químicas que transforman la energía potencial en calor, movimiento o alguna otra forma de energía cinética. Todas las formas de energía son, por lo menos en parte, interconvertibles. Los sistemas vivientes constantemente transforman energía potencial en cinética o viceversa. La energía química que los organismos utilizan en las reacciones metabólicas, proviene de los enlaces químicos de los glúcidos, lípidos

y proteínas. Esta energía potencial que guardan los enlaces químicos, puede ser aprovechada parcialmente por el organismo cuando se rompen esos enlaces químicos. La energía que no puede ser atrapada por el organismo, se disipa como calor. En condiciones experimentales controladas, puede medirse y compararse la cantidad de energía que entra y sale de un sistema determinado. La termodinámica es el estudio de la energía. El análisis de las transformaciones energéticas que ocurren en la materia viva se llama termodinámica. Los investigadores llaman *sistema* para denotar una porción de materia bajo estudio. El resto del universo (todo aquello fuera del sistema) es el entorno. Los organismos son sistemas termodinámicos obligatoriamente abiertos, es decir intercambian materia y energía con el entorno. La termodinámica tiene dos leyes fundamentales que gobiernan las transformaciones energéticas de la materia y por lo tanto también rigen para los seres vivos.

8.1.1 La Primera ley de la Termodinámica. También conocida como de la Conservación de la Energía establece que la energía puede convertirse de una forma en otra, pero no se la puede crear ni destruir. La energía total de un sistema y su ambiente, por lo tanto se mantiene constante a pesar de todos los cambios de forma. En todas las conversiones energéticas, cierta energía útil se convierte en calor y se disipa. De todos modos, en una reacción química, la energía de los productos de la reacción más la energía liberada en la misma, es igual a la energía inicial de las sustancias que reaccionan.

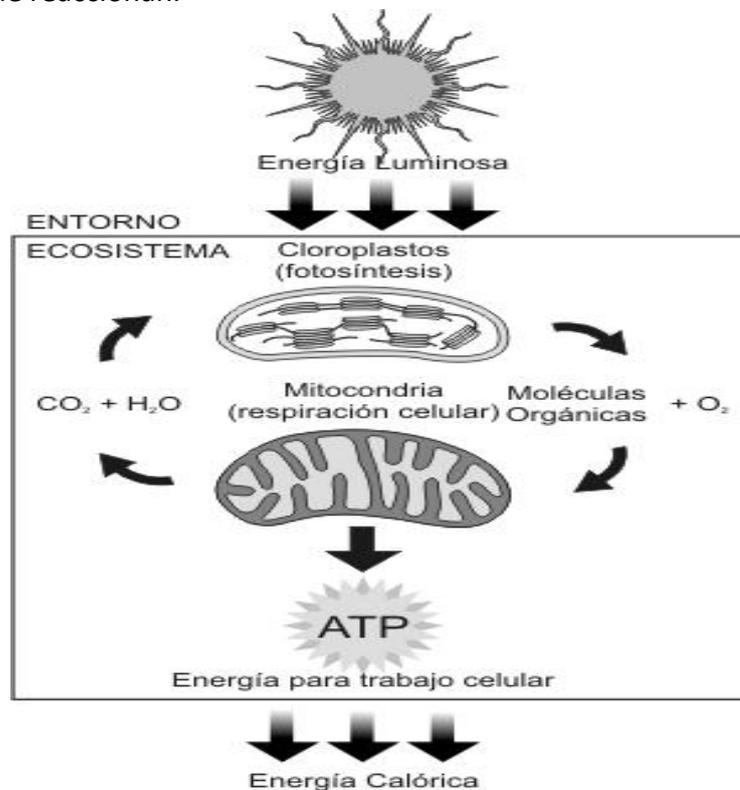


Figura 54. Flujo de energía y materia en un ecosistema.

Las mitocondrias de los eucariotas (incluso plantas) utilizan las moléculas orgánicas producto de la fotosíntesis como combustible para la respiración celular, pero también consume el oxígeno liberado en la fotosíntesis. La respiración libera la energía almacenada en las moléculas orgánicas y genera ATP, el cual se utiliza para el trabajo celular. Los productos de desecho de la respiración, CO₂ y H₂O, son las moléculas que los cloroplastos utilizan como sustrato de la fotosíntesis. Por lo tanto, las moléculas esenciales de la vida son recicladas, pero la energía no. La energía ingresa al ecosistema como energía lumínica y sale como energía calórica.

8.1.2 La Segunda ley de la Termodinámica. Establece que todos los intercambios y conversiones de energía, si no entra ni sale energía del sistema en estudio, la energía potencial del estado final siempre será menor que la energía potencial del estado inicial. Por ejemplo las piedras ruedan siempre cuesta abajo, nunca lo hacen hacia arriba.

En termodinámica se designa como energía dependiente de un alto grado de ordenamiento a la energía potencial, mientras que a la energía cinética molecular se la considera como energía con un grado reducido de ordenamiento. A medida, entonces, que la energía potencial se transforma en cinética, el desorden aumenta y utilizamos la expresión entropía, para caracterizar el grado de desorden de un sistema (las células NO están desordenadas, así que tienen baja entropía). En la naturaleza, el desorden es un estado más probable que el orden y la entropía, como medida del desorden, se convierte en una función que tiende a crecer constantemente. El contenido de energía potencial de los compuestos químicos está representado por la fuerza que mantiene unidos a los átomos y moléculas y cuando las sustancias químicas reaccionan, parte de esta energía se libera como calor y otra parte puede ser convertida en trabajo. Esta fracción de energía disponible para el trabajo se denomina energía libre o entalpía. En otras palabras es el monto máximo de trabajo que puede obtenerse de un sistema.

La energía libre: un criterio para cambio espontáneo los organismos solamente pueden vivir a expensas de la energía libre adquirida del entorno. La cantidad de energía libre de un sistema se simboliza con la letra G. Hay dos componentes para G: la energía total del sistema (H) y su entropía (S). La energía libre se relaciona con estos factores de la siguiente manera:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Con la T (temperatura, en grados Kelvin) para temperaturas absolutas. Como se ve, la temperatura aumenta el término de la entropía en la ecuación. Esto tiene sentido si se recuerda que la temperatura mide la intensidad del movimiento de las moléculas al azar (calor), lo que provoca desorden. Entonces, esta ecuación enuncia que no toda la energía almacenada en un sistema (H) está disponible para el trabajo. El desorden del sistema, el factor de entropía (S), se resta a la energía total para calcular la máxima capacidad del sistema para realizar trabajo útil.

¿Cómo el concepto de energía libre ayuda a determinar si un proceso determinado puede ocurrir espontáneamente? En la ecuación de más arriba, la energía libre (G) es considerada como una medida de inestabilidad del sistema, o sea su tendencia a cambiar a un estado más estable. Por lo tanto, aquellos sistemas que tienden a cambiar espontáneamente a uno más estable son los que tienen mayor energía, baja entropía o ambos. La ecuación de G considera estos dos factores los cuales están consolidados en el contenido de G del sistema en estudio. Ahora se puede establecer un criterio para cambio espontáneo: en cualquier proceso espontáneo la energía libre de un sistema decrece. Los cambios de energía libre cuando un sistema va desde un estado inicial a un estado final representado por:

$$\Delta G = G_{\text{estado final}} - G_{\text{estado inicial}}$$

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

Finalmente, para que un proceso ocurra espontáneamente, el sistema debe ceder energía (decrece H) o perder orden (se incrementa S), o ambos. Cuando los cambios en H o en S son grandes, ΔG tiene un valor negativo.

Las reacciones metabólicas son exergónicas o endergónicas. Las reacciones metabólicas pueden ser clasificadas en exergónicas (aquellas que liberan energía) o endergónicas (aquellas que consumen energía) tomando en cuenta sus cambios de energía libre. En una reacción exergónica hay una liberación neta de energía libre. Puesto que los reactantes pierden energía libre (G), ΔG es negativa para una reacción exergónica. En otras palabras, las reacciones exergónicas ocurren espontáneamente. Las reacciones endergónicas toman G de su entorno. Esto se debe a que esta clase de reacciones almacenan más energía libre (G) en las moléculas, por lo tanto ΔG es positivo. Tales reacciones no son espontáneas.

De lo anterior, se concluye que si un proceso químico es exergónico en una dirección, entonces el proceso inverso debe ser endergónico.

8.1.3 Desequilibrio Metabólico: Clave de la vida. Las reacciones químicas del metabolismo son reversibles y podrían equilibrarse sólo en un medio aislado como un tubo de ensayo. En los sistemas químicos en equilibrio ΔG es cero y sin energía libre no hay trabajo, por lo tanto una célula que ha alcanzado su equilibrio está muerta. Este desequilibrio metabólico es una de las características que define a la vida y esto se mantiene gracias a que en las vías metabólicas los productos no se acumulan, siendo sustratos de otras reacciones y por lo tanto no alcanzándose nunca el equilibrio. Por ejemplo, durante la respiración celular, la glucosa y otros combustibles energéticos son degradados y el dióxido de carbono es eliminado al medio interno y luego expelido al exterior con lo cual la célula no alcanza nunca su equilibrio y continúa trabajando. Este simple ejemplo nos sirve para comprender la importancia que reviste para los organismos vivos ser sistemas abiertos. La molécula de ATP es responsable de la mayoría de los procesos de acoplamiento energético en las células. Como se recordará, una estrategia clave de la bioenergética es el acoplamiento energético, es decir el uso de un proceso exergónico para llevar a cabo uno endergónico.

8.1.4 El adenosíntrifosfato (ATP). "la moneda de la célula", transfiere la energía liberada por la ruptura de las uniones químicas en los procesos exergónicos hacia las reacciones endergónicas, es decir las reacciones que consumen energía.

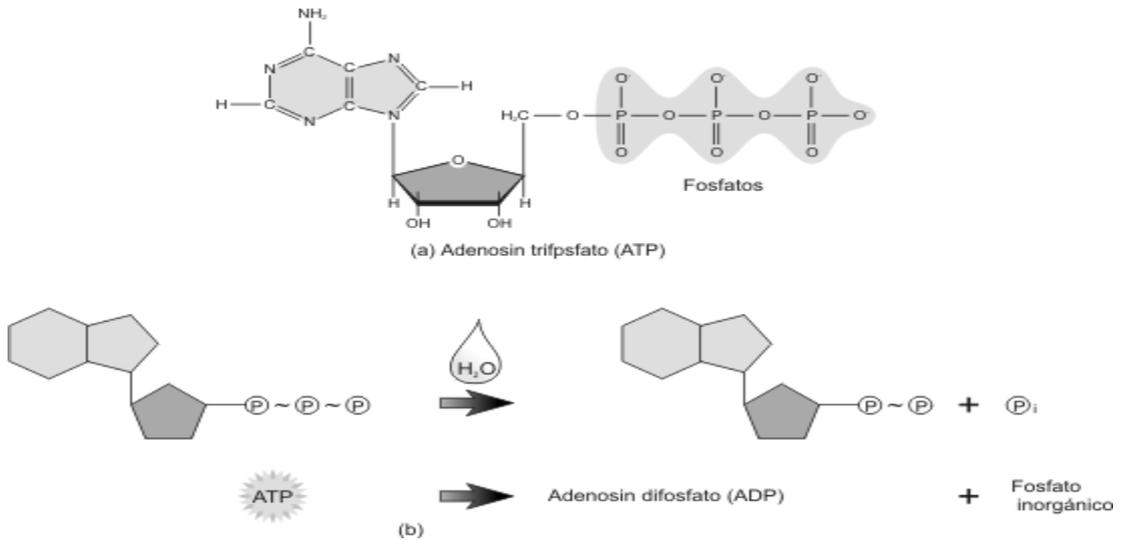


Figura 55 Molécula de ATP

.El enlace entre el segundo y el tercer fosfato es un enlace rico en energía. Para establecerlo se necesitó de un gran aporte energético, esto es, de la energía libre obtenida del entorno por la célula. Por otro lado, su ruptura resulta en la liberación de esta energía, la que puede ser empleada para los distintos tipos de trabajos celulares.

En la mayoría de los casos, la fuente inmediata de energía que potencia el trabajo celular es el ATP. Esta molécula es también conocida como un transportador o intermediario energético.

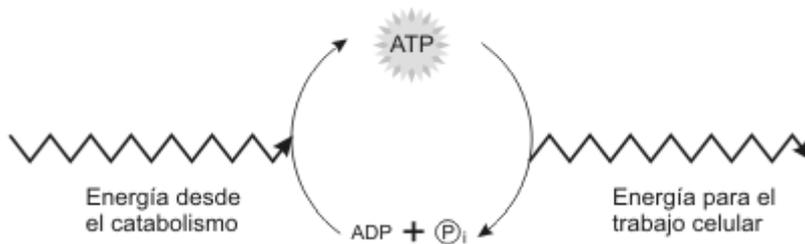


Figura 56. El ciclo del ATP.

La energía liberada en las reacciones catabólicas se usa para fosforilar ADP, generando ATP. La energía almacenada en el ATP se utiliza en la mayoría de los trabajos celulares. Por lo tanto, el ATP acopla los procesos productores de energía de la célula a los consumidores de energía.

Muchos de las reacciones de los metabolismos son reacciones de óxido-reducción. Los electrones poseen distintas cantidades de energía potencial según su distancia respecto del núcleo del átomo y la atracción del núcleo por los electrones. Al aportar energía, el electrón pasa a un nivel energético más alto, pero sin la energía adicional, el electrón permanece en el nivel energético más bajo disponible para él. Las reacciones químicas son transformaciones energéticas en las cuales la energía almacenada en los enlaces químicos se transfiere a otros enlaces químicos recién formados. En estas transformaciones los electrones pasan de un nivel energético a otro. En muchas reacciones los electrones se transfieren de un átomo o molécula a otro. Estas reacciones muy importantes en los sistemas vivientes, se conocen como:

- A) Reacciones de Oxidación-Reducción (Redox).- La pérdida de un electrón se conoce como oxidación y el átomo o molécula que pierde el electrón se ha oxidado. La pérdida de electrones se llama oxidación porque el oxígeno que atrae con fuerza a los electrones, es la mayoría de las veces el receptor de los mismos.

- B) Reacciones de Reducción.- Por el contrario, es la ganancia de electrones. La oxidación y la reducción siempre ocurren simultáneamente, porque el electrón que pierde un átomo es aceptado por otro, que se ha reducido en el proceso.

En los sistemas vivientes muchas veces los electrones son transferidos con un protón, es decir, es un átomo de hidrógeno. En tal caso la oxidación implica una pérdida de átomos de hidrógeno y la reducción la ganancia de estos. La energía de las moléculas es liberada en el transcurso de las reacciones de oxidación. Durante el transcurso de sucesivas y graduales reacciones de oxidación, la mayor parte de la energía química contenida en los alimentos es liberada de manera secuencial. De esta manera, se logra la eficaz captación de la energía liberada en enlaces de alta energía como los del ATP.

Toda oxidación de un átomo o de una molécula está asociada a la reducción de otro átomo u otra molécula. Durante las reacciones de oxidación pueden perderse hidrógenos (H). Estos se pueden disociar en un protón (H^+) y en un electrón (e^-). En un sentido general, toda remoción de e^- de cualquier átomo o molécula constituye una reacción de oxidación. Este e^- pudo haber sido removido de un H. Luego el H^+

puede permanecer en la molécula a la que conformaba o puede pasar al medio. Por otro lado, la reducción de un átomo o molécula puede implicar la ganancia de hidrógeno o e^- . Existen moléculas intermediarias en las reacciones de óxido-reducción: la *nicotinamida adenina dinucleótido* (NAD^+), la *nicotinamida adenina dinucleótido fosfato* ($NADP^+$) y la *flavina adenina dinucleótido* (FAD).

Las siglas de las coenzimas anteriormente expuestas representan las moléculas oxidadas. Las formas reducidas se representan: $NADH + H^+$; $NADPH + H^+$; $FADH_2$, respectivamente.

Por ejemplo, el compuesto XH_2 es oxidado, NAD^+ es reducido:

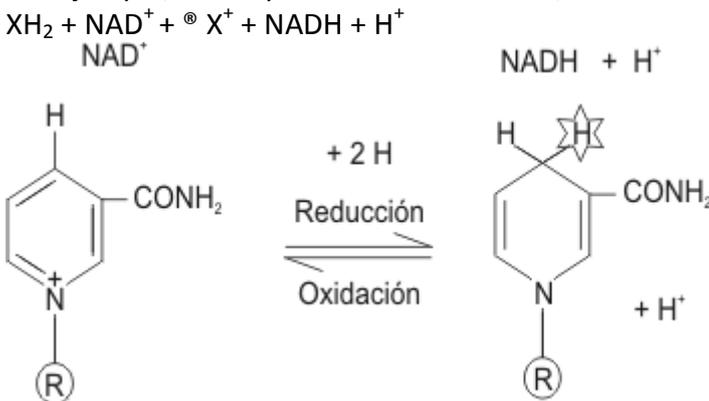


Figura 57. Oxido-reducción de la coenzima NAD^+

8.1.5 La célula puede realizar tres clases principales de trabajo. Donde se requiere energía:

- Trabajo Mecánico: como el batido de cilios y flagelos, la contracción de las células musculares, el fluir del citoplasma dentro de la célula o el movimiento de los cromosomas durante la división celular.
- Trabajo de Transporte: el bombeo de sustancias e iones a través de la membrana en contra de la dirección del movimiento espontáneo.
- Trabajo Químico: El impulso de reacciones endergónicas, que no ocurrirían espontáneamente, como la síntesis de los polímeros a partir de sus monómeros.

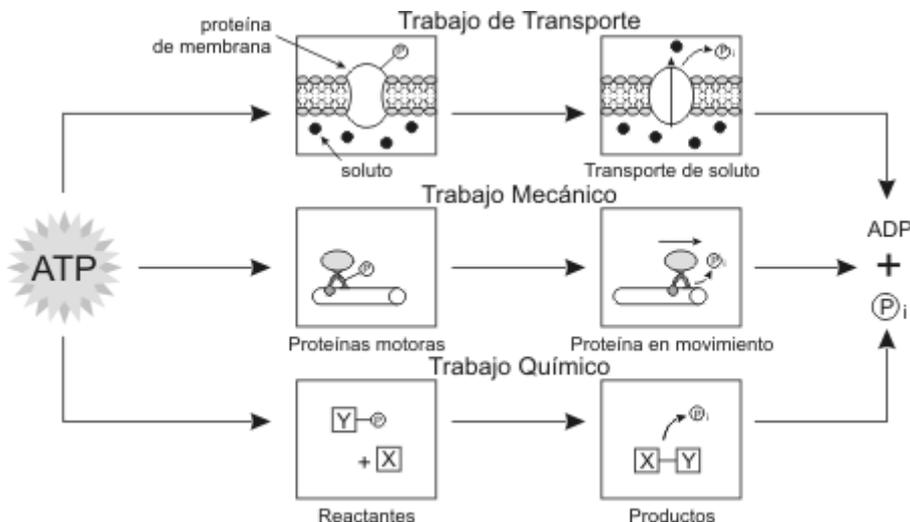


Figura 58. Tipos de trabajo celular que utilizan ATP

8.2 LAS ENZIMAS

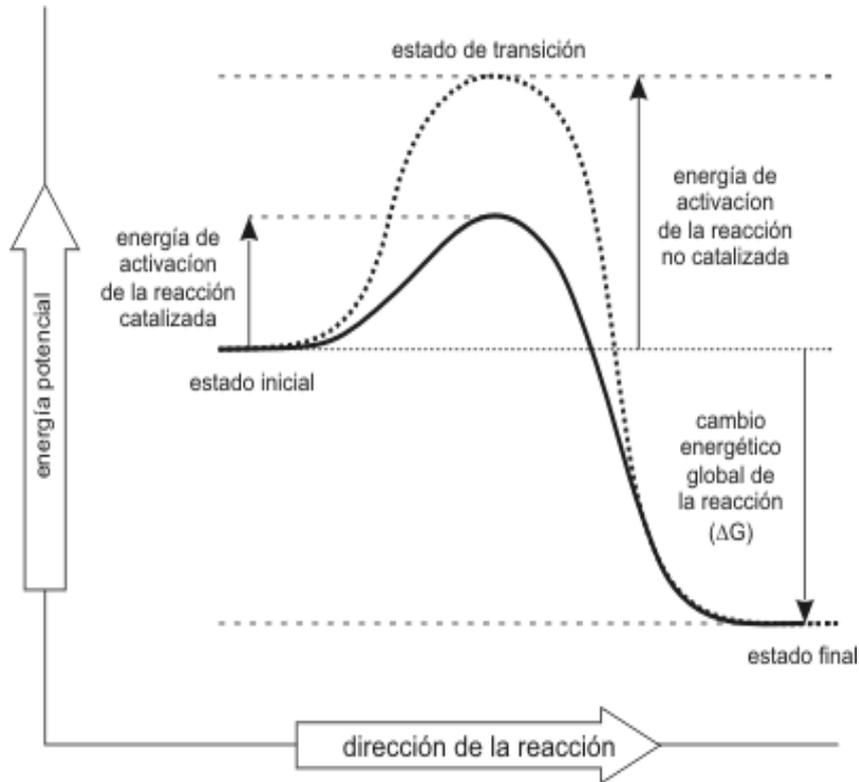
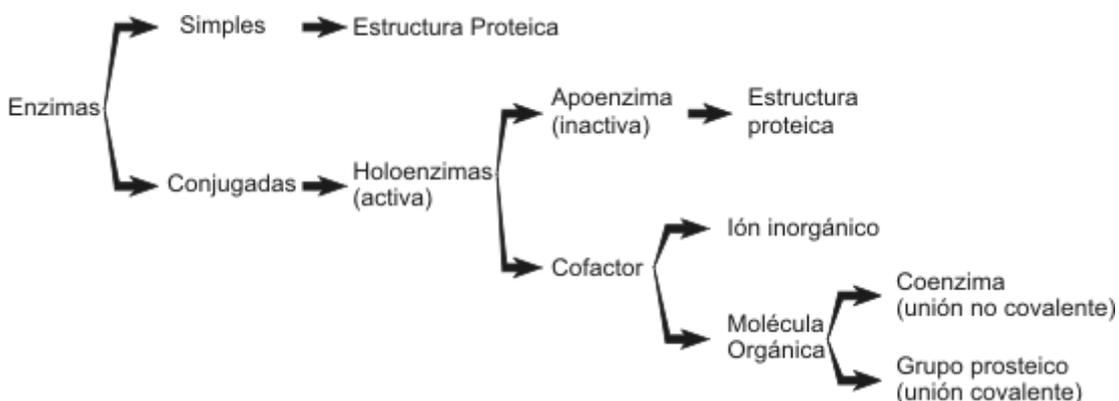


Figura 59. Perfil de energía de una reacción exergónica. La curva punteada indica el curso de la reacción sin enzima. La curva continua el curso de la reacción en presencia de la enzima. Según su naturaleza los catalizadores pueden ser químicos o biológicos.

Cuadro 36. Diferencias entre catalizadores biológicos y químicos	
Biológicos	Químicos
Son específicos para una determinada reacción química o para un grupo de reacciones químicas para un sustrato o grupo de sustratos.	Aceleran cualquier reacción inespecíficamente.
Son proteínas mayoritariamente (hay ARN (Ribozimas) con función enzimática.	Son sustancias simples finamente divididas.
Son saturables	No son saturables.
Son altamente eficaces (son eficaces en bajas concentraciones).	Son medianamente eficaces.
Puede ser regulada su actividad catalítica.	No pueden ser regulados.
Son termolábiles y su actividad puede variar también de acuerdo al pH del medio.	No son termolábiles ni se alteran con cambios de pH.

Una enzima puede estar formada por una sola cadena de polipéptido, consistir en subunidades múltiples o requerir de componentes no proteicos. En general las reacciones catalizadas por enzimas se llevan a cabo a presión, temperatura y pH moderado.

8.2.1 Clasificación de las Enzimas. Desde el punto de vista estructural podemos clasificar a las enzimas en simples y conjugadas (de la misma forma que hemos clasificado a las proteínas). Clasificación de las enzimas según su estructura:



- 1.-Enzimas simples: son aquellas que constan solo de una estructura proteica. Pueden estar formadas por una o varias cadenas polipeptídicas.
- 2.- Enzimas conjugadas: también llamadas holoenzimas poseen en su estructura una parte no proteica denominada cofactor y una parte proteica que se denomina

apoenzima. Para que estas enzimas actúen como catalizadores es necesario que la apoenzima se una al cofactor. El término cofactor puede aplicarse tanto a un ión como a una molécula orgánica de naturaleza variable (grupo prostético y coenzimas). Las coenzimas funcionan como portadores de grupos químicos pequeños como ser acetilo, metilo o bien protones y electrones. Las coenzimas se unen no covalentemente a la apoenzima permitiendo que la holoenzima así formada lleve a cabo reacciones que la apoenzima sola no puede efectuar. Por ejemplo, ninguna de las cadenas laterales de los aminoácidos es capaz de transportar electrones pero cuando se agrega por ejemplo la coenzima FAD^+ , la proteína adquiere esta función. Las moléculas orgánicas que están fuertemente unidas a la apoenzima se denominan grupos prostéticos.

Muchas coenzimas derivan de vitaminas solubles en agua como ser las del grupo B

Cuadro 37.			
Vitaminas hidrosolubles , sus coenzimas derivadas y sus funciones			
Vitamina	Coenzima derivada	Abreviatura	Función
Tiamina (B1)	Pirofosfato de tiamina	TPP	Descarboxilación y transferencia de grupos acilo.
Riboflavina (B2)	Flavinamonucleótido	FMN	Portadores de hidrógeno y electrones en oxidoreducciones
	Flavina y adenina dinucleótido	FAD	
Ácido Nicotínico	Nicotinamida y adenina dinucleótido	NAD^+	Portadores de hidrógeno y electrones en oxidoreducciones
	Nicotinamida y adenina dinucleótido fosfato	$NADP^+$	
Piridoxina, piridoxal y piridoxamina (B ₆)			Transaminación y decarboxilación
Ácido Pantoténico	Coenzima A	CoASH	Transferencia de acilos
Biotina	Enlazada covalentemente a carboxilasas		Carboxilación
Ácido Fólico	Tetrahidrofolato	TH ₄	Transferencia de un carbono
Cobalamina (B ₁₂)	Coenzima de cobalamina		Reordenamientos, transferencia de metilos

Otra forma de clasificarlas es de acuerdo con las reacciones que catalizan, como se indica el cuadro 4, a continuación.

Cuadro 38. Clasificación de las Enzimas (según International Union of Biochemistry)	
Clase	Tipo de reacción catalizada
1 - Oxidorreductasas	Síntesis de componentes a través de la ruptura oxidativa o reductora de un enlace de alta energía. p. ej. alcohol deshidrogenasa alcohol + NAD ⁺ ® colina + glutamato
2 - Transferasas	Transferencia de un grupo funcional de una molécula a otra. p. ej. aspartatoaminotransferasa L-aspartato + 2-oxoglutarato ® 2- oxalacetato + 1-L- glutamato
3 - Hidrolasas	Ruptura de enlaces por hidrólisis p. ej. Acetilcolina + H ₂ O ® 2 oxalacetato + L- glutamato
4 - Liasas	Ruptura de enlaces por eliminación p. ej. Piruvato descarboxilasa 2 oxoácido ® aldehído + CO ₂
5 - Isomerasas	Modificación de la forma o del ordenamiento espacial de las moléculas. p. ej. Fosfogliceratomutasa 2-fosfoglicerato ® 3- fosfoglicerato
6 - Ligasas	Unión de moléculas usando la energía que se deriva de la hidrólisis de los enlaces de alta energía p. ej. Acetil- CoAligasa ATP + acetato+ CoA ® AMP + acetato + CoA + pirofosfato + acetil-CoA

8.2.2 Sitio Activo. Es el sitio en el cual el o los sustratos se unen a la enzima. En general estos sitios se encuentran en el interior de la estructura proteica, formando hendiduras o bolsas, de manera que el sustrato pueda experimentar un máximo de interacciones con la enzima. De toda la estructura de la enzima, que en realidad son moléculas enormes, solo una parte muy pequeña interactúa con el sustrato en general solo participar cinco o seis aminoácidos. La especificidad de una enzima hacia su sustrato es una de las características más notables, normalmente se propone el modelo de llave y cerradura para explicar la forma complementaria en que interactúan la enzima y el sustrato, sin embargo esto nos hace pensar en una estructura rígida. Actualmente se sabe que las enzimas son moléculas flexibles, por lo tanto el modelo más correcto sería el llamado ajuste o encaje inducido, en donde

el sitio activo se modifica para hacerse complementario al sustrato. Una manera de graficar este modelo sería la forma en que un guante se ajusta a la mano, es decir el guante tiene una forma particular, que al momento de “interactuar” con la mano se modifica, haciéndose complementaria con la misma.

8.2.3 Mecanismo de Acción. Como hemos visto las propiedades químicas de una enzima dependen casi enteramente de las cadenas laterales. La actividad catalítica de una enzima resulta de la unión de la molécula de sustrato al sitio activo de la enzima por medio de interacciones generalmente débiles. Al parecer, las más significativas son las interacciones puente hidrógeno. También debemos recordar que esta unión es sumamente específica.

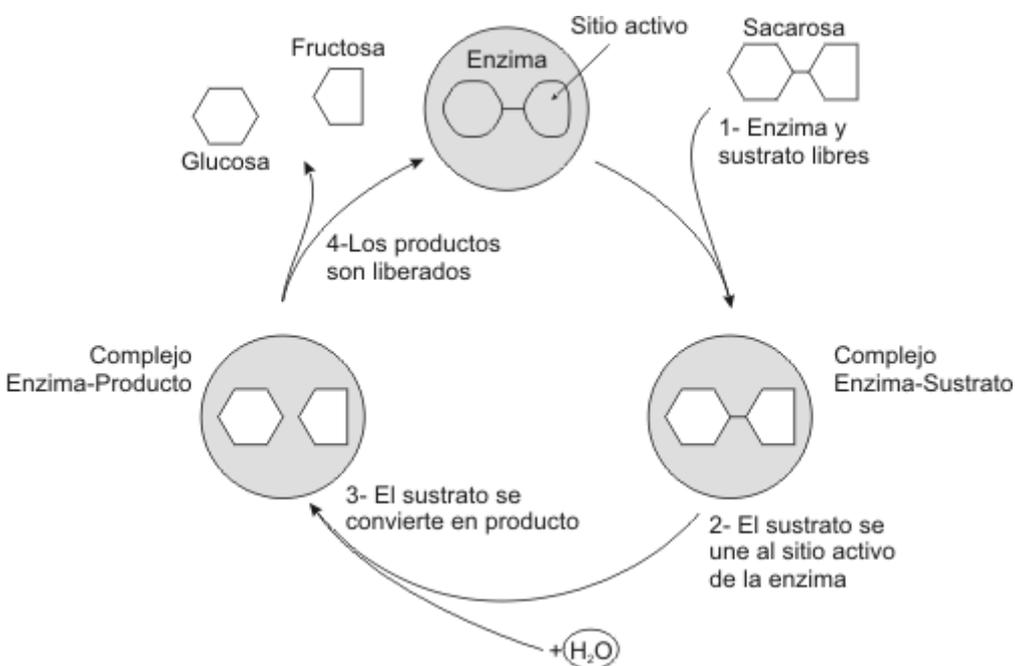


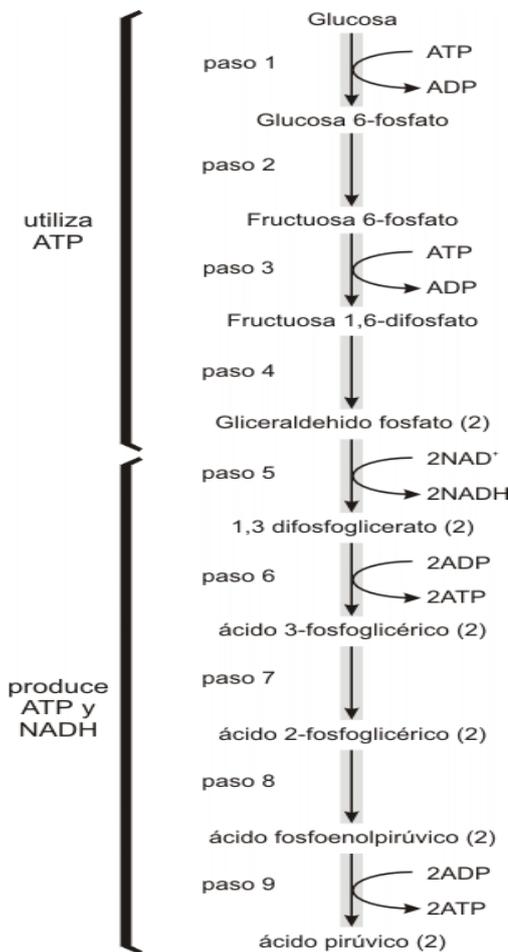
Figura 60.

Una vez que la enzima reconoce al sustrato y se ajusta a él, se forma un complejo que recibe el nombre de complejo enzima-sustrato. La ruptura y la formación de los enlaces se llevan a cabo por las interacciones entre las cadenas laterales de la enzima y los enlaces dentro del sustrato. Una vez que se han formado los productos obtenemos un complejo que recibe el nombre de complejo enzima-producto, finalmente los productos se separarán de la enzima recuperándose esta para reaccionar con otra molécula de sustrato, es decir que en el transcurso de la reacción la enzima no se modifica.

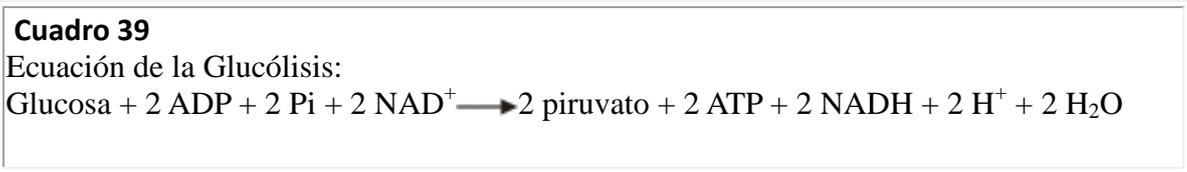
8.2.4 La glucólisis. La glucólisis, lisis o escisión de la glucosa, tiene lugar en una serie de nueve reacciones, cada una catalizada por una enzima específica, hasta formar dos moléculas de ácido pirúvico, con la producción concomitante de ATP. La

ganancia neta es de dos moléculas de ATP, y dos de NADH por cada molécula de glucosa. Las reacciones de la glucólisis se realizan en el citoplasma, como ya adelantáramos y pueden darse en condiciones anaerobias; es decir en ausencia de oxígeno. Los primeros cuatro pasos de la glucólisis sirven para fosforilar (incorporar fosfatos) a la glucosa y convertirla en dos moléculas del compuesto de tres carbonos gliceraldehído fosfato (PGAL). En estas reacciones se invierten dos moléculas de ATP a fin de activar la molécula de glucosa y prepararla para su ruptura.

Resumen de la glucólisis

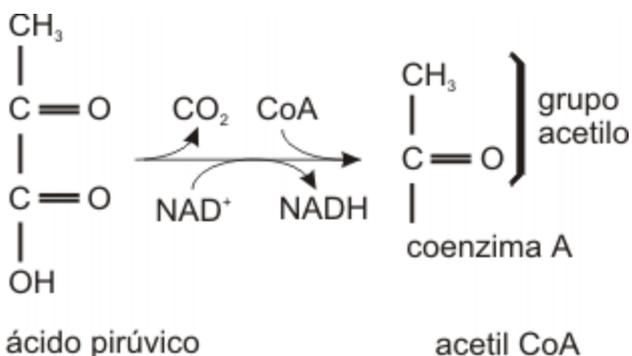


1. **Figura 61.** Resumen de las dos etapas de la glucólisis. En la primera etapa se utilizan 2 ATP y la segunda produce 4 ATP y 2 NADH. Otros azúcares, además de la glucosa, como la manosa, galactosa y las pentosas, así como el glucógeno y el almidón, pueden ingresar en la glucólisis una vez convertidos en glucosa 6-fosfato.



8.2.5 Respiración aeróbica. En presencia de oxígeno, la etapa siguiente de la degradación de la glucosa es la respiración, es decir la oxidación escalonada del ácido pirúvico a dióxido de carbono y agua. La respiración aeróbica se cumple en dos etapas: el ciclo de Krebs y el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa (estos dos últimos procesos transcurren acopladamente). En las células eucariotas estas reacciones tienen lugar dentro de las mitocondrias; en las procariontas se llevan a cabo en estructuras respiratorias de la membrana plasmática.

8.2.6 Ciclo de Krebs. El ácido pirúvico sale del citoplasma, donde se produce mediante glucólisis y atraviesa las membranas externa e interna de las mitocondrias. Antes de ingresar al Ciclo de Krebs, el ácido pirúvico, de 3 carbonos, se oxida. Los átomos de carbono y oxígeno del grupo carboxilo se eliminan como dióxido de carbono (descarboxilación oxidativa) y queda un grupo acetilo, de dos carbonos. En esta reacción exérgica, el hidrógeno del carboxilo reduce a una molécula de NAD^+ a NADH .



Ahora la molécula original de glucosa se ha oxidado a dos moléculas de CO_2 , y dos grupos acetilos y, además se formaron 4 moléculas de NADH (2 en la glucólisis y 2 en la oxidación del ácido pirúvico). Cada grupo acetilo es aceptado por un compuesto llamado coenzima A dando un compuesto llamado acetilcoenzima A (acetil CoA). Esta reacción es el eslabón entre la glucólisis y el ciclo de Krebs.

El ciclo de Krebs también conocido como ciclo del ácido cítrico es la vía común final de oxidación del ácido pirúvico, ácidos grasos y las cadenas de carbono de los aminoácidos. La primera reacción del ciclo ocurre cuando la coenzima A transfiere su grupo acetilo (de 2 carbonos) al compuesto de 4 carbonos (ácido oxalacético) para producir un compuesto de 6 carbonos (ácido cítrico).

El ácido cítrico inicia una serie de pasos durante los cuales la molécula original se reordena y continúa oxidándose, en consecuencia se reducen otras moléculas de NAD^+ a NADH y de FAD^+ a FADH_2 . Además ocurren dos carboxilaciones y como resultado de esta serie de reacciones vuelve a obtenerse una molécula inicial de 4 carbonos el ácido oxalacético. El proceso completo puede describirse como un ciclo de oxalacético a oxalacético, donde dos átomos de carbono se adicionan como acetilo y dos átomos de carbono (pero no los mismos) se pierden como CO_2 .

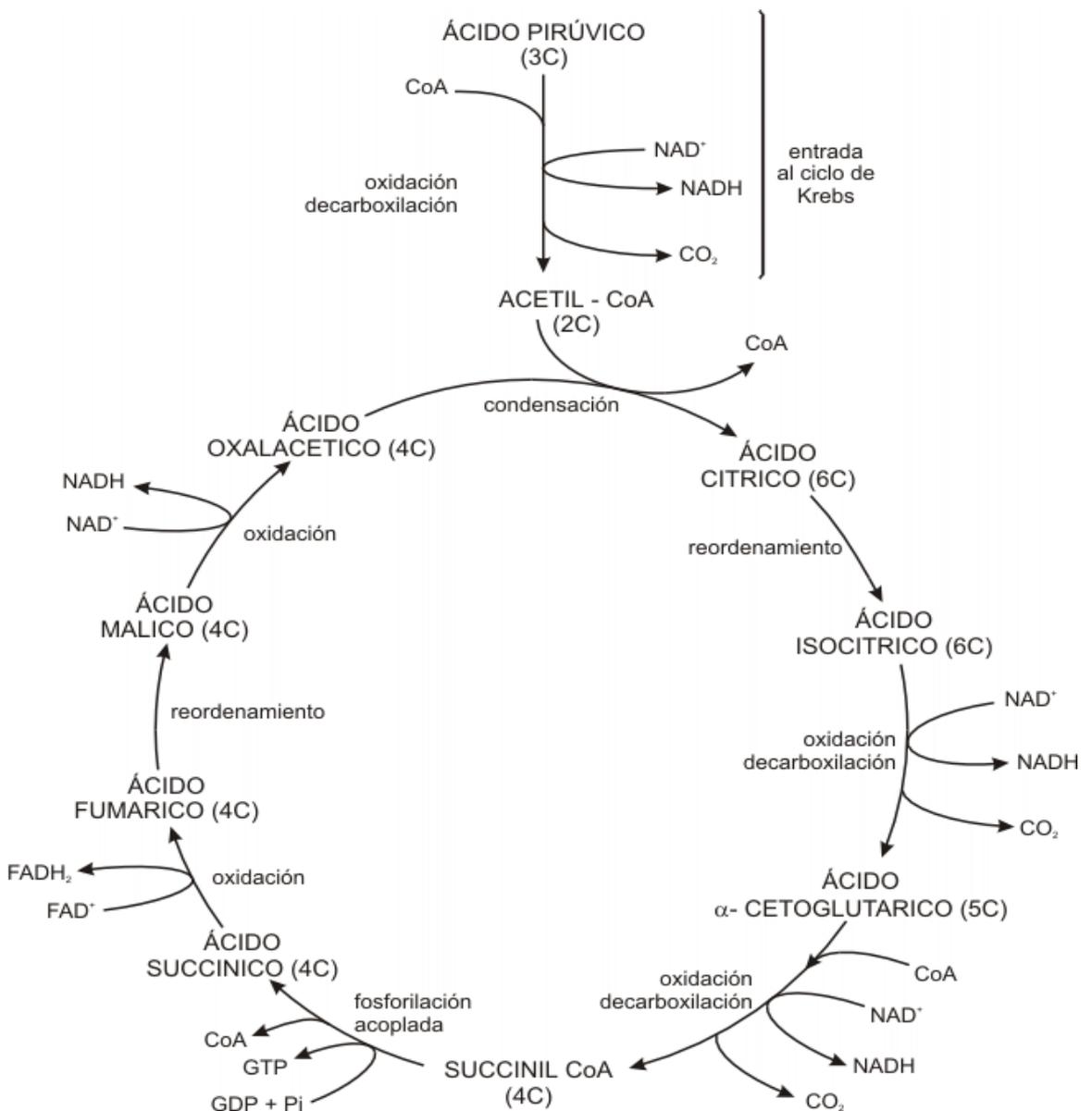


Figura 62. Esquema simplificado del Ciclo de Krebs

Dado que por cada molécula de glucosa inicial se habían obtenido dos de ácido pirúvico y, por lo tanto dos de acetil CoA, deben cumplirse dos vueltas del ciclo de Krebs por cada molécula de glucosa. En consecuencia los productos obtenidos de este proceso son el doble del esquema que se detalla a continuación.

Cuadro 40. Balance parcial de la respiración		
Proceso	Sustrato	Productos
Glucólisis	Glucosa	2 ácido pirúvico 2 ATP 2 NADH
Entrada al ciclo de Krebs	2 ácido pirúvico	2 Acetil CoA 2 CO ₂ 2 NADH
Ciclo de Krebs	2 Acetil CoA	4 CO ₂ 2 GTP (equivalentes a 2 ATP) 6 NADH 2 FADH ₂
Glucosa	→ 6 CO ₂ → 2 ATP → 2 GTP → 10 NADH → 2 FADH ₂	

Observando el balance parcial del ciclo de Krebs, se comprueba que en este proceso no se obtiene energía directamente bajo la forma de ATP (sólo se obtiene 1 GTP que es equivalente a 1 ATP). En cambio se obtienen cantidades de coenzimas reducidas (NADH y FADH₂), y es a través de la oxidación posterior que se obtendrá la energía para sintetizar ATP. Cada coenzima NADH equivale a 3 ATP y cada coenzima FADH₂ equivale a 2 ATP.

8.2.7 Transporte de electrones o Cadena respiratoria. En esta etapa se oxidan las coenzimas reducidas, el NADH se convierte en NAD⁺ y el FADH₂ en FAD⁺. Al producirse esta reacción, los átomos de hidrógeno (o electrones equivalentes), son conducidos a través de la cadena respiratoria por un grupo de transportadores de electrones, llamados citocromos. Los citocromos experimentan sucesivas oxidaciones y reducciones (reacciones en las cuales los electrones son transferidos de un dador de electrones a un aceptor). En consecuencia, en esta etapa final de la respiración, estos electrones de alto nivel energético descienden paso a paso hasta el bajo nivel energético del oxígeno (último aceptor de la cadena), formándose de esta manera agua. Cabe aclarar que los tres primeros aceptores reciben el H⁺ y el

electrón conjuntamente. En cambio, a partir del cuarto aceptor, sólo se transportan electrones, y los H^+ quedan en solución.

8.2.8 Fosforilación Oxidativa. El flujo de electrones está íntimamente acoplado al proceso de fosforilación, y no ocurre a menos que también pueda verificarse este último. Esto, en un sentido, impide el desperdicio ya que los electrones no fluyen a menos que exista la posibilidad de formación de fosfatos ricos en energía. Si el flujo de electrones no estuviera acoplado a la fosforilación, no habría formación de ATP y la energía de los electrones se degradaría en forma de calor.

Puesto que la fosforilación del ADP para formar ATP se encuentra acoplada a la oxidación de los componentes de la cadena de transporte de electrones, este proceso recibe el nombre de fosforilación oxidativa. En tres transiciones de la cadena de transporte de electrones se producen caídas importantes en la cantidad de energía potencial que retienen los electrones, de modo que se libera una cantidad relativamente grande de energía libre en cada uno de estos tres pasos, formándose ATP.

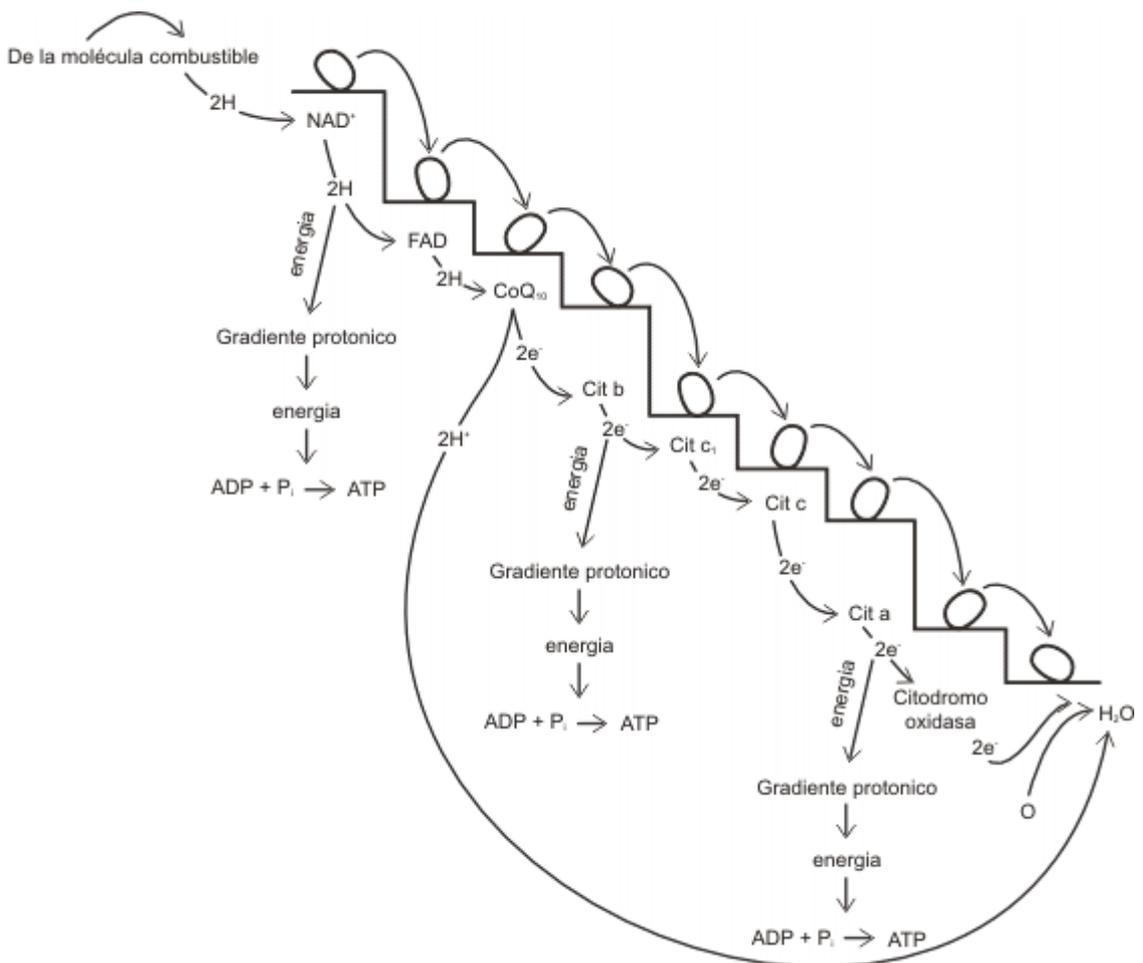


Figura 63. Diagrama de la cadena respiratoria y de la fosforilación oxidativa asociada

8.2.9 Hipótesis Quimiosmótica.

Durante mucho tiempo se intentó explicar la naturaleza del enlace entre la cadena respiratoria y el sistema de fosforilación. En 1961, Mitchell propuso la hipótesis Quimiosmótica, que es la que actualmente se acepta en general. Esta hipótesis ha sido apoyada por las evidencias experimentales encontradas en distintos laboratorios, lo que le valió a Mitchell el premio Nobel en 1978. La misma propone que el transporte de electrones y la síntesis de ATP están acopladas por un gradiente protónico a través de la membrana mitocondrial. Según este modelo, el transporte de electrones paso a paso, desde el NADH o el FADH₂ hasta el oxígeno a través de los transportadores de electrones, da por resultado el bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial interna hacia el espacio entre las membranas mitocondriales interna y externa. Este proceso genera un potencial de membrana a través de la membrana mitocondrial interna, ya que el medio que ocupa el espacio intermembranoso se carga positivamente. La diferencia en concentración de protones entre la matriz y el espacio intermembranoso representa energía potencial, resultado en parte de la diferencia de pH y en parte de la diferencia en la carga eléctrica de los lados de la membrana. Cuando los protones pueden fluir de regreso a la matriz, descendiendo por el gradiente protónico, se libera energía utilizable en la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi. Los protones regresan a la matriz a través de conductos especiales situados en la membrana interna. Estos conductos están dados por un gran complejo enzimático, llamado ATP sintetasa. Este complejo consta de dos proteínas: F₀ y F₁. Las partículas F₀ están incluidas en la membrana mitocondrial interna y la atraviesan desde afuera hacia adentro. Se presume que poseen un conducto o poro interior que permite el paso de los protones. Las partículas F₁ (que ya habíamos mencionado, al describir la estructura mitocondrial) son proteínas globulares grandes consistentes en nueve subunidades polipeptídicas unidas a las partículas F₀ en el lado de la membrana que linda con la matriz. Se comprobó que propulsa la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i. Conforme los protones descienden a lo largo del gradiente de energía, dicha energía utiliza para sintetizar ATP. De esta manera, el gradiente protónico que existe a través de la membrana mitocondrial interna acopla la fosforilación con la oxidación.

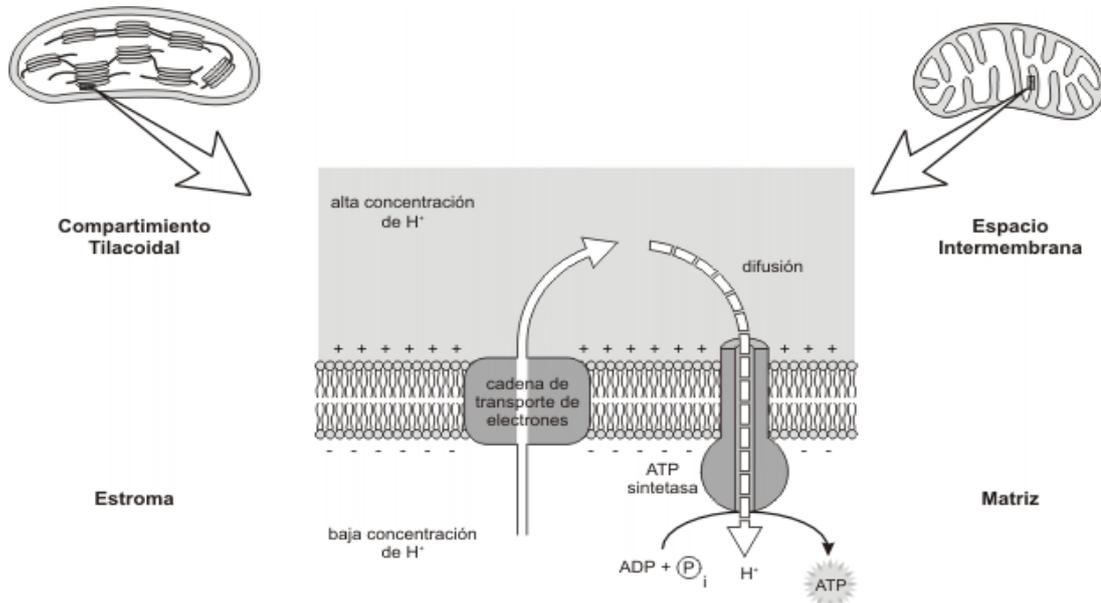


Figura 64. Esquema comparativo de la quimiosmosis en la mitocondria y el cloroplasto.

Observe el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana (sombreado). El ATP se forma del lado de la membrana que mira a la matriz, por la difusión de los H^+ a través del complejo ATPsintetasa. En el cloroplasto, a través de la membrana tilacoidal se bombean protones desde el estroma al compartimiento tilacoidal (sombreado). Como los H^+ atraviesan la membrana a través de la ATPsintetasa, la fosforilación del ADP tiene lugar del lado de la membrana que mira al estroma.

Cuadro 41. RESUMEN DE LA GLUCÓLISIS Y DE LA RESPIRACIÓN		
En el citoplasma: Glucólisis →	2 ATP	2 ATP
En las mitocondrias:	2 NADH → 6 ATP	→ 6 ATP*
De la glucólisis:	1 NADH → 3 ATP (x 2)	→ 6 ATP
De la respiración	1 ATP	→ 24 ATP
Ácido pirúvico → acetil	3 NADH → 9 ATP (x 2)	
CoA:	1 FADH ₂ → 2 ATP	
Ciclo de Krebs:		
Rendimiento total de ATP → 36 a 38 ATP		
* en algunas células el costo energético de transportar los electrones desde el NADH formado en la glucólisis a través de la membrana mitocondrial interna deprime el rendimiento neto de estos 2 NADH a sólo 4 ATP		

La glucosa se degrada a ácido pirúvico, en el citoplasma con un rendimiento de 2 moléculas de ATP y la reducción (flechas entrecortadas) de dos moléculas de NAD^+ a NADH. El ácido pirúvico se oxida a acetil CoA y se reduce una molécula de NAD^+ , esta reacción y la siguiente ocurren 2 veces por cada molécula de glucosa (pase de e^- con línea entera). En el ciclo de Krebs, el grupo acetilo se oxida y los aceptores de electrones NAD^+ y FAD se reducen. El NADH y FADH_2 transfieren sus electrones a la serie de transportadores de la cadena de transporte de electrones. Al circular los electrones hacia niveles energéticos menores se liberan cantidades relativamente grandes de energía libre. Esta liberación transporta protones a través de la membrana mitocondrial interna estableciendo el gradiente de protones que propulsa la síntesis de ATP a partir del ADP.

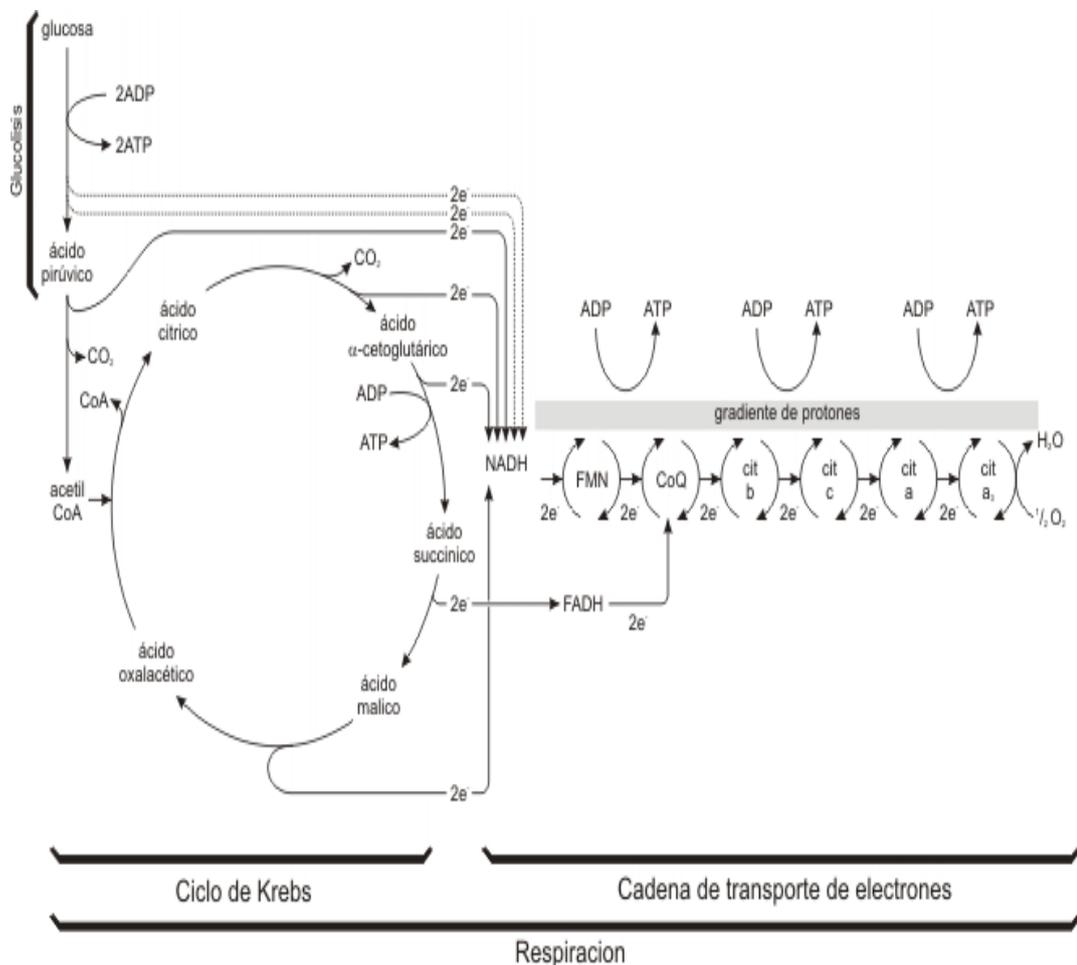


Figura 65. Resumen de la Glucólisis y de la Respiración.

8.3 OTRAS VÍAS CATABÓLICAS

La mayoría de los organismos no se alimentan directamente de glucosa, obtienen su energía a partir de las grasas o proteínas. La respuesta está en que el ciclo de Krebs es el cual es un gran nudo del metabolismo energético. Otras sustancias alimenticias son degradadas y convertidas en moléculas capaces de ingresar al ciclo.

Las grasas se desdoblan en sus componentes glicerol y ácidos grasos. Estos últimos son fraccionados en fragmentos de dos carbonos e introducidos en el ciclo de Krebs como Acetil - CoA. Las proteínas se degradan a aminoácidos, estos son desaminados (se les eliminan los grupos amino) y el esqueleto de carbonos se convierte en un grupo acetilo, ingresando al ciclo de Krebs. Los grupos amino si no se utilizan, se excretan como urea u otros desechos nitrogenados

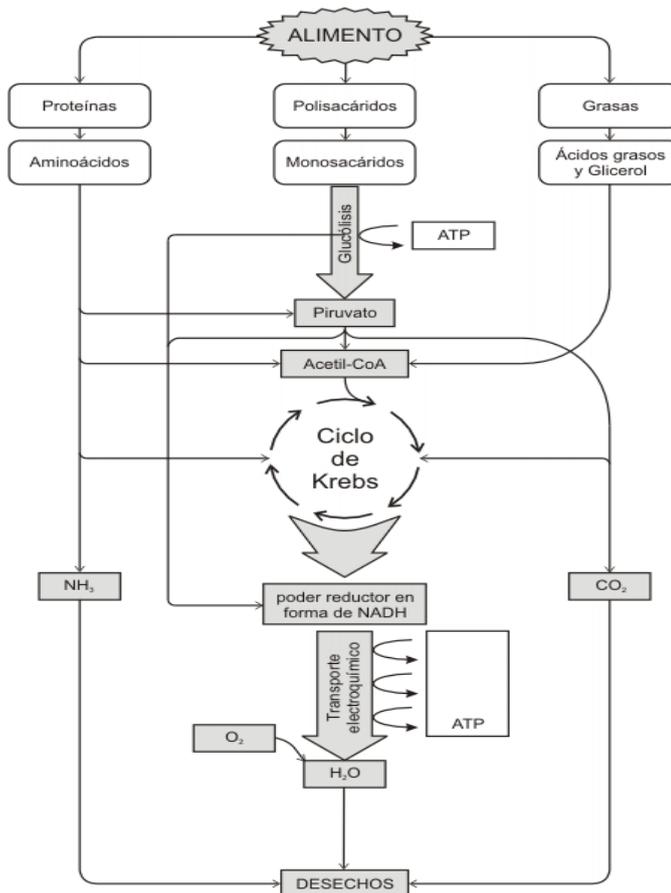


Figura 66. Vías principales del catabolismo y anabolismo en la célula

8.4FACTORES FÍSICOS Y QUÍMICOS QUE INFLUYEN EN EL METABOLISMO CELULAR

Es de mucha importancia conocer los factores Físicoquímicos que influyen en la actividad metabólica de los microorganismos, conocimiento relevante para poder diseñar planes o barreras de protección alimentaria:

8.4.1 Temperatura. -Cada microorganismo tiene una temperatura de crecimiento adecuada. Si estudiamos la variación de la velocidad de crecimiento en función de la temperatura de cultivo, podemos observar una temperatura mínima por debajo de la que no hay crecimiento; a temperaturas mayores se produce un incremento lineal de la velocidad de crecimiento con la temperatura de cultivo, hasta que se alcanza la temperatura óptima a la que la velocidad es máxima. Por encima de esta temperatura óptima, la velocidad de crecimiento decae bruscamente y se produce la muerte celular. El incremento de la velocidad de crecimiento con la temperatura se debe al incremento generalizado de la velocidad de las reacciones enzimáticas con la temperatura.

Se denomina coeficiente de temperatura a la relación entre el incremento de la velocidad de reacción y el de temperatura. En términos generales, la velocidad de las reacciones bioquímicas suele aumentar entre 1.5 y 2.5 veces al aumentar 10 °C la temperatura a la que tienen lugar. La falta de crecimiento a temperaturas muy bajas se debe a la reducción de la velocidad de crecimiento por la reducción de la velocidad de reacción y al cambio de estado de los lípidos de la membrana celular que pasan de ser fluidos a cristalinos impidiendo el funcionamiento de la membrana celular. La muerte a altas temperaturas se debe a la desnaturalización de las proteínas y a las alteraciones producidas en las membranas lipídicas a esas temperaturas. Es importante tener en cuenta que a temperaturas bajas, el metabolismo celular se ralentiza y las células paran de crecer; aunque no tienen por qué morir. Sin embargo, cuando la temperatura es superior a la óptima, se produce la muerte celular rápidamente y las células no pueden recuperar su capacidad de división. Esto permite esterilizar por calor y no por frío. Hay varios tipos de microorganismos en función de sus temperaturas de crecimiento mínima, máxima y óptima.

Tipo de Microorganismo	Temperatura Mínima	Temperatura Óptima	Temperatura Máxima
Psicrófilo	-5 +5	12 – 15	15 – 20
Psicrótrofo	-5 +5	25 – 30	30 – 35
Mesófilo	5 - 15	30 – 45	35 – 47
Termófilo	40 - 45	55 – 75	60 – 90

CUADRO 42. Clasificación de los Microorganismos en función de su temperatura.

Los microorganismos psicrótrofos son mesófilos que pueden crecer a temperaturas bajas. Por tanto, se les puede considerar como psicrófilos facultativos. Esto es importante desde el punto de vista aplicado porque cuando se

encuentran contaminando alimentos, son capaces de crecer en condiciones de refrigeración aprox.

(4 - 8°C) y de producir infecciones en los consumidores del alimento.

Los microorganismos capaces de producir toxoinfecciones son los mesófilos y algunos

psicrótrofos ya que sus temperaturas óptimas de crecimiento son de (30 - 35 °C) coinciden con las corporales. Sin embargo, tanto mesófilos como psicrófilos, psicrótrofos y termófilos pueden producir toxinas causantes de intoxicaciones alimentarias.

8.4.2 Actividad de agua (a_w). Se denomina actividad de agua a la relación entre la presión de vapor de agua del substrato de cultivo (P) y la presión de vapor de agua del agua pura (P_0). El valor de la actividad de agua está relacionado con el de la humedad relativa (HR). El valor de la actividad de agua nos da una idea de la cantidad de agua disponible metabólicamente.

Por ejemplo: comparemos el agua pura donde todas las moléculas de agua están libremente disponibles para reacciones químicas con el agua presente en una disolución saturada de sal común (NaCl) donde una parte importante de las moléculas

de agua participa en la solvatación de los iones de la sal disuelta. En este último caso, la actividad de agua es mucho menor que en el primero. Conforme aumenta la cantidad de solutos en el medio, disminuye su actividad de agua.

Cuando un microorganismo se encuentra en un substrato con una actividad de agua demasiado baja, su crecimiento se detiene. Esta detención del crecimiento no suele llevar asociada la muerte del microorganismo, sino que éste se mantiene latente en condiciones de resistencia durante un tiempo más o menos largo. En el caso de las esporas, la fase de resistencia puede ser considerada prácticamente ilimitada. La gran mayoría de los microorganismos requiere unos valores de actividad de agua muy altos para poder crecer. De hecho, los valores mínimos de actividad para diferentes tipos de microorganismos son, a título orientativo, los siguientes:

- Bacterias $a_w > 0.90$,
- Levaduras $a_w > 0.85$,
- Hongos filamentosos $a_w > 0.80$.

Como puede verse, los hongos filamentosos son capaces de crecer en substratos con una actividad de agua mucho menor (mucho más secos) de la que permite el crecimiento de bacterias o de levaduras. Por esta razón se puede producir deterioro de alimentos de baja actividad de agua (por ejemplo, el queso o almíbar) por mohos (hongos filamentosos) y no por bacterias. En función de su tolerancia a ambientes con baja a_w , los microorganismos que pueden crecer en estas

condiciones se clasifican en halotolerantes, halófilos y xerófilos según toleren o requieran condiciones salinas o hipersalinas, respectivamente. La reducción de la actividad de agua para limitar el crecimiento bacteriano tiene importancia aplicada en la industria alimentaria. La utilización de almíbares, salmueras y salazones reduce la actividad de agua del alimento para evitar su deterioro bacteriano.

8.4.3 Potencial de Hidrogeniones (pH). El pH de un mosto actúa como selector, es un parámetro crítico en el crecimiento de microorganismos ya que cada tipo de microorganismo sólo puede crecer en un rango estrecho de pH fuera del cual muere rápidamente. El pH intracelular es ligeramente superior al del medio que rodea las células ya que, en muchos casos, la obtención de energía metabólica depende de la existencia de un gradiente en la concentración de protones a ambos lados de la membrana citoplasmática. El pH interno en la mayoría de los microorganismos está en el rango de 6.0 a 7.0. Los rangos de pH tolerables por diferentes tipos de microorganismos son, también, distintos. Hay microorganismos acidófilos que pueden vivir a pH=1.0 y otros alcalófilos que toleran pH=10.0

Hay que considerar que, como consecuencia del metabolismo, el pH del medio de crecimiento suele tender a bajar durante el cultivo. Por otra parte, la bajada del pH del medio que producen ciertos microorganismos les confiere una ventaja selectiva frente a otros microorganismos competidores. Así, por ejemplo, las bacterias lácticas que producen grandes cantidades de ácido láctico como consecuencia de su metabolismo primario reducen el pH del medio de cultivo a valores inferiores a los soportables por otras bacterias competidoras (llegan a bajar el pH del medio hasta 4.5). De esta forma, las bacterias competidoras mueren y las lácticas se convierten en la población dominante. La bajada del pH se puede deber a varios factores, uno de los cuales es la liberación de ácidos orgánicos de cadena corta (fórmico, acético, láctico) por ciertas bacterias. En este sentido, hay que tener en cuenta que la acción bactericida de estos ácidos orgánicos de cadena corta es más potente que la debida únicamente a la bajada del pH que producen. Esto es, los ácidos orgánicos de cadena corta son tóxicos para algunas bacterias por sí mismos.

El efecto letal del pH ácido sobre los microorganismos tiene aplicación en la conservación de alimentos acidificándolos. De esta forma, la adición de ácido acético en forma de vinagre permite la conservación de alimentos perecederos y la producción de ácidos en el curso de fermentaciones naturales permite alargar la vida de los alimentos.

Tipo de microorganismo	Potencial de H del medio
Acidófilas	1.0 – 5.0
Neutrófilas	5.5 – 8.5
Basófilas o Alcalófilas	9.0 – 10.0

CUADRO 43. Clasificación de los Microorganismos en función de su pH

8.4.4 Potencial Redox: nos indica la capacidad del sustrato para aceptar o donar electrones, esto es sus características oxidantes o reductoras. Uno de los factores que intervienen en el potencial Redox, aunque no el único, es la concentración de oxígeno [O₂]. Hay microorganismos que requieren ambientes oxidantes para crecer, mientras que otros necesitan ambientes reductores. El metabolismo de ambos tipos de microorganismos presenta diferencias notables. El requerimiento de condiciones oxidantes o reductoras no debe confundirse con la necesidad de presencia o ausencia de oxígeno para que se produzca el crecimiento. En general, cuando un microorganismo requiere un ambiente oxidante se dice que desarrolla un metabolismo oxidativo (o respirativo) mientras que los microorganismos que requieren ambientes reductores (o menos oxidantes) realizan un metabolismo fermentativo. Un microorganismo es aerobio cuando necesita oxígeno para vivir y es anaerobio cuando o bien no lo necesita (anaerobios facultativos como las bacterias entéricas, como *Saccharomyces cerevisiae*; o anaerobios aerotolerantes como las bacterias lácticas) o cuando muere en presencia de oxígeno (anaerobios estrictos como los *Clostridios*).

Hay microorganismos que viven en ambientes carentes de oxígeno (anaerobios) que, sin embargo, llevan a cabo un metabolismo oxidativo porque usan otro aceptor final de electrones que actúa como oxidante ambiental. Por ejemplo, las bacterias que "respiran" nitratos (NO₃⁻), sulfatos (SO₄⁻) u otros compuestos orgánicos oxidados (respiración anaerobia). Hay microorganismos que, aunque viven en presencia de oxígeno, no son capaces de utilizarlo como aceptor final de electrones y deben desarrollar un metabolismo fermentativo (las bacterias lácticas que son anaerobias aerotolerantes, por ejemplo). Por otra parte, hay microorganismos que pueden desarrollar ambos tipos de metabolismo. Esto es en presencia de oxígeno desarrollan un metabolismo oxidativo y en su ausencia, fermentativo. El rendimiento de los procesos fermentativos es menor que el de los respirativos. Las bacterias y las levaduras producen menos biomasa cuando crecen fermentando que cuando lo hacen respirando. En el curso de ciertas reacciones metabólicas Redox se forman compuestos altamente reactivos (radicales libres, formas superóxido) que pueden dañar las proteínas, membranas y ácidos nucleicos produciendo la muerte de las células. Las células se defienden de estos compuestos reactivos mediante las enzimas siguientes: Superóxido dismutasa (SOD) y catalasa. Los anaerobios estrictos carecen de SOD y de catalasa o tienen niveles muy bajos de estas enzimas de forma que no pueden sobrevivir en presencia de oxígeno. La detección de estas enzimas tiene valor taxonómico.

-Aerobias estrictas: Dependen de O₂ para su crecimiento.

-Anaerobias estrictas: se desarrollan en ausencia total de O₂, utilizan aceptores finales distintos del oxígeno: CO₂, H₂ y N₂ o poseen metabolismo estrictamente fermentativo.

-Anaerobias Facultativas: pueden desarrollarse en presencia o ausencia de O₂ aunque predominan en medios anaeróbicos.

-Microaerófilas: sólo se pueden desarrollar en presencia de bajas tensiones de O₂ (menor del 12% en lugar del 20% que es la atmosférica) y altas tensiones de CO₂

8.5 MEDIOS DE CULTIVO.

La mayoría de los medios de cultivo están diseñados para aislar microorganismos clasificados como quimiorganotrófico (Obtiene su energía de sustratos orgánicos siendo importante proporcionar las condiciones nutricionales y ambientales de su habitat natural. Los medios de cultivo contienen agua, una fuente de carbono y energía, una fuente de nitrógeno elementos traza y factores de crecimiento. Además de esto los medios deben tener el pH adecuado para el crecimiento del microorganismo. Los medios más comunes contienen agua, sales, azúcares, agar, peptona, hidrolizado de caseína, extracto de carne, extracto de levadura, extracto de malta, entre otros.

8.5.1 En función de su consistencia:

1).- Medios Líquidos: También denominado caldos, se usan en tubos de ensayos y en frascos. En los medios líquidos algunas bacterias crecen uniformemente produciendo turbidez homogénea, otras que son aerobias crecen formando una "película de superficie". Los medios líquidos son útiles para hacer crecer en biomasa un determinado microorganismo. Los medios líquidos no son adecuados para aislar microorganismos, puesto que no se puede detectar la presencia de más de un tipo de microorganismo.

2).- Medios Sólidos: Cualquier medio líquido puede hacerse sólido adicionando ciertos solidificantes como el Agar, que es el más comúnmente usado. El Agar es un polisacárido no ramificado obtenido de algunas especies de algas marinas *Rhodophytales* como las del género *Gelidium*, *Gracilaria*, entre otras. El Agar está compuesto de una mezcla heterogénea de dos polisacáridos de cadena larga (70% de agarosa y 30% de agaropeptina) que son polímeros de galactosa y ácido galacturónico. Se licua a 95°C y se solidifica a 42°C no tiene propiedades nutritivas y la mayoría de microorganismos no lo hidrolizan, tampoco tiene sustancias que retarden el crecimiento de, se le usan a concentraciones de 1-3% siendo lo más común en 1,5% para solidificar un medio. Los medios sólidos son útiles para aislar microorganismos debido a que inmovilizan células permitiendo que crezcan en colonias que son masa visible de células aisladas llamadas Unidad Formadora de Colonia (UFC) las colonias pueden ser de varias formas y tamaños dependiendo del tipo de microorganismo, las condiciones de cultivo, los tipos de nutrientes, etc. las colonias permiten visualizar la pureza del cultivo.

3).- Medio Semi – sólido: Son medios con una concentración de Agar reducida a 0,2-0,5% este tipo de medios son blandos y son útiles para estudiar la motilidad bacteriana y para mantener cepas de microorganismos por varios meses, es decir para hacer un Cepario.

4).- Medio Bifásicos: Son medios que comprenden una fase sólida y una fase líquida en el mismo frasco de cultivo .Este tipo de medios son adecuados para microorganismos que requieren bastante humedad.

8.5.2 En función de sus componentes nutricionales

1).- Medios químicamente definidos o sintéticos: Se preparan adicionando cantidades precisas de sustancias químicas inorgánicas u orgánicas altamente purificadas disueltas en agua destilada .Por tanto, se conoce su composición química exacta.

2).- Medios químicamente indefinidos o complejos: Se preparan con digeridos de productos de animales y vegetales tales como la caseína, carne de soya, malta, o de levaduras. No se conoce la composición exacta de estos productos. Los digeridos están comercializados como peptonas, extracto de levadura, macerado de maíz, harina de soja, etc.que aportan las sustancias fundamentales ya mencionadas, pero que son químicamente indefinidas y de composición variable.

En el estudio de los medios de cultivo es conveniente considerar en primer lugar el Diseñopara tratar a continuación la formulación y optimización de los mismos

8.5.3 Diseño de un medio de fermentación.El diseño tiene como finalidad, la elección de los componentes necesarios para lograr el crecimiento y la formación de productos correspondientes al proceso a desarrollar.

Con tal objeto se debe tener en cuenta todos aquellos aspectos relacionados con el microorganismo, el proceso y los sustratos a ser empleados como son los requerimientos nutricionales del microorganismo y algunos específicos del proceso, la disponibilidad real de los componentes, consideracionessobre las materias primas. Otros aspectos que son también importantes se refieren a todos losprocesos y operaciones previas y posteriores a la etapa de fermentación y al conocimiento de los mecanismos bioquímicos que regulan la formación de productos (Metabolitos)La preparación de medios para el desarrollo de procesos de fermentación esuna etapa fundamental para asegurar la productividad de los mismos. Los componentes de los medios constituyen los efectores eternos de naturaleza química que desempeñan un rol esencial en los procesos metabólicos, satisfaciendo los requerimientos del crecimiento y de formación de productos, además suministrar energía para la síntesis de metabolitos y para el mantenimiento

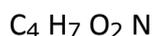
celular. No obstante que los microorganismos varían considerablemente respecto de los nutrientes que pueden necesitar es posible efectuar la distinción de las siguientes categorías de componentes:

A) Macronutrientes: Agregados en cantidades de gramos por litro que están representados por las fuentes de C, N, S, P, K y Mg.

B) Micronutrientes o elementos trazas: Representados por las sales de Fe, Mn, Mo, Ca, Zn y Co que se agregan a los medios en cantidades de miligramos o microgramos por litro.

C) Factores de crecimiento: Constituidos generalmente por componentes orgánicos suministrados en baja concentración y que no son sintetizados ni metabolizados por las células, sino incorporados a estructuras celulares y de función metabólica específica, como vitaminas, algunos aminoácidos, ácidos grasos no saturados, etc.

8.5.4 Requerimientos Nutricionales. Los requerimientos nutricionales están determinados por el tipo de metabolismo celular, los heterotróficos necesitan compuestos orgánicos como fuente de carbono. Otro factor esencial está determinado por las condiciones del cultivo, si es aerobio o anaerobio. En el proceso de respiración aeróbica el O_2 es el agente oxidante, aceptor de electrones e hidrogeno en el metabolismo energético celular. Durante el proceso de fermentación el aceptor de los electrones de la cadena transportadora es el Acetaldehído, reduciéndolo a etanol. El NO_3 o SO_4 son utilizados como aceptores de electrones por algunas bacterias. Las bacterias metanogénicas son auxótrofos anaerobios que utilizan H_2 para reducir el CO_2 a CH_4 para obtener energía. Otros protistas obtienen su energía, en condiciones anaerobias por reacción de óxido-reducción realizada sobre compuestos orgánicos. Las fuentes de carbono cumplen también el rol de ser fuente de energía. Un microorganismo necesita para crecer nutrientes que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus constituyentes celulares. Dependiendo de la fuente de carbono que utilizan, los microorganismos se pueden clasificar en autótrofos si es el CO_2 atmosférico (microorganismos que fotosintetizan) y heterótrofos si utilizan carbono orgánico. La fórmula elemental de un microorganismo es, aproximadamente,



Lo que supone que los componentes de las células son: carbono que representa alrededor del 50% del peso seco, oxígeno (32%), nitrógeno (14%), fósforo (3%), azufre (en torno al 1%) y otros elementos traza entre los que se encuentran Fe, K, Mg, Mn, Co, Mo, Cu y Zn. La elaboración de medios de cultivo requiere proporcionar los elementos antes citados en una forma asimilable. Así, por ejemplo, el C debe estar en forma de carbono orgánico para los heterótrofos y como CO_2 para los autótrofos, el N en forma de NH_4 de NO_3^- o de NO_2^- o en forma de aminoácidos a los que se pueda tomar su grupo amino; el P debe estar en forma de PO_4^- PO_3 , el S procede de aminoácidos sulfurados o de SO_4 – SO_2 , etc. Además, en ciertos casos, es

necesario añadir a los medios de cultivo algunos aminoácidos o vitaminas que determinados tipos de microorganismos no pueden sintetizar. En el caso de la levadura del pan (*Saccharomyces cerevisiae*) la fórmula elemental más concreta es:



Esta composición puede variar ligeramente en función de las condiciones de cultivo o de la fase de crecimiento. El conocimiento de la fórmula elemental del microorganismo que se cultiva facilita la formulación del medio de cultivo más adecuado para el mismo.

Los medios de cultivo se pueden clasificar en definidos cuando su composición química se conoce totalmente y complejos cuando no es el caso porque están compuestos por mezclas de extractos de materiales complejos (extracto de levadura, extracto de carne, etc.). Por otra parte, los medios de cultivo pueden ser líquidos o sólidos si se añade algún agente solidificante que no sea consumible por los microorganismos (Normalmente Agar). En función de los microorganismos que pueden crecer en ellos, los medios pueden ser generales, selectivos cuando favorecen el crecimiento de ciertos microorganismos mientras suprimen el de otros selectivo-diferenciales cuando combinan las dos características, y medios de enriquecimiento que permiten aislar un tipo determinado de microorganismo a partir de una mezcla una población mixta de gran tamaño

8.6 MICROBIOLOGÍA Y CONTROL MICROBIOLÓGICO EN LA INDUSTRIA CERVECERA

Entre los microorganismos presentes en el aire, agua y materias primas, algunos se adaptan perfectamente a las condiciones existentes en las cervecerías. Su crecimiento en la cebada y la malta, antes y durante la fermentación, libera metabolitos que afectan la estabilidad y cualidades organolépticas del producto final, algunos incluso, se desarrollan en éste. No todos los microorganismos pueden establecerse y convertirse en contaminantes, para ello es preciso vencer toda una serie de obstáculos como:

- 1) El mosto se hierve aproximadamente 2,5 horas
- 2) El proceso de fermentación se realiza a baja temperatura
- 3) Los valores de pH en el mosto y la cerveza son bajos
- 4) El lúpulo posee componentes con acción antiséptica, fundamentalmente sobre las bacterias del tipo Gram positivas
- 5) Durante la fermentación prevalecen condiciones de anaerobiosis
- 6) Hay presencia de etanol tanto en la masa en fermentación como en la cerveza
- 7) La cerveza por lo general se pasteuriza

Diversas especies de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*, por ser endosporógenos, soportan tiempos de ebullición entre 2-2,5 horas, sin embargo, como en su mayoría

son Gram positivos, resultan sensibles a los antisépticos del lúpulo. Pese a las barreras que impone el proceso de producción cervecero, diversos géneros bacterianos, algunos mohos y levaduras salvajes, son capaces de vencerlas y establecerse como contaminantes, afectando la calidad del producto final y/o constituyendo un riesgo a la salud del consumidor. A continuación se expondrán algunos géneros y especies bacterianas, frecuentes contaminantes en estos procesos, y se detallarán sus principales cualidades morfológicas, tintoriales y fisiológicas:

Género *Lactobacillus*: Bastones largos Gram positivos, microaerófilos, asporogenos, catalasanegativa. Crecen entre 11 y 45°C. Son tolerantes a los antisépticos del lúpulo. Por oxidación del etanol producen ácido láctico y ácido fórmico. Provocan agriado y turbidez sedosa de la cerveza.

Género *Achromobacter*: Bastones Gram positivos, anaerobios facultativos, asporogenos, catalasapositivos. Toleran los pH ácidos y los antisépticos del lúpulo. Se destruyen a temperaturas de 60°C en 5 minutos. Además de turbidez provocan olor y sabor repugnantes.

Género *Pediococcus*: Cocos Gram positivos, anaerobios, asporogenos, catalasa negativos. Sontolerantes a los ácidos pero su pH óptimo oscila entre 5 y 6. Producen ácido láctico y diacetilo. Ocasionan agriado, turbidez y viscosidad. A las contaminaciones por este género se les denomina “mal de la sarcina”.

Género *Acetobacter*: Bastones Gram negativos, aerobios, asporogenos, catalasa positivos (excepto *A. peroxidans*). Crecen entre 5-40°C. Son tolerantes a los antisépticos del lúpulo. La mayoría de las especies provocan el agriado de la cerveza excepto *A. capsulatum* y *A. viscosum* que ocasionan viscosidad y *A. turbidans*, responsable de agriado y turbidez. Las especies responsables del agriado oxidan el etanol a ácido acético y finalmente a dióxido de carbono y agua.

Género *Gluconobacter*: Bastones Gram negativos, aerobios, asporogenos, catalasa positivos. La especie *G. oxidans* produce ácido acético a partir de etanol. Algunas cepas son capaces de crecer en la cerveza embotellada gracias al escaso contenido de aire del cuello de las mismas y su crecimiento da la apariencia de sogas o cuerdas.

Género *Zimomonas*: Bastones Gram negativos, anaerobios, asporogenos, catalasa negativos. Tolerantes al alcohol (lo producen). Provocan turbidez y sabores de fondo.

Familia *Enterobacteriaceae*: Todos sus géneros y especies se presentan como bastones cortos Gram negativos, anaerobios facultativos, asporogenos, catalasa positivos. Son sensibles a pH iguales o menores a 4,2 y al etanol. Por lo general se presentan como contaminantes del mosto y en las primeras etapas de la fermentación. Las especies más reportadas son: *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*,

Klebsiella sp., *Enterobacter* sp. y *Obsobacterium proteus*. Este último es el más reportado. Provocan infección de la levadura y desarrollan olores y sabores desagradables.

Levaduras salvajes: Se considera levaduras salvajes “aquellas que no son utilizadas deliberadamente ó no están bajo control” De esta forma se incluyen tanto las perjudiciales como las inocuas sin efectos detectables. Constituyen la parte más complicada del control microbiológico, ya que se dificulta la diferenciación de las levaduras seleccionadas para el proceso como son: *Saccharomyces cerevisiae* y *S. carlsbergensis*. Para la diferenciación se han sugerido numerosas formulaciones de medio de cultivo. Dentro del género de *Saccharomyces*, la diferenciación de estirpes es prácticamente imposible mediante técnicas de cultivo y solo los métodos inmunológicos resultan precisos. En ocasiones el test de esporulación resulta muy útil ya que las estirpes cerveceras no son capaces de esporular a diferencia del resto de *Saccharomyces*.

Algunas levaduras que han sido identificadas como contaminantes cerveceros en diferentes publicaciones incluyen los géneros: *Brettanomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia* y *Saccharomyces*. De ellos *Pichia*, *Hansenula* y la mayoría de las cepas de *Candida* son aeróbicas lo que limita su capacidad contaminante a cervezas almacenadas en presencia de aire. En estas condiciones crecen rápido, formando películas superficiales y originando sabores de fondo. Las especies de *Brettanomyces*, aunque aeróbicas, producen grandes cantidades de ácido que afectan el sabor de las cervezas. Dentro de las levaduras salvajes, las más importantes son algunas especies de *Saccharomyces* como *S. uvarum* (también conocida como *S. carlsbergensis*; por supuesto, en fábricas que utilicen *S. cerevisiae*), *S. diastaticus* y *S. pastorianus*. Las mismas son responsables de exceso de gas y turbidez; *S. diastaticus* también provoca atenuación. Las levaduras salvajes son capaces de crecer durante la fermentación y en la cerveza acabada, representando un problema especial en la alteración de la cerveza acondicionada para barril.

Mohos: Los mohos no constituyen contaminantes directos de la cerveza, sí de la cebada, cereales aditivos y la malta. Los metabolitos que se producen durante su crecimiento, más adelante pueden ser fuentes de sabores desagradables de fondo y provocar la rápida evolución de dióxido de carbono al disminuir la presión (gushing). La flora normal de la cebada incluye géneros como *Fusarium*, *Helminthosporium* y *Alternaria*. Durante el almacenaje, cuando la humedad es superior a 13,2%, germinan las esporas y se desarrollan *Aspergillus* y *Penicillium*; todos, por lo ya explicado, constituyen hongos imperfectos fáciles de identificar

8.7 PRINCIPALES PUNTOS DE CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA

8.7.1 En las Materias primas

A) El Agua.-El agua utilizada en las cervecerías debe ser microbiológicamente pura. Este

criterio se sustenta en dos resultados: determinación de coliformes; conteo total de microorganismos. El primero acredita que el agua está exenta de contaminación fecal; el segundo que la carga microbiana está dentro de los parámetros (inferior a 10 u.f.c/mL). Es común la presencia de *Pseudomonassp.*, *Acinetobactersp.* y *Alcaligenessp.* y coliformes de vida libre (saprófitos) como *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Hafnia*. Estos saprófitos se diferencian de los procedentes de la flora intestinal mediante siembra en caldo Mac Conkey e incubación a 44°C; solo los entéricos crecen y producen gas. Estas bacterias constituyen una fuente de contaminación en las cervecerías y pueden desarrollarse rápidamente en el mosto (muy raras veces en la cerveza ya que el pH es muy bajo y el contenido de etanol atentan contra su multiplicación) y producir derivados fenólicos y sulfurados que afectan el sabor final de la cerveza.

B) Cebada y malta.-Como ya se ha expresado, los mohos constituyen flora normal de los cereales. Tras el almacenaje, si no hay el debido control de la humedad (inferior al 13%) van a ser contaminados por diversas especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. Los granos pierden su color característico. Estos mohos producen diversas toxinas

(Micotoxinas) que, en otras condiciones constituyen un riesgo a la salud sin embargo, los estudios realizados demuestran que las mismas, al parecer, son degradadas durante el proceso de producción y no constituyen un riesgo a la salud aunque si pueden afectar la calidad del producto final.

C) Lúpulo.- El lúpulo posee componentes que ejercen acción bacteriostática sobre bacterias Gram positivas. Sin embargo, cuando se almacena en lugares húmedos se promueve el crecimiento de hongos y estos afectan su acción antibacteriana ulterior.

D) En el Mosto.-El mosto constituye un medio ideal para la mayoría de las bacterias Gram negativas y algunas Gram positivas tolerantes a los antisépticos del lúpulo por ello, nunca debe almacenarse a temperaturas por debajo de 55 °C por breve que sea el tiempo antes de añadirle el inóculo de cultivo. Bacterias como *Lactobacillus delbrueckii*, y otras formadoras de endosporas, como son termófilas, pueden contaminar el mosto, multiplicarse rápidamente a temperaturas entre 50-65°C y provocar acidez. Otras bacterias, como las mencionadas dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, al desarrollarse en el mosto producen derivados sulfurados y fenólicos que afectan el sabor final de la cerveza.

8.7.2 Durante la Fermentación. Con la inoculación, si no se utiliza un cultivo puro, se incorporan al mosto toda una gama de levaduras salvajes y bacterias. Entre estas últimas merece especial atención *Obesumbacterium proteus*. Se introduce al ámbito

cervecero a través del agua y, con gran rapidez se adapta a las condiciones de la fábrica aspecto que le permite presentarse junto a las levaduras que se utilizan por segunda o tercera vez. Crece en los primeros estadios de la fermentación hasta que los descensos de pH y la elevación en la concentración de etanol le resultan adversos ya a las 24-36 horas de realizado el inóculo. Al incrementarse su concentración retarda el proceso de fermentación al elevar el pH de la cerveza. Afecta además su sabor al producir compuestos sulfurados.

Otra especie, *Enterococcus agglomerans*, tiene un comportamiento similar. Las *Enterobacterias* y otras Gram negativas, se inhiben rápidamente durante la fermentación. A no ser que ya existiera un crecimiento abundante antes de la inoculación, su efecto es pequeño en la cerveza. En los procesos en los que se recupera la levadura de la superficie *O. proteus* constituye un problema al unirse a éstas, no sucede igual con las otras Gram negativas.

Acetobacter y *Gluconobacter*, aunque pueden aislarse en esta etapa, su crecimiento se ve afectado por las condiciones de anaerobiosis. *Lactobacillus* y *Pediococcus*, también aisladas durante esta etapa, han de competir con la levadura, ésta, en mayor concentración. El diacetilo que producen (0,1 g/L) es reducido por las levaduras a butano-2-3-diol que, para que afecte el sabor debe aparecer en concentraciones de 500 mg/L. La levadura cervecera, para que cumpla su rol, ha de estar pura. Este estado ideal no siempre se pierde por contaminación con levaduras salvajes, la propia levadura cervecera puede perder sus cualidades debido a la aparición de mutantes. Esto constituye un problema pues las mismas pueden estar mejor adaptadas (crecer mejor) pero perder sus cualidades fermentativas. Estas mutaciones pueden aparecer de forma espontánea o ser inducidas. La aparición de cepas salvajes puede tener su origen en las materias primas, el aire, la propia planta cervecera. Como el sustrato es el mismo, compiten con la levadura cervecera y superarla. Algunas son muy pequeñas y dificultan la filtración, otras pueden secretar exoenzimas que afectan la atenuación, o producen ésteres y compuestos fenólicos que alteran el sabor.

8.7.3 Durante la Fermentación. Previo al embotellamiento, o cuando ya éste se ha efectuado pero existieron errores de filtración o pasteurización, puede producirse contaminación. El número de bacterias que pueden constituir problema a este nivel es reducido debido a: el bajo pH; la presencia de etanol; la ausencia de carbohidratos fermentables y las condiciones de anaerobiosis. Sin embargo, las bacterias ácido lácticas como *L. Brevis* y *P. damnosus* pueden lograrlo. Su mayor afectación es al sabor ya que la producción de diacetilo, al no haber levaduras en suspensión, no puede ser reducida y confiere un sabor a mantequilla. Las bacterias acéticas, debido a la anaerobiosis, no causan por lo general problemas en esta etapa, sin embargo, *G. oxidans*, con el escaso aire presente en el cuello de las botellas, crece, produce ácido acético y altera el aspecto del producto (crecimiento

con apariencia de cuerdas). Otros contaminantes a este nivel pueden ser las levaduras salvajes que forman películas superficiales, provocan turbidez y producen ésteres que afectan el sabor.

8.7.4 En el Equipo de Dispensado. Aunque lo referido abarca los principales puntos de contaminación, el producto terminado está expuesto a otros agentes ya fuera de la fábrica. Por supuesto, no pretendemos analizar el caso de los populares “Surtidores” ya que cada uno sería fuente suficiente para un extenso Cepario, sin embargo, en los países donde se expende la cerveza en barriles o en toneles, se ha podido constatar la presencia de levaduras salvajes, no coincidentes con las detectadas en la fábrica de origen, bacterias acéticas y otras. Aunque su nivel, por lo general, no es lo suficientemente alto para afectar el producto, este daño tampoco tiene lugar debido al rápido consumo que se hace de estas cervezas, cualquier retardo conllevaría a las afectaciones ya descritas. Estas contaminaciones hablan en detrimento de la limpieza de los contenedores utilizados, en los que, poco a poco, se van estableciendo estos contaminantes.

8.8 BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA (BPM)

En 1969 entraron en vigencia para la industria de alimentos, pautas que se refieren a: “Alimentos humanos: Buenas prácticas vigentes (Higiénicas) en la Manufactura, procesamiento, empaque o almacenamiento” las pautas se refieren a todos los tipos de procesamientos de alimentos, de manera que las recomendaciones son aplicables a la industria cervecera. Si se contempla adecuadamente todas las condiciones y campos dentro de un Programa de Aseguramiento de la Seguridad de la Cerveza, deben satisfacerse entonces los requerimientos de las Buenas Prácticas de Manufactura. Se sugiere estas pautas como base de un programa de medidas sanitarias. La mayoría de los riesgos serios de muchos alimentos es la posible contaminación con bacterias causantes de las toxiinfecciones alimentarias, como *Clostridia* o *Listeria*. La cerveza es por sí misma bastante segura en lo que se refiere a la microbiología de alimentos. En parte es debido a la etapa de cocción, que elimina básicamente cualquier contaminante microbiano que proceda de las materias primas y también debido al efecto antibacteriano del alcohol, el bajo pH, el dióxido de carbono y los ácidos del lúpulo. Esto significa que las toxiinfecciones alimentarias no sean posibles a través de la cerveza, sencillamente quiere decir que es poco probable que sea peligrosa.

Con el fin de eliminar o minimizar las diferentes categorías de peligros descritos anteriormente es necesario aplicar distintas estrategias. Los contaminantes procedentes de la cadena de transporte y de distribución en teoría podrían ser erradicados, en contraste con los componentes tóxicos de un componente integral de algún alimento el cual sería biológicamente imposible eliminar. También hay que ser consciente nada en esta vida puede ser garantizado como seguro al 100%. Una

gran cantidad de sustancias, entre las que incluyen, requerimientos básicos de oxígeno, alimento y agua que son necesarios para la vida a una determinada concentración, puede ser extremadamente peligrosa a otra. El viejo dicho de “La dosis hace el veneno” continua vigente.

8.8.1 Limpieza e Higiene. La filosofía apropiada es primero limpiar y luego desinfectar. Los tanques son limpiados con bolas de regado permanente en el lugar o rociado con aspersores Butterworth. Normalmente los tanques son limpiados en frío con soluciones cáusticas, para evitar el recalentamiento de la bodega. Después que se haya concluido la limpieza y el enjuague de los tanques, se procede a su desinfección y drenaje. Resulta posible completar estas operaciones con un sistema de limpieza en el lugar controlado mediante programación. Las tuberías deben limpiarse en caliente, porque esto no afecta apreciablemente la temperatura de las bodegas, la limpieza apropiada requiere de un flujo turbulento a través de la línea, las líneas deben mantenerse llenas con un control de contra presión. Nuevamente, sigue la desinfección. Los agentes de desinfección deben ser eficaces a bajas concentraciones y compatibles con el sabor de la cerveza, se usan hipocloritos de 200ppm. Pero pueden afectar mucho el sabor de las cervezas. Los yodoforos en concentraciones de 25 ppm. Son más compatibles con la cerveza. Las soluciones desinfectantes deben enjuagarse o desaguarse de todas las líneas y tanques en todos los casos previamente a la introducción de la cerveza. El agua caliente por encima de 80°C también es efectiva. El calor penetra en los aditamentos cerveceros más eficazmente que las sustancias químicas. El control del proceso de Higiene y desinfección debe exigir un mínimo de comprobación de la actividad. La cerveza tiene que fabricarse bien la primera vez, ya que normalmente resulta imposible tomar medidas correctivas. El proceso debe ser predecible.

Todas las materias primas principales usadas en la fabricación de cerveza son fuentes potenciales de contaminación con microorganismos indeseables, ninguno de los cuales (salvo que exista un súbito brote de enfermedad por el agua) tiene probabilidades de ser patógeno para el hombre. Además, los coadyuvantes cerveceros como los finalizadores, iniciadores, medios filtrantes y contenedores de envasado (barriles, botellas, etc.). Tanto el mosto como la cerveza son susceptibles a los microorganismos alteradores, especialmente el primero por aportar muchos nutrientes y un ambiente oxigenado, en teoría, muchos microorganismos pueden crecer en el mosto particularmente cuando su temperatura desciende durante el proceso. La buena práctica cervecera debe garantizar que en teoría esto no suceda, haciendo pasar directamente el mosto de la cuba de maceración a la cuba de cocción. La propia cerveza con su pH intrínsecamente bajo, no proporciona un ambiente propicio, para la supervivencia de la inmensa diversidad de bacterias.

8.8.2 Control sanitario de personal e instalaciones. La calidad de los productos alimenticios depende, por un lado, de la salud e higiene del personal y por otro lado,

de la limpieza y desinfección de las instalaciones de la fábrica. Si no se toman en cuenta estos dos aspectos del control sanitario, la calidad del producto disminuirá.

Salud e higiene del personal.- El personal de la fábrica debe pasar periódicamente por una serie de exámenes médicos, para determinar su grado de salud, estos exámenes incluyen examen de orina, de sangre de excremento para tener conocimiento de la existencia de parásitos y otras enfermedades en el organismo del trabajador. El examen torácico es también fundamental en los análisis médicos. Las personas con enfermedades contagiosas no deben trabajar en este tipo de empresas. El personal de la fábrica debe además cumplir con las normas sanitarias, ya que cualquier imprudencia puede poner en peligro la salud del consumidor. En la práctica se ha demostrado que las contaminaciones tienen origen en las personas desaseadas o enfermas. Los trabajadores de la fábrica deben cambiar de bata diariamente, deben cubrirse la cabeza y usar guantes esterilizados. En las salas de procesamiento, el personal no debe consumir alimentos.

Limpieza y desinfección de instalaciones.- La limpieza de las instalaciones consiste en eliminar residuos y otras impurezas. La desinfección consiste en destrucción de gérmenes patógenos y de otros microorganismos que pueden dañar la calidad del producto. La limpieza y desinfección son dos operaciones consecutivas. La desinfección momentos antes de utilizar el equipo. La clase y la naturaleza de la suciedad influyen en la selección del método de limpieza y desinfección. Existen impurezas sueltas y masas enquistadas sobre las superficies, la suciedad se adhiere más fuertemente a las superficies rugosas que a las lisas. Por lo tanto, el equipo debe ser de material liso como el acero austenítico y su configuración debe facilitar la limpieza. Así mismo, el material debe resistir la acción de los detergentes.

Detergentes y desinfectantes.- Los detergentes deben reunir las siguientes condiciones:

- Suavizar el agua y prevenir la sedimentación en el equipo, de sales no solubles.
- Mejorar el poder humectante para facilitar la limpieza.
- Emulsificar la grasa en pequeños glóbulos
- Dispersar las impurezas sólidas para eliminarlas fácilmente.
- No ser tóxicos, ni irritar la piel.

Existen dos clase de detergentes, los alcalinos y los ácidos. Los detergentes alcalinos se componen principalmente de sosa cáustica, carbonato de sodio, fosfato trisódico, polifosfatos y meta silicatos sodicos. Los detergentes ácidos contienen ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido tartárico. Estos detergentes eliminan las sales minerales depositadas como el oxalato de calcio. Por tanto, se deben añadir sustancias que inhiban el efecto corrosivo. A los detergentes se añaden agentes especiales para incrementar la capacidad de ablandar el agua y el

poder humectante. La solución de detergentes no debe ser muy concentrada.

La desinfección.- Se realiza mediante medios físicos y químicos. Los primeros aplican el vapor como esterilizante, el vapor será efectivo si la duración del chorro se prolonga por lo menos 10 minutos. La aplicación del calor se realiza en la auto clave. Este aparato sirve para materiales pequeños como tuberías desmontables. La inmersión en agua hirviendo durante los diez minutos, es un buen medio de desinfección. El flameado se usa para desinfectar superficies, sin embargo este método es poco usado a causa de las limitaciones. Los desinfectantes químicos son muy utilizados por su fácil aplicación. Los desinfectantes disueltos en agua fría actúan bien una temperatura elevada aumenta su eficacia el pH también influyen en su efectividad. El Cloro es el desinfectante químico más utilizado, teniendo presente que en altas concentraciones provoca la corrosión, especialmente la del aluminio y el cobre, este no afecta el acero inoxidable si se aplica según las indicaciones del fabricante, las soluciones del Hipoclorito no deben mezclarse con ácido, porque pueden desprender gases tóxicos.

El cloro se puede utilizar de las siguientes formas y concentraciones de cloro activo

El cloro se puede utilizar de las siguientes formas y concentraciones de cloro activo.

Estos compuestos tienen una fuerte acción bactericida:

- Circulación de la solución por el circuito de tubería: Las bombas, tuberías y cambiadores de placas se esterilizan con una solución de 200 mg por litro. Se deja circular por unos 5 minutos.
- Inmersión: El material se puede sumergir durante 5 minutos en una solución de 200mg por litro
- Cepillado: Los recipientes, las cubas y los agitadores se cepillan con una solución de 400mg por litro
- Rociado: Los tanques y recipientes grandes se pueden rociar con una solución de 300mg por litro, procurando que las superficies queden en contacto con la solución durante 5 minutos por lo menos.
- Atomizado: En tanques cerrados se atomiza una solución de 500 mg por litro, formando una niebla que se deposita en la superficie del equipo. Si no se puede emplear cloro, se utilizan soluciones de cloraminas. Estas sustancias son combinaciones de cloro y amoníaco. Tienen alto poder bactericida, pero su acción es más lenta que la del cloro, estos compuestos huelen menos a cloro. Los compuestos de amonio cuaternario son otro tipo de desinfectantes que no atacan los metales no tiene olor, y son más estables. Tiene un poder humectante mayor que las soluciones de cloro, sin embargo, su actividad no es completa, ya que difícilmente destruyen bacterias butíricas se emplean en concentraciones de 200 a 350 mg por litro. Existen también desinfectantes elaborados sobre la base de los yodoforos. Estos son compuestos en el que el yodo está combinado con agentes humectantes. Las propiedades de los yodoforos son similares a las del cloro, con la ventaja que no corroen a los metales. Las temperaturas de estas soluciones no debe ser mayor de 50 °C para evitar manchas en el equipo. También pueden utilizarse

soluciones calientes de sosa cáustica como desinfectantes. La siguiente tabla muestra la relación entre las concentraciones de la solución y el tiempo de contacto necesario para obtener una desinfección adecuada de las superficies.

Concentración (w/w)	Temperatura °C	Tiempo de contacto (minutos)
3,5 a 5,0 %	50	5
2,7 a 3,7%	50	10
2,7 a 3,7%	60	5
1,4 a 2,0%	60	10
1,2 a 1,4%	70	5
1,0 a 1,2%	70	10

Cuadro 44.

El efecto bactericida aumenta si posteriormente se trata el equipo con solución ácida.

- Operaciones de limpieza y desinfección

Las operaciones de limpieza de equipo y locales se efectúan inmediatamente después del empleo de éstos. La desinfección se realiza después de la limpieza y antes de su empleo.

Las operaciones de limpieza y desinfección se realizan siguiendo los siguientes pasos:

- Remojo.-Para eliminar las impurezas
- Limpieza.- Es el tallado y la eliminación de la suciedad
- Desinfección.- El equipo se pone en contacto con un desinfectante para destruir microbios
- Drenaje y secado.- Se aplica cuando el equipo no se va utilizar inmediatamente.

El remojo se hace con agua de 20 a 40 °C El enjuague final se efectúa para eliminar residuos de detergentes y desinfectantes.

Es importante tomar en cuenta que los aparatos deben quedar completamente secos después de las operaciones ya que los gérmenes se adhieren con mayor facilidad a las superficies húmedas. Antes de utilizar el equipo debe efectuarse una desinfección.

Cómo los concentrados químicos son extremadamente cáusticos se deben emplear guantes, delantal, botas de goma, y gafas protectoras. Para tratar posibles quemaduras, se deben tener preparado soluciones neutralizantes de ácido acético diluido al 2% y una solución de carbonato monosódico. Para efectuar la limpieza, generalmente es necesario detener las máquinas y desmontar el equipo. Sin embargo las instalaciones y los sistemas de tuberías se pueden limpiar en circuito sin desmontarlas. Este tipo de limpieza, parcialmente automático se basa en la circulación de solución detergente y desinfectante. Para emplear este tipo de

limpieza, se necesita una instalación con las siguientes características.

- La construcción debe ser tal que el producto no se mezcle con las soluciones de limpieza.

- Todas las partes conductoras del equipo deben estar en contacto con las soluciones

-El material del equipo debe ser resistente a la corrosión.

Este sistema de limpieza y desinfección, se pueden emplear en instalaciones que permitan la conexión de una instalación de limpieza a un circuito cerrado, incluyendo, por ejemplo los tanques, filtros prensas, lavadora de botellas, enchapadora etc.

Las válvulas de desviación de cierre y de regulación, así como las llaves de paso y de tres vías, deben ser desmontadas después de la limpieza, para quitarles la suciedad que haya quedado cuando las partes estén secas se montan nuevamente.

A continuación se detalla la instalación para la limpieza en circuito cerrado.

1.- Entrada de agua

2.- Depósito

3.- Depósito para detergentes concentrados

4.-Depósito para soluciones detergente

5.- Depósito

6.- Deposito para la solución de desinfectantes

7.-Bomba para la solución desinfectante

8.- Entrada de la cerveza .Esta debe estar desconectada durante las operaciones de limpieza

9.- Cambiador de calor de placas

10.-Lineas de tuberías

11.- Desagüe.

Antes de empezar las operaciones, se cierra las entrada de la cerveza se llena el depósito con agua a 40°C y se bombea a través de los aparatos esta agua no se evacua hacia el sistema general de desagüe porque contiene residuos de cerveza ,luego el depósito de la solución de detergente se llena con agua a 85 °C y se dosifica el concentrado de un detergente alcalino hasta tener la solución adecuada la solución preparada se deja circular durante 30 minutos se enjuaga el sistema de nuevo con agua templada. Luego se prepara una solución ácida a 85°C y se deja circular por 15 minutos después se deja pasar agua templada para enjuagar.La eficacia de la limpieza y desinfección se evalúa por medio de normas microbiológicas. La norma más conocida se basa en el control de número total de gérmenes por unidad de superficie del equipo que está en contacto con el producto en elaboración.

8.9ASEGURAMIENTO DE LA SEGURIDAD DE LA CERVEZA.

Un programa adecuado de medidas sanitarias dentro de una planta de alimentos

debe desarrollarse a base de una orientación preventiva, si es que ha de alcanzar el éxito que se desea. Debemos señalar, no obstante, que ningún proceso único ni conjunto específico alguno de pautas pueden ser aplicados a todas las plantas malteras y cerveceras. Más bien, el programa de medidas sanitarias de una compañía debe adaptarse al tipo de operación en que participa la compañía, los tipos de contaminantes que pueden hallarse en las materias primas y productos terminados y la capacidad del el programa debe aplicarse entonces, de acuerdo a un enfoque organizado, para controlar todas las posibles vías de contaminación, desde materias primas hasta productos terminados.

Hay una serie de hechos que deben tomarse en consideración dentro de un programa de Aseguramiento de la Seguridad de la Cerveza:

- Los componentes naturales de las materias primas que sean tóxicos en sí mismos.
- Los contaminantes ambientales asociados a las materias primas.
- Los pasos que se tomarán para asegurar que se detecten dicha contaminación.
- Los insectos dañinos u otras formas de contaminación que pueden invadir las operaciones mismas del procesamiento
- Los métodos que se aplicaran para eliminar dichos insectos dañinos en la operación particularmente en las zonas más críticas.
- El tipo de limpieza que se empleará para ayudar a resguardar contra la invasión de insectos dañinos u otras sabandijas.

personal que es responsable de que se alcance el nivel deseado de higiene. Lógicamente el primer paso hacia el establecimiento de un programa de medidas sanitarias implica una familiarización con los problemas potenciales. Una vez adquirido dicho conocimiento:

- La frecuencia con que debe de limpiarse cada área para asegurar su protección contra insectos dañinos.
- La frecuencia con que debe aplicar pesticidas como parte del programa de medidas sanitarias
- Los pesticidas mejor adaptados para cada tipo de control y la frecuencia de su utilización.
- La manera en que se utilizan, para evitar permanezcan residuos ilegales de pesticidas
- Las infecciones microbianas
- Los contaminantes que derivan de los trasportes, la distribución, el almacenamiento o el envasado.
- Los contaminantes procedentes del procesado.
- Los asociados a los aditivos, adyuvantes de fabricación y otros materiales utilizados durante el procesado que pueden entrar en contacto con los alimentos.
- La contaminación de un alimento con un material peligroso.
- Componentes como los alérgenos que aunque resultan inofensivos para la mayoría de la población, puede significar un riesgo importante para una pequeña minoría.
- La frecuencia con la que se inspecciona todas las instalaciones de la planta para detectar condiciones que no conduzcan a buena higiene.

Un buen programa de Aseguramiento de la Seguridad de la Cerveza recomienda tres metas básicas.

- 1) Garantizar que el consumidor quede satisfecho con la calidad higiénica de los productos terminados.
- 2) Asegurar que todos los sectores del proceso manufacturero cumplan con las leyes aplicables de los organismos competentes.
- 3) Obtener la máxima eficacia a base de los esfuerzos y dinero invertido en el programa.

Par lograr estas metas deben de preverse un control de los esfuerzos que se realizan dentro del programa de medidas sanitarias, control que puede lograrse mediante un sistema de inspección y de informes.

El primer paso para resolver es la frecuencia con que se debe inspeccionar cada departamento de la planta.

En general el área debe considerarse como crítica si se tiene cualquier contacto directo con el flujo de materias primas o producto. Ejemplo áreas críticas en donde los productos son procesados o transferidos, área de almacén de productos terminados, envase y de carga, lugares donde se almacenan los envases, estas áreas críticas deben inspeccionarse con una frecuencia de por lo menos 30 días por que coincide con el ciclo de desarrollo de muchos insectos dañinos más comunes Que pueden infestar productos de granos y cereales.

Ciertas áreas de la planta pueden considerarse como menos críticas por que no tiene contacto directo con las operaciones del proceso, esto no significa que el área carezca de importancia y puedan ignorarse. Ejemplo oficinas, laboratorios, talleres de mantenimiento, patios las cuales pueden ser supervisadas cada 60 días. En cualquier programa de de medidas sanitarias especialmente dentro de la industria maltera, la prevención es la clave de la buena higiene .La prevención incluye la eliminación de polvos y granos ,la instalación de equipos aerodinámicos bien diseñados que eviten que dichos nocivos puedan albergarse en el mismo, el almacenamiento apropiado diseñado tanto para el producto como para el equipo mecánico y, finalmente, prevención mediante una limitación de acceso al local.

8.10 ANÁLISIS DE PELIGROS MEDIANTE EL CONTROL DE PUNTOS CRÍTICOS (APCPC)

La estrategia utilizada por la mayoría de fabricantes de cerveza para maximizar la seguridad alimentaria y para minimizar los riesgos para los consumidores es la misma que la empleada en gran parte del sector de la industria alimentaria y es conocida como (APCPC). Proviene originariamente del sistema diseñado para asegurar que el alimento utilizado para los astronautas americanos fuese absolutamente seguro desde el punto de vista microbiológico. Hoy en día su uso está ampliamente extendido en la industria alimentaria para asegurar la tanto la seguridad microbiológica como la química y con frecuencia se extiende para su uso para cubrir parámetros relacionados con la calidad. Un sistema de APCPC puede ser descrito del siguiente modo:

- Debe considerarse todo el proceso, desde las materias primas hasta el producto final. Aquí nos resulta útil un simple diagrama de flujo
- Debe realizarse un listado de todos los peligros potenciales asociados a todas las materias primas utilizadas y a todas las etapas de producción. Debe de tenerse en cuenta la probabilidad de que cada uno de estos peligros se manifieste con el fin de identificar los riesgos reales del producto
- Además, deben identificarse aquellas etapas del proceso en los cuales se puede controlar de un modo efectivo los distintos peligros (Puntos Críticos de Control) y debe ponerse en marcha un sistema de control adecuado que asegure que los efectos no deseables sean eliminados o controlados hasta niveles aceptables.
- Si se exceden estos límites será necesario tomar acciones correctoras. Estas deben ser especificadas. También debe existir alguna manera de comprobar que se han llevado a cabo estas acciones correctoras y que se han alcanzado los resultados deseados.

Deben de mantenerse registros de modo que sea posible tomar un lote de cerveza y confirmar que las materias primas cumplieran con las especificaciones de calidad definidas y que el proceso estuvo funcionando dentro de los límites establecidos.

Ejemplo. La cocción del mosto. Antes de la fermentación el mosto cervecero es cocido junto al lúpulo. Este proceso es importante por varias razones:

- 1.- Convierte los ácidos del lúpulo en su forma isomerizada (amargos)
- 2.- Coagula con las proteínas deseables.
- 3.- Se produce la volatilización de compuestos del flavor no deseables.
- 4.- Esteriliza el mosto.

Por ello es crucial que se alcancen temperaturas próximas a 100°C durante un determinado tiempo. La temperatura exacta de cocción no es siempre 100 °C sino que varía en función de la presión atmosférica. En consecuencia debe de medirse y registrarse la temperatura de ebullición y si esta se encuentra fuera de los límites especificados (quizás $\pm 2^\circ\text{C}$) debe de prolongarse el tiempo de ebullición o bien cerrar la caldera de cocción para lograr un aumento de presión interna, logrando así aumentar el punto de ebullición del mosto.

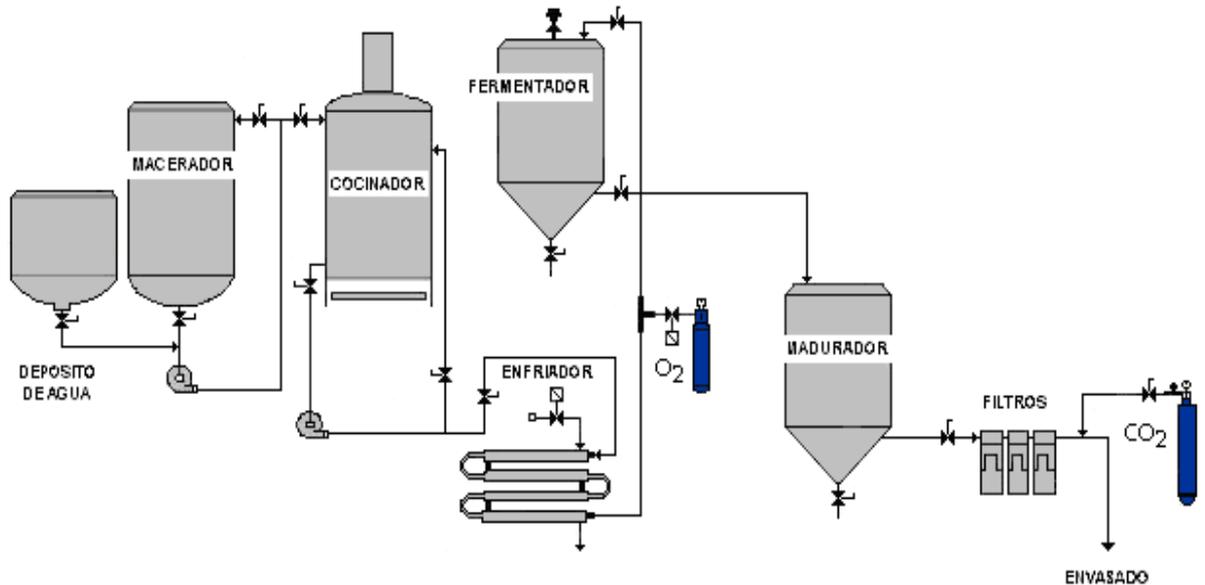


Figura 67. Diagrama de flujo de la planta de producción de Cerveza

8.10.1 Materias primas. Las principales materias primas para la elaboración de cerveza son la cebada malteada, el lúpulo (o productos obtenidos a partir del lúpulo como pellets o extractos), levaduras y agua. Otros cereales, malteados o sin maltear, en forma de harinas o *Grits*, o como grano entero, o también puede utilizarse para impartir características especiales a algunas cervezas.

Cereales y Malta.-

Los riesgos más importantes en estas materias primas son los contaminantes químicos, las infecciones por hongos y las infecciones por insectos. Hay establecido límites legales para una serie de contaminantes como residuos pesticidas y metales pesados como el Pb en las producciones vegetales. El fabricante de cerveza debe insistir que la malta que le suministren esté elaborada a partir de cereales que cumplan con la legislación.

Las condiciones de almacenamiento también son importantes:

Especialmente de la malta que es muy vulnerable ya que puede absorber malos olores con facilidad. También deben fijarse límites máximos para las nitrosaminas Volátiles.

La detección de estos contaminantes cancerígenos en la cerveza y el whisky (así como otros alimentos como las carnes curadas) durante el comienzo de los años 70 causó una gran preocupación y alteración en las industrias cervecera y del malteo, hasta que se identificó la fuente de contaminación. Tras arduas investigaciones se halló que la NDMA (N-nitrosodimetilamina) podía formarse durante el secado y tostado de la malta mediante la reacción entre los óxidos de nitrógeno (NO_x) presentes en los gases del horno y las aminas del grano. En las plantas modernas se evita la formación de nitrosaminas mediante el uso de hornos de combustión

indirecta en los cuales los gases no entran en contacto con la capa de grano. Hoy las cantidades de NDMA son muy bajas, pero se sigue controlando de modo rutinario tanto por las maltas como a las cervezas para asegurar que el contenido en nitrosaminas se encuentre dentro de los límites especificados.

Los hongos pueden infectar al grano tanto en el campo como durante el almacenamiento. En cada uno de los casos se ven involucradas especies diferentes adaptadas al contenido de humedad disponible que oscila desde un 40-50% en el grano en maduración, hasta por debajo del 18% en el grano maduro. En la medida de lo posible deben de evitarse estas infecciones fúngicas, no solo por el daño que le ocasiona a la viabilidad del grano y la calidad de la cerveza, sino también porque puede llevar asociada la formación de metabolitos secundarios tóxicos, conocido como Micotoxinas las más tóxicas de estas sustancias, las aflatoxinas están principalmente circunscritas a los productos cultivados en climas tropicales ya que los hongos que lo producen requieren de condiciones de temperatura y humedad más elevadas de las que habitualmente se encuentran. La unión Europea ha introducido una serie de controles legales con el propósito de protegerse frente a las posibles contaminaciones de productos importados, especialmente maní y maíz estas normas imponen un límite de 4 microgramos /kg de aflatoxinas totales en cereales y un límite de 2 microgramos/kg para las más tóxicas, la aflatoxinas B₁

La especie de hongos micotoxigénicos más comunes que se encuentran en los campos

pertenecen a *Fusaria*. Estos se encuentran en los cereales como maíz, trigo, cebada normalmente los niveles de infección son bajos, los hongos del género *Fusarium* pueden producir varias micotoxinas. Químicamente se conocen como tricotecenos e incluyen compuestos como el Desoxinivalenol, Nivalenol y la toxina T-2 son sustancias menos tóxicas que la aflatoxinas. Aunque se estaban estudiando niveles de acción de entre 500 y 750 microgramos /kg de cereales y sus derivados. La concentración de toxinas del género *Fusarium* en la cebada cervecera está muy por debajo de los niveles de actuación propuestos para granos de alimentación animal.

Otros hongos como la especie *Penicillium Aspergillus* pueden crecer con los contenidos de humedad más bajos del grano maduro (entre un 16-20% de humedad) en las condiciones favorables de temperatura y humedad, estas especies pueden producir otra micotoxina, la ocratoxina A. Se cree que la ocratoxina A es cancerígena y actualmente se están implantando límites legales en la Unión Europea (de 3-5 microgramos/kg) La cebada para malteado es habitualmente desecada hasta un contenido de humedad inferior al 14% (a menudo por debajo del 12% de humedad para almacenamiento durante periodos largos de tiempo) con el objeto de conservar su viabilidad ya que esta es, por supuesto, esencial para la germinación. La misma malta es desecada hasta un contenido de humedad no superior al 6% el cual como se almacenan en condiciones apropiadas de ambiente seco, resulta

demasiado seco como Para permitir el crecimiento de los mohos.

Las infecciones por insectos son siempre un problema potencial en cualquier lugar donde se almacenen granos a lo largo del tiempo .Es esencial prestar atención a la limpieza e higiene en el almacén de los granos .El secado y el enfriado también son importantes, ya que muchos insectos no pueden reproducirse por debajo de determinadas condiciones de temperatura y humedad. Los cereales sin maltear que pueden haber estado almacenado por muchos años desde su recolección ,pueden tratarse con insecticidas adecuados, este tratamiento no está permitido para la malta .Aunque se encuentra parcialmente protegido del ataque de los insectos por su bajo contenido de humedad es necesario que la malta se elabore y comercialice a lo largo del mismo año para evitar que se almacene durante largos periodos de tiempo por consiguiente cualquier plan de APCPC prestará especial atención en comprobar las condiciones de almacenamiento para todas las materias primas.

Un grupo de contaminantes ambientales que causa crecientemente problemas es el de los PCBs (bifenilospoliclorados) y las dioxinas que están relacionadas estructuralmente. Estos contaminantes orgánicos derivan casi en su totalidad de fuentes de origen humano. Una fuente particularmente importante en la incineración de de materiales de desecho, que si no se llevan a temperaturas suficientemente elevadas puede generar tantas dioxinas como PCBs, los cuales son compuestos químicos extremadamente tóxicos que pueden contaminar los pastos y las cosechas de las áreas próximas .Los dioxinas como PCBs son contaminantes de naturaleza orgánica solubles el lípidos por lo tanto tienden a concentrarse en alimentos como la leche, los aceites y las carnes. La cerveza se encuentra protegida a este respecto ya que la cebada tiene un contenido de lípidos relativamente bajo (Alrededor de un 3% del grano está compuesto de lípidos)

El Lúpulo y productos derivados.-

Como para los cereales, los principales riesgos provienen de los residuos de pesticidas y de metales pesados, también se han establecido límites para los nitratos, que tienden a acumularse en zonas de las plantas que tienen hojas y en los conos del lúpulo.

Por ejemplo el procesado para producir extractos de lúpulo en los cuales los ácidos del lúpulo se encuentran concentrados, generalmente reduce las concentraciones de estos contaminantes de un modo importante.

El Agua.-

Más del 95% de la cerveza es agua. Por ello no resulta sorprendente que la calidad del agua sea de vital importancia para la calidad del producto final. El agua utilizada para la producción de la cerveza, proceda tanto de los pozos propios de la cervecera

como de las redes públicas, debe ser agua de calidad para consumo humano en lo relativo a cualquier contaminante químico o microbiológico. Esto significa que debe cumplir cualquiera de las legislaciones vigentes.

Los metales pesados, como el plomo y cadmio, son una de las principales Preocupaciones en lo relativo al agua empleada para la fabricación de alimentos. Sin embargo, nos encontramos con que, de nuevo, la cerveza está protegida, ya que los metales se unen al bagazo, a los turbios y a las levaduras, siendo retirados de la cadena de producción, por ello, la cerveza normalmente contiene concentraciones más bajas de estos contaminantes que el agua utilizada en su elaboración.

En muchas fábricas de cerveza en particular en aquellas ubicadas cerca de áreas urbanas vulnerables, se han instalado plantas de tratamiento de aguas que incluyen columnas de intercambio iónico y de ósmosis inversa. En estos lugares deben de incluirse un plan de APCPC. De este modo deben de existir procedimientos claros para el mantenimiento y limpieza de los filtros y controles reguladores para asegurar que están funcionando dentro de los parámetros especificados.

La Levadura.-

La mayoría de las fábricas de cerveza utilizan varias veces su levadura, en consecuencia el principal objetivo sobre seguridad es evitar la contaminación microbiológica, tanto por bacterias como por levaduras salvajes. Por ello, un buen plan de APCPC tendría que especifica

r el modo de manipular y almacenar las levaduras que son recogidas al final de la fermentación. En las grandes fábricas de cerveza es posible que se establezca un número fijo de generaciones antes de introducir un cultivo fresco. Sin embargo, en muchas fábricas pequeñas la levadura ha sido reutilizada de una fermentación a otra durante muchas generaciones. Con frecuencia estas fábricas confían en una mezcla de cepas de levadura emparentada las cuales han evolucionado a lo largo de décadas para adecuarse a las condiciones del proceso a la calidad del producto requerido, además de la complicación que supone el tratar de usar un cultivo puro. Suponiendo que la levadura se maneja y almacena de modo adecuado de modo que sea viable por completo, fácilmente superará a cualquier microorganismo alterante que trate de competir y puede utilizarse casi *indefinitum* sin que aparezcan efectos deletéreos en la calidad de la cerveza afortunadamente y como ya se ha mencionado, la combinación de los ácidos amargos del lúpulo, el bajo pH, las concentraciones de dióxido de carbono y las condiciones anaeróbicas asociadas con la fermentación de la cerveza implican que pocas bacterias patógenas, si es que hay alguna sean capaces de crecer. La principal preocupación la constituyen las bacterias alterantes.

Estas bacterias que se han adaptado a las condiciones de la cerveza y que, aunque no son peligrosas para el hombre pueden dar lugar a turbidez o sabores desagradables a la cerveza. Algunas de las bacterias alterantes como *Obesumbacteriaproteus* pueden, constituir, además, un riesgo sanitario de modo

indirecto ya que son capaces de reducir los nitratos a nitritos los cuales a su vez pueden transformarse en nitrosaminas, en el intestino humano tiene lugar reacciones muy parecidas. Al contrario que el NDMA, estas nitrosaminas no son volátiles y forman un grupo de compuestos que todavía no han sido caracterizados por completo. En consecuencia se les denomina ATNC o compuestos N-nitrosos totales (del inglés *apparent Total N-nitroso Compounds*) para evitar la formación de cualquier compuesto ATNC algunas fábricas han introducido un lavado regular de levadura con algún ácido diluido de calidad alimentaria con el fin de matar a cualquier otra bacteria. También es cada vez más frecuente el limitar el número de generaciones que se utilizan las levaduras. Un buen plan de APCPP para una fábrica pequeña de cerveza, incluiría exámenes regulares de las levaduras mediante microscopía óptica para detectar levaduras salvajes y bacterias contaminantes. También serían de utilidad los datos del análisis y de las cartas de producto terminado para controlar la presencia de bacterias alterantes ya que los malos olores producidos por estos microorganismos pueden ser detectados normalmente a concentraciones extremadamente bajas, por catadores extremados.

8.10.2 Durante el proceso. El plan de APCPC también deben considerarse aquellos peligros asociados al proceso en sí mismo. En estos se incluirán

- La planta de fabricación de cerveza, debe tener un diseño higiénico. Sin puntos muertos en el sistema de tuberías que no pueden ser limpiados de un modo adecuado.
- Los materiales de construcción. Deben ser resistentes a la corrosión y a la suciedad, capaces de ser limpiados por completo mediante el uso de agentes de limpieza permitidos para el uso sobre materiales en contacto con los alimentos y no deben ser fuente de materiales que puedan ser peligrosos o que puedan conferir olores desagradables a la cerveza.
- Agentes de limpieza y esterilización: éstos deben estar permitidos para su uso en materiales en contacto con los alimentos y no deben dejar residuos peligrosos u olores, o afectar de algún otro modo a la cerveza (por ejemplo alterando la capacidad de formación de espumas)
- Frecuencia y eficacia de los ciclos de limpieza y aclarado
- Empleo de aditivos y coadyuvantes de fabricación; estos deben estar aprobados para el uso previsto, fabricados según las especificaciones adecuadas y añadidos en las dosis correctas.
- Parámetros críticos como tiempos, temperaturas y grado de mezcla.

El sistema de APCPC debe asegurarse que estén en marcha los controles adecuados para mantener el proceso funcionando en la dirección y modo en el que se pretende hacerlo. También debe asegurarse que cualquiera de las desviaciones que puedan aparecer, sean detectadas y corregidas. De nuevo, deben tomarse los registros adecuados de modo que posteriormente se puedan seguir la trazabilidad de las condiciones de procesamiento de cualquiera de los lotes.

8.11 SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA

Como se ha mencionado anteriormente, la incapacidad que las bacterias patógenas tienen para multiplicarse en la cerveza implica el que la industria cervecera no sea de alto riesgo en términos de seguridad microbiológica. Sin embargo, puede verse comprometida la calidad del producto debido a las infecciones por bacterias alterantes. Aunque la etapa de cocción después del braceado o empastado esteriliza en forma efectiva el mosto cervecero antes de la fermentación, no es deseable la actividad bacteriana previa a la etapa de cocción a causa de la presencia de algunos de sus productos, como nitritos o las toxinas, que son potencialmente dañinos. Por ejemplo cualquier nitrito puede reaccionar con las aminas presentes en el mosto cervecero, como ya se ha descrito en el caso de las bacterias alterantes al principio de la fermentación, para dar lugar a las nitrosaminas no volátiles, y ATNCs por consiguiente, el plan de APCPC debe tener en cuenta la higiene de las instalaciones de empastado y asegurar que se alcanzan las temperaturas establecidas para los procesos de empastado y de cocción durante el periodo de tiempo determinado. Aquellos mostos que deben almacenarse por un periodo de tiempo antes de la cocción no que vallan a ser conducidos a la caldera de empastado, deben almacenarse a una temperatura alta para prevenir la actividad bacteriana.

Los estándares de limpieza son incluso mayores para todas aquellas fases del proceso posteriores a la etapa de cocción. La cerveza que se destine a envasado en botellas, latas o barriles tiene la salva guarda añadida de la pasteurización, pero también existen cervezas que se comercializan sin pasteurizar en toneles. El plan APCPC también es necesario tener en cuenta cualquiera de los productos o procesos que sean particularmente vulnerables como los productos bajos en alcohol y las botellas rellenables. Obviamente la operación de pasteurización es crítica y es necesario que estén puestos en marcha los controles necesarios para comprobar que siempre se alcanzan las temperaturas correctas de trabajo y que el tiempo de mantenimiento es suficiente. El plan APCPC especificara la frecuencia y el tipo de ensayos microbiológicos que se realizarán y allí donde sea posible deben utilizarse test rápidos.

8.11.1 Envasado. En las fábricas modernas de cerveza esta es una operación muy rápida, no es raro un volumen de 2000 botellas por minuto, y como consecuentemente vulnerable, El plan APCPC debe abarcar:

- La calidad de los materiales de envasado: deben ser adecuados para su uso en alimentos y no deben liberar sustancias químicas dañinas o que den olores al producto.
- El almacenamiento de los envases vacíos, son con el fin de evitar que se recojan suciedad u olores.
- Limpieza adecuada de los envase reutilizables.

- La posibilidad de que los objetos extraños (por ej. Un insecto) se introduzcan en el envase en el momento del llenado.
- La posibilidad de que haya cristales en el envase: estos pueden tener su origen en las botellas defectuosas o en las cabezas de las llenadoras y las mirillas
- Sabotajes
- La limpieza de los filtros.
- La posibilidad de contaminación, por ejemplo, lubricantes (de las cintas transportadoras, etc.) refrigerante o agente de limpieza.
- El funcionamiento eficiente de los pasteurizadores.
- El llenado estéril

Hoy en día, los equipos de envasado normalmente tienen incorporado un gran número de sistemas de control y de seguridad, para por ejemplo, comprobar la presencia de objetos extraños en el envase, El sistema de APCPC debe asegurar que hay pruebas suficientes de que estos sistemas trabajan correctamente y que pueden detectar todo tipo de inclusiones. Por ejemplo es una práctica habitual la de utilizar una serie de envases "test" con inclusiones a diferentes alturas de las botellas y de las latas para comprobar que el sistema de detección está funcionando.

8.11.2 Manejo de aguas residuales. Las aguas residuales varían según el tipo de producto de producto y los métodos de trabajo. Estas aguas contienen un elevado contenido de material orgánico, que ocasiona daños en el sistema de drenaje y en las aguas superficiales. Por eso, las aguas residuales deben tratarse antes de ser evacuadas. Las aguas residuales pueden dividirse en las siguientes clases:

1) Agua para los servicios públicos.- Deben estar libres de gérmenes patógenos, antes de ser evacuados a través del sistema general de drenajes.

2) Agua utilizada en enfriamiento.- El agua para enfriamiento se reutiliza con el mismo fin. También se puede utilizar para la limpieza y para alimentar calderas.

3) Agua con residuos de productos.-El grado de contaminación del agua con residuos orgánicos de productos, se expresa mediante el Demanda Bioquímica de Oxígeno o DBO. Se determina la cantidad de oxígeno que consumen las bacterias para descomponer la materia orgánica durante cinco días .Así la DBO se expresa en mg de oxígeno consumido para la descomposición de la materia orgánica en un litro de agua.

Las aguas residuales se depuran con métodos físicos, biológicos, o con la combinación de ambos. A través de la depuración física se eliminan primero las partículas sólidas luego se adicionan coagulantes para favorecer la floculación. Los sólidos floculados se dejan sedimentar. Cuando el agua está clara, se filtra. La depuración biológica consiste en favorecer la actividad microbiana que convierte las sustancias orgánicas en anhídrido carbónico y agua. Esto se logra por la inyección de aire al agua .Cuando el material carbónico se ha degradado, el barro y los conglomerados de microorganismos se dejan sedimentar el agua clarificada se

evacua por el sistema general de drenajes. Las aguas residuales se emplean el riego. El contenido orgánico sirve de abono a los cultivos.

8.11.3 Manejo de desechos. Los desechos sólidos se emplean en la preparación de piensos, fertilizantes y pectina. Por lo que respecta a la basura, ésta se maneja en la siguiente forma.

- Deben mantenerse temporalmente en depósitos cerrados
- Debe de recogerse de inmediato aquella que proviene de las áreas de elaboración, y transportarse en recipientes cerrados
- Debe recogerse regularmente y eliminarse
- No debe acumularse, ni aun en los depósitos.

Un mal manejo de los desechos puede crear focos de infección en el proceso de elaboración del producto.

8.11.4 Sabotajes. Hay una serie de medidas que pueden adoptarse con el fin de reducir las posibilidades de la introducción de una sustancia dañina que puede alterar al alimento. La mayor parte de estas medidas son comunes a todos los alimentos en general. Entre estas se incluyen la seguridad en los lugares de fabricación y almacenamiento, recipientes cerrados y/o sellados y el uso de un envasado "a prueba de apertura". La naturaleza de la mayoría de los envases utilizados en la cerveza, es decir, las latas, botellas, barriles hace que cualquier manipulación al producto terminado vaya a ser evidente.

Sin embargo, es imposible el prevenir totalmente el acceso a las cadenas de producción durante la fabricación. En este punto, la principal salvaguarda debe de ser la completa trazabilidad del producto, mediante el marcado de lote, los códigos de envasado y la documentación adjunta, de modo que los lotes sospechosos puedan ser identificados rápidamente y retirados sin importar en qué lugar de la cadena de distribución se encuentren, afortunadamente, este tipo de incidentes son raros, aunque allí donde ocurren, tienden a traer una gran publicidad.

8.12 ALERGENOS

Un alérgeno es una sustancia que puede inducir una reacción de hipersensibilidad (alérgica) en personas susceptibles, que han estado en contacto previamente con el alérgeno. Esta reacción de hipersensibilidad involucra el reconocimiento del alérgeno como sustancia "extraña" y ajena al organismo en el primer contacto. En exposiciones posteriores, el sistema inmunitario reacciona a la exposición de forma excesiva, con la liberación de sustancias que altera la homeostasis del organismo, lo que da lugar a los síntomas propios de la alergia. Generalmente esta hipersensibilidad está predispuesta genéticamente en algunos individuos o familias. Con relación a la cerveza, deben de considerarse dos potenciales alérgenos uno es él:

1) Gluten.- Es el nombre que reciben el complejo de las proteínas gliadinas y los carbohidratos presentes en el trigo .En los cereales estrechamente emparentados con la cebada, la avena y el arroz se encuentran proteínas similares estructuralmente. En la

Cebada a esta proteína se denomina hordeína, nombre que proviene de la denominación latina de la cebada *Hordeum*. Estas proteínas pueden causar irritación de las células de la mucosa gástrica de ciertas personas causando la enfermedad celiaca, los que sufren del síndrome celiaco deben de evitar el consumo de cualquier alimento que tenga derivados del trigo y de otros cereales responsables. Obviamente la cebada y la malta son dañinos para los celíacos .Existe debate sobre si la cerveza es o no peligrosa, ya que una parte importante de las proteínas de la cebada se queda en el bagazo. Además, gran parte de proteína extraída del mosto cervecero es retirada después en forma de turbios o bien separada por filtración antes del envasado, de modo que no permanece en la cerveza. El análisis químico del gluten de la cerveza y de otros alimentos procesados está sujeto a una serie de limitaciones y la presencia de proteínas celiaco positivas en la cerveza no ha sido probada de forma consistente, aunque se encuentran ciertos péptidos derivados de la cebada .Sin embargo se aconseja a los enfermos celíacos que tomen la cerveza con cuidado, ya que la sensibilidades pueden variar enormemente en los individuos.

2) Dióxido de azufre.- La otra reacción alérgica (que podría ser descrita de un modo más apropiado como intolerancia alimentaria) que puede asociarse a la cerveza es la relacionada al dióxido de azufre. Este es el aditivo autorizado que se utiliza como conservante en un amplio grupo de alimentos durante muchos años y que, en las concentraciones utilizadas, no supone ningún riesgo para la salud de la mayoría de las personas .Sin embargo, un pequeño número de individuos son hipersensibles al sulfito y estas personas pueden sufrir graves reacciones asmáticas, que pueden resultar

fatales, incluso a exposiciones bajas. El dióxido de azufre puede añadirse, normalmente en forma de metabisulfito sódico o potásico, como antioxidante y conservante a un amplio grupo de alimentos entre los que incluyen bebidas alcohólicas. En la cerveza la principal función es proteger frente a la formación de sabores a rancio u oxidados. Las concentraciones de sulfito se encuentran reguladas por la legislación de la Unión Europea con un límite para las cervezas envasadas de 20 miligramos /kg se permite hasta 50 miligramos /kg en algunas cervezas maduras en toneles) que son relativamente bajas, si se comparan con algunos otros alimentos.

9. BIBLIOGRAFÍA

Amparo Querol, Graham Fleet 2006 YEASTS IN FOOD AND BEVERAGES Springer New York pp. 215-284

Asociación de Maestros Cerveceros de las Américas 1977 EL CERVECERO EN LA PRÁCTICA Inc. Madison, Wisconsin pp.18-314

C. W. Bamforth 2006 BREWING NEW TECHNOLOGIES Woodhead Publishing Limited Cambridge England pp.167-180

Chris Boulton and David Quain 2001 BREWING YEAST AND FERMENTATION Blackwell Science Ltd pp. Oxford 29-508

Dennis E. Briggs 2004 BREWING SCIENCE AND PRACTICE Woodhead Publishing Limited. Cambridge England pp. 1-325

Fergus G. Priest & Graham G. Stewart 2006 HANDBOOK OF BREWING Taylor & Francis Group Boca Raton, Florida pp.91-487

Henry C. Vogel 1997 FERMENTATION AND BIOCHEMICAL ENGINEERING HANDBOOK Heinkelsistemas de filtrado, Inc. Bridgeport, Nueva Jersey pp.1-161

Ian S. Hornsey 1999 ELABORACIÓN DE CERVEZA MICROBIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y TECNOLOGÍA Acribia Zaragoza pp.99-137

J.S. Hough 1990 BIOTECNOLOGÍA DE LA CERVEZA Y LA MALTA Acribia Zaragoza pp.9-156

Katherine Smart 2003 BREWING YEAST FERMENTATION PERFORMANCE Blackwell Science pp. Massachusetts 61-118

Lubert Stryer 2004 BIOQUÍMICA Editorial Reverté S.A. Barcelona pp.189-221

Michael T. Madigan 2004 BROCK BIOLOGÍA DE LOS MICROORGANISMOS Pearson Prentice Hall Illinois pp.65- 131

P.S Hughes y E.D Baxer, 2004 CERVEZA CALIDAD, HIGIENE Y CARACTERÍSTICAS NUTRICIONALES, Editorial Acribia S.A, Zaragoza. pp. 105-165

Wolfgang Kunze 2006 TECNOLOGÍA PARA CERVECEROS Y MALTEROS VLB Berlín pp.255-543