UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

TITULO DE LA TESIS:

Detección de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) por biología molecular y ocratoxina A en cerveza

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

Zatzil Pamela Robles Gómez

TUTOR(A)
Dr. José Francisco Montiel Sosa

M. en C. Josefina Moreno Lara

CUAUTITLÁN IZCALLI , ESTADO DE MÉXICO 2019

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias:

Esta tesis está dedicada a mis padres, hermanos, a mis abuelitos paternos, maternos, tías, tíos, y amigos, que siempre estuvieron acompañándome a lo largo de esta etapa.

Agradecimientos

Le quiero agradecer a Dios, por permite llegar hasta esta etapa en mi vida. En el camino tuve situaciones difíciles, felices, dolorosas y satisfactorias. Gracias a la fe en el muchas de las complicaciones que hubo en el camino las sobre lleve de una manera correcta

A mi papá, por enseñarme tantas cosas a lo largo de estos 24 años, gracias por siempre darnos un ejemplo de ser un hombre, esposo y padre de familia extraordinario. Te agradezco inmensamente los sacrificios que has hecho, las enseñanzas dadas, tu forma tan sociable y amiguero de ser con todos los que te rodean, los valores que me han forjado y me hacen ser la gran mujer que soy. Gracias por ser el pilar de nuestro hogar y demostrar que eres el compañero de vida que una gran mujer necesita, porque tú eres igual de grande que ella.

A mi mamá, sin ella, absolutamente nada de esto sería posible. Gracias por enseñarme que, si la vida nos pone obstáculos muy grandes, como una enfermedad, hay que siempre luchar por salir de esta, con la mejor cara, con todas las ganas del mundo, por amor a sus hijos, a su esposo y a ella. Gracias por ser mi guerrera de vida, gracias por estar conmigo después de tantos momentos difíciles, gracias a la vida que aun estas a mi lado. Eres mi ejemplo de vida.

A mis hermanos, que simplemente mi vida no estaría completa sin ustedes, feos, esto también es gracias a ustedes, por privarse de algunas cosas, para poder irme a vivir a otro estado en busca de mi sueño, se lo difícil que fue separarnos, pero siempre que regresaba a casa, nos disfrutábamos inmensamente, desde pelas hasta horas de risa, y mucho amor. Gracias por darme el privilegio ser su hermana mayor, gracias por estar en mi vida, gracias por ser tan diferentes, en nuestro carácter, hasta en etapas de vida, porque exactamente eso hace que nos compaginamos demasiado.

A mis abuelitos paternos. Abuelito Polin y abuelita Chole, no saben lo orgullosa y agradecida que estoy por tantas enseñanzas, sin duda, una de las principales que tengo es que, ante la adversidad, ustedes siempre lucharon por estar juntos, aunque las circunstancias fueron inverosímiles y difíciles. Ambos gracias por siempre apoyarme con su amor, consejos, regaños y hasta monetario, por apoyarme con mi educación, y la de mis hermanos. Son un ejemplo de todos los valores que deben existir en la familia. Abuelita físicamente ya no estás con nosotros, pero siempre estarás en mi corazón.

Abuelitos maternos. Abuelita Chagua, sin duda alguna eres la matriarca de la familia, gracias a ti y a mi vuelito Chay “El rudo”, tenemos la familia tan grande y tan bonita que tenemos. Aunque hace ya 9 años nos dejó mi abuelito siempre lo recordaré como un

hombre que era querido y respetado entres todos, que sacó a su familia adelante y junto a ti hicieron todo por sacar a sus hijos adelante y ahora estoy aquí, agradecida

A mis tíos, Coco, Moya, Luis, gracias por ser parte importante tanto de mi formación integral, como en lo académico. Sobre todo, quiero agradecer a mi tía Chata y mi tía Vita, gracias por nunca dejarme sola, siempre han estado para mí, para platicar, aconsejarme, apoyarme, física, moral y sentimental. Gracias por ser dos mujeres extraordinarias.

A mis amigos de Oaxaca, no saben lo agradecida y bendecida que me siento de haberlos conocido y que sean parte de mi vida. A pesar de tantos años y diferentes caminos, seguimos estando juntos. Gracias por apoyarme en momentos difíciles, pero también en los momentos felices, por siempre creer en mí, en mi capacidad. Más que amigos, los considero como parte de mi familia, pues dicen que los amigos son la familia que uno escoge y no me quedad duda alguna de eso. Gracias por tanto Alex, Carlos Daniel, Irvin, Fabi, Ro y sobre todo Andy, por darme ánimos y apoyarme antes y durante mi tesis. Gracias a La Salle, por juntarnos en el camino. Renta, Rodrigo, gracias por estos 18 años juntos. Moy gracias por ser el mejor vecino y amigo, por ser parte de mi familia.

A mis amigos de Cuautitlán, gracias por hacerme sentir como en un nuevo hogar, ustedes hicieron que irme de mi estado no fuera tan difícil. Sin duda alguna, no pude encontrarme con mejores personas. A Monroy, Javier y Joel, por estar conmigo desde el inicio de esta aventura, por abrirme las puertas de su casa. Cris, Rubí, mis chinas oaxaqueñas, amigas y cómplices, gracias por siempre estar, por apoyarme, por creer en mí. Kevin, Fabián, gracias por llegar durante el proceso, por todas las anécdotas, las cosas buenas y malas. Luis, bebé de luz, gracias por ser parte de este proceso. Lupita, eres a mejor roomie que pude tener, gracias por apoyarme y acompañarme durante esta etapa de mi tesis.

Lau, tu sabes que más que mi amiga, eres mi hermana, gracias por siempre estar para mí en todo momento, por esa conexión tan inverosímil que tenemos, pero sobre todo por hacerme parte de tu gran familia. Que grato es tenerte en mi vida.

Un agradecimiento especial a UNIGRAS Unidad de investigación de granos y semillas por brindarme el espacio necesario para llevar a cabo las pruebas microbiológicas que requería para mi trabajo de tesis. Agradezco también a la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, laboratorio número 8 de Biotecnología por brindarme el conocimiento y la práctica del área en biología molecular.

A mi Co- asesora Josefina Moreno, mil gracias por todas las horas que estuvo a mi lado, durante todos los meses de experimentación, gracias por ser paciente, por creer en mí, por enseñarme tanto, por sufrir juntas y por los logros obtenidos, mil gracias. Al Doctor Montiel por todos sus conocimientos, su sabiduría y amor por la biotecnología, que nos contagiaba en cada clase. A la profesora Vaely, por ser la más dedicada, paciente y una de las mejores maestras que tuve a lo largo de la carrera.

Gracias a todas las personas que estuvieron y ya no están, aquellas que aún siguen estando, gracias por cada una de sus enseñanzas, por formar parte de esto, sin cada uno de ustedes, no estaría en donde estoy.

A mi amada universidad, gracias por todos los conocimientos adquiridos durante toda mi estancia, por darme una nueva forma de pensar, de vivir, por tantas lecciones de vida. No me puedo sentirme más orgullosa por ser parte de la Universidad Nacional Autónoma de México, la mejor del país y una de las mejores tanto de América Latina, como del mundo. Gracias por todo UNAM, gracias por tanto Ingeniería en Alimentos, Generación 38, fue un honor ser tu representante.

Por mi raza hablará el espíritu.

Un agradecimiento especial al proyecto “Aplicación de herramientas moleculares en el área agroalimentaria y diagnóstico de enfermedades mitocondriales” con la clave PIAPI1837 y “Asociación del fondo genético mitocondrial en enfermedades mitocondriales de la población mexicana” PAPIIT IN226419 por el apoyo brindado para la realización de esta tesis

“Sea rubia, morena o rojiza, la cerveza evoca un universo femenino, sensual y delicioso. ¿Cómo podría ser otro modo si tenemos en cuenta que, por los siglos de los siglos, han sido las mujeres quiénes han dado nacimiento a esa bebida amada por los hombres y los dioses?”

(Berger, 1988, p. 9)

Contenido

Índice de cuadros 11
Índice de figuras 12
Resumen: 13
Introducción 14
CAPITULO 1 Antecedentes 16
1.1 Cebada 16
1.1.1 Clasificación botánica 16
1.1.2 Morfología de la cebada 16
1.1.3 Tipos de cebada 17
1.1.4 Malta 18
1.1.5 Producción de cebada 18
1.1.6 Hongos en cebada: 19
1.2 Hongos 19
1.2.1 Clasificación de los hongos 19
1.2.2 Características generales de los hongos 20
1.2.3 Hongos dañinos y benéficos 21
1.3 Levaduras 22
1.3.1 Morfología 23
1.3.2 Fisiología 25
1.3.3 Clasificación 25
1.3.4 Recuento o cuantificación de levaduras 28
1.3.5 Aplicaciones en bebidas alcohólicas 29
1.3.6 Levaduras utilizadas durante la fermentación alcohólica 30
1.4 *Saccaromyces cerevisae* 31
1.4.1 Bioquímica de las levaduras 34
1.4.2 Países productores 35
1.5 Cerveza 36
1.5.1 Componentes de la cerveza 37
1.5.2 Contaminación microbiana y calidad de la cerveza 38
1.5.3 Tipos de cerveza: 39
1.5.4 Composición típica de la cerveza 41
..... 41

1.5.5 Características nutricionales de la cerveza 41
1.5.5.1 Agua 41
1.5.5.2 Alcohol 42
1.5.5.3 Carbohidratos 42
1.5.5.4 Proteínas, péptidos y aminoácidos 42
1.5.5.5 Lípidos 42
1.5.5.6 Fibra 42
1.5.5.7 Valor energético 43
1.5.5.8 Minerales 43
1.5.5.9 Vitaminas y micronutrientes 43
1.5.6 Principales productores de cerveza 43
1.6 Fermentación 44
1.6.1 Fermentación primaria 46
1.6.2 Fermentación secundaria 46
1.6.3 Etanol 47
1.7 Micotoxinas 48
1.7.1 Toxicidad 49
1.7.2 Hongos productores de micotoxinas 51
1.8 Ocratoxina A 52
1.9 Micotoxicosis 52
1.9.1 Aspectos legislativos de las micotoxinas y normativa vigente 53
1.9.2 Normas y legislación de Ocratoxina A: 54
1.9.3 Codex alimentarius 55
1.10 Ingeniería genética: 56
1.10.1 ADN 56
1.10.2 Dogma central 57
1.11 Técnica PCR 57
1.11.1 Fundamento 58
1.11.2 Etapas de la reacción 58
1.11.3 Ventajas y desventajas 60
1.11.4 Aplicaciones de la PCR 60
1.11.5 Diseño de Primers 61
1.12 Electroforesis 62

1.12.1 Fundamento 62
Capitulo II 64
2.1 Cuadro Metodológico 64
2.2 Objetivos: 65
2.2.1 Objetivo General: 65
2.2.2 Objetivos Particulares: 65
Objetivo particular 1: 65
Objetivo particular 2: 65
Objetivo particular 3: 65
Objetivo particular 4: 65
Objetivo particular 5: 66
2.3 Justificación: 66
Capítulo III Metodología 67
3. Materiales y Métodos 67
3.1 Diseño de primers: 67
3.2 Metodología de la extracción de DNA: 68
3.3 Metodología para la cuantificación de DNA: 69
3.4 Metodología de la PCR: 70
3.5 Metodología para la electroforesis en gel de agarosa (gel al 3%) 71
3.6 Metodología de medios de cultivo 72
3.7 Conteo de levaduras: 73
3.8 Metodología de determinación de presencia de ocratoxina A: 74
Capitulo IV Resultados 76
4.1 Resultados del Objetivo particular 1: 76
4.2 Resultados del Objetivo particular 2: 76
4.3 Objetivo particular 3: 77
4.4 Objetivo particular 4: 82
4.5 Objetivo particular 5: 83
Conclusiones: 87
Glosario 88
Bibliografía 90
Anexos 97
Anexo 2: 104

Anexo 3 105
Anexo 4: 106

Índice de cuadros

Cuadro 1: Clasificación botánica 16

Cuadro 2: Producción de cebada 18

Cuadro 3: Clasificación de los reinos y divisiones (phyla) de los hongos 20

Cuadro 4: Clasificación de los principales generos de levaduras 27

Cuadro 5: Taxonomía de la *Saccharomyces cerevisiae* 32

Cuadro 6: Composición de la levadura 33

Cuadro 7: México es el tercer proveedor de agroalimentos 35

Cuadro 8: Balanza Comercial Agroalimentaria y Pesquera de México- Brasil 35

Cuadro 9: Componentes de la cerveza. Niveles típicos (g/100mL) 41

Cuadro 10: Principales productos agroindustriales exportados 44

Cuadro 11: Riesgos para la salud humana 50

Cuadro 12: Clasificación de las micotoxinas 51

Cuadro 13: Hongos productores de micotoxinas 51

Cuadro 14: Hongos y micotoxinas de importancia 54

Cuadro 15: Niveles máximos admitidos de Ocratoxina A en la alimentación 54

Cuadro 16: Cervezas 67

Cuadro 17: Secuencia de primers diseñados de levadura *Saccaromyces cerevisae* 68

Cuadro 18: Reactivos y materiales para la extracción de ADN 68

Cuadro 19: Reactivos y materiales para cuantificación de ADN 69

Cuadro 20: Reactivos para PCR 70

Cuadro 21: Reactivos y materiales para electroforesis 71

Cuadro 22: Reactivos del medio de cultivo 72

Índice de figuras

Figura 1: Modificación del grano de cebada durante el malteo 17

Figura 2: Estructura celular de un hongo 21

Figura 3: Morfología de la levadura 24

Figura 4: Levadura liquida, instantánea y seca 26

Figura 5: *Saccharomyces cerevisiae* 33

Figura 6: Tipos de cerveza 40

Figura 7: Estados productores de cerveza 44

Figura 8: Fermentación 45

Figura 9: Fases de crecimiento fúngico y localización de las síntesis de Micotoxinas 48

Figura 10: Países con y sin reglamentos para las micotoxinas 53

Figura 11: Límites a nivel mundial para la ocratoxina A en los cereales y en productos a base de cereales 55

Figura 12: Representación del principio de amplificación 58

Figura 13: Programa de la PCR 71

Figura 14: Preparación de medios de cultivo 73

Figura 15: Cervezas 73

Figura 16: Cervezas para el análisis de micotoxinas 74

Figura 17: Peso de reactivos 74

Figura 18: Columnas monoclonales 75

Figura 19: Fluorometro para la determinación de micotoxinas 75

Figura 20: Ocratoxina en diferentes marcas de cerveza 82

Figura 21: Ausencia de levaduras en cerveza 83

Figura 22: Levaduras en cervezas 84

Figura 23: Levadura en diferentes marcas de cerveza 85

Resumen:

El consumo de cerveza forma parte de la vida cotidiana de algunas personas en el mundo, donde México juega un papel sumamente importante, pues es el principal exportador y el cuarto productor de cerveza en el mundo. El extracto de malta es un producto agroindustrial significativo en exportación. Para la elaboración de la cerveza, la cebada es parte importante, pues es la materia prima por excelencia para los maestros cerveceros. A pesar que no es estrictamente el único grano requerido para fabricarla. En la cebada existe una gran variedad de hongos patógenos que pueden afectar a este grano y pueden producir micotoxinas que causan daños a la salud en humanos y animales. Aspegillus niger, Apergillus *ochraceus* y Aspergillus *carbonarius* se pueden desarrollar en el grano de cebada y producir ocratoxinas. Esta micotoxina produce micotoxicosis, que llega a ser nefrotóxica, cancerígena, hepatotóxica, teratogénica e inmunotóxica en el humano.

El objetivo principal de este trabajo fue detectar levadura de *Saccaromyces cerevisiae* en cervezas, mediante PCR y análisis de ocratoxina A mediante columnas de inmunoafinidad para conocer la calidad de la cerveza en estos dos aspectos.

Se utilizaron 18 muestras de diferentes cervezas, tanto comerciales como artesanales. Se diseñaron los primers específicos para *Saccharomyces cerevisiae* mediante programas bioinformáticos. Se realizó la PCR para la identificación de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y se determinó la ocratoxina A mediante columnas de inmunoafinidad.

En resultados obtenidos de PCR se observaron los amplificados de la levadura Saccharomyces cerevisiae en 8 cervezas comerciales y artesanales. En otras 10 cervezas no se observaron los amplificados que detectan la presencia de la levadura. En la determinación de ocratoxina A se encontraron 4 cervezas que rebasaron el límite máximo permitido de 5µg/L por la Unión Europea. Mientras que en los 14 restantes estuvieron dentro de los límites permitidos.

Se concluye que se pudo detectar *Saccaromyces cerevisiae* en algunas cervezas comerciales y artesanales mediante la técnica de PCR y se encontró una correlación con el crecimiento de levaduras en medio de cultivo. En todas las cervezas hubo presencia de ocratoxina A en diferentes concentraciones.

Introducción

Las levaduras son hongos en los que la forma unicelular es la más evidente. Están agrupadas 350 especies en 39 géneros. No solo pueden presentar una forma unicelular, si no también pueden presentar micelios. Estas dos formas se pueden dar simultáneamente en el medio donde se encuentra el microrganismo, independiente de las condiciones ambientales (García, 2004).

La Saccharomyces cerevisiae es una levadura que se encuentra dentro del grupo de microorganismos asociado al progreso, su nombre deriva del vocablo *Saccharo* (azúcar), *myces* (hongo) y *cerevisiae* (cerveza). En el género *Saccharomyces,* la especie *cerevisiae* constituye la levadura y el microorganismo eucarionte más estudiado (Perdones, 2000). Estas levaduras son células elipsoidales a cilíndricas de 5-10 µm (Lappe y Uloa, 1989).

Actualmente se está utilizando la ingeniería genética para aplicar técnicas que permiten la recombinación de ácido desoxirribonucleico, abreviado como ADN, y para conocer el genoma de diferentes organismos (Muñoz, y otros, 2004). A diferencia de los genomas de organismos multicelulares, el genoma de la levadura es muy compacto, dado que el 72% de la secuencia corresponde a secuencias codificantes, es por esto que se puede elegir una secuencia para su identificación por biología molecular (Baxter y Hughes, 2008)

La cerveza tiene una fuente importante de los principales nutrientes que son carbohidratos, proteínas, fibra y vitaminas en comparación con otras bebidas (Baxter y Hughes, 2008).

Las levaduras en exceso, que contaminan a los alimentos, usualmente provocan cambios indeseables en los mismos. Estos cambios son de dos tipos, el primero es estético, debido a la presencia física que dan turbidez, la segunda es el resultado del metabolismo de estas que genera aumento de pH y aromas particulares (Hornsey, 2003).

En la cerveza hay 4 grupos que las afectan más, las cuales son bacterias Gram positivas, Gram negativas, levaduras salvajes, llamadas así porque estas no son introducidas en el proceso y otros hongos que pueden producir micotoxinas (Frazier y Westhoff,2000).

El origen de la palabra micotoxinas es griego, que quiere decir *mikes* y *toxina*, que significa hongo y veneno correspondientemente (Castillo, 2009).

Las micotoxinas pueden contaminar desde la cebada, hasta el producto final de la cerveza, dando como resultado a enfermedades y trastornos, mejor conocidos como *micotoxicosis* siendo tóxicos tanto para el humano como para los animales. La presencia de estas micotoxinas en los alimentos, puede estar de forma individual o simultánea con otras, lo que puede provocar es una mayor toxicidad (Castillo, 2009).

Las ocratoxinas son micotoxinas producidas por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillum.* La más toxica de estas, es la ocratoxina A, está formada por una dihidroisocumarina unida por el grupo 7-carboxilo a una molécula de L-β-fenilalanina por medio de un enlace amida. Por lo que es importante detectar la presencia de ocratoxina A en la cerveza que puede causar efectos tóxicos en el tracto gastrointestinal, hígado, sistema nervioso, piel y en el riñón (Castillo, 2009).

CAPITULO 1 Antecedentes

1.1 Cebada

La base para la elaboración de vino, es la uva, de igual forma la cebada lo es para la elaboración de cerveza. A pesar que no es estrictamente el único grano requerido para fabricarla, la cebada viene a ser la materia prima por excelencia para los maestros cerveceros de todo el mundo (Arias, 2011).

1.1.1 Clasificación botánica

El nombre científico de la cebada es *Hordeum vulgare L*. el fruto es un cariópside con las glumillas adheridas. Se considera una planta autógama perteneciente a la familia de las gramíneas. (SAGARPA, 2017). Perteneciendo a la subfamilia Poideae, dentro de la familia Poaceae e incluye plantas cultivadas y espontáneas (Guartaza y Israel, 2015).

Cuadro 1. Clasificación botánica

Reino	**Plantae**
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Genero	*Hordeum*
Especie	vulgare L.

Fuente: (Guartaza y Israel, 2015)

1.1.2 Morfología de la cebada

Debido a la influencia del ambiente, varia el tamaño del grano, esta variación puede oscilar entre 9.5mm a 6mm de longitud y de ancho entre 1.5 y 4mm (SAGARPA, 2017).

En la Figura 2 podemos observar las partes que forma el grano de cebada, la abreviatura Al: es la capa de aleurona, E: endosperma, Em: embrión. G ácido giberélico y M: modificación.

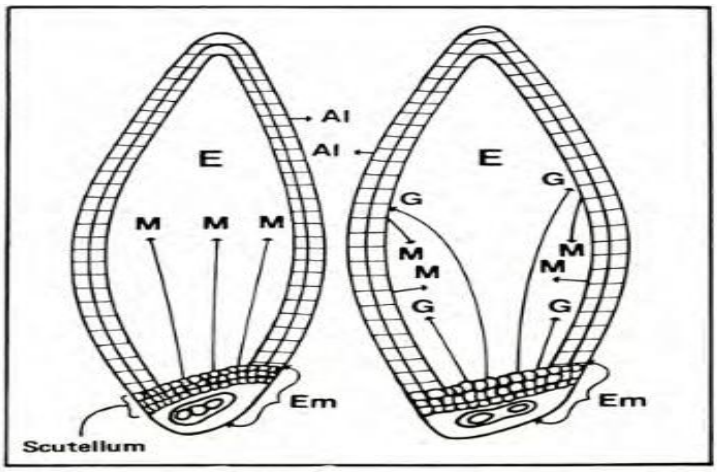


Figura 1: Modificación del grano de cebada durante el malteo. Fuente (Arias, 2011)

Color y brillo: El color de la cebada es de un verde pálido, a diferencia del trigo, la cebada aprecia mejor en la forma de la aurícula, cuando la planta está en crecimiento y en la forma de la espiga, en las plantas maduras (Parsons, 1983). Diversos factores climáticos, como lo son las lluvias al final de la maduración llega a provocar una decoloración más o menos intensa (Arias, 2011).

El brillo en la cebada nos da una condición correcta de maduración, cosecha y adecuado manejo de almacenamiento (Arias, 2011).

Porcentaje de cáscaras: El porcentaje de cascaras o también llamadas glumelas, así como la forma del grano de la cebada, tiene una gran influencia en el rendimiento de la malta obtenida. Las cascaras representan alrededor del 7 al 13% de la sustancia seca de la cebada. Se dice que entre más bajo sea el porcentaje de cáscaras, beneficia la calidad de la cerveza, debido a que esta materia seca en el mosto se solubiliza y resulta perjudicial al gusto y estabilidad de la cerveza, por eso el rango adecuado es 7 al 9% (Arias, 2011).

1.1.3 Tipos de cebada

Existen muchos tipos diferentes de cebada, pero las más comunes en cervecería son de dos y seis hileras. En general poseen entre 60 y 65% de almidón, y un 10% de proteínas. Estos tipos de cebada dan un excelente resultado en la fermentación, el de dos hileras ofrece un mayor rendimiento de almidones debido a su alto contenido de alcohol, mientras que el de 6 hileras tiene una abundante actividad enzimática o diastática que quiere decir, macerado más eficiente (Gonzales, 2017).

La cebada de dos hileras o *Hordeum distichum* es filogenéticamente más antigua que la de 6 hileras o *Hordeum vulgare.* Los nombres de estos dos tipos de cebada, es bastante obvio, ya que el primero muestra dos líneas de espiguillas a lo largo del eje central, también llamado raquis, mientras que el segundo presenta seis (Gonzales, 2017).

1.1.4 Malta

El grano de cebada o cualquier otro grano, no puede ser utilizado directamente por la levadura en el proceso de fermentación alcohólica, para poder romper las cadenas de almidones en moléculas de azúcar que, si pueden ser fermentadas, es necesaria la presencia de algunas enzimas llamadas amilasas o diastasas. Dichas enzimas las contiene el propio grano, pero solo se activan en el momento de la germinación. Aquella cebada que se germina y se procesa especialmente para tener la actividad enzimática deseada, recibe el nombre de malta, siendo uno de los ingredientes fundamentales en la elaboración de la cerveza (Gonzales, 2017).

El grano de cebada malteada produce amilasas, las cuales tiene la capacidad de sacarificar su propio almidón, pero al mismo tiempo actúa sobre los almidones de otros granos presentes, si es el caso. A raíz de esto se deriva 4 grandes categorías de malta, que son la malta base, maltas de acción mixta, maltas atezadas y maltas especiales (Gonzales, 2017).

1.1.5 Producción de cebada

La producción nacional de la cebada durante la última década se redujo 9.54% en el periodo 2003-2016 (SAGARPA, 2017).

En el 2016 se sembraron 334.270 hectáreas, de las cuales el 97.33% de la superficie se encuentra mecanizada y un 22.50% del total de la superficie cuenta con tecnología aplicada a la sanidad vegetal, mientras que el 32.35% conto con asistencia mecánica (SAGARPA, 2017).

En el cuadro 2 se puede observar la producción de años anteriores, como posibles estimaciones en la producción de cebada, así como el crecimiento acumulado y crecimiento de promedio actual

Cuadro 2. Producción de cebada

Estimaciones**					Crecimiento acumulado					
Año/Periodo	2016	2018	2024	2030	2003-2016	2016-2018	2016-2024	2016-2030	2003-2016	2016-2030
Producción potencial de cebada grano** (miles de toneladas	978.35	1,020.02	1,145.04	1,270.06	-95.4%	4.26%	12.26%	29.82%	-0.77%	1.75%

Fuente: (SAGARPA, 2017).

1.1.6 Hongos en cebada:

Existe una gran variedad de hongos patógenos que pueden afectar a los cereales, como son, *Rhopalosiphum padi, Sitobion avenae, Schizapis graminum*, estos producen importantes daños en la cebada, sobre todo el primero de ellos

Rincosporiosis o escaldado (*Rynchosporium commune*) es la enfermedad que provoca mayores daños en el cultivo de la cebada, con síntomas similares respecto a otras enfermedades foliares de origen fúngico (Gort y Querol, 2015)

Es conocido como problema fitosanitario y se encuentra extendido por todas las zonas templadas del planeta y se considera una de las enfermedades importantes del cultivo de la cebada, sobre todo en los países de latitudes más frías y húmedas (Gort y Querol, 2015).

1.2 Hongos

Son aquellos organismos que poseen un núcleo definido y que tienen características similares a las plantas y animales, Los hongos no se encuentran conformadas por órganos como hojas, raíces, corazón, o pulmones, si no por células las cuales son alargadas y al alinearse forman filamentos llamadas hifas, las cuales se entrelazan en una masa llamada micelio (Moreno, 2016).

La humanidad y los hongos han estado íntimamente relacionados desde su origen. El hongo fungió un papel importante en la alimentación, debido a la necesidad de encontrar otras formas de obtener los nutrimentos necesarios (Trujillo, 2012).

Fue en el siglo XVIII que, gracias a Leeuwenhoek, se pudo observar por primera vez, hongos microscópicos, a través de la invención del microscopio. Después de este gran descubrimiento la humanidad se ha beneficiado con el desarrollo de alimentos y antibióticos, así como reconocer aquellos que son patógenos para el ser humano, los animales y plantas (Trujillo, 2012).

A continuación, se mencionan los hongos con una mayor importancia a nivel social: Hongos ornamentales, alimenticios, venenosos o tóxicos, alucinógenos, medicinales, contaminantes, biocontroladores y patógenos (Trujillo, 2012).

1.2.1 Clasificación de los hongos

En la actualidad surgen nuevas propuestas de clasificación de los reinos que se observan en el cuadro 3. Esta clasificación está basada en características morfológicas, fisiológicas y sobre todo de biología molecular (Trujillo, 2012).

Cuadro 3. Clasificación de los reinos y divisiones (phyla) de los hongos

Tipo de célula	Reino/ phyla (división)
Procarionte	Archeabacteria Eubacteria
Eucarionte	Protozoa • Plasmodiophoromycota • Acrasiomycota • Myxomycota • Dictyosteliomycota Choromista • Hyphochytriomycota • Oomycota • Labyrinthulomycota Fungi • Chytridiomycota • Zygomycota • Basidiomycota • Ascomycota Plantae Animalia

. Fuente: (Kendrick, 2002).

La clasificación macroscópica dada a los hongos, es en cuatro diferentes grupos: a) hongos macroscópicos o setas, b) mohos u hongos filamentosas, c) levaduras u hongos de crecimiento limitado, d) actinomicetos o bacterias filamentosas de crecimiento limitado (Trujillo, 2012).

1.2.2 Características generales de los hongos

Son organismos eucariontes, bien definidos, los cuales poseen núcleos organizados, membrana nuclear, son heterótrofos, aerobios, su reproducción es sexual y asexual. Los hongos presentan dos células fúngicas, las cuales son las somáticas, aquellas que cuentan con núcleos muy pequeños, teniendo como procesos de división la mitosis ordinaria, y las reproductoras, aquellas que contienen núcleos mucho más grandes, y cuya división celular es por meiosis (Trujillo, 2012).

Estas células fúngicas, se encuentran rodeadas por una pared que usualmente contiene quitina, como componente mayoritario (Anderson y Pascual, 2000).

Por ser eucariontes, poseen mitocondrias, sistema endomembranoso, aparato de Golgi, de este se derivan microvesículas y macrovesículas, las primeras son parte del retículo endoplasmático, membrana celular, donde se encuentran los esteroles, teniendo como

principal componente el ergosterol, lo que sería equivalente al colesterol en las células humanas, como se muestra en la figura 2 (Trujillo, 2012).

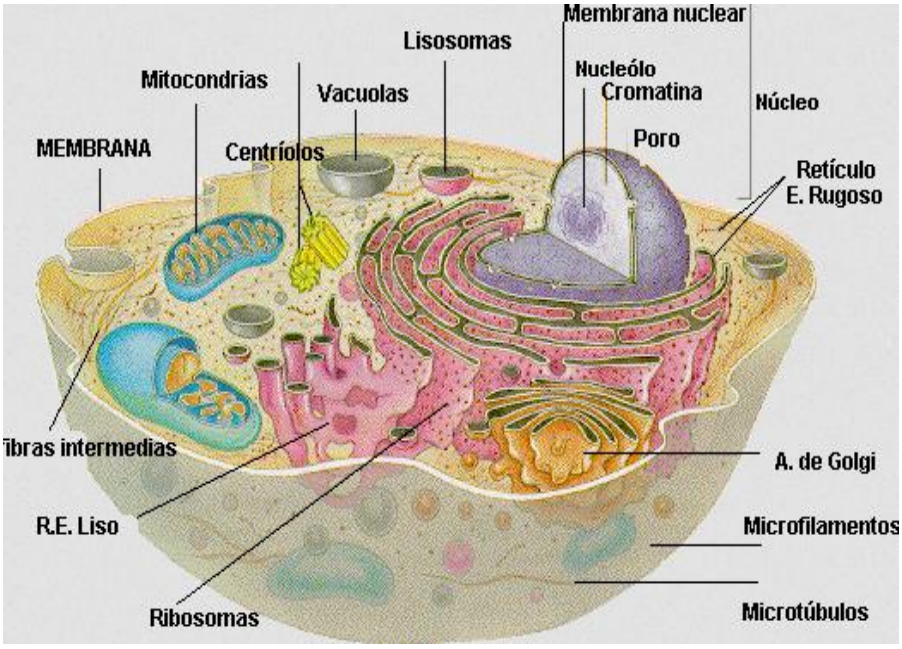


Figura 2. Estructura celular de un hongo (Salgado, 2017).

Los hongos filamentosos tienen un elemento estructural llamados hifas, las cuales son filamentos individuales formados por células que están alineadas en serie (Anderson y Pascual, 2000). Las hifas que se entrelazan en una masa similar al algodón son llamados micelios (Moreno, 2016).

La nutrición de los hongos se realiza por medio de la absorción de sustancias orgánicas simples o elaboradas. Esta se da de dos maneras diferentes, la primera es saprofita, cuando toman sus nutrientes de materias orgánicas en plena descomposición o materias muertas, la segunda, cuando se nutren de materia viva. Para la nutrición de estos, es importante los carbohidratos, como fuente de carbono, sobre todo glucosa, sacarosa y maltosa, nitrógeno, H2O, nutrientes mayores como potasio, fosforo y magnesio, nutrientes menores como hierro, cobre, zinc y molibdeno (Trujillo, 2012).

Las condiciones para el crecimiento oscilan entre 0° a 55°C, mientras que el rango ideal es de 20° a 30°C. Pero existe una clasificación de los hongos dependiendo su rango de temperatura, los cuales son los psicrófilos, los cuales se desarrollan entre 0° a 20°C, mientras que su temperatura ideal es 15° a 17°C, los mesófilos tiene un extenso rango de temperatura que va de los 0° a 50°C, (Moreno, 2016). Su rango optimo es de 15° y 40°C, por último, están los termófilos, su rango de crecimiento es de 20° a 50°C (Trujillo, 2012).

1.2.3 Hongos dañinos y benéficos

Los hongos, sin lugar a duda, son vitales para la vida en la tierra y, por lo tanto, en la historia humana. La importancia de los hongos en la biosfera se debe a su carácter de

descomponedores, especialmente en bosques. Reciclan la materia orgánica y no sólo la madera, con notable eficacia, regulan la liberación de nutrientes y son esenciales para la supervivencia de plantas y animales. Además de los hongos empleados en la fermentación de alimentos (*Saccharomyces cerevisae)*, existen hongos que se encuentran dentro del sector alimenticio por su sabor, olor y los beneficios a la salud (Decon, 2010).

Otros hongos son empleados como organismos de laboratorio para el estudio de procesos biológicos fundamentales, por ejemplo, *Saccharomyces, Neurospora, Coprinus, Schizophyllum, Phycomyces, Aspergillus, Ustilago,* etc (Decon, 2010).

Hay hongos que descomponen madera de construcciones, postes, embarcaciones, etc., sobre todo si hay mucha humedad, tal es el caso de *Serpula lacrimans*. Otros pueden descomponer desde productos alimenticios hasta las cosas más extrañas (papel, emulsiones fotográficas, pintura, fungicidas, incluso discos compactos o hasta papel pintado, generando a veces en el proceso gases tóxicos), lo que genera tratar de evitarlos por medios químicos, refrigeración, enlatado, etc (Mendoza et al., 2017).

Existen hongos degradadores, conocidos como mohos, que hacen que los alimentos lleguen rápidamente a su estado de descomposición al utilizarlos como su propia fuente de nutrientes. Este proceso se ve favorecido por las condiciones cálidas y húmedas que les permiten crecer y reproducirse. Algunos de los géneros de mohos que pueden encontrarse en los alimentos son *Penicillium, Aspergillus, Fusarium* y *Rhizopus* (Decon, 2010).

1.3 Levaduras

Es complicado tener un definición simple del término levadura, debido a que son un grupo de hongos complejos, ya que poseen 60 géneros y 500 especies (Bourgeois et al., 1994).

Alguna de las mejores definiciones de levaduras es “aquellos hongos, basidiomicetos o ascomicetos, cuyo estado vegetativo es unicelular, que se multiplican por gemación o fisión, que puede o no formar esporas durante un estado sexual y que no han sido denominadas como otro tipo de hongos (Wagner et al., 2009).

Las levaduras son hongos que forman sobre los medios de cultivo colonias pastosas, constituidas en su mayor parte por células asiladas, que pueden ser ovoideas, esféricas, alargadas o esféricas (Carillo y Audisio, 2007).

Las levaduras tienen una reproducción asexual, por gemación vegetativa o sexual, en el cual implica el acoplamiento y finalmente la producción de esporas sexuales, mejor conocidas como ascosporas, estas se encuentran dentro de sacos (Hornsey, 2009).

Los factores para el crecimiento y desarrollo de la levadura, son la presión osmótica y el estrés osmótico, que puede causar una disminución en el volumen celular, provocando una afectación a la velocidad de fermentación, así como la viabilidad celular; la

temperatura, estas causan una disminución de la biomasa, esto es resultado de un descenso en el contenido de proteínas RNA, ADN y aminoácidos libres y genera rigidez de la membrana (Marín, 2016).

Las levaduras tienen una característica de servir como potencializadores de sabor, a partir de su hidrólisis. Este es un mercado amplio para la industria alimentaria (Wagner, Otero, & Guerrero, 2009). La levaduras pertenecen a los productos constituidos por células de microorganismos, que son conocidos como single cell protein. La Food and Agricultural Organization elaboró hace años un grupo de recomendaciones donde sus propuestas principales han sido establecidas en documentos específicos, en donde no sólo se fijan límites de la presencia de microorganismos y compuestos patógenos, sino que también proponen pruebas clínicas a las que debe ser sometidos cada uno de estos productos a fin de ser reconocida como GRAS (Generally Recognized as Safe) (Wagner et al., 2009).

1.3.1 Morfología

La morfología se utiliza principalmente para saber distinguir el nivel del género de las levaduras, para identificar su especie (Chen, 2001). Además de su morfología, la habilidad para fermentar varias fuentes de carbono, utilizar su nitratos como fuentes de nitrógeno, así como la composición de ácidos grasos en la membrana citoplasmática (Gutiérrez, 2010).

Además del aspecto que muestra su forma vegetativa, también puede formar psudomicelios, micelos verdaderos y ascosporas (Wagner et al., 2009).

Las características de su reproducción sexual son, por formación de zigoto, formación de ascosporas, por su forma, tamaño y numero de esporas (Kuhar et al., 2013)Las dimensiones son alrededor de 1 a 9 µm de ancho y 2 a 20 µm de longitud según sea el tipo de especie, nutrición, edad, entre otros factores más (Hernández et al., 2006).

Las partes observables de su estructura es la pared celular, el citoplasma, vacuolas de agua, los glóbulos de grasa y los gránulos como la albumina o almidón (Frazier y Westhoff, 2000). Por ser un organismo eucarionte posee una gran cantidad de compartimentación celular que se caracteriza por el material hereditario dentro del núcleo, como se puede observar en la Figura 2 (Wagner et al., 2009).

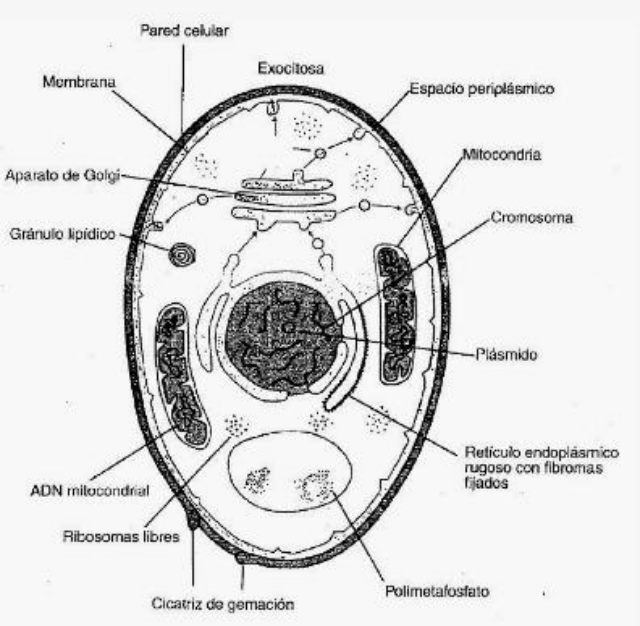


Figura 3. Morfología de la levadura (Togores, 2015).

La encargada de conservar la membrana nuclear es el citoplasma durante su división. La pared celular es rígida, la cual es responsable de darle forma a la célula. La multiplicación vegetativa por gemación se traduce, al separarse las células, cuando se forma una cicatriz de gemación sobre la célula madre (Togores, 2015).

Presentan una pared celular encargada de mantener la estructura y la rigidez de la célula, también poseen membranas especializadas, las cuales son; membrana plasmática que se encarga de separar componente celular del medio externo, membrana mitocondrial que separa las mitocondrias del citoplasma, la interna separa la matriz mitocondrial y sintetiza el ATP, también contiene membrana del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi, estas ayudan a la síntesis y modificación de proteínas, membrana nuclear se encarga de aislar el ADN del resto de la célula y las membranas vasculares que separan las funciones metabólicas especiales (Mora, 2009).

La pared celular puede llegar a poseer un espesor de 150-300 µm, dependiendo de la cepa y las condiciones de desarrollo, también metabólicamente activa, conteniendo enzimas. El espacio periplásmico y la membrana tiene un grosor de alrededor 10 µm. El 85% de peso seco que se tiene en la pared celular es debido a presencia en cantidades similares de dos polisacáridos estructurales, que son el β-Glucano y polímeros, estas se encuentras ubicadas dentro del interior de la pared, encargadas de regular la rigidez y la forma de la pared (Hornsey, 2009).

La pared celular de la levadura posee una carga negativa, y posee la característica de ser hidrófoba, características de importancia para el cervecero. La carga negativa se da debido a cadenas de fosfatos localizadas en la pared externa, la medición de esta carga se puede realizar por medio de un cromatógrafo y medios electroforéticos. Esta carga es de suma importancia para la cerveza, en la parte final, cuando este ya está en la etapa

de envasar, pues cuando los puntos que tienen carga positiva son utilizados en el paso del proceso de clarificación de cerveza, atraen a las células que están asiladas de la levadura, produciendo una sedimentación. Mientras que la hidrofobicidad se da por los lípidos que se encuentran en la parte externa de la pared, estos al igual que la carga negativa y positiva pueden ser determinados mediante un cromatógrafo (Hornsey, 2009).

Al igual que otros organismos vivos, las levaduras requieren fuentes de carbono, nitrógeno, fosforo, elementos trazas y factores de crecimiento para que estos puedan crecer y multiplicarse (Wagner et al., 2009). En general las levaduras toleran un rango de pH entre 3 y 10, su pH optimo es ácido, entre 4.5 y 6.5 (Marín, 2016).

Usualmente fermentan unos pocos glúcidos, principalmente hexosas y disacáridos. Algunos más, son fermentadores enérgicos de los azucares, en condiciones anaerobias (Hernández et al., 2006).

La célula de levadura, cuando se encuentra en un medio nutritivo, engrosa y aumenta hasta que se va definiendo la forma pequeña de la célula, que se va distanciando o separando (Hernández et al., 2006).

1.3.2 Fisiología

Existen diversas especies de levaduras y aunque su morfología y fisiología son muy diferentes, las levaduras de gran importancia para la industria poseen actividades fisiológicas similares, vistas de una forma general (Frazier y Westhorff, 2009).

La mayoría de estas levaduras crecen mejor con aporte de humedad disponible, crecen de una manera más eficaz en sustratos que contienen elevadas concentraciones de solutos, como el azúcar y sal (Frazier y Westhorff, 2009). El alcohol generado por las levaduras fermentativas, es el principal producto en la fabricación de cerveza, vinos, alcohol industrial otros más (Trujillo, 2012).

Es posible seleccionar levaduras por determinadas propiedades fisiológicas, haciendo posible que muten a nuevas formas, pues estas se pueden adaptar a crecer en condiciones que no habían crecido antes, de esa adaptación. A esto, constituye un claro ejemplo de las diversas propiedades fisiológicas que se dan dentro de una misma especie, como es el caso de las *Saccharomyces cerevisiae*, que fueron y siguen siendo adaptadas a diferentes usos y condiciones (Frazier y Westhorff, 2009).

1.3.3 Clasificación

Cuando se clasifican los hongos microscópicos de una forma empírica, se distinguen dos grupos, los hongos filamentosas y las levaduras, estas tienen un crecimiento cremoso o bacterioforme, esto quiere decir que posee gran cantidad de colonias, las cuales no se distingue a simple vista (Trujillo, 2012).

Existe una clasificación de levaduras, estas son, en levadura fresca o prensada, estas contienen un 70 % de humedad y un 30% de sólidos, la vida de anaquel de esta es de

alrededor de dos semanas y deben ser almacenadas en refrigeración, este en general es utilizada para la elaboración de pan y pizzas (COFALEC, 2012).

Levadura seca es otra clasificación, conteniendo solo 10% de humedad, es la levadura fresca pero deshidratada, teniendo vida de anaquel de 6 meses y no necesita ser refrigerada, al momento de su uso se hidrata. Por su forma de almacenaje, este tipo de levadura es práctica (COFALEC, 2012).

Otra clasificación es la levadura instantánea, esta contiene un 5% de humedad, teniendo una vida de anaquel de 2 años, esta es envasada al vacío, al igual que la seca no requiere de refrigeración. Esa levadura es la más viables para una comercialización a mercados lejanos (COFALEC, 2012)

Antiguamente la forma la más común de encontrar la levadura era en forma líquida, esto hace que el producto sea más delicado y con un menor porcentaje de vida de anaquel. Las levaduras desactivadas, son otro tipo de clasificación, en su masa se encuentran las membranas que permiten el escape del contenido de la célula, haciendo que al momento de manipular la masa alcancen un alto de nivel de maduración, generando un desarrollo durante la mezcla de la masa, logrando una disminución del 15% y 20 % durante el proceso. Con esta levadura de reduce la oxidación de la masa durante la mezcla, mejorando el sabor y la calidad aromática del producto final (COFALEC, 2012).

Existen levaduras denominadas especiales, estas son producto derivados de la inactivación, autolisis o hidrólisis de las levaduras alimenticias, los productos derivados de esto son de las levaduras de consumo directo (EURASYP, 2016).

Figura 4. Levadura liquida, instantánea y seca (Valdelato, 2017)

Existe otro tipo de calificación de las levaduras, incluyendo a los géneros más importantes de las levaduras, como se muestra en el cuadro 4 (Bourgeois et al., 1994).

Cuadro 4. Clasificación de los principales generos de levaduras

Levaduras pertenecientes a los Ascomicetos		
Ascomicotina		
He		
Endomicetales		
Spe	*Coccidiascus*	
	Mestscnikowia	
	Nematospora	
Saccharomycetaceae		
Lipomycetoideae		
Nadsonioideae		
	Lipomyces	
	Haseniaspora	
	Nadsonia	
	Saccharomycodes	
	Wickerhamia	
Saccharomycetoideae	*Ambrosiozyma*	*Pachysolen*
	Arthroascus	*Pachytichospora*
	Citeromyces	*Pichia*
	Clavispora	*Saccharomyces*
	Cyniclomyces	*Saccharomycopsis*
	Debaromyces	*Schwanniomyces*
	Dekkera	*Sporopachydermia*
	Guilliermondella	*Stephanoascus*
	Hansenula	*Torulaspora*
	Issatchenkia	*Wickerhamiella*
	Kluyveromyces	*Wingea*
	Lodderomyces	*Zygosaccharomyces*
Levaduras pertenecientes a los Basidiomicetos		
Basidiomicotina		
Filobasidiaceae	*Filobasidium*	
	Filobasidiella	
Levaduras productoras de teliósporas		
	Leucosporidium	
	Filobasidiella	

Fuente: (Bourgeois, 1994).

1.3.4 Recuento o cuantificación de levaduras

Usualmente el crecimiento en masa de las levaduras no resulta práctico para la identificación de estas (Frazier & Westhoff, 2000). Para el recuento de levaduras se pueden utilizar diferentes métodos, todos estos se pueden incluir entre dos generales, que son cultivos directos de agar y cultivos después de la concentración por filtración por membrana (Bourgeois et al., 1994). Se han descrito algunos medios de cultivo para dicho recuento, tanto en hongos filamentosos como en levaduras, que se describen más abajo (Camacho et al., 2009).

Toda aquella sustancia que se usa para el cultivo de microorganismos, es llamada medio, o mejor conocido como un medio de cultivo (Delaat, 1985). Este, es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que hacen las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos (Ramírez, 2018).

Los medios de cultivos que se utilizan, siempre deben ser selectivos y deben poseer propiedades anti fúngicas y antibacterianas, debido que muchas veces los alimentos o producto alimenticio contiene hongos y bacterias, además de las levaduras (Bourgeois et al., 1994). El recuento en placas por siembra en superficie es sembrar un volumen conocido de la dilución de la muestra sobre la superficie de un medio de cultivo en placas Petri. En este método las colonias crecen sobre la superficie del medio (Ramírez, 2018).

Para el recuento de las levaduras en la microbiología alimentaria los medios más utilizados son:

- Extracto de levadura, glucosa, agar
- Medio Sabouraud
- Oxitetraciclina, glucosa, agar (O.G.A)
- Medio de patata, glucosa, agar (P.D.A)
- Medio de jugo de uva, agar (para enología) o medio mosto de cerveza, agar (para cervecería)

Los medios de cultivo fomentan el crecimiento microbiano, de tal manera que puedan comprobarse las características del cultivo. También se encargan de facilitar reacciones bioquímicas, de las cuales pueden ser demostrables mediante la observación directa o indirecta con la ayuda de algunos reactivos adicionales (Camacho et al., 2009).

Estos medios son por acidificación a un pH 4 o 3.5, debido a que se hacen selectivos frente a muchas baterías (Bourgeois et al., 1994). Esta acidificación no tiene efecto sobre bacterias acidofílicas ni tampoco en los hongos. El papel que juegan algunos antibióticos, como el cloranfenicol o la oxitetraciclina, llegan a inhibir el desarrollo de bacterias que afecten al medio de cultivo (Camacho et al., 2009).

Muchas de las colonias jóvenes de levadura, son húmedas y algo mucosas, aunque es posible que tengan aspecto harinoso, la mayoría de estas son de color blanco, aunque otras pocas presentan un color crema o rosado. Al paso del tiempo algunas colonias al envejecer cambian ligeramente su aspecto, otras se secan y se arrugan (Ramírez, 2018).

Las levaduras son oxidativas, fermentativas o pueden presentar ambos tipos de actividad metabólica. Las levaduras oxidativas en la superficie liquidan, pueden crecer en forma de película, de velo o de espuma, por tal motivo se les denomina levaduras formadoras de espuma. Por su parte, las levaduras fermentativas crecen en toda la masa del líquido, y se encargan de producir dióxido de carbono (Frazier y Westhoff, 2000). Con el paso del tiempo, para facilitar cada una de estas pruebas de recuento de levaduras se han innovado muchas técnicas. Tradicionalmente y aun en la actualidad se ha llevado a cabo manualmente, utilizando cajas Petri, pipeta y tubos, con la lectura e inspección visual (Mossel, 2007).

Algunos de ejemplos de mecanización incluyen los siguientes

1) Con un aparato llamado Stomacher, se hace una preparación homogeneizado en bolsas (Mossel, 2007).
2) El uso de Diluidores gravimétricos facilita la preparación de homogeneizados y diluciones, con esto reducir los errores de pesado y pipeteo manuales (Mossel, 2007).
3) Existen también diferentes sistemas y aparatos automatizados para poner en las cajas Petri los medios de cultivo e incluso, se adquieren placas previamente preparadas con diversos tipos medios de cultivo. De igual forma se pueden realizar diluciones, vertido de agar, colocación de las tapas, marcado y transporte de las placas a la incubadora (Mossel, 2007).
4) Las placas clásicas también han sido sustituidas por films recubiertos con nutrientes y agentes gelificantes deshidratados, en algunas ocasiones si se requiere se agregan colorantes indicadores. Todo esto se innovó con el fin de ahorrar trabajo, materiales y espacios en la industria y laboratorios (Mossel, 2007).

La Norma Oficial Mexicana NOM-111-ssa1-1994, bienes y servicios, nos habla sobre el método para la cuenta de hongos y levaduras en alimentos nos dice que el método se basa en inocular una cantidad conocida de muestra de prueba en un medio selectivo específico, acidificado a un pH 3,5 e incubado a una temperatura de 25 ± 1°C, dando como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos (NOM, 1994).

1.3.5 Aplicaciones en bebidas alcohólicas

No cabe duda que la tecnología de la fabricación de bebidas alcohólicas fue sumamente desarrollada por las primeras civilizaciones, a pesar de desconocer el agente de la fermentación (Wagner et al., 2009).

El origen de las bebidas alcohólicas es en la fermentación alcohólica. Todo líquido que presenta un azucarado, presenta una fermentación espontanea, esto se debe a la acción de las levaduras que, en su ausencia de aire, destruyen la glucosa y otros azúcares, generando etanol y dióxido de carbono (Casado, 2006).

Durante muchos años, se han utilizado diversas técnicas para medir la tolerancia al etanol de diferentes tipos de cepas de levaduras. La tolerancia a este, se puede definir como la

medida del flujo de protones que entran y salen de la célula. Usualmente, las levaduras que se usan en la destilería, son más tolerantes al etanol, si las compramos con las utilizadas en la cervecería. El acúmulo de etanol es aquel aumento del contenido en esteroles y en ácidos grasos insaturados de las membranas. El punto clave es la membrana citoplasmática, para la interacción de levadura- etanol, pudiendo así inhibir algunos sistemas de transporte membranario (Bourgeoi y Larpente, 2005).

Saccharomyces cerevisiae es utilizada para la producción de cerveza durante su fermentación. En la fermentación de la malta depende de la composición del medio en la que se encuentre la levadura y a las condiciones de operación que se presente. La levadura se mantiene en condiciones fisiológicas óptimas a temperaturas bajas (Wagner et al., 2009).

La temperatura que se encuentra durante la fermentación es de 50°C, la cual es perfecta para la generación de la autolisis. En esta etapa, la separación de la levadura es fundamental para la obtención de una cerveza de calidad y para la recuperación de la levadura (Wagner et al., 2009).

1.3.6 Levaduras utilizadas durante la fermentación alcohólica

La fermentación etílica se utiliza para la producción de vinos, cervezas y bebidas alcohólicas. Según los sustratos y las cepas en las fermentaciones por levaduras se logran obtener alcoholes como propanol, butanol, isobutanol, pentanol, así como ésteres, aldehídos, cetonas, aminas y compuestos de azufre (Marín, 2016).

Las bebidas alcohólicas se elaboran con productos vegetales con un índice alto en hidratos de carbono (Koolman y RÖhm, 2005).

Las levaduras que se encuentran en la superficie en la fermentación son muy activas, y crecen de manera rápida a 20 °C. Estas se sitúan en la superficie debido a la formación de agregados celulares y a la rápida generación de CO2, ocasionando el desplazamiento de las células de la levadura, por este motivo se les conoce como levaduras de superficie. Mientras que las levaduras que se encuentran en el fondo del tanque, no forman los agregados celulares, crecen de una forma más lenta y tiene una mayor actividad fermentativa a temperaturas más bajas que oscilan entre los 10° a 15°C (Frazier & Westhoff, 2000). Cuando la levadura entra en contacto con el mosto, se encuentra con carbohidratos, la cual se compone de alrededor 45% de maltosa, 15% maltotriosa, 10% glucosa, 5%sacarosa, 2% fructosa y 23% de dextrinas (Bamforth, 2008).

Las dextrinas son fermentables, los otros azucares utilizados son sacarosa, glucosa, fructosa, maltosa y maltotriosa. La sacarosa es hidrolizada por una enzima que es librada por la levadura al exterior de la célula. Posteriormente la glucosa y fructosa entran a la célula para ser metabolizadas, la maltosa y matotriosa también entran por acción de permeasas específicas (Bamforth, 2008).

La levadura de la cerveza tiene una mayor parte de nitrógeno que requiere para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos de los aminoácidos del mosto. Los responsables de la

captación de aminoácidos son una serie de permeasas. Se dice que los aminoácidos son trasminados o cetoácidos que se llegan a almacenar dentro de la levadura hasta el momento que se requieran, en ese momento serán de nuevo trasminados al correspondiente aminoácido (Bamforth, 2008).

Cuando la levadura es sembrada en el mosto, utiliza las reservas de carbohidratos que tiene para activar los primeros pasos del metabolismo, como lo es la síntesis de esteroles. Teniendo dos reservas principales, glicógeno y trehalosa, el primero tiene una estructura parecida a la fracción de amilopectina del almidón de la cebada y la trehalosa es un disacárido que está compuesto de dos glucosas unidas mediante un enlace α-1,1 entre los carbones reductores (Bamforth, 2008).

Las reservas de glicógeno, se acumulan en el proceso de la fermentación y es de suma importancia que sean conservadas en la levadura durante su almacenamiento entre fermentaciones. La trehalosa actúa como protección el estrés nutricional, al igual que ayuda a la levadura a sobrevivir en las condiciones deshidratantes que presenta en el almacenamiento y transporte como levadura seca (Bamforth, 2008).

Es de suma importancia sembrar la cantidad adecuada de levaduras, cuanto mayor sea la cantidad la velocidad de fermentación aumentara, hasta llegar al grado de que la cantidad sintetizada de nueva levadura sea declinada. El metabolismo de la levadura y la cantidad de s productos metabólicos, como el sabor de la cerveza se ve afectada por el grado de atenuación y la cantidad de crecimiento (Bamforth, 2008).

En general las levaduras de la cerveza, son resistentes al pH ácido (2.0-2.2), por tanto, la adición de ácido fosfórico hace disminuir el pH, siendo este un método efectivo para eliminar bacterias que, al paso de la fermentación, tras fermentación, contaminaría la levadura (Bamforth, 2008).

1.4 *Saccaromyces cerevisae*

Es una levadura que contiene el grupo de microorganismos asociado al progreso, su nombre deriva del vocablo *Saccharo* (azúcar), *myces* (hongo) y *cerevisiae* (cerveza). En el género *Saccharomyces,* la especie *cerevisiae* constituye la levadura y el microorganismo eucarionte más estudiado (Perdones, 2000). Estas levaduras son células elipsoidales a cilíndricas de 5-10 µm, como se observa en la figura 3 (Mallol, 2009).

Es un hongo ascomiceto unicelular que se divide asexualmente por gemación, además presenta un ciclo de vida sexual (Casadeús, 1995). Por ser un organismo eucarionte, como ya lo mencionamos anteriormente, es usado extensivamente como un modelo para la biología molecular, pues posee características típicas de un microorganismo, como es un corto periodo de tiempo de generación, no es patógeno y el más importante, es que permite hacer análisis genético (Lázaro, 2014).

En el cuadro 5 se observa detalladamente la clasificación taxonómica de la levadura *Saccharomyces cerevisiae.*

Cuadro 5. Taxonomía de la *Saccharomyces cerevisiae*

División	**Micophitas**
Clase	Eumycetos
Subclase	Ascomycetos
Orden	Endomycetales
Familia	*Saccharomycetaceae*
Subfamilia	*Saccharomycetoideae*
Género	*Saccharomyces*
Especie	*Cerevisiae*
Variedad	*Ellipsoideus*

Fuente: (J.A. Suárez Lepe, 2004).

Saccharomyces cerevisiae es por excelencia una levadura para la producción de cerveza, esta tiene vida sexual, en las condiciones de la producción, su forma de reproducción mediante gemación. La gemación se puede presentar hasta 20 veces, dejando cada vez una cicatriz, lo que nos indica su vejez (Bamforth, 2008).

La superficie de la pared encargada de envolver a la célula, está cargada negativamente debido a la presencia de grupos fosfato unidos a los polisacáridos de manosa localizados en la pared (Lázaro, 2014).

La membrana plasmática está compuesta de esteroles, ácidos grasos, proteínas (Bamforth, 2008). La *Saccharomyces cerevisiae* utilizan preferentemente monosacáridos como son la glucosa, la fructosa, la manosa y la galactosa, también disacáridos como maltosa e isomaltosa como fuente de carbono y energía (Perdones, 2000).

Hay una primera etapa en la utilización de estos azúcares, esta consiste en el paso a través de la membrana plasmática, siendo esta permeable a moléculas no cargadas de pequeño tamaño. Los azucares y la mayoría de los nutrientes no pasan libremente a través de ella. Por esta causa, la entrada de la célula necesita la acción de las proteínas integrales de la membrana, conocidas con el nombre de permeasas o transportadores. Toda la célula contiene transportadores de azucares (Perdones, 2000).

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene dos sistemas de transporte para los monosacáridos, que son la glucosa y la galactosa (Perdones, 2000).

Figura 5. *Saccharomyces cerevisiae* Fuente: (Syred, 2014)

El transporte de glucosa está conformado por un gran número de proteínas capaces de transportar glucosa y fructosa. Esta primera etapa catalizada de glicolisis, es la vía principal, de cual se obtiene energía en la levadura y en la velocidad de esta. Una de las estrategias que utiliza la levadura es regular estos transportadores, con el fin de adaptarse a ciertos cambios nutricionales (Perdones, 2000). En el cuadro 4, se observa cómo se compone una levadura.

Cuadro 6. Composición de la levadura

Componente (%)	S. cerevisiae
Materia seca	90%
Proteínas	45%
Fibra	2%
Grasa	0.5%
Cenizas	5%
Minerales	39%
Calcio	0.2%
Fósforo	1%
Magnesio	0.2%

Fuente: (Carrascoa, 2005).

Saccharomyces cerevisiae utilizada en la producción alimenticia contiene una cantidad considerable de ácidos grasos insaturables, además posee contenido de esteroles de distintos tipos moleculares y compuestos como lecitina (Wagner et al., 2009).

Los parámetros físicos de la fermentación de la *Saccharomyces cerevisiae* más importantes son, la temperatura, desde el punto de crecimiento de las levaduras en la fermentación, su temperatura óptima durante el crecimiento es 30°C (Carrascoa, 2005).

El pH de la *Saccharomyces cerevisiae* ronda de entre 2.75-4.2, los efectos que posee un pH bajo se debe a que incrementa el efecto toxico del etanol y del sulfito, así como

favorecen la hidrolisis de disacáridos y por tanto la fermentación. La tolerancia de pH ácido depende de la gran cantidad de iones de potasio en el mosto (Carrascoa, 2005).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ocupa en diversas industrias alimentarias, utilizando diferentes cepas específicas para la producción de pan, cerveza, vinos, producción de alcohol industrial y glicerol. Estas se destacan por su mayor eficiencia en la conversión de azúcares y su tolerancia a concentraciones elevadas de etanol, por este motivo es considerada el género fermentativo por excelencia en este proceso (Castilleja et al., 2015).

1.4.1 Bioquímica de las levaduras

Las levaduras son Los microorganismos más relacionados con el progreso y bienestar humano. Esto se debe a su capacidad de convertir eficientemente los azucares, como los que están en el mosto de frutas, cebada, otros cereales y leche en alcohol y CO2. Son microorganismos altamente usados por la microbiología industrial en bebidas fermentadas, pan, y algunas veces en glicerina y grasas, así como en todo el desarrollo de la bioquímica (Parés y Juárez, 2002).

Los hermanos Buncher, en el año de 1897, obtuvieron el primer extracto de levadura, el cual les permitió fermentar la glucosa sin presencia de células. Por este motivo, ese día tan importante en la ciencia fue el nacimiento de la bioquímica (Parés & Juárez, 2002).

Cagniard-Latour, en el año de 1837 demostró que la levadura se multiplica durante la fermentación alcohólica y quien atribuyó un origen vegetal, Schann la llamó “zuckerpilz”, mejor conocida como hongo del azúcar (Parés y Juárez, 2002).

Louis Pasteur propuso la existencia de los llamados fermentos formales, los cuales solo podrían actuar en las células de levadura vivas mientras que Liebig, creía que estos fermentos eran un material soluble y que un aspecto estructural de la vida no era de importancia para denostar sus efectos y propiedades (Bradley y Peter, 1892).

Generalmente las levaduras son aerobias, pero algunas veces son facultativas. Lo que determina el comportamiento aerobio de las levaduras es el suministro de oxígeno y la concentración de azúcar, mientras que en condiciones anaerobias es la velocidad de consumo del sustrato es mucho más alta (Parés & Juárez, 2002).

Los mecanismos de control que dan el rumbo al tipo de metabolismo de la levadura, ya sea por respiración anaerobia o por fermentación, dependerá fundamentalmente de la concentración de azúcar. Si existe gran concentración de azúcar provoca que la célula cambie en forma de fermentación, y que el piruvato se metabolice vía acetaldehído a etanol. Cuando hay baja concentración de azúcar, el piruvato pasa hacia acetil-coA y la cadena respiratoria. A este efecto se le conoce como Crabtree. Cuando existe una concentración elevada, no tiene la necesidad de generar tantas moléculas de ATP por molécula de azúcar, por otro lado cuando el suministro de azúcar es escaso, la levadura debe maximizar la eficiencia de utilidad de ese azúcar, dicho de otra manera, mediante

la vía fermentativa se generan 2 moléculas de ATP, mientras que la vía de la respiración se originan 32 moléculas por molécula de azúcar (Bamforth, 2008).

1.4.2 Países productores

Las 4 principales productores transnacionales de levadura son Gist Brocales (Holanda), SAF (Francia), Red Star (EE.UU) y Mauri (Austria) (Jaffé, 1994). Mientras que México, es el tercer proveedor de 22 productos a la Unión Europea, donde se encuentra la levadura, como se observa en el cuadro 7 (SAGARPA, 2014).

Cuadro 7. México es el tercer proveedor de agroalimentos

Aceites esenciales de naranja (5.4%)
Jugo de toronja (8.3%)
ld - Prep. Mezcla (7.3%)
Nueces pecanaeras (2.9%)
Levaduras vivas (16.6%)
Chicle con sacarosa < 60% (6.4%)
Levaduras vivas (12.5%)
Pan tostado (16.5%)

Fuente: (SAGARPA, 2014)

En 2008 se alcanza el mayor monto de exportación con 30.20 millones de dólares (mdd) para luego descender en 2009 a 16.55 mdd y en 2010 a 17.96 mdd. Para el año 2011 con 28.04 mdd. Este el 2013, con relación a 2003, representó un incremento del 400% en las ventas a la Unión Europea (Aguirre, y otros, 2013).

Estos productos tienen una mayor diversificación en cuanto a destinos de exportación con un menor peso relativo de los distintos países que realizan la importación. Así, Reino Unido participa con el 24%, Países Bajos 23%, Grecia 15.4%, España 12.3% y Francia 9%, en menor proporción participan Alemania (5.6%) y Bélgica (5%) (Aguirre, y otros, 2013).

México posee una relación bilateral con Brasil, en el comercio agroalimentario y pesquero, durante el periodo de 2008 a 2012, tuvo un déficit promedio de 86 millones de dólares, como se puede observar en el cuadro 8.

Cuadro 8. Balanza Comercial Agroalimentaria y Pesquera de México- Brasil

	Millones de dólares							TMAC (%)	Variación (%)
	2008	2009	2010	2011	2012	Ene-Jun	Ene-Jun	2008/2012	Ene-Jun 2012/2013
Balanza	-72	-119	-102	-52	-86		-37	-114	
Exportaciones	24	27	51	69	75	33.5	36	45	24.7
Importaciones	95	146	153	121	161	14.0	73	159	117.1
Comercio Total Agroalimentario	119	174	205	190	236	18.7	109	203	86.8

Fuente: (SAGARPA,2014)

Los principales productos de exportación que México tiene con Brasil, son las preparaciones alimenticias, tabaco, tequila, garbanzo, pectinas, chocolates, cervezas y levaduras (SAGARPA, 2014).

Al igual que Brasil, Cuba tiene una relación comercial con México, en el periodo del año 2012 tuvo un superávit de 48 millones de dólares, donde uno de sus principales productos de exportación fue la levadura (SAGARPA, 2014).

1.5 Cerveza

El termino *beer*, palabra en ingles que significa cerveza, proviene de la palabra latina *Bibere*, que quiere decir beber (Bamforth, 2008).

Desde hace 5,000-8,000 se ha llevado a la practica el arte de la elaboración de la cerveza (Hughes, 2006).

En la antigüedad, aproximadamente 6000 a.c, en la etapa de la civilización de Mesopotamia, la producción de cerveza ya era del dominio cotidiano de los pobladores, se dice que quizá esta difería de las actuales, pues se dicen que eran menos espesas, pobres en alcoholes, eran más dulces y ricas en proteínas. Otra civilización de cual se tiene registro que consumían cantidades importantes de cerveza, fue la civilización egipcia, enseñando este arte a otras más, tales como la griega y romana (Hughes, 2006).

En la etapa medieval, la cerveza se consumía en cantidades exorbitantes, esto se debía a que microbiológicamente era más segura, que consumir agua, ya que la cerveza pasa por el proceso de ebullición. Se dice que para el siglo XV, se introdujo por primera vez, lúpulo a la elaboración de la cerveza (Hughes, 2006).

Lo que permitió una extensión de la cerveza fuera del mediterráneo, fue su elaboración a partir de la cebada, un cereal que podía ser cultivado en muchos tipos de clima (Bourgeoi y Larpente, 2005).

Los maestros cerveceros y agremiados de la edad media, guardaban celosamente el proceso de la cerveza. Para la población era un misterio y un arte, ya que desconocían la razón de cada etapa y en qué consistía, como lo era la fermentación, pues fue descubierta por casualidad, el maltado consistía en la inmersión de la cebada en el agua, el cual producía la germinación. Todo esto se hacía, pero nadie sabía la explicación de cada uno de estos fenómenos (Lovisoay y Libkindb, 2018).

Mientras tanto, en México desde hace seis mil años y desde hace cuatro mil en la cordillera de los Andes se ha cultivado el maíz. Cultivo en el cual, el centro de Perú, desarrolló una cerveza, como símbolo de una ofrenda, llamada aca, esta era para ofrecérsela a su dios Viracocha creador de la divina pareja Sol-Luna. Este líquido de maíz fermentado, era la muestra de su agradecimiento por las bondades dadas por aquel dios (Lovisoay y Libkindb, 2018).

Se dice que la cerveza es una mezcla compleja, esto debido, no solo por los compuestos que aportan las materias primas utilizadas para su elaboración, sino a las diferentes etapas del proceso donde se producen numerosas reacciones e interacciones que se encargan de definir las características organolépticas de esta (Lovisoay y Libkindb, 2018).

Las materias primas utilizadas para la elaboración de la cerveza son la malta, el lúpulo, agua y algunas veces otros tipos de cereal. La malta es el resultado de la transformación de la cebada en la maltería. Esta parte de proceso de trasformación, comienza con una inhibición que rehidrata los granos, una fase de germinación controlada, originando la aparición de diversas enzimas, como la amilasas y proteasas, al final una desecación y un calentamiento breve o mejor conocido como torrefacción, que se encarga de estabilizar el grano de la malta y el contenido enzimático, encargados de llevar a cabo durante el malteado la hidrolisis de las moléculas de sacarosa del almidón que hay en la malta (Bourgeoi y Larpente, 2005).

El lúpulo juega en papel importante en la elaboración de la cerveza, es el encargado de contribuir al aroma, aportando el amargor, inhibe los contaminantes debido a sus propiedades antisépticas (Bourgeoi y Larpente, 2005).

El agua, por su parte influye de manera importante en la calidad de la cerveza, actuando en los procesos de extracción, transformación enzimática y precipitación. En la actualidad el agua es de ayuda para adaptar el tipo de cerveza que se desea producir (Bourgeoi y Larpente, 2005).

En comparación con otras bebidas alcohólicas, la cerveza es relativamente baja en contenido de alcohol, siendo el índice de porcentaje de alcohol por volumen indica en mililitros de etanol por 100 mL, o también llamada graduación media más alta, es de 5.1%ny la más baja de 3.9% (Bamforth, 2008).

1.5.1 Componentes de la cerveza

Espuma: Son sistemas coloidales, que se componen de una fase discontinua gaseosa y de una fase continua ya sea sólida o líquida. En la espuma de la cerveza, la cantidad de líquido retenido depende del tiempo, con la espuma más o menos húmeda rápidamente se seca, para formar una red esencialmente sólida de burbujas, a este proceso de secado de la espuma, se le llama drenaje, debido a que el líquido abandona la espuma, debido a la influencia de la gravedad (Baxter y Hughes, 2008).

Dulzor: Es una consecuencia de la presencia de carbohidratos residuales del en el producto final. La presencia de estos carbohidratos, pueden deberse a la malta o que sean añadidos a causa de los cebadores que se utilizan para la fermentación secundaria. Los azúcares que más se encuentran para el dulzor de la cerveza, son la fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa y maltotriosa (Baxter y Hughes, 2008).

Salado: La cerveza tiene un sabor salado a consecuencia de la presencia de aniones y cationes. La aportación de iones también es debida a las materias primas, como es el

caso de la malta. En la actualidad las industrias cerveceras cuentan con agua de distintas procedencias para estandarizar la calidad del agua recurren a la deionización y en algunas ocasiones a la decloración del agua que se ocupara antes de añadirle los iones necesarios (Baxter y Hughes, 2008).

Acidez: Los ácidos principales provenientes de la cerveza son el ácido carbónico, acético, láctico y acínico, estos ácidos se originan de las levaduras, estos dependen del vigor de la fermentación, pues liberan más ácidos cuando la fermentación es más vigorosa (Baxter y Hughes, 2008).

Amargo: Es una característica muy reconocida por aquellas personas que la consumen, este amargor se le atribuye en gran medida a un grupo de compuestos, iso-α-ácidos (Baxter y Hughes, 2008).

Aroma de la cerveza: Este aroma procede no sólo de cuando huele, sino también de la destilación de los volátiles de la cerveza cuando la ingerimos. A continuación, puntualizaremos las diferentes clases de componentes y su procedencia (Baxter y Hughes, 2008).

Sin duda alguna, la levadura es la influye de una manera mayor en el sabor de la cerveza debido a la producción de diversos compuestos que interactúan tanto de manera positiva y negativa en la calidad de la cerveza. Entre estos compuestos sobresalen los esteres, fenoles, alcoholes superiores compuestos sulfurados, aldehídos, cetonas y ácidos grasos entre otros (Lovisoay y Libkindb, 2018).

Ésteres: Existe un cierto número que influye en sobre los niveles de los componentes de los ésteres, tales como la gravedad especifica del mosto y la cantidad de oxígeno a la que se expone la levadura. La cepa de levadura es el factor principal que afecta la cantidad de esteres producidas, ya que algunas tienen la facilidad de generarse más que otras (Lovisoay y Libkindb, 2018).

Alcoholes: Los alcoholes superiores son producto del metabolismo secundario de las levaduras, generando altas concentraciones respecto a otros componentes volátiles, y como resultado dan un alto impacto en el aroma y el sabor de las cervezas. Los alcoholes superiores poseen dos carbonos y su peso molecular y punto de ebullición son mayores que los del etanol (Lovisoay y Libkindb, 2018).

Para la obtención de estos en la levadura dependerán de condiciones favorecedores, tales, como la aireación excesiva o la oxigenación, condiciones que pueden mejorarse si se aplica una presión durante la fermentación (Lovisoay y Libkindb, 2018).

Aroma de lúpulo: El lúpulo no solo juega un papel importante en el amargor de la cerveza, también en su tan peculiar aroma del lúpulo, provenientes de aceites esenciales. Es bastante complejo comprender de donde proceden los sabores, ya que el aceite esencial de lúpulo, contiene más de 300 componentes.

1.5.2 Contaminación microbiana y calidad de la cerveza

Las levaduras que contaminan a los alimentos, usualmente provocan cambios indeseables en los mismos. Estos cambios son de dos tipos, el primero es estético,

debido a la presencia física de las levaduras que dan turbidez o formación de una película en la superficie de los líquidos, la segunda es resultado del metabolismo de las levaduras que genera aumento de pH y aromas particulares (Bourgeois et al., 1994). Estos contaminantes microbianos, no solo afectan el sabor de la cerveza, pues también provocan turbidez a medida que aumenta el número de bacterias. Estos problemas microbiológicos se minimizan si hay una correcta higiene, limpieza, desinfección eficaz y una correcta esterilización (Baxter y Hughes, 2008).

En la cerveza hay 4 grupos que afectan más, los cuales son las Gram positivas, Gram negativas, levaduras salvajes, llamadas así porque estas no son introducidas en el proceso y otros hongos (Baxter y Hughes, 2008).

Las levaduras salvajes, especialmente las *Saccharomyces* salvajes alteran la cerveza, formando turbidez, además de atenuar la cerveza, metabolizando los azucares y produciendo mayor cantidad de etanol, así como dióxido de carbono. Mientras que las Saccharomyces no salvajes producen un conjunto de sabores extraños, que también generan turbidez y afectan la ruta fermentativa (Baxter y Hughes, 2008).

Estos hongos se generan cuando dispone de oxígeno y cuando se contamina con cerveza residual en los aparatos que no fueron debidamente limpiados. Otra forma donde se pueden generar, es dentro de las botellas mal cerradas, creciendo en la interface aire-cerveza. Las maltas también pueden generar hongos que dan lugar a toxinas peligrosas como las aflatoxinas y ocratoxina A (Baxter y Hughes, 2008).

La cerveza tiene la labor de impedir que se multipliquen microrganismos por su pH bajo, por su contenido en sustancias antisépticas en forma de alcoholes y de sustancias extraídas del lúpulo, por su baja temperatura a la que almacena, de igual forma durante todas las fases de su elaboración. La cerveza es un medio anaerobio y la mayoría de estas, pasan por una pasteurización y/o filtración (Frazier y Westhoff, 2000).

A pesar de todos los motivos por los que la cerveza debería estar exenta de presencia microbiológica, esta realmente se encuentra expuesta no solo a defectos por causas físicas y químicos, sino también a enfermedades causadas por el microorganismo (Garrido, 2014).

1.5.3 Tipos de cerveza:

La cerveza tipo Ale es aquella a la que se le añade lúpulo, las cuales son fermentadas con levaduras altas, estas son las que al final de la fermentación se van al fondo (ICA, 2014). Lagers, es una palabra alemana que significa guarda, o permanencia, y son aquellos tipos de cerveza que contienen levaduras bajas (ICA, 2014).

Esta clasificación de cervezas son de aquellas cervezas que han sido elaboradas a partir de lúpulo, agua, levaduras y cebada malteada con o sin adición de otros carbohidratos.

Ale: Estas se elaboraron con cervezas altas, anteriormente explicadas en que consisten.

1) Pale: Son consideradas cervezas claras, elaboradas con maltas pálidas, utilizan un lúpulo altamente aromatizante, tiene un sabor poco dulce.
2) Bitter: El sabor de estas son amargas, su término es utilizado por para las Pale ale.
3) Brown: Sabor amargo. Utilizan para su elaboración maltas que dan un color intenso, este es más dulce y con menor cantidad de lúpulo que las pálidas.
4) Mild: Estas se caracterizan por ser suaves.
5) Stout: Este tipo de cerveza son las más oscuras, algunas de ellas son intensamente amargas y algunas otras, son dulces.
6) Vinos de cebada: Son muy pálidas.

Lagers: Estás como ya mencionamos anteriormente, tienen la característica de ser fermentadas con levaduras bajas.

1) Pale (Hell o Plisher): Están elaboradas con una malta pálida, aromatizadas con lúpulo y perfectibles de sabor dulce.
2) Dark (Dunkel): Fabricadas con maltas oscuras, son más fuertes que las pálidas y algunas de estas son sutilmente dulces.
   Märzen, Bock: Estas solo se elaboran en ciertas épocas del año, son cervezas de gran fuerza.

Weissbier ,Weizenbien: La características de estas, es que son fabricadas con una mezcla de centeno malteado y de cebada, con el mosto hirviendo, sin agregarle el lúpulo y fermentándolo con levaduras bajas. Usualmente estas se beben acompañadas de zumo de fruta y/o rodajas de limón (Garrido, 2014).

Cervezas nativas africanas: Estas son elaboradas con sorgo malteado, algunas ocasiones se les agrega cebada malteada, el mosto no se hierve, ni se aromatiza con lúpulo, se sirven sin que pase por el proceso de clarificación y durante el proceso fermentativo (Garrido, 2014).

Figura 6. Tipos de cerveza Fuente: (CERVEMUR, 2018)

1.5.4 Composición típica de la cerveza

Hay tres ingredientes básicos utilizados para la elaboración de la cerveza, que son cebada, el lúpulo y el agua, pero además debemos tener muy en cuenta otros componentes como se muestra en el cuadro 10.

Cuadro 9. Componentes de la cerveza
Niveles típicos (g/100mL)

Ingredientes	Cerveza	Vino
Agua	92-95	85-91
Alcohol	2.5-3.5	9-14
Carbohidratos totales	1.5-3	0.1-6.0
Azucares libres	0.2	0.1-6.0
Proteínas totales, péptidos y aminoácidos	0.2-0.6	0.002
Lípidos	Despreciable	despreciable
Minerales	0.2-0.3	0.1-0.3
Vitaminas y otros micronutrientes	0.002	0.0003
Fibra	0.3-1.0	Despreciable
Polifenoles y compuestos de lúpulo	0.002-0.006	0.03-0.074

Fuentes: (McCance, 1996)

1.5.5 Características nutricionales de la cerveza

La cerveza es una fuente importante de los principales nutrientes que son carbohidratos, proteínas, fibra y vitaminas en comparación con otras bebidas. El contenido de vitaminas, es alto, igual que el de la leche, mientras que el contenido de grasa en la cerveza, es inferior a la de la leche (Baxter y Hughes, 2008).

1.5.5.1 Agua

La ingesta de agua, es crucial para mantener el equilibrio electrolítico entre los fluidos intracelulares del organismo y así, contrarrestar de la deshidratación. La cerveza se ha considerado como una forma agradable de aportar este líquido vital. Algunos estudios realizados, han arrojado que la cerveza es más eficaz que al agua para aclarar los riñones y ofrecer cierta protección contra los cálculos renales, esto debido a sus iones minerales (Baxter y Hughes, 2008).

1.5.5.2 Alcohol

Reino Unido comprobó que el consumo de cerveza recomendado, por departamento de salud son de 3 a 4 unidades diarias para el hombre y para la mujer son de 2 a 3. El consumo moderado de alcohol puede proporcionar claros beneficios para la salud. El consumo de alcohol se relaciona con un aumento de las lipoproteínas de baja densidad (HDL2, HDL3) y las lipoproteínas A-I y A-II que se consideran protectoras contra enfermedades coronarias, se han reducido muertes por enfermedades cardiovasculares, como ataques al corazón, reduce la formación de coágulos sanguíneos disminuyendo la concentración de fibrinógeno en el plasma sanguíneo, por la ingesta moderada de cerveza (Baxter y Hughes, 2008).

1.5.5.3 Carbohidratos

Los niveles de carbohidratos en la cerveza oscilan entre 2 a 3g/100mL, comprados con la leche, la cual tiene un valor de 5g/100 ml.

Las cervezas con carbohidratos de bajo peso molecular, contienen menos carbohidratos porque las dextrinas han sido digeridas más o menos completamente y fermentadas mediante una combinación de técnicas (Baxter y Hughes, 2008).

1.5.5.4 Proteínas, péptidos y aminoácidos

La cerveza posee un rango de 0.2 a 0.6g/mL. El origen de esta proteína, es la cebada malteada, la mayoría de estas proteínas de alto peso molecular, precipitan y se separan durante la fase de ebullición del mosto de la cerveza, mientras que los aminoácidos del mosto son captados por la levadura durante la fermentación, con este proceso la mayoría del material de la proteína de la cerveza se encuentra en forma de péptidos y polipéptidos, fáciles de digerir. La mayoría de las cervezas contiene los 20 aminoácidos esenciales, en un rango entre 5 y 10mg por cada 100g (Baxter y Hughes, 2008).

1.5.5.5 Lípidos

La cerveza es un alimento muy pobre en grasa, contiene solamente trazas de lípidos, Estos bajos niveles de lípidos son también importantes para la calidad de la cerveza, teniendo efectos deletéreos sobre la espuma y el sabor de la espuma, Tanto el alcohol como los carbohidratos se pueden transformar en grasa en el organismo si su consumo excede los requerimientos caloríficos (Baxter y Hughes, 2008).

1.5.5.6 Fibra

La cerveza contiene fibra dietética, esta se puede definir como los polisacáridos no amiláceos y dentro la cerveza estos se encargan de producir glucano de las paredes celulares de la cebada. Su contenido dentro de la cerveza es 0.3 y 1g/100mL, ayudando a un buen funcionamiento de intestino, estos –glucanos disminuyen los niveles del colesterol del suero sanguíneo, protegiendo contra enfermedades coronarias (Baxter y Hughes, 2008).

1.5.5.7 Valor energético

El valor energético entre casi todas las cervezas esta entre 20 y 40 kcal/100mL, siendo similar al valor de la leche. La mayor parte de la energía de la cerveza se deriva del alcohol, junto con los carbohidratos residuales y la proteína (Baxter y Hughes, 2008).

Las cervezas pobres de carbohidratos siguen conteniendo un valor energético relativamente alto, si el contenido del alcohol es significativo. Aquellas cervezas bajas en carbohidratos, calorías y en alcohol se les denomina Lite (Baxter y Hughes, 2008).

1.5.5.8 Minerales

El contenido de iones minerales en la cerveza es muy amplio, como era de esperarse en una bebida que está elaborada a base de agua. Los diferentes tipos de cerveza que han desarrollado a lo largo del mundo dependen del agua natural suministrada, debido a que los iones minerales pueden tener un efecto significativo sobre el sabor (Baxter y Hughes, 2008).

Una cerveza puede aportar el 10% de los minerales más importantes que son el potasio, calcio, magnesio y fósforo. El Ministerio de Agricultura Alimentos y Pesquerías de España indica que la ingesta de diaria de minerales es una media inferior de 10 a 20% (Baxter y Hughes, 2008).

1.5.5.9 Vitaminas y micronutrientes

La cerveza es una fuente de vitaminas, especialmente las del grupo B. Estas vitaminas se encuentran en alimentos naturales, las plantas y los cereales y germinados como la malta son una fuente especialmente buena (Baxter & Hughes, 2008).

Las cervezas preparadas que contienen aditivos no malteados, como arroz, maíz, generalmente contienen menos contenido de vitaminas, mientras que las hechas con pura malta se sitúan en el extremo más elevado (Baxter y Hughes, 2008).

1.5.6 Principales productores de cerveza

En México la producción de cerveza es de 105 millones de hectolitros anuales, y se dice que, en los próximos años, la producción llegará a 120 millones, después de que comience las operaciones en la planta de Cuauhtémoc-Moctezuma Heinken en el estado de Chihuahua y se sume la producción de la nueva planta de Grupo Modelo en el estado de Yucatán (Cerveceros de México, 2017).

Somos el cuarto productor y el primer lugar en exportación de cerveza a nivel mundial. Los estados que producen cerveza a nivel nacional como se puede observar en la figura 5 que van de mayor a menor son los siguientes: Zacatecas con 17%, Coahuila 14.6%, Ciudad de México 12.5%,Nuevo León 11.1%, Oaxaca 10.8%, Veracruz 7.8%, Sonora 7.8%, Baja California 5.3% y Estado de México 3.9% (Cerveceros de México, 2017).

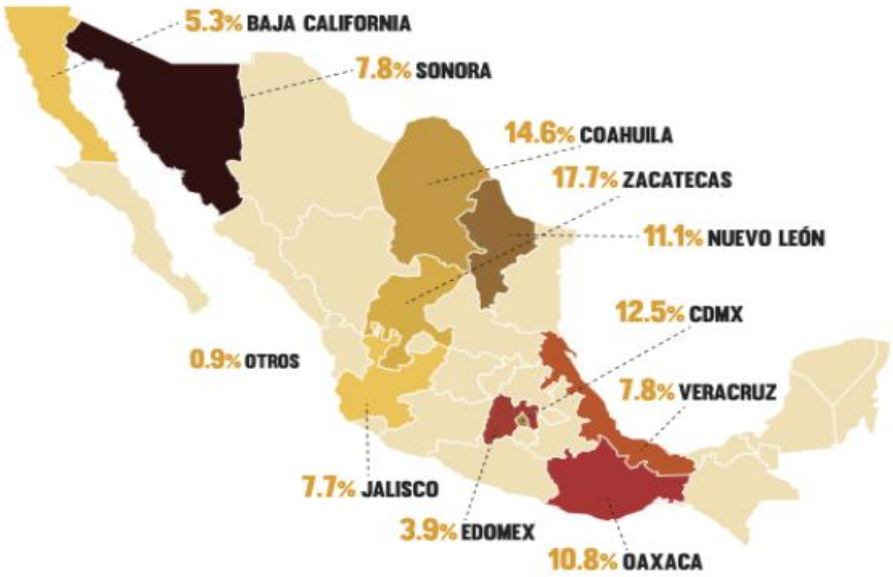


Figura 7. Estados productores de cerveza.
Fuente : (Cerveceros de México, 2017).

La cerveza y el extracto de malta es un producto agroindustrial significativo en exportación, gracias a sus saldos positivos de superávit como podemos observar en el cuadro 11 (Gobierno de México, 2019).

Cuadro 10. Principales productos agroindustriales exportados (millones de dólares)

Cerveza	Tequila y mezcal	Productos de panadería	Azúcar	Artículos de confitería sin cacao
674	248	187	125	111
Chocolate y otros preparados de alimentos con cacao	**Frutas en conserva**	**Jugo de naranja congelado**	**Carne de porcino**	**Extracto de malta**
97	95	92	90	64

Fuente: (Gobierno de México, 2019)

1.6 Fermentación

Desde hace más de 8 mil años el hombre ha desarrollado y utilizado las fermentaciones o procesos fermentativos, a pesar que no se conocía la existencia ni la influencia de los microorganismos en estos procesos (Hernández et al., 2013).

En el año de 1764 MacBride identificó al CO2 como el resultante de la fermentación. En 1789 Antoine Lavoisier determinó las cantidades de los elementos, carbono, oxigeno e hidrogeno que intervenían en la fermentación, mientras que en 1815 Gay-Lussac fue el primero en definir una reacción de fermentación logrando obtener etanol a raíz de la glucosa, aunque a pesar de este logro, aun eran desconocidos los fundamentos de toda la fermentación (Legarreta et al., 2014).

"La palabra fermentación proviene de la adaptación del término en latín fermentare, que significa ebullir" (Hernández et al., 2013).

Figura 7. Fermentación Fuente: (IATA, 2016).

Esta adaptación fue utilizada porque se describió lo que aparentaba ser una ebullición durante el proceso en la producción fermentativa del vino, por consecuencia de la producción de dióxido de carbono, este se liberaba en forma de burbujas, por este motivo se producía un ligero movimiento en el líquido (Hernández et al., 2013).

El concepto que conocemos de fermentación, al paso del tiempo se ha ido modificando, en la actualidad, este concepto abarca un número considerable de procesos, tanto tradicionales como industriales. A pesar de esto, para su decisión se utilizan dos criterios muy importantes, que son el microbiológico y bioquímico (Hernández et al., 2013).

Mientras que el concepto bioquímico de la fermentación, se define como un proceso, por el cual las sustancias orgánicas llamadas sustratos, pasan por una serie de transformaciones químicas conocidas como reducciones y oxidaciones, estas llegan a producir energía Hernández et al., 2013).

El concepto microbiológico de fermentación, es aquel proceso en el cual los microorganismos producen metabolitos o biomasa, a partir de utilizar algunas sustancias orgánicas, en presencia o ausencia de oxígeno. Los microorganismos producen enzimas, que son las encargadas de descomponer de los sustratos (Hernández et al., 2013).

La fermentación generalmente requiere condiciones anaerobias en las cuáles no existe el proceso de fosforilación oxidativa para mantener la producción de ATP por medio de glucolisis. En la fermentación el piruvato se va metabolizando en ácido láctico, etanol y dióxido de carbono en fermentaciones alcohólicas. No necesariamente las fermentaciones se llevan a cabo en medios anaerobios, sin embargo, algunas levaduras

llegan a obtener su energía mediante la fosforilación oxidativa, en esta se debe encontrar azúcares disponibles en el medio para su consumo. El sustrato más comúnmente utilizado en las fermentaciones son los hidratos de carbono, de esta los productos resultantes son el etanol, ácido láctico, lactato y dióxido de carbono. A pesar de esto, la fermentación puede llevarse a cabo mediante ácidos grasos, aminoácidos y bases nitrogenadas (Catillo, y otros, 2005).

Se define como una bebida o alimento fermentado cuando los componentes originales se han transformado o modificado por acción de uno o varios microrganismos, esto genera que su procesamiento tenga las características distintas al alimento original, como son su aroma y sabores que son agradables (Mendoza, 2013).

Generalmente para establecer una clasificación de la fermentación, se basa en el tipo de producto final que se obtiene y en la presencia o ausencia de oxígeno en el proceso (Catillo, y otros, 2005).

Los organismos utilizados para procesos de fermentación deben cumplir con la característica de ser capaces de crecer en el sustrato de forma rápida, tener un ambiente adecuado, cultivarse de forma sencilla y obtener en ella grandes cantidades (Vega, 2012).

Algunos beneficios en la ingesta de alimentos fermentados son, que existe una reducción en la intolerancia a la lactosa, por una menor concentración de lactosa disponible, la disminución de los niveles de colesterol en sangre, y causan una especie de efecto anti cáncer (Vega, 2012).

La temperatura optima de las levaduras, para realizar una multiplicación y fermentación adecuada es de 25°C. Para alcanzar esta temperatura durante la fermentación se requiere que el mosto, ya con un proceso de preclarificación, tenga una temperatura inicial de 15-18°C (Reinhard, 2006).

1.6.1 Fermentación primaria

Se encarga de llevar a cabo cada una de las transformaciones bioquímicas del mosto, específicamente la trasformación de los azucares en alcohol (Bourgeois & Larpent, Microbiología Alimentaria Fermentaciones Alimentarias, 1995). Es decir, la fermentación por la cual se permite a la levadura, bajo su crecimiento controlado, fermentar el mosto para producir alcohol y con esto el espectro de sabores (Bamforth, 2008).

1.6.2 Fermentación secundaria

La cerveza producida por la fermentación primaria necesita ser condicionada al contenido de dióxido de carbono deseado y su sabor refinado, es mejor conocido como fermentación secundaria (Bamforth, 2008).

Se desarrolla durante varias semanas a una temperatura de 1°C, en esta se presenta modificaciones bioquímicas, decisivas sobre el plano organoléptico que consisten en la desaparición de sustancias con aromas y sabores desagradables como acetaldehído, acetoína, acetolactato, diacetilo (Bamforth, 2008).

Los microorganismos contaminantes pueden ser el origen de defectos de fermentación o a causa de una mala conservación. El género *Saccharomyces* originan defectos de aromas que se relacionan con la producción de compuestos fenólicos a causa de decarboxilación de ácidos hidroxicicinámicos que se encuentran en el mosto y en la cerveza, por esto, es necesario controlar regularmente los fermentos y remplazarlos antes que estos contaminantes vayan aumentando y alteren al producto (Bourgeoi y Larpente, 2005).

1.6.3 Etanol

El etanol o alcohol etílico, cuya fórmula química es C_2H_5OH, es un compuesto orgánico, que es el producto de la transformación de los glúcidos por las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. El peso molecular de este es 46.07g. posee un poder energético de 29kJ g-1, que el organismo no tiene la posibilidad de almacenar a diferencia de otros elementos energéticos. El grado alcohólico esta expresado en % de alcohol volumen, este difiere según la vista, el país y su legislación (Manfred y Moll, 2006).

Después del consumo del alcohol o etanol, llega al hígado, donde se realiza una degradación metabólica. La cantidad de etanol absorbido en general, es más importante que la capacidad de degradación en el hígado. El excedente pasa a la circulación general, donde es el origen de la alcoholemia (Manfred y Moll, 2006).

Las células del hígado (parénquima hepático), se encargan de asegurar las funciones exocrina y endocrina del hígado implican tres vías para que ocurra el metabolismo oxidativo del alcohol (Manfred y Moll, 2006). En el plan de salud, el alcohol ingerido por el ser humano es la molécula más estudiada. No existe relación entre el consumo de alcohol y el peso corporal. Se dice que un bajo consumo de alcohol está asociado a la reducción del riesgo enfermedad coronaria del corazón, favorece la salud cardiovascular en general, mientras que un alto consumo conduce a riesgos de ataque hemorrágico, provoca cambios profundos en el metabolismo mineral de los huesos, quiere decir, que se reducen los minerales en los huesos (Manfred y Moll, 2006).

Las manifestaciones de comportamientos, bajo la influencia del alcohol es el resultado de la interacción entre el etanol y el sistema neuronal del cerebro, causando diferentes comportamientos, como reducción de la ansiedad, sensación de placer, sedación, incoordinación muscular, agresividad, alteración de cognición, y cambios en las interacciones sociales (Manfred y Moll, 2006).

Estudios epidemiológicos han demostrado que los consumos de bebidas alcohólicas aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de boca, de faringe, y de laringe, enfermedad del hígado, esteatosis hepática, hepatitis alcohólica aguda y cirrosis hepática (Manfred y Moll, 2006).

1.7 Micotoxinas

Desde la edad media se tiene conciencia de la existencia de las micotoxinas dada por la contaminación de los alimentos (Derache, 1990). El origen de la palabra micotoxinas es griego, que quiere decir *mikes* y *toxina*, que significa hongo y veneno correspondientemente (Castillo, 2009).

Las micotoxinas son consideradas moléculas pequeñas, ya que su tamaño es de alrededor de Pm<700. La mayor parte donde se encuentran estos metabolitos secundarios es en la cadena policetónica. La cadena general de esta es de tipo R-CO-CH_2-CO-CH_2-CO-CH_2-CO-CH_2-CO-SCoA, de la cual se deriva la mayor parte de las micoxinas. Son producidas por la mayoría de los hongos al final de la fase de crecimiento y durante la fase estacionaria como se muestra en la figura 7 (Castillo, 2009).

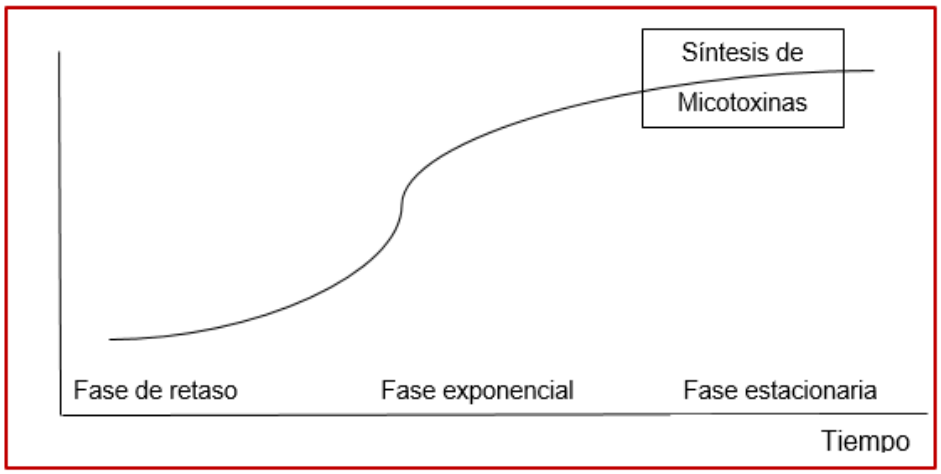


Figura 9. Fases de crecimiento fúngico y localización de las síntesis de micotoxinas (Castillo, 2009).

Las micotoxinas son aquellos metabolitos secundarios tóxicos con diferentes propiedades químicas, biológicas y toxicológicas, que son originadas por hongos toxigénicos, que se producen por medio de los productos vegetales (Castillo, 2009).

No todos los hongos producen micotoxinas, debido a que no todos son toxigénicos. Existen casi doscientas especies consideradas toxinogénicas, de las cuáles existen cepas que originan micotoxinas, mientras que hay cepas que no las producen o las producen en una cantidad mínima. El sustrato y las condiciones ambientales son muy importantes en su producción (Bourgeois et al., 1994).

Las micotoxinas pueden contaminar desde las materias primas, hasta los alimentos ya procesados, dando como resultado enfermedades y trastornos, mejor conocidos como *micotoxicosis,* siendo tóxicos tanto para el humano como para los animales. La presencia de estas micotoxinas en los alimentos, puede estar de forma individual o simultánea con otras, lo que puede provocar una mayor toxicidad (Castillo, 2009).

Las micotoxinas afectan principalmente a los granos usados como alimento animal y de ahí pasa a la carne, leche y huevos, el consumo de tales productos tiene consecuencias directas para los humanos, ya que son la base de su dieta (Mendoza, Alvarado, Pavía, Marrufo, & Malvido, Micotoxinas: ¿Qué son y cómo afectan a la salud pública?, 2017)

Las micotoxinas tienen una correlación por los lípidos, por este motivo se encuentran en la grasa de plantas y animales. Por lo general, las toxinas se clasifican de acuerdo a la especie fúngica de la que se aislaron, a su estructura química y al modo de acción. A pesar de esto, una sola especie puede producir varias toxinas y una toxina puede ser producida por diferentes especies fúngicas (Mendoza et al., 2017).

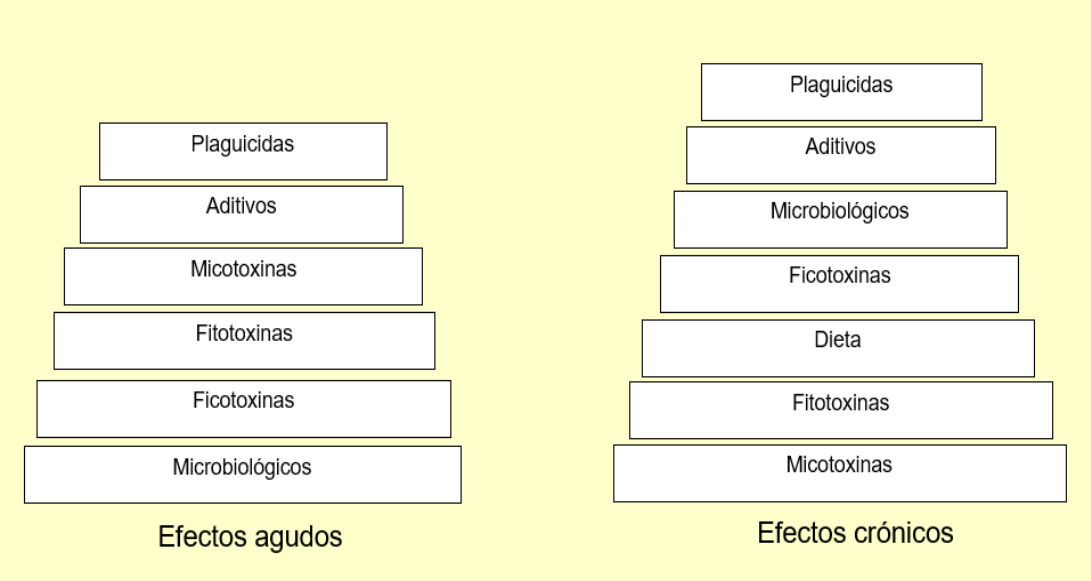
1.7.1 Toxicidad

Para todas las sustancias toxicas hay que distinguir intoxicaciones agudas e intoxicaciones crónicas, las primeras son producidas por la ingestión, una o varias veces, de una dosis relativamente elevada de micotoxinas, las crónicas resultan de la ingestión de pequeñas dosis repetidas a lo largo de un tiempo (Bourgeois et al., 1994).

Altos niveles de micotoxinas en la ingesta diaria, pueden causar efectos agudos y crónicos sobre la salud del hombre, así como una gran variedad de animales. Estos efectos pueden dañar distintos órganos, aparatos o sistemas, principalmente al hígado, riñón, sistema nervioso, endocrino e inmunitario (Derache, 1990). Los síntomas que presentan, pueden ser diversos, así como lo son sus distintas estructuras químicas. Se pueden clasificar en tres categorías a los efectos tóxicos de las micotoxinas, las cuales son teratogenicidad, mutagenicidad y cancerogenicidad (Castillo, 2009).

El riesgo de intoxicación aguda por micotoxinas en el hombre es bajo si lo comparamos con intoxicaciones de origen microbiológico o por contaminantes químicos, pero a diferencia de los contaminantes de origen antropogénico, aditivos alimentarios y plaguicidas, como se puede observar en el cuadro 12 (Castillo, 2009).

Cuadro 11. Riesgos para la salud humana



Fuente: (Castillo, 2009).

Las micotoxinas tienen un amplio espectro de efectos tóxicos fisiopatológicos, en los que sobresalen, los efectos sobre el sistema inmunitario, causando una disminución de las defensas en animales y en el hombre, aumentando la susceptibilidad a infecciones (Castillo, 2009).

Dependiendo el tipo de micotoxina, será el mecanismo de acción sobre el sistema inmunitario. Las micotoxinas también actúan sobre el metabolismo de glúcidos y lípidos, en los primeros actúan las ocratoxinas A, citrinina, aflatoxina B y rubratoxina, mientras que en los lípidos actúan las aflatoxinas ocratoxinas, citrinina, y tricotecenos. También llegan a causar efectos tóxicos en el tracto gastrointestinal, hígado, sistema nervioso, piel y en el riñón (Castillo, 2009).

La agencia Internacional de Investigación sobre el cáncer (IARC, International Agency for Research on Cancer) clasifica la toxicidad crónica de varias micotoxinas como carcinógenas o potencialmente carcinógenas, en el hombre, como se puede observar en el cuadro 13. el resumen de la evaluación realizada (Castillo, 2009).

- Grupo cancerígeno 1: El agente es carcinógeno en humanos
- Grupo 2A: agente probablemente carcinógeno en humanos; poca evidencia de humanos y muchos con animales
- Grupo 2B: Agente posiblemente carcinógeno; no hay suficiente evidencia ni en humanos, ni en animales
- Grupo 3: Agente no es clasificable como carcinógenos para humanos, por tal motivo no puede incluirse en otro grupo
- Grupo 4: Agente probablemente no es carcinógeno en humanos esto se comprobó de forma experimental en humanos y animales.

Cuadro 12. Clasificación de las micotoxinas

Micotoxinas	IARC
Aflatoxinas	1
Aflatoxina M1	2B
Citrinina	3
Esterigmatocistina	2B
Fumonisina B1	2B
Ocratoxina A	2B
Patulina	3
Toxinas derivadas de Fusariumgraminearum, F. culmorum, F. crookwellense (zearalenona, deoxinivalenol, nivalenol y fusarenona X)	3
Toxinas derivadas de Fusarium sporotrichioides (toxinaT-2)	3

Fuente (Castillo, 2009)

1.7.2 Hongos productores de micotoxinas

Existen hongos que tienen la capacidad para formar micotoxinas, sustancias dañinas cuya ingesta, inhalación o absorción cutánea causa enfermedades. Las micotoxinas son producidas principalmente por 5 tipos de hongos: *Aspergillus*, *Penicillium, Fusarium, Claviceps* y *Alternaria.* En el siguiente cuadro se muestran las toxinas producidas por estos géneros.

Cuadro 13. Hongos productores de micotoxinas

Hongo	Toxina
Aspergillus	Aflatoxinas Sterigmatocistina Ocratoxina A
Fusarium	Tricotocenos (DON, NIV, Toxina T2, DAS) Zearalenonas Fumonisinas Fusarina Moniliformina
Penicilium	Patulina Citrinina Ocratoxina A
Alternaria	Alternariol Ácido tennazónico
Claviceps	Alcaloides

Fuente (Mendoza et al., 2017).

1.8 Ocratoxina A

En el año de 1965 Van der Merwe, detectó en alimentos elaborados sobre la base de maíz contaminado, cepas de *Aspergillus ochraceus*, causando muerte de pavos, ratas y ratones, consiguiendo aislar un nuevo tipo de micotoxina, llamado ocratoxina A (OTA) (Castillo, 2009).

Las ocratoxinas son micotoxinas producidas por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillum.* La más toxica de estas, es la ocratoxina A, está formada por una dihidroisocumarina unida por el grupo 7-carboxilo a una molécula de L-β-fenilalanina por medio de un enlace amida (Castillo, 2009).

Las ocratoxinas tienen un anillo de fenilalanina y otro de isocumarina, de las cuales, la que es considerada más peligrosa es la ocratoxina A (Bourgeois et al., 1994).

El arroz, maíz, centeno trigo, cebada y avena son los que poseen mayor presencia de OTA, debido a la facilidad con la que se contamina por hongos toxigénicos durante la cosecha, el secado y el almacenamiento. Además, estos cereales son la base de la alimentación en todo el mundo (Castillo, 2009).

En las bebidas alcohólicas donde se presenta la OTA, es en la cerveza y el vino. Los valores en la cerveza están entre los rangos de 0.0012 y los 0.0662 ng/ml. En el proceso del malteado de cerveza, no presenta una estabilidad establecida, esto se debe a las grandes oscilaciones en las perdidas de OTA entre las diversas etapas de su proceso (Castillo, 2009).

En la cebada la OTA se degrada durante el proceso de malteado y en la fermentación final de la cerveza, detectándose la presencia de OTA lo que nos indica que la actividad de las peptidasas, producidas en el proceso del malteado originan la degradación de las micotoxinas. Durante el proceso de la elaboración de la cerveza, los cereales pasan por condiciones acuosas con temperaturas hasta de 90°C, dando como resultado reducciones del 50 al 90%. A pesar de ser considera, que la mayor fuente de OA es en cereales, se ha determinado que los productos de cerdo son también una fuente importante de esta (Castillo, 2009).

1.9 Micotoxicosis

La ocratoxina A es una micotoxina nefrotóxica, cancerígena, hepatotóxica, teratogénica e inmunotóxica (Coli y Castro, 2015). La principal micotoxicosis en humanos sin duda es la nefrotoxicidad (Gimenos y Martins, 2011).

Es soluble en disolventes orgánicos y ligeramente soluble en agua. Es absorbida en el tracto digestivo, especialmente en el intestino delgado y de ahí es transportada a través de la sangre, principalmente a los riñones y en una menor cantidad se introduce en el hígado, en la grasa y en músculos (Coli y Castro, 2015).

La carcinogénicidad que presenta la ocratoxina A la ha clasificado en la categoría 2B, es decir, como posible carcinógeno humano por la Agencia Internacional de Investigación

contra el Cáncer (IARC). La exposición a alimentos contaminados con OTA se ha relacionado con evidencias epidemiológicas de cáncer testicular debido a la formación de aductos con el ADN inducidos por la acción de este genotóxico (Abreu et al., 2011).

1.9.1 Aspectos legislativos de las micotoxinas y normativa vigente

Existen diversos factores que influyen en las autoridades para fijar los límites y reglas sobre las micotoxinas, en las cuales sobresalen la evaluación del riesgo, distribución de la micotoxina en el producto y procedimientos de muestreo, disponibilidad de métodos de análisis, la política económica y disponibilidad de alimentos (Castillo, 2009).

A nivel mundial, 99 países tienen reglamentos en los alimentos y/o en las proporciones que se deben ingerir de micotoxinas. Estos pases representan el 87% de la población total. En la figura 8 muestra la mundial con reglamentos vigentes para las micotoxinas, hasta el año 2003, que fue realizada la última evaluación de esta (FAO., 2003).

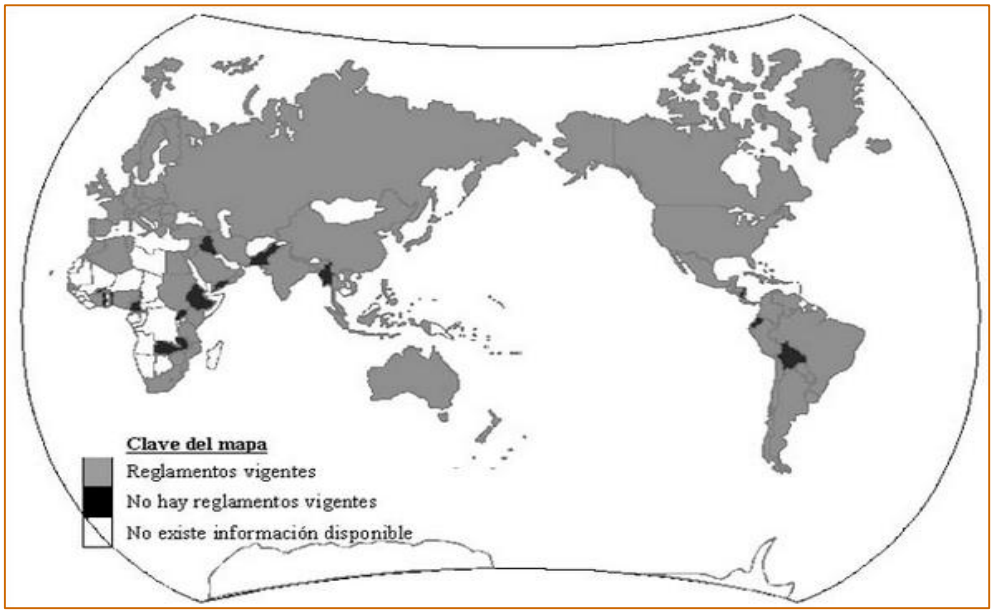


Figura 10. Países con y sin reglamentos para las micotoxinas. Fuente: FAO 2003

En el cuadro 15, podemos observar los mohos y micotoxinas considerados de importancia mundial. Una micotoxina se considera importante cuando se demuestra que posee la capacidad de tener efectos en la salud de las personas y la productividad de animales en distintos países (FAO., 2003)

Cuadro 14. Hongos y micotoxinas de importancia

Especie de moho	Micotoxinas producidas
Aspergillus parasiticus	Aflatoxinas B_1, B_2, G_1 Y G_2
Aspergillus flavus	Aflatoxinas B_1 y B_2
Fusarium sporotrichioides	Toxina T-2
Fusarium graminearum	Desoxinivalenol Zearalenona
Fusarium moniliforme (F. verticillioides)	Fumonisina B_1
Penicillium verrucosum	Ocratoxina A
Aspergillus ochraceus	Ocratoxina A

Fuente: (FAO., 2003)

1.9.2 Normas y legislación de Ocratoxina A:

En el 2005 fue publicado el ultimo reglamento comunitario de la Unión Europea, donde se advierte de la futura implantación de los máximos niveles en alimentos como el café, cerveza, frutos secos, vinos, cacao, especias y productos cárnicos. En el cuadro 16 se observa los niveles máximos de ocratoxina A permitidos en algunos (Europea, 2005).

Cuadro 15. Niveles máximos admitidos de Ocratoxina A en la alimentación humana

Productos	Ocratoxina A: Contenido Máximo (µg/kg)
Ocratoxina A	
Cereales (incluidos el arroz y el alforfón) y productos derivados de los mismos.	
Cereales en grano sin trasformar (incluido el arroz sin transformar y el alforfón).	5.0
Productos derivados de los cereales (incluidos los productos transformados a base de cereales y los cereales y los cereales en grano destinados al consumo humano directo).	3.0
Uvas pasas	10.0
▪ Café tostado en grano y café tostado molido, con excepción de café soluble	5.0
▪ Café soluble	10.0
▪ Vino (tinto, blanco y rosado) y otras bebidas a base de vino y/o mosto de uva	5.0
▪ Zumo de uva, ingredientes de zumo de uva en otras bebidas, incluido el néctar de fruta y el zumo de uva concentrado reconstituido	2.0
▪ Mosto de uva destinados al consumo directo	2.0
Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	0.50
Café verde, frutos secos distintos de las uvas pasas, cerveza, cacao y productos del cacao, vinos de licor, productos cárnicos.	-

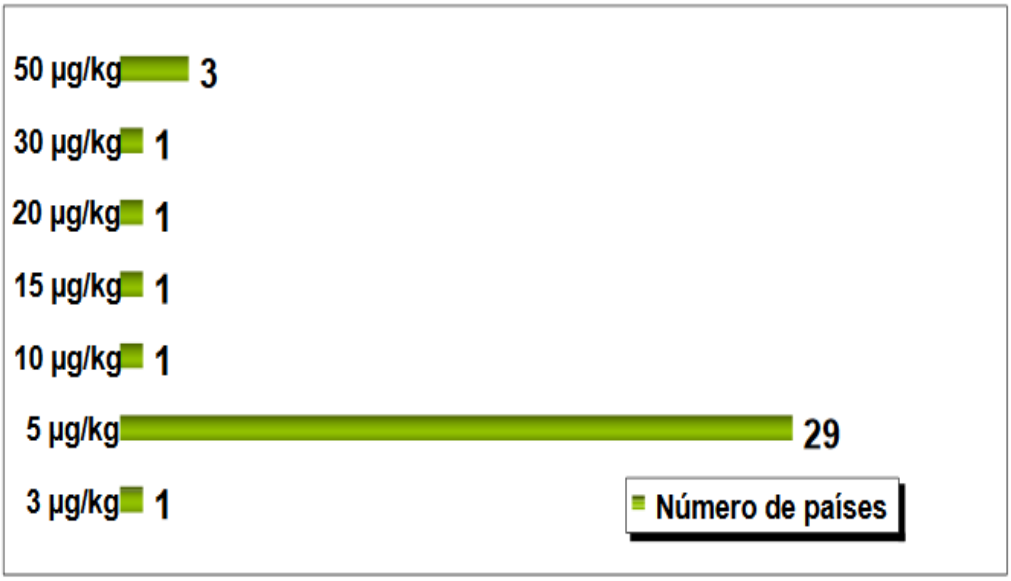
Fuente: (Europea, 2005)

Estos niveles, máximos permitidos entraron en vigor, a partir de los alimentos elaborados el 1 de abril del 2005 (Europea, 2005).

En once países se han desarrollado reglamentos sobre la OA, en general las concentraciones permitidas varían entre 1 a 50 mg/kg en alimentos y de 100 a 1000 µg/kg en piensos. El comité mixto, integrado por FAO Y OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios, han recomendado que la ingesta semanal tolerable de OA es de 100 ng/kg de peso corporal, lo que es equivalente a 14 ng diarios por kg de peso corporal (FAO., 2003).

Diversos países han fijado límites para la ocratoxina A en cereales como se puede observar en el grafico 17. En la unión Europea el límite es de 5µg/kg, que se encuentra en el pico dominante de la gráfica.

Figura 11. Límites a nivel mundial para la ocratoxina A en los cereales y en productos a base de cereales



1.9.3 Codex alimentarius

La Comisión del Codex Alimentarius (CCA), apoyada por la FAO y la OMS, facilitan el comercio mundial, así como salva guardar la salud de los consumidores, por medio de la creación de normas internacionales tanto para alimentos como para raciones. Hoy en día esta comisión cuenta con 168 países. Dentro de esta comisión existe el Comité del Codex para Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos (CCFAC), que se encarga de establecer normas para los aditivos y los contaminantes en los alimentos, estas normas conllevan los análisis de riesgos según las reglas y métodos que se encuentran estipulados en el Manual de Procedimientos del Codex y en la Norma General del Codex para Contaminantes y Toxinas en los Alimentos (FAO., 2003)

1.10 Ingeniería genética:

En la actualidad vivimos la tercera revolución industrial. La primera revolución fue a causa de la aplicación de nuevas fuentes de energía, con la máquina de vapor, la segunda evolución llegó con la transferencia de la teoría de la información a los procesos industriales y finalmente la tercera revolución es la científico-técnica, e involucra principalmente a la robótica, la computación y a la ingeniería genética (Muñoz et al., 2004).

El siglo XX estuvo lleno de logros importantes en el conocimiento del funcionamiento de los seres vivos, quedó en claro que todos tenemos en común un tipo de macromoléculas orgánicas, las cuáles son denominadas ácidos nucléicos (ADN ácido desoxirribonucléico y ARN ácido ribonucléico), los cuales constituyen el elemento más importante de la biología .Desde ese hallazgo, se han obtenido mejor y más útiles herramientas biológicas, que han permitido grandes avances, dando lugar a una nueva rama de la ciencia biológica, llamada ingeniería genética o Tecnología del ADN recombinante (Ferri et al., 2003).

La ingeniería genética, principalmente involucró tres procesos de transmisión hereditaria que son la duplicación, transcripción y la traducción, al igual que el estudio de tres macromoléculas que son el ADN, ARN y el de las proteínas (Muñoz, y otros, 2004).

La ingeniería genética es el conjunto de técnicas que permiten la recombinación de del ADN en el laboratorio, esta parte de la manipulación directa de los genes o segmentos de ADN, segmentos que codifican específicamente, y en sus mecanismos de expresión. La manipulación y recombinación presentada se lleva a cabo por el código genético que permite usar enzimas de restricción para cortar una determinada secuencia de ADN de cualquier origen, generando sitios idénticos y complementarios, con el objetivo de modificar organismos genética (Muñoz et al., 2004).

1.10.1 ADN

Se tuvo conocimiento de los ácidos nucleicos desde hace más de 70 años, después de un tiempo se tuvo la sospecha de que ADN podría ser el material genético cuando se manifestó su elevada concentración en cromosomas y en algunos virus, pero el comprobarlo no fue una tarea sencilla por su alta asociación de proteínas. La mayor cantidad de ADN de las células animales se aloja en el núcleo, en donde es la constitución principal de los cromosomas, mientras que la mayor cantidad de ARN se encuentra en el citoplasma (Montgomery et al., 1999).

El ADN nuclear se encuentra en forma de una doble hélice estrecha de tan sólo 2nm de ancho, esta doble hélice está plegada y forma complejos con proteínas (Montgomery et al., 1999).

1.10.2 Dogma central

El ADN tiene dos funciones principales, que son la replicación y la expresión. El ADN debe tener la capacidad de autorreplicarse de tal forma, en que se transmita fidedignamente a la descendencia. Mientras que la información debe resultar útil (Montgomery et al., 1999).

El proceso de expresión se realiza mediante ARN, el cual actúa como molde para la síntesis de todas las proteínas del organismo. Las relaciones entre ADN, el ARN y las proteínas se expresa en el dogma central (Montgomery et al., 1999).

1.11 Técnica PCR

Uno de los avances más importantes que se ha hecho en los últimos años, dentro del campo de la biología molecular, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Castro, 2005).

En 1985, la tecnología de la PCR desarrollada por Kary Mullis revolucionó la biología molecular, este ganó el premio Nobel de Química en 1993 (Castro, 2005).

En este método, se encuentra involucrada una enzima presente en un microorganismo, que vive en aguas termales, la bacteria es llamada *Thermus aquaticus (*Taq*)*, esta hace sintetizar una infinidad de copias de ADN, a partir de una cantidad mínima inicial de este, para poder detectar visualmente la amplificación del producto. La particularidad que tiene esta ADN polimerasa, es que tiene la capacidad de ser termoestable a altas temperaturas (95°C), que permite la extensión sucesiva del DNA sin parar las actividades en los ciclos sucesivos de la elevación de la temperatura (Fonseca et al., 2010).

La PCR se encarga de copiar millones de veces una secuencia de ADN, las cuales requieren de un molde o ADN matriz, llamados primers, los cuales se encargan de delimitar la zona de ADN que deseamos copiar, los nucleótidos que son adicionados a la nueva cadena y la enzima de ADN Taq polimerasa encargada de hacer síntesis química (Fonseca et al., 2010).

En esta técnica no importa que cantidad de sustrato se parte, ya sea de una célula, una copia de ADN entre otros, ya que, si el número de ciclos de polimerización o síntesis es la adecuada, se tendrá una cantidad de producto elevado, ya que se trata de una amplificación (Fonseca et al., 2010).

La amplificación exponencial de pequeñas cantidades de material genético hace que esta técnica sea útil para diagnosticar enfermedades infecciosas y parasitarias, clonación de genes, generación de cantidades grandes para la secuenciación de ADN, mutaciones, expresión diferencial de genes entre más técnicas de manipulación y análisis de ADN y ARN (Castro, 2005). La PCR es un procedimiento importante en la tecnología genética (Koolman y Rohm, 2005).

1.11.1 Fundamento

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es un método que permite la amplificación in vitro de fragmentos de ADN a partir de una cadena de ADN molde. Esta técnica utiliza la capacidad de un oligonucleótido para hibridar con una zona específica de ADN, lo que genera la extensión de la cadena del nucleótido, en una reacción catalizada por una ADN polimerasa. Al seleccionar los nucleótidos complementarios a determinadas secuencias de las dos hebras del ADN a estudiar, de una forma que se delimite una región de interés, se puede obtener de manera exponencial una amplificación del número de copias de esa región, como se observa en la figura 9 (Roca et al., 2003).

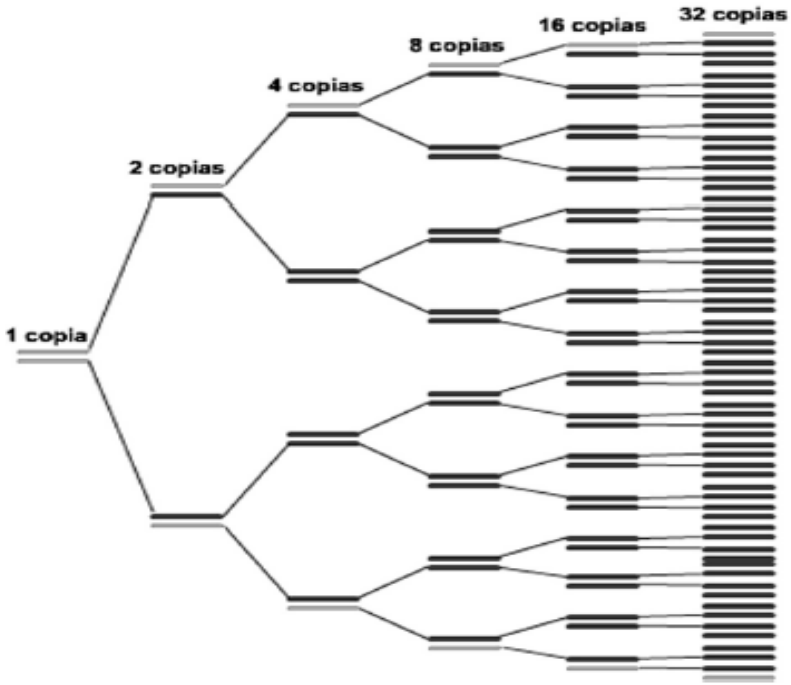


Figura 12: Representación del principio de amplificación del número de copias de una región de interés por el método de PCR (Roca et al., 2003).

1.11.2 Etapas de la reacción

La reacción en cadena de la polimerasa, contiene etapas, que cumplen diferentes funciones. Algunas de estas etapas se dan una sola vez, mientras que otras se repiten n número de veces, originando los ciclos de amplificación (Roca et al., 2003).

Desnaturalización inicial:

Esta es la primera etapa, en donde hay un aumento en la temperatura y se realiza solo una vez. La muestra de ADN se desnaturaliza para originar hebras simples. El calentamiento inicial que presenta es a unos 95° C, durante un tiempo de 3 a 5 minutos, tiempo necesario para desnaturalizar completamente el ADN genómico, el cuál en las

condiciones en las que tiene lugar la reacción, ya no vuelve a su estado original (Roca et al., 2003).

Hibridación:

La etapa siguiente es la hibridación, en donde se reduce la temperatura del medio para que pueda darse la unión de los primers a sus dianas en el ADN. La temperatura en esta etapa se determina empíricamente, según las características de los primers y suele oscilar entre 50C° y 60°C. La temperatura es seleccionada de manera que el procedimiento tenga la mayor especificidad y sensibilidad (Roca et al., 2003).

Las bajas temperaturas aumentan la sensibilidad del proceso, favoreciendo la unión de los primers al ADN, al mismo tiempo que la especificidad disminuye resultando uniones erróneas, mientras que las altas temperaturas disminuyen la sensibilidad y genera mayor especificidad (Roca et al., 2003).

El resultado de la buena unión de los primers va a depender del número de copias del ADN y del tiempo que sea suficiente para que ocurra la unión de la secuencia complementaria (Roca et al., 2003).

El tiempo de hibridación de los primers es de 20 a 40 segundos, aunque depende del tipo de termociclador que se vaya a utilizar para la PCR (Roca et al., 2003).

Elongación:

La temperatura del medio se incrementa hasta alcanzar la mejor temperatura para el funcionamiento de la ADN polimerasa, en el caso de la Taq polimerasa, esta temperatura se encuentra alrededor de los 72°C. Usualmente da buen resultado la utilización de tiempos de elongación que van desde 20 segundos (Roca et al., 2003).

Desnaturalización:

Las etapas de la hibridación, la extensión y la desnaturalización se repiten número de veces, hasta alcanzar la amplificación deseada, a la hora de diseñar el programa de ciclos dentro del termociclador debemos tomar en cuenta la temperatura de polimerasa que es en un rango de 90°-95°C, y sobre pasar este rango puede provocar daños que causan la incorporación errónea de los nucleótidos. Al igual que un número excesivo de ciclos puede ocasionar que los ciclos finales falte alguno de los sustratos de la reacción en el medio, como primers y dnTPs (Roca et al., 2003).

En esta etapa las hélices de ADN formadas se separan por aumento de la temperatura que va al redor de 90°C a 95°C. La desnaturalización suele ser más corta que la primera y va a depender del diseño de cada PCR (Roca et al., 2003).

Elongación final:

Comúnmente, tras el último ciclo se añade un periodo de incubación a 72°C en un lapso de tiempo 5 a 12 minutos, para permitir que se complete la elongación de los productos que se encuentren parcialmente sintetizados (Roca et al., 2003).

1.11.3 Ventajas y desventajas

Ventajas que presenta esta técnica molecular es que es altamente específica, altamente sensible. No requiere el aislamiento del agente infeccioso, permite un diagnóstico rápido (Negroni, 2009).

La principal ventaja de la PCR es que permite generar millones de copias de la región de interés a partir de una o muchas copias de ADN molde. Esta técnica es muy amplia debido a la gran capacidad de los oligonucleótidos de unirse específicamente a sus secuencias complementarias de ADN discriminando fácilmente entre centenares de muchos sitios (Serrato y Flores, 2014).

Otra ventaja de la PCR en la clonación es la rapidez y sencillez de uso, pues la PCR permite clonar ADN en pocas horas, con ayuda de equipos relativamente pocos sofisticados. Se utiliza un termociclador que lleva un microprocesador para programar los cambios de temperaturas y el número de ciclos deseados (UNED, 2000).

Cuando se refiere a la ventaja de la sensibilidad es que la PCR puede amplificar secuencias a partir de cantidades pequeñas de ADN. Esta sensibilidad ha permitido el desarrollo de nuevos métodos para el estudio de la patogénesis molecular y en la aparición de numerosas aplicaciones en la ciencia forense, estudios paleontología entre otras, donde las muestras pueden tener muy pocas células. Una consecuencia de la sensibilidad tan elevada significa que se deben tomar las medidas necesarias para tratar de no contaminar la muestra con un ADN extraño (UNED, 2000).

La robustez, permite la amplificación de secuencias específicas de material que contiene ADN muy degradado o incluido en un medio que hace problemática su purificación. Esto resulta acertado para estudios de antropología (UNED, 2000).

Algunas de las desventajas que presenta son los falsos positivos y negativos, tecnología costosa, no siempre están estandarizadas, resultados no siempre son reproducibles, los resultados positivos no indican algunos gérmenes viables (Negroni, 2009).

El tamaño corto de los productos de la PCR, pues a diferencia de la clonación de ADN en células, donde se pueden clonarse secuencias, la información que se tiene sobre la mayor parte de las secuencias clonadas por PCR sitúa el tamaño de los fragmentos clonados, tendiendo hacia el extremo inferior, conforme van creciendo se hace más difícil obtener una amplificación eficiente (UNED, 2000).

Otra desventaja es la necesidad de estandarizar la técnica para el organismo o la técnica de interés, esto puede llegar a ser tardado y costoso (Serrato y Flores, 2014).

1.11.4 Aplicaciones de la PCR

La PCR es la técnica con mayor importancia en la biología molecular porque con ella se ha conseguido la simplificación e innovación de otras técnicas moleculares que permiten abordar nuevas líneas de investigación en muchas ramas de la ciencia como lo son la biotecnología, ecología, evolución, biología de la conservación, arqueología, medicina forense entre muchas más (Serrato y Flores, 2014).

La amplificación en cadena de la polimerasa se utiliza para encontrar el material genético de un agente infeccioso en una muestra clínica y para identificación de aislamientos (Miles, 1998).

Otras aplicaciones de la PCR son los diagnósticos de paternidad biológicas y parentesco biológico, la identificación de vestigios biológicos tales como sangre, semen, saliva, raíces de cabello, tejidos, piezas dentales entre otras, utilizadas en procedimientos penales (UNED, 2000).

1.11.5 Diseño de Primers

La genética utiliza la informática como herramienta con múltiples aplicaciones para su desarrollo. Aparte de los programas de uso común como procesadores de texto, bases de datos, hojas de cálculo, programas de gráficos o de estadística, navegadores, existen diversos programas que son específicos que se utilizan en la rama de la genética, permitiendo el estudio de las secuencias de ADN. El diseño de primers, permite encontrar enzimas de restricción (Escrig, 2003).

Los primers son necesarios debido a que el ADN polimerasa no es capaz de incorporar nucleótidos a una cadena sencilla de ADN, sino que requiere de una región de doble cadena precedente para comenzar la síntesis. Los primers son secuencias de DNA monocatenario de pequeño tamaño, generalmente oscilan de entre 15 y 30 pares de bases, con regiones de ADN molde cerca a cada uno de los extremos del fragmento de interés para su amplificación (Roca et al., 2003).

Los primes se diseñan a partir del conocimiento de la secuencia que se quiere amplificar. Estos se deben de seleccionar de manera en que evite la complementariedad de bases entre los propios primers, o entre éstos y secuencias del ADN de regiones distintas a las que se quiere estudiar, pues esto puede causar la aparición de productos muy distintos a los que deseamos (Roca et al., 2003).

Un aspecto importante en el diseño de primers es el valor de su temperatura de fusión, mejor conocida como Tm, esta sirve de referencia a la hora de fijar una temperatura de hibridación (Roca et al., 2003).

La Tm de ambos primers deben muy similares, no deben poseer más de 5°C de diferencia con la Tm del producto que se va a amplificar, si se cumple esto, va a garantizar temperaturas de alineamiento similares para ambos primers y una eficiencia de amplificación adecuada (Salazar et al., 2013).

La Tm aumenta según la longitud del iniciador, si un iniciador se encuentra por debajo de los 18 nt hibridaría de forma inesperada en la cadena molde y originaría productos que no son específicos. Mientras que los indicadores muy largos requieren de Tm superiores a 65°C, por esto, la longitud óptima está entre los 2 y 30 nucleótidos, para que se encuentren en un rango de Tm de 50° y 65°C, compatible con la amplificación general de los fragmentos (Salazar et al., 2013).

Para calcular la Tm hay muchos tipos de métodos, pero todos toman en cuentan la concentración de nucleótidos de la guanina y la citosina, así como la longitud del primer y la concentración de Na (Salazar et al., 2013).

1.12 Electroforesis

En las distintas biomoléculas el rasgo que más las diferencia es la carga que presentan y que estas cambian en función del pH que presenten en el medio que se encuentran (L & Wilson, 1981).

Estas biomoléculas pueden ser aminoácidos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos, estos comparten que son grupos ionizables (Wiliams y Wilson, 1981).

En general, las biomoléculas presentan grupos ácidos y básicos débiles, lo que establece que el signo de la carga, ya sea negativo o positivo dependa del pH y de constitución de la disolución en la que se encuentre. Por este motivo se han desarrollado diversos métodos, uno de los más utilizados ha sido la electroforesis (Roca et al., 2003).

Existen muchos tipos de electroforesis, lo que difiere en cada una de estas es los distintos tipos de medios de soporte, los geles de celulosa son usados para moléculas de bajo peso molecular como lo son los aminoácidos y los carbohidratos, los geles de poliacrilamida y agarosa se ocupan para moléculas de mayor peso molecular (ADN, RNA y proteínas) (Segal y Ortega, 2005).

Los geles utilizados en la electroforesis pueden ser horizontales, verticales o cilíndricos (capilares). Las condiciones electroforéticas cambian, por ejemplo, la electroforesis de zona necesita un amortiguador a pH constante durante el tiempo de separación. La electroforesis de un gel discontinuo se utilizan dos diferentes geles, uno concentrador y el otro separador, estos geles son preparados con amortiguadores de diferente fuerza iónica, pH y tamaño de poro (Segal y Ortega, 2005).

1.12.1 Fundamento

La electroforesis es el desplazamiento de partículas cargadas bajo un campo eléctrico, de forma en que las moléculas con carga positiva se desplacen al cátodo que es el electrodo con carga negativa, mientras las moléculas con carga negativa se desplazan al ánodo que es el electrodo con carga positiva. La velocidad de este desplazamiento se encuentra determinada por las características de la biomolécula que se desplaza, la intensidad del campo eléctrico y las características del medio donde se origina este desplazamiento. La velocidad que presenta el desplazamiento de una molécula cargada es el resultado de una fuerza impulsora del movimiento, que es de tipo electrostático (Roca et al., 2003).

Por consiguiente, la electroforesis es una técnica que permite separar moléculas con carga neta y que muestran diferencias de carga, forma y tamaño. Por medio de esta

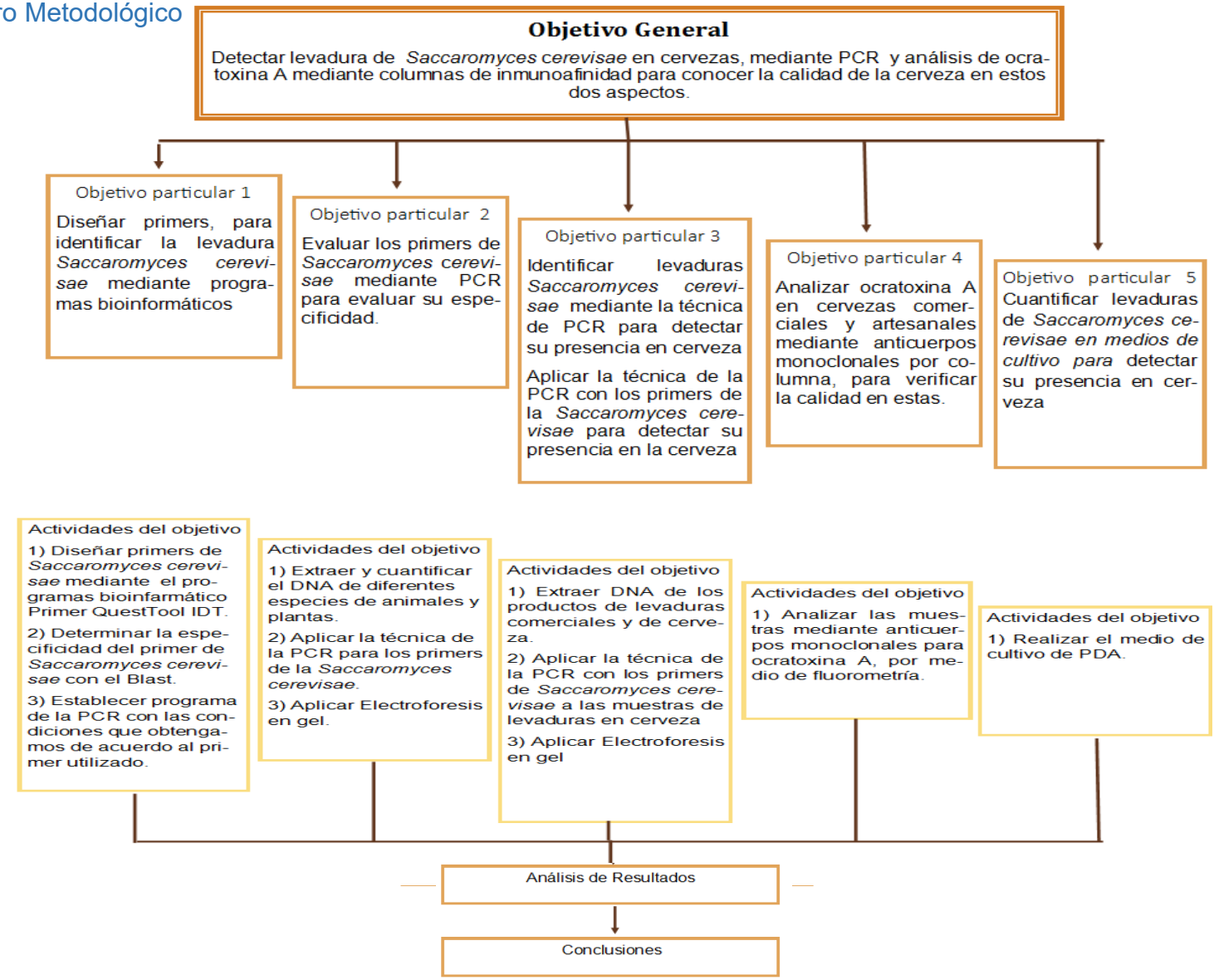
técnica puedes separarse proteínas, ácidos nucleicos, péptidos, nucleótidos, aminoácidos entre otros (Roca et al., 2003).

Los ácidos nucleicos tienen una relación entre masa y carga, la cual es constante, pues todas las unidades de los nucleótidos tienen una masa similar y cada una de ellas tienen una carga negativa (Miriam Aidé Castillo Rodríguez, 2005). El desplazamiento de estas moléculas, además de depender de su carga, también depende de del tamaño y la forma de moléculas (Castillo, 2005).

Las principales variables que intervienen en la electroforesis son el voltaje del campo eléctrico, la concentración del gel de agarosa, el tiempo de los pulsos, la temperatura a la que se encuentra, la fuerza iónica del amortiguador. Debido a estas condiciones favorecerá el desplazamiento de las moléculas de distintos tamaños (Puerta y Ureña, 2005).

Capitulo II

2.1 Cuadro Metodológico



2.2 Objetivos:

2.2.1 Objetivo General:

Detectar levadura de Saccaromyces c*erevisae* en cervezas, mediante PCR y analizar ocratoxina A mediante columnas de inmunoafinidad para conocer la calidad de la cerveza en estos dos aspectos.

2.2.2 Objetivos Particulares:

Objetivo particular 1: Diseñar primers, para identificar la levadura *Saccaromyces cerevisae* mediante programas bioinformáticos.

Actividades del objetivo:

1) Diseñar primers de *Saccaromyces cerevisae* mediante el programa bioinfarmático Primer Quest Tool IDT.
2) Determinar la especificidad del primer de *Saccaromyces Cerevisae* con el BLAST
3) Establecer programa de la PCR con las condiciones que obtengamos de acuerdo al primer utilizado.

Objetivo particular 2: Evaluar los primers de *Saccaromyces cerevisae* mediante PCR para evaluar su especificidad.

Actividades del objetivo:

1) Extraer y cuantificar el DNA de diferentes especies de animales y plantas
2) Aplicar la técnica de la PCR para los primers de la *Saccaromyces cerevisae*
3) Aplicar Electroforesis en gel.

Objetivo particular 3: Identificar levaduras *Saccaromyces cerevisae* mediante la técnica de PCR para detectar su presencia en cerveza

Aplicar la técnica de la PCR con los primers de la *Saccaromyces cerevisae* para detectar su presencia en la cerveza

Actividades del objetivo:

1) Extraer DNA de los productos de levaduras comerciales y de cerveza
2) Aplicar la técnica de la PCR con los primers de *Saccaromyces cerevisae* a las muestras de levaduras en cerveza
3) Aplicar Electroforesis en gel

Objetivo particular 4: Cuantificar levaduras de *Saccaromyces cerevisae en medios de cultivo para* detectar su presencia en cerveza

Actividades del objetivo:

1) Realizar el medio de cultivo de PDA

Objetivo particular 5: Analizar ocratoxina A en cervezas comerciales y artesanales mediante anticuerpos monoclonales por columna, para verificar la calidad en estas.

Actividades del objetivo:

1) Analizar las muestras mediante anticuerpos monoclonales para ocratoxina A por medio de fluorometría

2.3 Justificación:

La levadura de la cerveza es rica en contenido de vitaminas, por lo que ha sido empleada como fuente de vitaminas del complejo B y en el tratamiento de afecciones cutáneas en humanos. Esto es debido a que el contenido de vitaminas hidrosolubles de la levadura está determinado por el sustrato o fuente de carbono que poseen (Wagner et al., 2009).

El consumo de 20g de levadura cubre buena parte de del requerimiento de vitaminas de complejo B. Superando incluso a alimentos como leche, queso y carnes (Wagner et al., 2009).

Por lo mencionado anteriormente se realizó una metodología rápida basada en la cadena de polimerasa (PCR), para la detección de *Saccharomyces cerevisiae* en cerveza, debido a que esta en consumo moderado aporta algunos nutrientes para el cuerpo humano y eleva el sistema inmune.

Esta técnica de la PCR se llevó acabo con el uso de diferentes cervezas tanto nacionales como internacionales, que fueron elaboradas de forma artesanal y a nivel industrial. La presencia de levaduras en la cerveza, evitan la necesidad de la fermentación maloláctica bacteriana, reduciendo el riesgo asociado de bacterias del deterioro en caso de un proceso no controlado.

Cuando no hay una adecuada inocuidad desde la cosecha de la cebada hasta la elaboración de la cerveza, pueden desarrollarse hongos micotoxigénicos que producen toxinas que en cantidades arriba de los límites permitidos pueden causar daños a la salud.

Es por esta razón que fue importante determinar la concentración de Ocratoxina A que puede estar presente en las diferentes cervezas consumidas en nuestro país. Ya que estas poseen efectos tóxicos fisiopatológicos, en los que sobresalen, los efectos sobre el sistema inmunitario, causando cáncer en riñón, disminución de las defensas en humanos y animales, aumentando la susceptibilidad a infecciones.

Capítulo III Metodología

3. Materiales y Métodos

Para poder realizar lo establecido en el cuadro metodológico, se necesitaron diversos tipos de cerveza, nacionales, extranjeras, comerciales y artesanales. En el cuadro 17 se observan las 18 diferentes cervezas.

Cuadro 16: Cervezas

Nombre	Tipo de cerveza	Procedencia
Siete siente siete	Lager	Ciudad de México
Rey de diamantes	Ale	México
Victoria	Viena	México
Indio		México
Erdinger Dunkel		Alemania
Guinness Draught	Stout	Irlanda
La Trappe	Dubbel	Holanda
Dos equis	Lager	México
Sohnfeld London	Porter	Estado México
Iron Maiden Trooper	Light Brigade	Reino Unido
Ingrata Tentación	Amber Stout	Oaxaca, México
Oaxaca de noche	Stout	Oaxaca, México
Blue Moon	Belgian White	Estados Unidos
Tecate original		Monterrey, N.L
Hopulencia	American IPA	Oaxaca, México
Inextremis	RYE IPA	León, Guanajuato
Porifirio	Porter	Oaxaca, México
H y P	Doble IPA	México

3.1 Diseño de primers:

Los primers que amplificaron para la levadura *Saccaromyces cerevisae* fueron diseñados mediante el programa Primerquest Tool y se verificaron en la base de datos bioinformática GenBank de National Center of Biotechnology Information NCBI).

La metodología detallada del diseño de primers se encuentra en el anexo 1. Los primers fueron seleccionados de acuerdo a su longitud y que amplificaron exclusivamente para *Saccaromyces cerevisae.* Las secuencias se observan en el cuadro 18.

Cuadro 17. Secuencia de primers diseñados de levadura *Saccaromyces cerevisae*

Primer	Secuencia	Amplificado
PF	CTTGAGGCTAGGAGCGTTATTC	564 Pb
PR	CCTCCACCTCGTTTCTTAGTTC	

3.2 Metodología de la extracción de DNA:

Las diferentes muestras de cerveza, se colocaron en tubos eppendorff, se centrifugaron 10ml a 14 rpm, durante 10 minutos. Esto se repitió en varias ocasiones hasta que se logró sedimentar un poco la cerveza, para continuar con la extracción de ADN.

Cuadro 18: Reactivos y materiales para la extracción de ADN

Reactivos	Material y Equipo
Agua desionizada libre de nucleasas	Agitador Vortex, Genie K 55 G
Solucion de Lisis Tris base 50 mM, NaCl 250 Mm, SDS 0.3%, EDTA 0.1M)	Juego de micropipetas, Rainin
Enzima proteinasa K	Termoblock, thermomixer compact eppendorff
Mezcla fenol cloroformo alcohol isoamílico	Microcentrifuga, Minispin plus eppendorf 14 000 rpm
Buffer de Lavado Etanol 70%)	Mini centrifuga manual FUGEVET
	Tubos eppendorf esterilizados
	Gradilla magnética de separación
	Balanza analítica electrónica, Coleparmer PR410 Equipar
	Mortero con pistilo
	Espatula
	Puntas para Micropipetas esterilizadas

Disgregación del tejido

1. Se vertió la muestra en un nuevo tubo de eppendorff
2. Adicionando 1250µL más de solución de lisis
3. Se adiciono 7 µL de enzima Proteinasa K
4. Se incubaron los tubos 50° C en el termoblock por 2 horas
5. Se elevó la temperatura de termoblock a 60°C por una hora, con el fin de desactivar la enzima

Desnaturalización de proteínas y polisacáridos

1. Se adiciono 250µL de la mezcla fenol cloroformo-alcohol-isoamílico para desnaturalizar y desprender las proteínas
2. Se centrifugaron las muestras en la microcentrifuga a 10 000 rpm durante 10 minutos, a una temperatura ambiente para obtener dos fases, una fase está formada principalmente de lípidos y proteínas y una fase es acuosa, la cual es de nuestro interés ya que el componente es el ADN
3. La fase acuosa situada en la parte superior se recuperó y se colocó en un nuevo tubo de eppendorf esterilizado

Precipitación de ADN

1. Se adicionó 1500µL de etanol frio a cada tubo
2. Se agitó suavemente
3. Se centrifugó a 10 000rpm durante 10 minutos
4. Se decantó el etanol y se dejó secar el ADN en la incubadora a 37°C por una hora
5. Se adicionó 50µL de agua desionizada para re suspender el ADN
6. Se dejó a 20°C hasta su utilización

3.3 Metodología para la cuantificación de DNA:

Después de obtener el material genético, es importante conocer la concentración mediante espectrofotometría. La ley de Beer Lambert indica que la concentración de una molécula en una solución depende de la cantidad de luz absorbida de las moléculas disueltas. En ADN genómico tiene una densidad óptica que equivale a 50 µg/ml. Se debe considerar el factor de dilución para obtener la concentración en nanogramos microlitro(ng/µL). Las concentraciones menores dificultan la estandarización de la PCR u otras técnicas. Para determinar la pureza del ADN se considera la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280nm

La proporción 1.8 indica que el ADN es puro, mientras que proporciones menores a este valor, nos dicen que hay presencia de proteínas mientras que valores de 2, muestran la existencia de preparaciones puras de ARN (Sambrook, 2008)

Cuadro 19: Reactivos y materiales para cuantificación de ADN

Reactivos	Materiales y Equipos
Muestras de ADN del material extraído cervezas)	Espectrofotometro, Abccesolab NanoDrop ND-1000
Agua libre de nucleasas	Tubos eppendorff
	Micropipetas Rainin
	Parafilm

1. Se utilizó el equipo Spectrophotometer Nanodrop1000, seleccionando la opción ácidos nucleicos.

2. Para calibrar el espectrofotómetro, se colocó 2µL de agua libre de nucleasas, posteriormente se seleccionó la opción ok.
3. Se limpió, y se colocó nuevamente 2 µL de agua libre de nucleasas y se tomó el registro como el blanco.
4. Se limpió el equipo y se colocaron 2µL de la muestra de ADN a analizar, se seleccionó la opción measure se dejó correr el programa y se esperó la lectura
5. Se registró la relación 260-280 y la concentración en ng-µL para determinar la pureza del ADN.

3.4 Metodología de la PCR:

Los primers antes de ser utilizados, deben ser hidratados a una concentración de 25 µM.

Cuadro 20: Reactivos para PCR

Componente	Cantidad µL
Go taq	12.5 µL
H2O	11 µL
PF	0.25 µL
PR	0.25 µL
ADN	1 µL
Volumen total	25µL

Las cantidades mostradas en el cuadro 2º son por muestra, dependiendo el número de muestras que se realizaran, se multiplica cada una de las cantidades ya establecidas y se van colocando una a una en un tubo de eppendorf

1. Se colocó en la centrifuga manual por 10 segundos para una mejor homogenización del tubo eppendorf
2. Se dividió el volumen final, agregando 24µL de reacción a cada tubo eppendorf previamente identificado
3. Posteriormente se agregó 1µL de ADN de las diferentes cervezas
4. Para el blanco, no se añade muestra de cerveza, si no agua libre de nucleasas

Etapas y ciclo de la reacción

Programa de la PCR:

Para el programa de la PCR utilizado para la identificación de levaduras *Saccaromyces cerevisae* se siguieron las recomendaciones de Go taq, así como de la Tm específicamente calculada para los primers de levaduras que se explica detalladamente en el anexo 2.

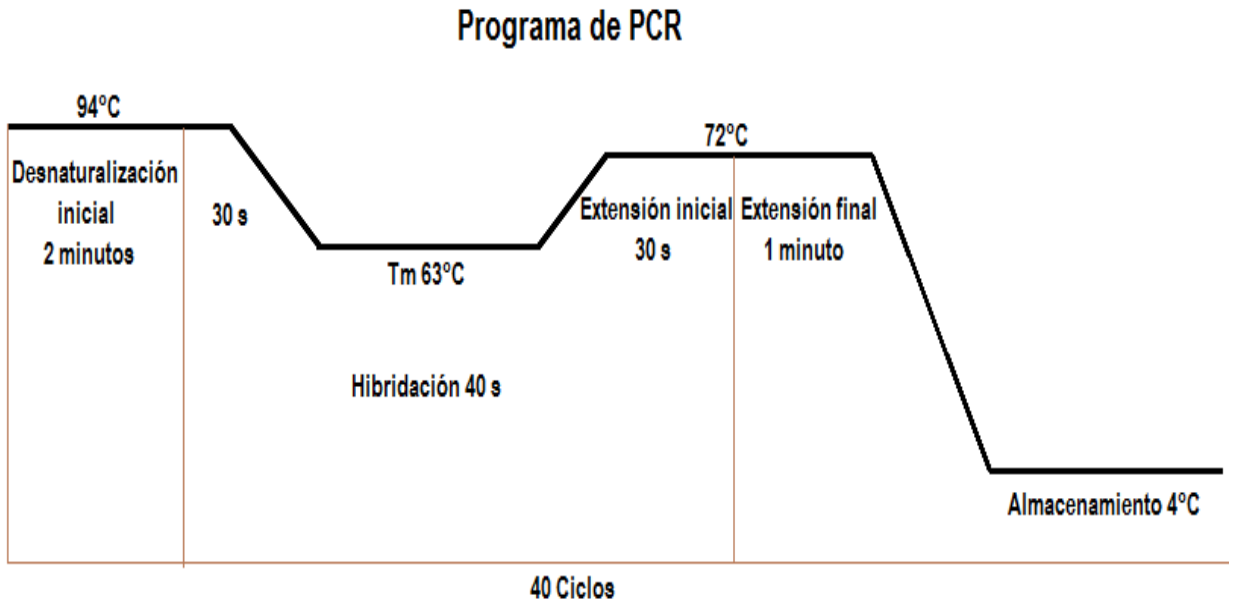


Figura 13: Programa de PCR para el promotor *Saccaromyces cerevisae*

5. Se programó en el termociclador con el programa con las condiciones ya definidas de la PCR
6. Se colocaron los tubos eppendorf en el termociclador
7. Se esperó alrededor de 2 horas para el termino del programa

3.5 Metodología para la electroforesis en gel de agarosa (gel al 3%)

Cuadro 21: Reactivos y materiales para electroforesis

Reactivos	Material y Equipo
Agarosa	Matraz Erlenmeyer de 200 ml
TAE 1X, como solución Buffer pH8	Balanza analítica electrónica
Bromuro de etidio BrET	Horno de microondas
Colorante blue-orange	Micropipetas
Marcador de peso molecular 100pb	Parafilm
Muestras de las reacciones de PCR	Gradillas
	Cámara y casette de electroforesis
	Equipo de fotografía para luz UV

1. Para la preparación del gel de agarosa se pesó 1.5g de agarosa en una balanza analítica en un matraz Erlenmeyer.
2. Se agregó 50mL de TAE 1X.

3. Se calentó la mezcla en el microondas 1 min por espacios de 20 segundos, hasta que la agarosa se disolvió por completo.
4. La solución se enfrió lo necesario y se le agrego una gota de bromuro de etidio BrEt y se agito para disolverlo.
5. Se vertió de manera que no formara burbujas en el soporte de la cámara de electroforesis colocando el peine para la formación de los posillos.
6. Se dejó gelificar la agarosa para retirar el peine
7. Se añadió TAE 1X a la cámara de electroforesis hasta que se cubrió el gel

Carga y corrida del gel

1. Se colocó en un pedazo de parafilm 3µL de bromuro de etidio, 3µL de colorante blue-orange y 1.5µL de marcador de peso molecular
2. Posteriormente se colocó 3µL de bromuro de etidio, 3µL de colorante blue-orange y 5 µL del producto de la PCR
3. Las tres gotas puestas en el parafilm, se mezclaron con ayuda de una micropipeta
4. Posteriormente cada una de las muestras se fueron colocando en los pocillos correspondientes
5. Se cerró la cámara de electroforesis, se conectó a la fuente de poder y se cargó a 60V
6. La corrida se dio por terminada hasta que el colorante pasa tres cuartas partes del gel.

Visualización de los geles de agarosa

1. Una vez concluida la migración de fragmentos de ADN, el gel se colocó en la base del transliminador de la luz UV.
2. Se encendió la cámara fotográfica y la lámpara de luz UV del foto-documentador, se enfocó la imagen y se tomó la fotografía del gel.

3.6 Metodología de medios de cultivo

Para la preparación de medios de cultivo se necesitaron pesar los siguientes reactivos:

Cuadro 22: Reactivos del medio de cultivo

Gramos	Reactivos
29.25 g	Papa dextrosa agar
0.5 g	Agar bacteriológico
750 ml	Agua destilada

1. Se pesó 29.25g de papa dextrosa agar en una balanza analítica.
2. Se agregó 100ml de agua destilada.
3. Se fue agitó poco a poco el matraz, hasta que quedó completamente disuelto el agar papa.

4. Se agregó 0.5 agar bacteriológico, se agito hasta quedar disuelto.
5. Se agregó 650 ml de agua destila restante.
6. Se metió el medio de cultivo al autoclave alrededor a 120°C durante 20 minutos, con el fin de esterilizarlo.
7. Posteriormente se vacío los medios de cultivo en las cajas Petri.

Figura 14: Preparación de medios de cultivo (Elaboración propia)

8. Se dejaron los medios de cultivo durante 24 horas a temperatura ambiente, con la finalidad de ver que no estuvieran contaminados.

3.7 Conteo de levaduras:

Para llevar a cabo esta metodología, se ocuparon las siguientes cervezas

1) Ingrata Tentación
2) H y P
3) Iron Maiden
4) Oaxaca de noche
5) La Trappe
6) Blue Moon
7) Sohnfeld
8) Inextremis
9) Hopulencia
10) Erdinger Dunkel
11) Porfirio
12) Tecate

Figura 15: Cervezas (Elaboración propia)

1. En condiciones estériles se fue agregando 1ml de la muestra de la cerveza correspondiente en los medios de cultivo de agar papa
2. Se incubo los medios de cultivo durante 48 horas, después de ese lapso de tiempo, se llevó a cabo el conteo de las levaduras

3.8 Metodología de determinación de presencia de ocratoxina A:

1. Se tomó de cada una de las botellas de cerveza 5 ml.

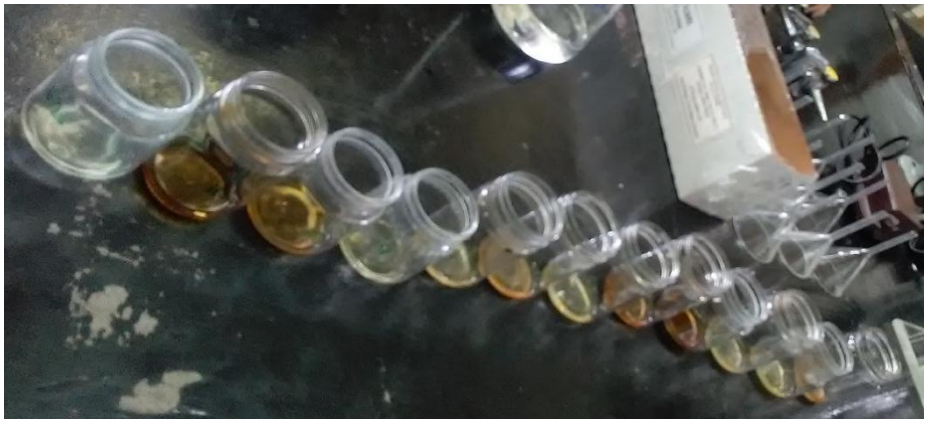


Figura 16: Cervezas para el análisis de micotoxinas (Elaboración propia)

2. Se le agregó 1 ml (Solución con NaCl al 1.5% y bicarbonato al 2%) a cada uno de los 5ml de cerveza

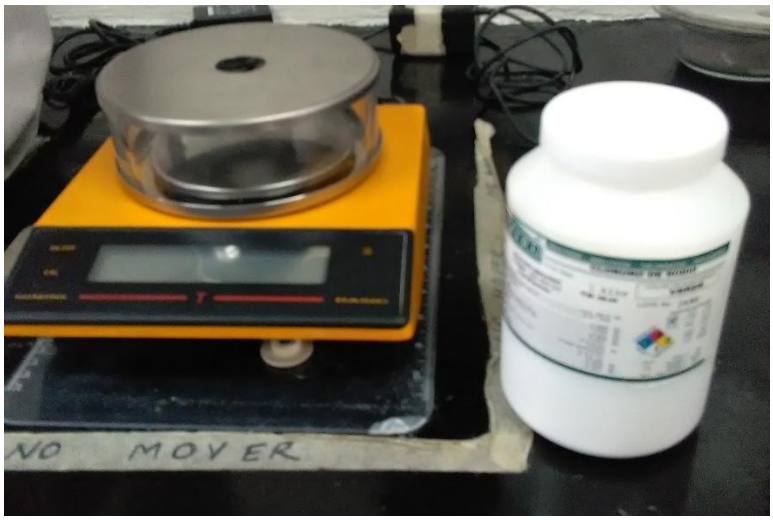


Figura 17: Peso de reactivos (Elaboración propia)

3. Se montó columnas monoclonares y las bombas, y se pasaron 6ml de las muestras con la solución mencionada anteriormente.
4. Se dejó pasar toda la cerveza por las columnas y quedó dentro de frascos

Figura 18: Columnas monoclonales (Elaboración propia)

5. Se lavó con 1 ml de la solución que contenía 5g de NaCl y 0.5% de bicarbonato en 200 ml de agua destilada.
6. Posteriormente se agregó 10 ml de agua destilada por las columnas monoclonares
7. Se retiraron los frascos de cada cerveza, después se pusieron tubos de cristal.
8. Se agregó 1.5 ml de revelador ocratest.
9. Al término de su paso por las columnas se llevó al fluorometro.
10. Previamente se calibró.
11. El fluorometro nos dió la lectura de la cantidad existente de ocratoxina A en cada una de las cervezas.

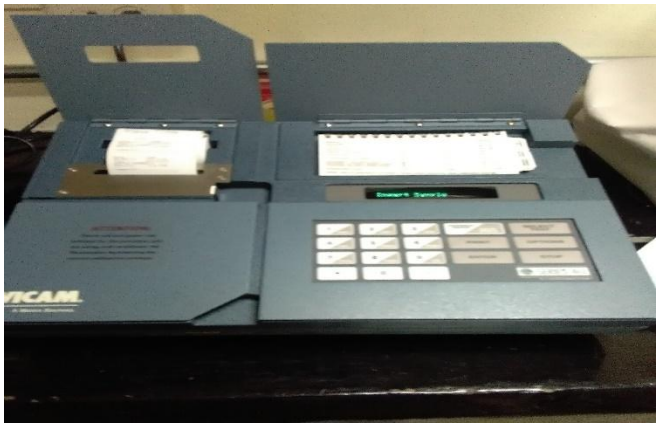


Figura 19: Fluorometro para la determinación de micotoxinas (Elaboración propia)

Capitulo IV Resultados

4.1 Resultados del Objetivo particular 1:

Diseñar primers, para identificar la levadura Saccaromyces Cerevisae mediante programas bioinformáticos.

Con la ayuda de programas bioinformáticos se diseñaron los primers específicos para la levadura de *Saccharomyces cerevisiae.* Se buscó que cumplieran con las características necesarias para ser utilizados.

Después de realizar el diseño de los primers, se hace el cálculo de la temperatura de alineación, con la ayuda de nuestras secuencias obtenidas, las cuales se muestran en el anexo 2.

Los primers diseñados con el programa bioinformático resultaron correctos, ya que se pudo obtener amplificados de levaduras *Saccaromyces Cerevisae* con una amplificación de 564pb.

4.2 Resultados del Objetivo particular 2:

Especificidad de los primers de Saccaromyces cerevisae mediante PCR

Se realizó la prueba de especificidad para los primers diseñados de levadura *Saccaromyces cerevisae*. Se utilizaron muestras de especies cercanas y lejanas.

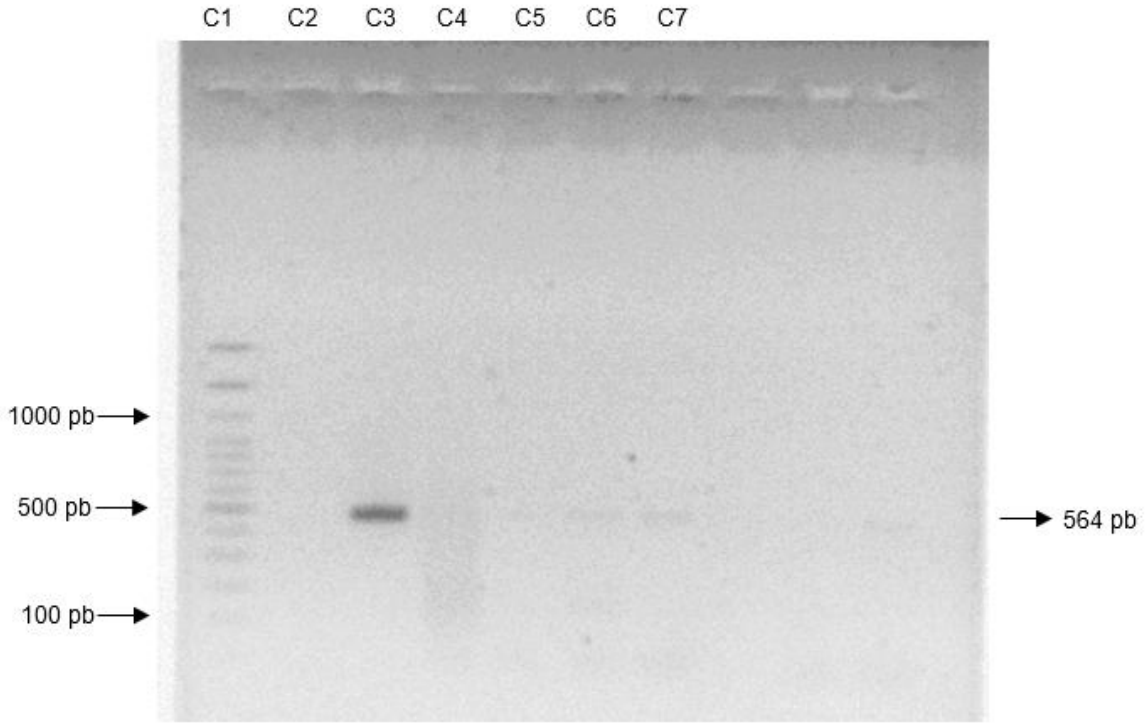


Figura 18. Se realizó un gel a una cocentración de 1%, se corrió a 90v,con *primers de Saccaromyces cerevisae,* con un amplificado de 564 pb. Carril 1 (C1) marcador de peso

molecular, carril 2 (C2) blanco, carril 3 (C3) control positivo, carril 4 (C4) avena, carril 5 (C5) pollo, carril 6 (C6) zanahoria, carril 7 (7) puerco, carril 8 (C8) caña, carril 9 (C9) maiz, carril 10 (10) trigo.

En el gel de especificidad podemos observar en el carril 2 (C2) donde se encuentra el blanco no amplificó, lo que significa que este, no se encuentra contaminado, el carril 3 (C3) amplificó, donde se encuentra el control positivo de la levadura. En el carril 6 se encuentra maíz y la muestra 7 con trigo se muestran ligeras amplificaciones, esto es debido a que son especies similares y donde se puede encontrar cierto porcentaje de *Saccaromyces Cerevisae.*

4.3 Objetivo particular 3:

Identificar levaduras Saccaromyces cerevisae mediante la técnica de PCR para detectar su presencia en cerveza.

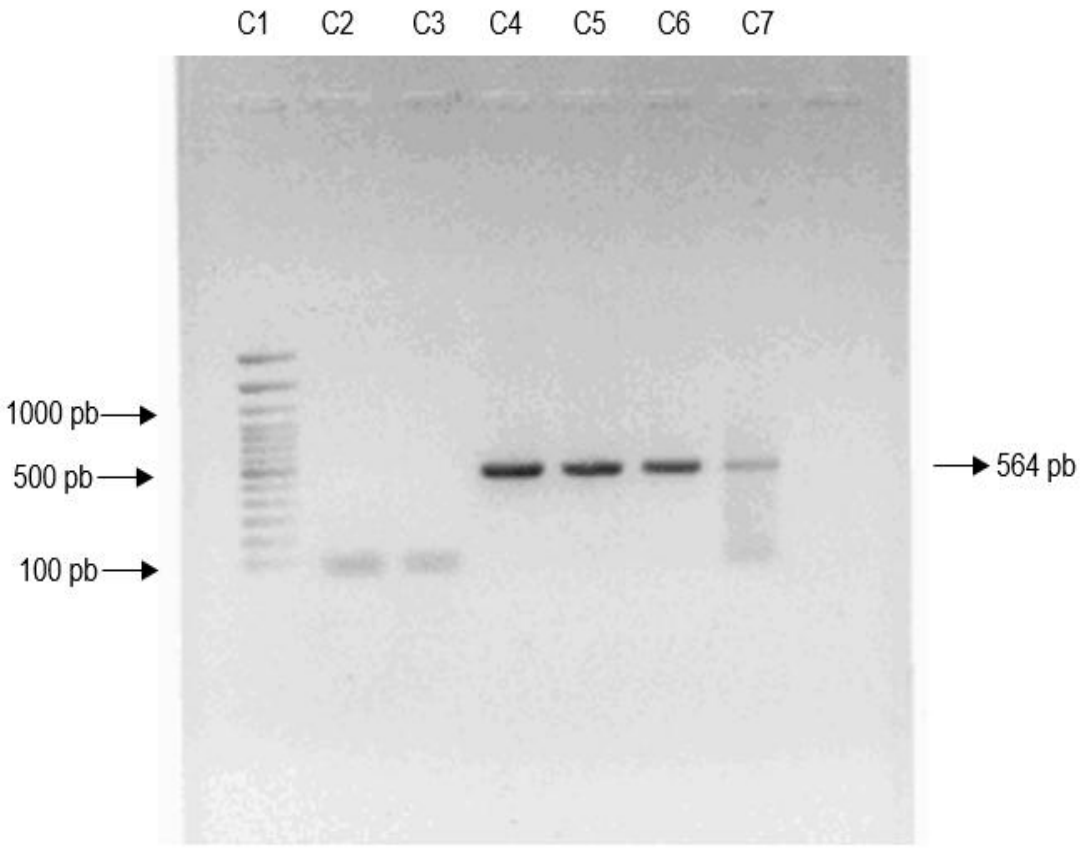


Figura 19. Se realizó un gel con una concentración al 1% a 90v, y primers de *Saccaromyces Cerevisae* con un amplificado de 564 pb. Carril 1 (C1) marcador de pasos, carril 2 (C2) blanco 1, C3 blanco 2, C4 control positivo1, carril 5 (C5) control positivo 2, carril 6 (C6) cerveza Erolinger y carril7 (C7) cerveza La Trapper.

Se observa que en el carril (C4) que amplificó el control positivo numero1, en el carril 5 (5) amplificó el control positivo 2, en el carril 6 (6) amplificó la cerveza Erolinger, en el carril 7 (C7) observábamos que amplificó ligeramente la muestra de cerveza La Trapper. En ambos controles positivos, amplificaron satisfactoriamente, lo que nos indica que cualquiera de estos puede ser utilizada en los geles.

El programa de la PCR se realizó para 5 cervezas. Los µL finales de cada uno de los componentes para la PCR salen del resultado de multiplicar cada una de las cantidades establecidas por el número de muestras, en este caso 5.

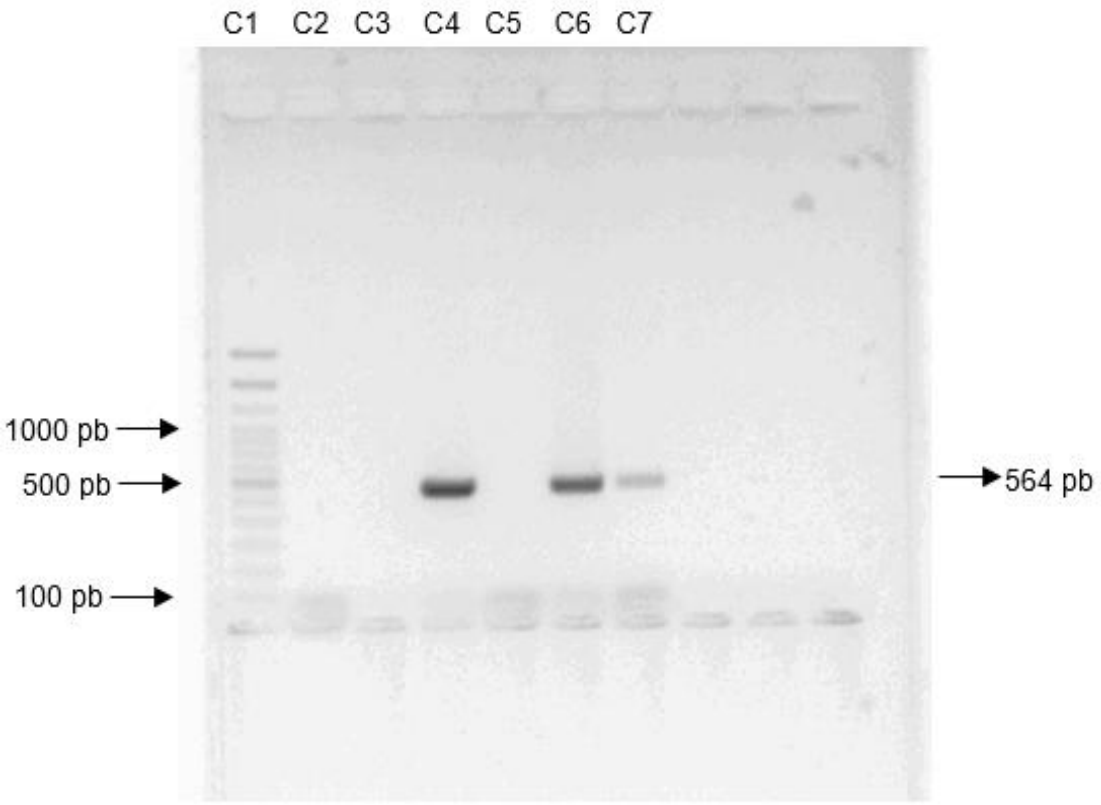


Figura 20. Gel de electroforesis a una concentración al 1%, se corrió a 90v, con primers de *Saccaromyces cerevisae* con un amplificado de 564 pb. En el carril 1 (C1) Marcador de 100 pb, carril 2 (C2) blanco, control negativo, carril 4 (C4) control positivo (*Saccaromyces cerevisae)*, carril 5 (C5) cerveza The Guinnes, carril 6 (C6) cerveza Sohnfeld, carril 7(C7) cerveza Hopulencia.

En el gel se observa que el blanco no está contaminado, en el carril 3 se dejó un pocillo libre para evitar una mezcla del control positivo con el blanco. En el carril 4 se muestra que amplificó el control positivo, carril 5 no amplificó la cerveza The Guinnes pues no contenía la levadura *Saccaromyces Cerevisae*, por filtrado y porque no se encuentra en el conteo de levaduras y porque son cervezas comerciales, en el carril 6 la cerveza

Sohnfeld amplificó al igual que el carril 7 con la cerveza Hopulencia. Todas las muestras que amplificaron fueron en los 560 pares de base aproximadamente.

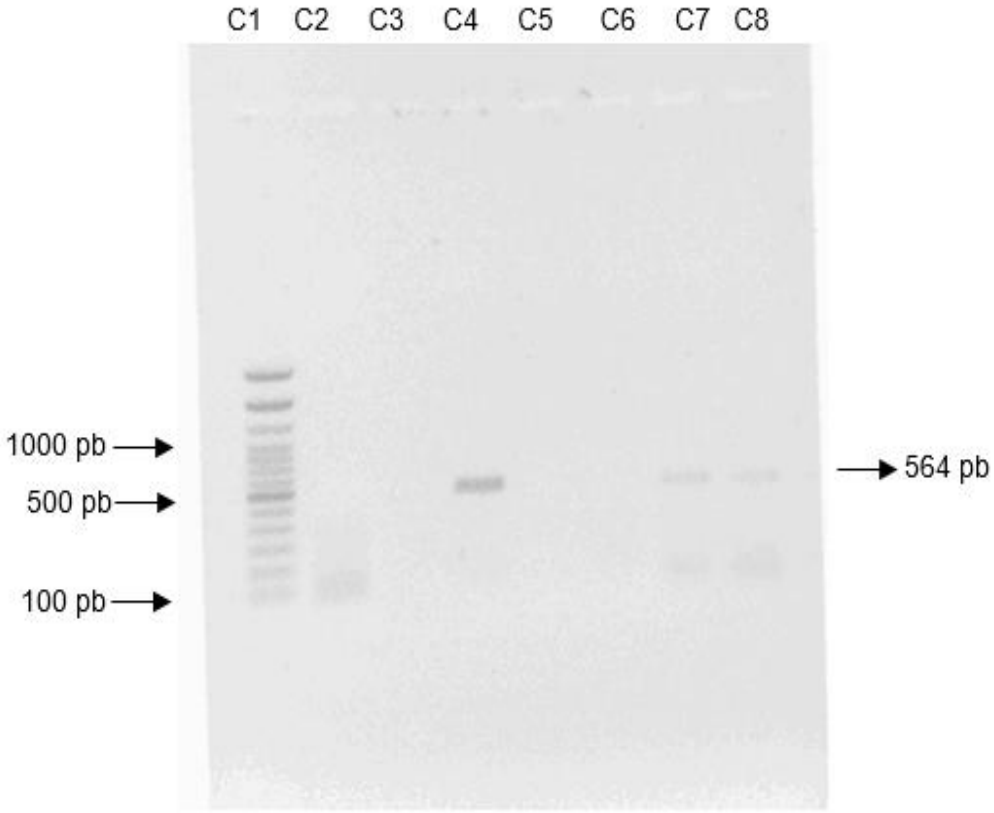


Figura 21. Gel de electroforesis a una concentración al 1%, corrido a 60v. Carril 1 (C1) Marcador de pasos, carril 2 (C2) blanco, carril 4 (4) cotrol positivo *Saccaromyces cerevisae*, en el carril 5 (C5) cerveza The Trooper, carril 6 (C6) cerveza Ingrata Tentación, carril 7 (7) cerveza Oaxaca de Noche, carril 8 (8) cerveza Blue Moon.

En el gel amplificó a 564pb, que en el carril 2 se encuentra el blanco, el cual no amplifico y esto nos indica que no está contaminado, en el carril 4 amplificó el control positivo, en los carriles 5 y 6 no amplificaron las cervezas The Trooper e Ingrata Tentación, mientras que en los carriles 7 y 8 amplificaron las cervezas Oaxaca de noche y Blue Moon.

Se realizó la electroforesis con 4 diferentes cervezas

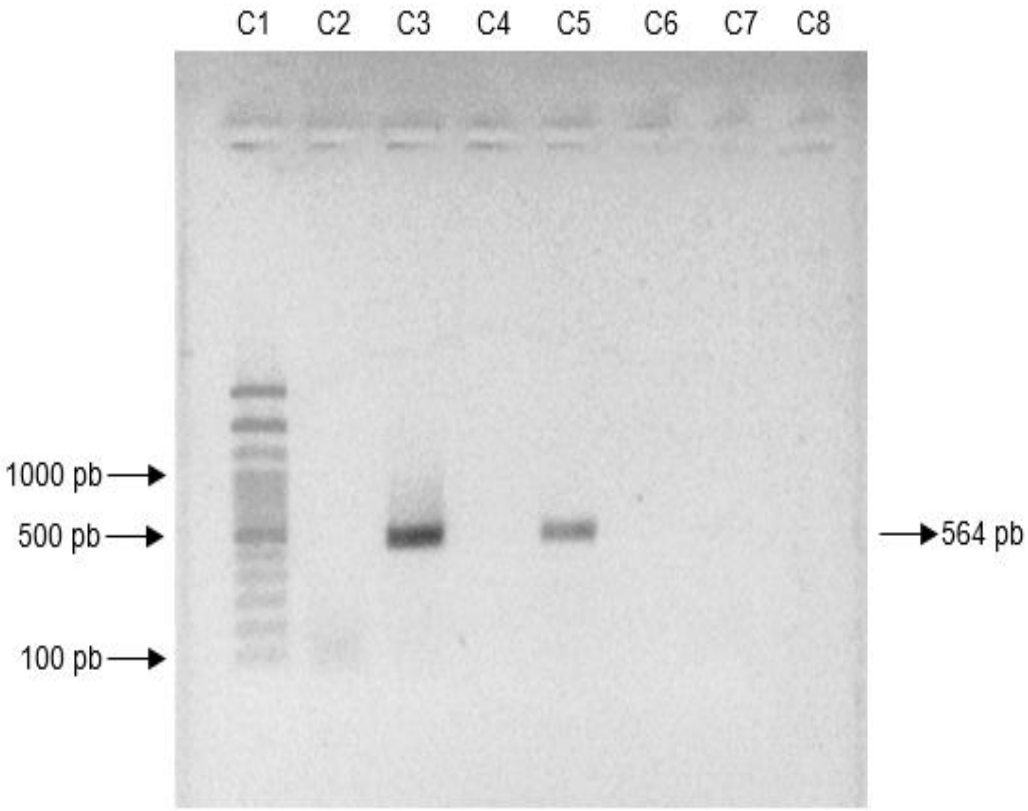


Figura 22. Gel de electroforesis a una concentración al 1%, se corrió 90v. Carril 1 (C1), marcador de pasos, carril 2(C2) blanco, carril 3(C3) control positivo *Saccaromyces cerevisae*, carril 4 (C4) cerveza H&P, carril 5(C5) cerveza Portfirio, en el carril 6 (C6) cerveza Inextremis, carril 7 (C7) cerveza Hopulencia.

En gel podemos observar que amplificó a 564 pb, en el carril 2 salió limpio el blanco, carril 3 amplificó nuestro control positivo, mientras que el carril 5 con la cerveza Portfirio amplificó, mientras que en los carriles 4, 6 y 7 con las cervezas H&P, Inextremis y Hopulencia correspondientemente.

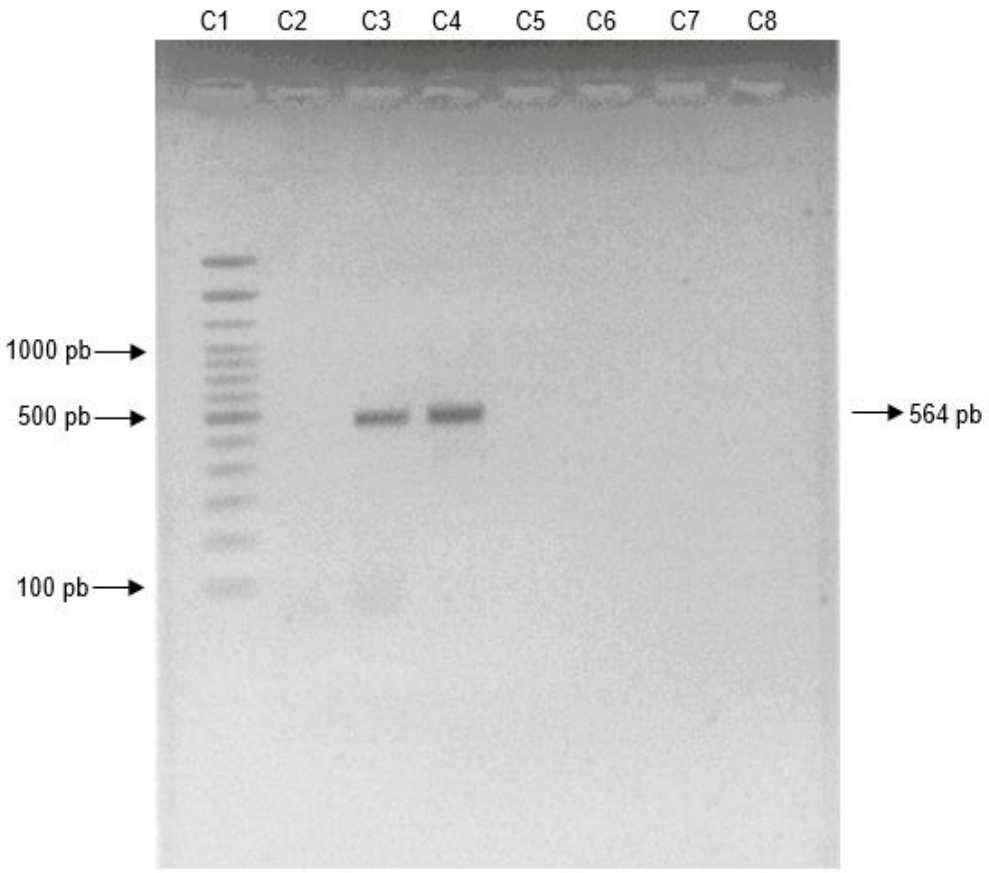


Figura 23. Gel de electroforesis a una concentración al 1%, se corrió a 60v. Carril 1(C1) marcador de pasos, carril 2(C2) blanco, carril 3(C3) control positivo *Saccaromyces cerevisae* y en el carril 4 (C4) cerveza H&P.

En el gel se observa que el carril 2 no amplificó el blanco, lo que nos indica que no se contaminó al momento de experimentar, en el carril 3 amplificó nuestro control positivo y en el carril 4 amplificó la cerveza H&P.

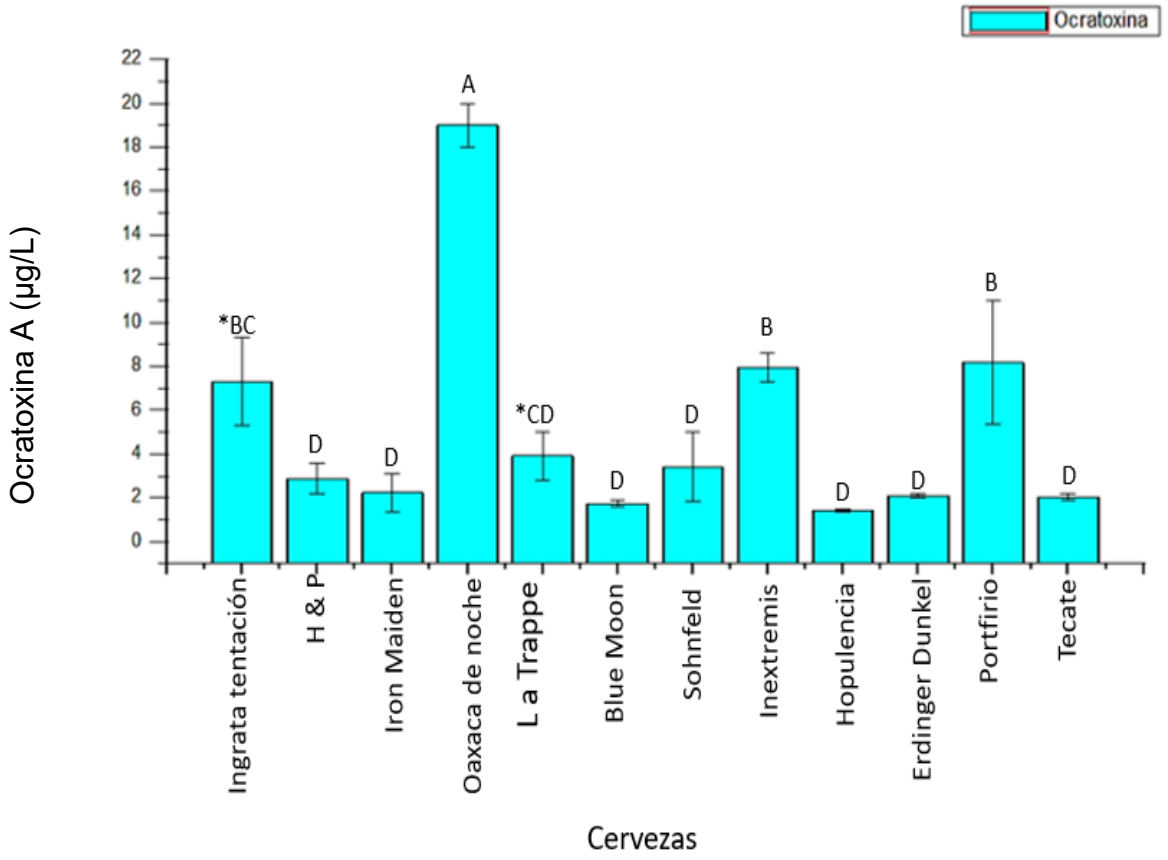
Como se puede observar en cada uno de los geles que se realizaron, solo amplificaron 8 cervezas, el resto de las cervezas que no amplificaron en gran medida se debe al proceso sofisticado que llevan al momento de la filtración. En la mayoría de los casos existen tres filtraciones. La última filtración se encarga de eliminar los últimos restos que puedan quedar de la fermentación, evitando la formación una especie de mucosa, lo que podría provocar más adelante que la cerveza saliera turbia. Por esa parte del proceso, se dice que es tan sofisticada la maquinaria utilizada en las grandes empresas, que impide el paso de las levaduras y por esto es difícil obtenerlas en cervezas comerciales, pues en artesanales fue donde se encontraron con mayor contenido de levaduras.

4.4 Objetivo particular 4:

Analizar ocratoxina A en cervezas comerciales y artesanales mediante anticuerpos monoclonales por columna, para verificar la calidad en estas.

Para llevar a cabo el análisis estadístico de ocratoxinas A, se realizó un ANOVA en donde hubo una diferencia altamente significativa entre las diferentes marcas de cervezas. Se llevó a cabo una comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). La cerveza Oaxaca de Noche, fue diferentemente significativa a todas las cervezas. Ingrata Tentación, Portfirio e Inextremis fueron iguales significativamente y las cervezas H&P, Iron Maiden, La Trappe, Blue Moon, Sohfeld, Hopuencia, Erdinger Dunkel y Tecate fueron iguales significativamente, pero diferentes a las mencionadas anteriormente.

Figura 20. Ocratoxina en diferentes marcas de cerveza



En el grafico podemos observar que la cerveza con mayor presencia de ocratoxina A, fue Oaxaca de noche, con una concentración de 19 µ/L, la cerveza Portfirio, Inextremis e Ingrata Tentación con una concentración 8.17 µ/L, 7.93 µ/L y 7.30 µ/L respectivamente.

En la cervezas que presentaron menor concentración de ocratoxina A fueron, H&P (2.86 µ/L), Iron Maiden (2.23 µ/L), LaTrappe (3.9 µ/L), Blue Moon(1.73 µ/L), Sohnfeld (3.4 µ/L), Hopulencia(1.4 µ/L), Erdinger Dunkel (2.10 µ/L), Tecate (2.03 µ/L).

Todas las muestras de cerveza presentaron ocratoxina A, pero solo Ingrata Tentación, Portfirio,Inextremis y Oaxaca de noche sobre pasaron el máximo límite permitido de 5µg/L por la Unión Europea (2005). (Union, 2005).

4.5 Objetivo particular 5:

Cuantificar levaduras de Saccaromyces cerevisae en medios de cultivo en cervezas comerciales y artesanales

Conteo de levaduras:

Después de 48 horas se obtuvieron los siguientes resultados:

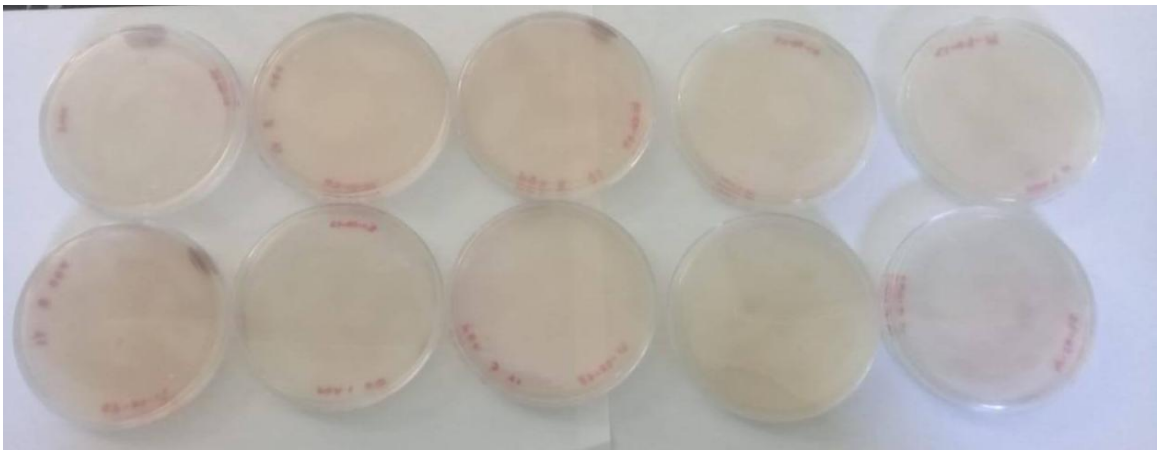


Figura 21: Ausencia de levaduras en cerveza

En la figura las cervezas Iron Maiden, La Trappe y Blue Moon no presentaron crecimiento de colonias de levaduras, con esto podemos confirmar que las cervezas comerciales pasan por un proceso de filtración en donde se eliminan las levaduras y las cervezas ya envasadas no contienen a *Saccaromyces cerevisae.*

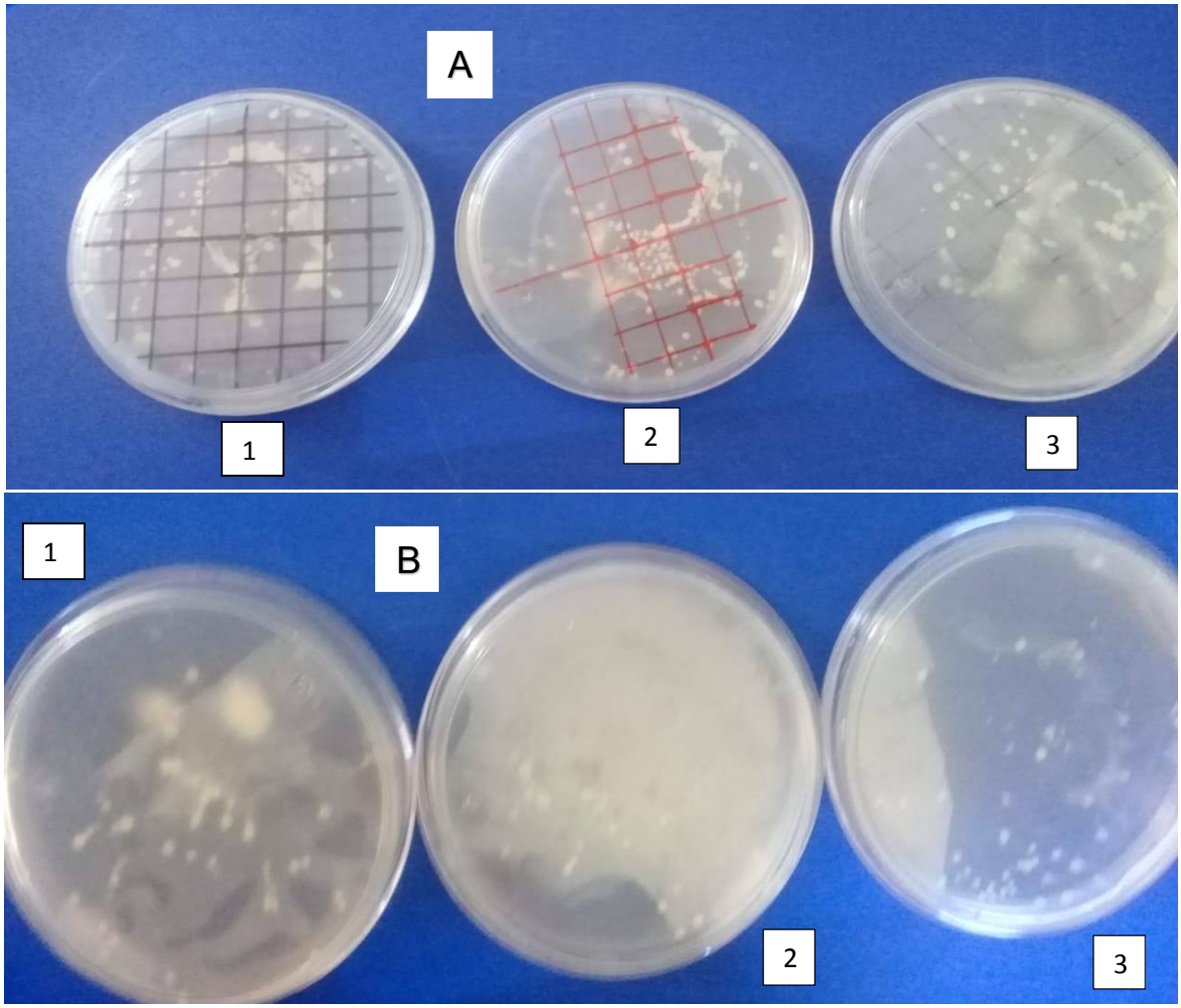


Figura 22. Levaduras en cervezas (Elaboración propia)

Las muestras de cerveza en la figura - A que sí presentaron levaduras durante 48 horas de incubación en medio de cultivo papa dextrosa agar fueron las cervezas Erdinger Dunkel (1) es una cerveza comercial en la que no pasa por un proceso de filtración en la que puedan eliminarse las levaduras. Portfirio(2), Oaxaca de Noche(3) son cervezas artesanales que pasan por un proceso de filtración menos controlado y pudimos observar las unidades formadoras de colonias (UFC) de las levaduras.

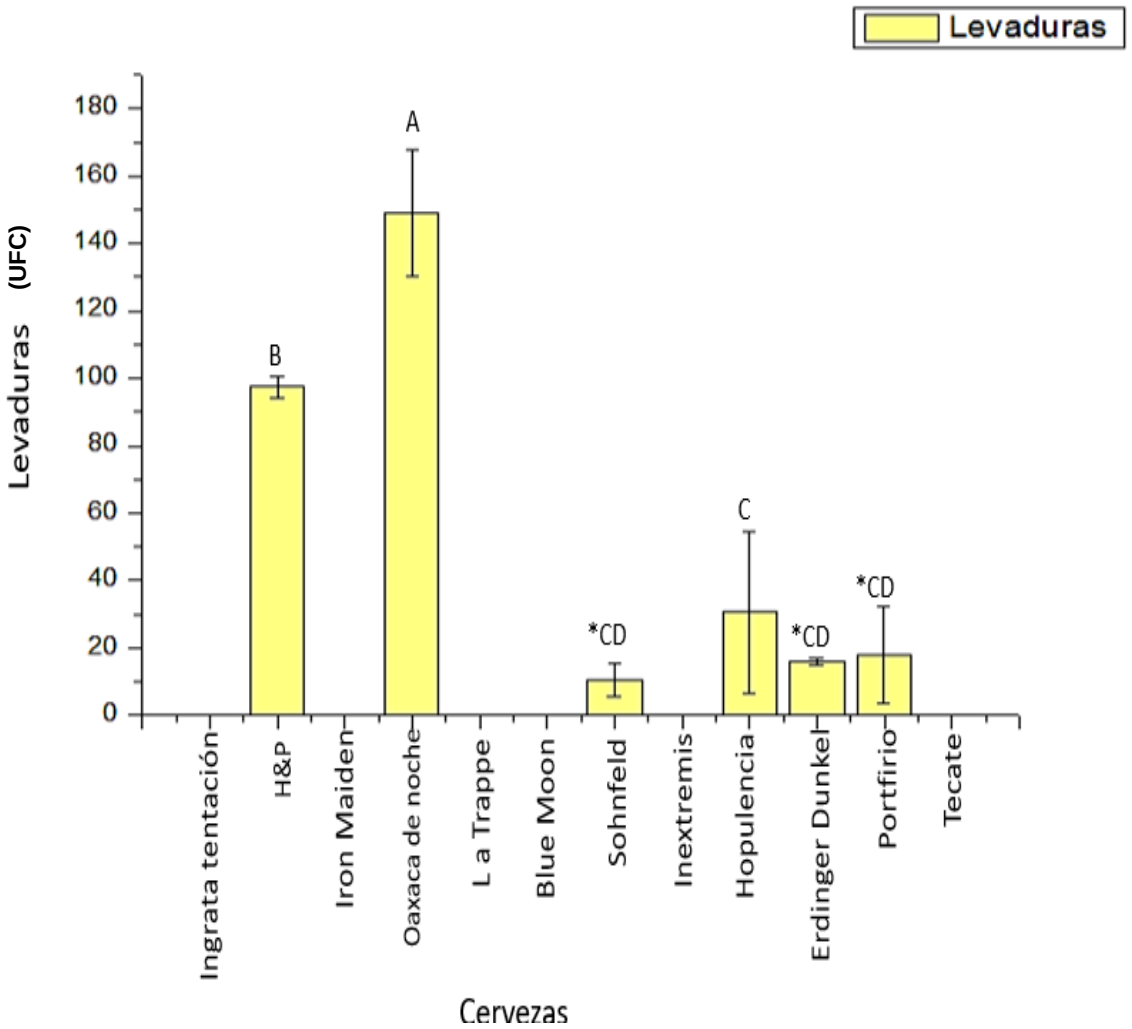
Las cervezas H&P, Hopulencia, Sohnfeld y Portfirio se repitieron, debido a que no fue posible el conteo de las levaduras, debido al gran número de unidades formadoras de colonias de levaduras como se puede observar en la figura B.

Cuantificación de número de levaduras:

En el anexo 3, podemos observar el resultado del análisis de ANOVA entre las diferentes cervezas con respecto a la presencia de sus levaduras. En el cual se observó una diferencia altamente significativa, de las unidades formadoras de colonias entre las diferentes marcas de cerveza.

En la comparación de medias por Tukey ($p \leq 0.05$), la cerveza Oaxaca de noche fue diferentemente significativa a todas las cervezas. En la cerveza H&P fue también diferente a las demás cervezas. Sohnfeld, Hopulencia, Dunkel, Portfirio, Ingrata Tentación, Iron Maiden, Blue Moon, Inextremis y Tecate fueron iguales significativamente, pero diferentes a las mencionadas anteriormente (Gráfica3).

Figura 23. Levadura en diferentes marcas de cerveza



En el gráfico 3 podemos observar que la cerveza Oaxaca de noche tiene mayor presencia de levaduras con una concentración 149 UFC. Las cervezas Sohfeld, Hopulencia,

Erdinger Dunkel, Portfirio con una concentración de 10.67 UFC, 30.7 UFC,16 UFC y18 UFC respectivamente. Mientras que Ingrata Tentación, Iron Maiden, La Trappe, Blue Moon, Inestremis y Tecate se obtuvo una concentración de 0.0 UFC..

En las cervezas Oaxaca de noche, Portfirio, H&P, Hopulencia, Erdinger Dunkel, Sohfeld e Inextremis en donde hubo presencia de levadura Saccharomyces cerevisae en los medios de cultivo de papa dextrosa agar también se pudieron detectar molecularmente en estas mismas cervezas, obteniendo los amplificados (564 pb) específicos para la levadura. En la cervezas donde no se presentó ningún amplificado, con los primers específicos para la levadura tampoco se desarrollaron en los medios de cultivo.

Conclusiones:

El diseño de los primers para *Saccaromyces cerevisae* mediante programas bioinformáticos fue exitosa ya que se obtuvo un implificado de 564pb en la zona de interés del ADN mitocondrial.

Al evaluar la especificidad de los primers, estos amplificaron para levaduras, a pesar que hubo una ligera amplificación en trigo y maíz, debido a que ambas pueden llegar a tener un porcentaje de levadura.

Se identificó presencia de levadura *Saccaromyces cerevisae* en las cervezas Oaxaca de noche, Portfirio, H&P, Hopulencia, Erdinger Dunkel, Sohfeld, Inextremis e Ingrata Tentación mediante la técnica de PCR.

En las cervezas Tecate, XX Lager, Rey de diamantes, Siete siete siete, Indio, Victoria, Corona, Tierra blanca, Guinnes, Iron Maiden, no se detectó ningún fragmento amplificado para *Saccharomyces cerevisiae*, lo que indicó que no hubo presencia de levaduras.

En las 8 cervezas que amplificaron molecularmente, también presentaron desarrollo de levaduras en los medios de cultivo papa dextrosa agar. La ingesta moderada de levaduras nos ayuda al cuerpo humano a prevenir enfermedades cardiacas, como algunas otras enfermedades, es rica en antioxidantes y vitaminas que están comprobadas en la literatura.

En las cervezas que presentaron mayor concentración de ocratoxina A fueron las artesanales, esto puede ser debido a que no tiene estándares de calidad a diferencia de las cervezas comerciales que presentaron menor concentración de la micotoxina.

Las cervezas Oaxaca de Noche, Portfirio, Inextremis, Ingrata Tentación estuvieron, por arriba del límite máximo permitido (5µg/L) por la Unión Europea (2005).

En México siendo el primer exportador de cerveza a nivel mundial y el cuarto productor de esta, no existe alguna legislación que indique los niveles máximos permitidos de levadura *Saccaromyces cerevisae y* no existen normas que establezcan los límites máximos de micotoxinas en cervezas.

Glosario

ADN: Molécula que contiene la información genética en todos los seres vivos. La molécula de ADN consiste en dos cadenas que se enrollan entre ellas para formar una estructura de doble hélice. Cada cadena tiene una parte central formada por azúcares (desoxirribosa) y grupos fosfato. Enganchado a cada azúcar hay una de las siguientes 4 bases: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T).

Agarosa: La agarosa es una fracción extraída de algas productoras de agar y es la responsable fundamental del poder gelificante de éste.

Aminas biógenas: Las aminas biógenas son compuestos nitrogenados que se localizan en alimentos y bebidas fermentados por bacterias lácticas.

Cetoácido: Son ácidos orgánicos que contienen un grupo funcional cetona y un grupo carboxilo.

Coalescencia: Es la propiedad de las cosas de fundirse o unirse. Las sustancias o los materiales coalescentes son aquellos que pueden unirse en un único cuerpo**.**

Deuteromicetos: También llamados hongos imperfectos incluyen un gran número de especies de reproducción únicamente asexual, ya sea porque no tienen o porque no se conoce su reproducción sexual.

Endomembranoso: Es un grupo de membranas y organelos en las células eucariontes que trabajan en conjunto para modificar, empacar y transportar lípidos y proteínas. Incluye una variedad de organelos, tales como la envoltura nuclear y los lisosomas, el retículo endoplásmico y aparato de Golgi

Estrés Osmótico: Situación desfavorable en un organismo, tejidos o células provocada por un desarreglo osmótico usualmente provocado por la falta de agua.

Ergosterol: Es un esterol que se encuentra en los hongos, y el nombre de ergot, un nombre común para los miembros del género fúngico *Claviceps* de la que el ergosterol fue aislado por primera vez.

Fluorocromo: Sustancia que se emplea para marcar anticuerpos u otras moléculas, por su propiedad de emitir luz de una determinada longitud de onda, cuando se le estimula con un láser o con luz ultravioleta.

Fosforilados: Es la introducción de un grupo fosfato dentro de una biomolécula, en un proceso que normalmente está controlado por una fosforilasa

Glicoproteínas: Las glicoproteínas son proteínas (principalmente las proteínas intrínsecas de membrana y de secreción) que son modificadas después de la traducción para unir covalentemente una parte oligosacárida.

Isocumarina: Es una lactona, un tipo de compuesto orgánico natural.

Lipolítica: Que produce la hidrólisis o desdoblamiento de las grasas dando lugar a ácidos grasos libres.

Mananos: Son un tipo de glúcidos derivados de la pared de la célula de la levadura *Saccharomyces cerevisiae.*

Monocatenario: El genoma de los virus puede ser monocatenario o bicatenario de ARN o ADN, y pueden utilizar o no la transcriptasa inversa.

Molibdeno: Elemento químico de número atómico 42, masa atómica 95,94 y símbolo *Mo*; es un metal del grupo de los elementos de transición, de color blanco, duro y maleable y propiedades químicas similares a las del cromo.

Periplásmico: Espacio que se encuentra entre la membrana citoplásmica y la membrana externa de bacterias gram-negativas.

Polifosfatos: El polifosfato es un producto sólido de cristales vítreos irregulares e incoloros con excelentes cualidades como estabilizador de dureza y con propiedades secuestrantes y dispersantes de las durezas magnésicas.

Psudomicelios: Pseudomicelio: conjunto de células encadenadas originadas por gemación sin constituir un verdadero micelio. Aparece en las levaduras.

Saprofita: Es el **adjetivo** que se emplea para calificar a los organismos cuya alimentación consiste en **ingerir sustancias orgánicas en estado de descomposición**.

Teratogenicidad: Es una manifestación de toxicidad en la reproducción, caso particular de la embrio-fetotoxicidad, demostrada por la producción o el incremento de la frecuencia de malformaciones estructurales, congénitas, no-hereditarias.

Toxigénicos: Son los productores de toxinas en el alimento y dan lugar a intoxicaciones.

Trasminados: Filtrarse o pasar a través de alguna cosa un líquido, un olor, etcétera.

Bibliografía

A, R. S., John, P. V., & Aldana, A. A. (2018). Análisis de técnicas de recuento de Microorganismos. 8.

Abreu, A. R., Armendáriz, C. R., Fernández, A. J., & Torre, A. H. (2011). La ocratoxina A en alimentos de consumo humano. *Scielo*.

Aguirre, R., Tellez, O. P., Terán, A. S., García, M. E., Pozos, L. B., Acevedo, L. A., . . . Arenas, J. P. (2013). Las Relaciones México- Unión Europea En el marco del Acuerdo Global y la Asociación Estratégica. *Las Relaciones México- Unión Europea En el marco del Acuerdo Global y la Asociación Estratégica. Un balance desde la sociedad civil mexicana*, 106.

Anderson, M. d., & Pascual, V. C. (2000). *Microbiología Alimentaria Metodología analítica para alimentos y bebidas.* Madrid España: Díaz de Santos.

Arias, G. (2011). Calidad industrial de la cebada cervecera. *Instituto Nacional de Invstigación Agropecuaria*.

AYESA. (2013). *Planta de levadura en México*. Obtenido de Planta de levadura en México: https://www.ayesa.com/es/proyectos/planta_de_levadura_en_mexico

Bakker, R. J. (2010). *Química del flavor del vino.* Oxford Inglaterra: Editorial ACRIBIA, S.A.

Bamforth, C. W. (2008). *Alimentos, fermentación y microorganismos.* Zaragoza, España: Acribia S.A.

Barbosa, C. D., & MSc. (2017). *invima Intituto Nacional de Vigilancia de medicamentos y alimentos.* Obtenido de Marco regulatorio de OGMspara consumo humano en Colombia: https://www.invima.gov.co/images/pdf/intranet/diroperaciones/eventosalimentos/8-Normatividad-en-OGM.pdf

Barreda, N. J. (2008). *Explorando los genes del Bing-Bang a la nueva biología.* Madrid: Encuentro.

Baxter, E. D., & Hughes, P. S. (2008). *Cerveza calidad, higiene y características nutricionales.* Zaragoza España: ACRIBIA S.A.

Benavent, J. L. (1996). Enología. En J. L. Benavent, *Enología* (págs. 51-59).

Bourgeoi, C., & Larpente, J. (2005). *Microbiología Alimentaria Fermentaciones alimentarias.* Zaragoza España: ACRIBIA S.A.

Bourgeois, C., & Larpent, J. (1995). *Microbiología Alimentaria Fermentaciones Alimentarias.* Zaragoza España: Acribia S.A .

Bourgeois, C., Mescle, J., & Zucca, J. (1994). *Microbiología alimentaria.* Zaragoza España: ACRIBIA, S.A.

Bradley, A. F., & Peter, B. T. (1892). *Bioquímica.* España: Reveté S.A.

Camacho, A., M.Giles, A.Ortegón, M.Palao, & O.Velázquez, B. y. (2009). Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*, 13.

Candelas, C. F. (2010). *Transgénicos.* Madrid, España: Catarata.

Carrascoa, A. V., Muñoz, R., & González, R. (2005). *Microbiología del vino.* Madrid, España: AMV Ediciones.

Carrillo, L., & Audisio, M. C. (2007). *Microbiología de alimentos.* Argentina: Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias.

Casadeús, J. (1995). *Microbiología y genética molecular .* Huelva España: Universidad de Huelva.

Casado, F. C. (2006). *Innovación tecnológica en la industria de bebidas.* Barcelona: UPC.

Castilleja, D. E., Barrera, E. O., -Medrano, S. M., & Pacheco, J. R. (2015). Aislamiento, selección e identificación de levaduras Saccharomyces spp. Nativas de viñedos en Querétaro, México. *Cuerpo Académico de Inocuidad Microbiana de los Alimentos*, 15.

Castillo, J. M. (2009). *Micotoxinas en alimentos.* España: Díaz de Santos.

Castro, J. Z. (2005). *Manueal de técnicas básicas de la Biología Molecular.* Mérida Yucatán México: Universidad Autónoma de Yucatán.

Catillo, F., M, R., Blasco, M., M. Caballero, F., Moreno, C., & Martínez, M. (2005). Biotecnología Ambiental. Fermentación . En F. Catillo, R. M, M. Blasco, F. M. Caballero, C. Moreno, & M. Martínez, *Biotecnología Ambiental. Fermentación* (págs. 79-81). Tébar.

Cerveceros de México. (2017). *Cerveceros de México. Cámara de la cerveza*. Obtenido de Cerveceros de México. Cámara de la cerveza: https://cervecerosdemexico.com/quienes-somos/

Chen, Y., Eisner, M. K.-B., K., a., Lima, A., & A, Y. B. (2001). *Polymorphic internal transcribed spacer region 1DNA sequences identify medically important yeasts.* Journal of Clinic Microbiology.

Christian Berger, P. D.-L. (1988). *El libro del amante de la cerveza.* Barcelona España: Sirven Grafic, S.A.

COFALEC. (2012). Confederation of yeast - Yeast it's life. *Confederation of yeast - Yeast it's life - COFALEC.* Paris , Francia.

cofepris. (19 de Marzo de 2008). *Reglamento de la ley de bioseguridad de organismos genéticamente modificados*. obtenido de reglamento de la ley de bioseguridad de organismos genéticamente modificados: http://www.cofepris.gob.mx/MJ/Documents/Reglamentos/ogms190308.pdf

Colli, H. A., & Castro, N. C. (2015). Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *Revista CES Medicina*, 4-5.

Decon, J. (2010). *Fungal Biology.* Reino Unido: Blackwell Publishing.

Delaat, A. N. (1985). *Microbiología.* Mexico D.F: Interamericana.

Derache, R. (1990). *Toxicología y seguridad de los alimentos.* Barcelona España: OMEGA, S.A.

Díaz, A. A. (2013). *Cultivos transgénicos ¿Quién pierde?* Mexico: Greenpeace México A. C.

Edmundo Bordeu S., J. S.-B. (Diciembre, 1998). *Análisis químico del vino.* Chile: Ediciones Univerdad Católica de Chile.

Escrig, A. J. (2003). *Manual de neurogenética .* Madrid, España: Díaz de Santos.

EURASYP. (2016). *Yeast extract*. Obtenido de Yeast extract at a glance: http://www.yeastextract.info/yeast-extract/at-a-glance

Europea, C. (7 de febrero de 2005). *ED.* Obtenido de Reglamento de la CE sobre la Ocratoxina A: http://www.ico.org/documents/ed1940c.pdf

F, E., Ferri, R., Zumalacárregui, J. M., Otero, C. A., Calleja, S., & de la Fuente Crespo, L. F. (2003). *Los alimentos transgénicos (y organismos manipulados genéticamente).* España: Caja España.

FAO. (1998).

FAO. (01 de mayo de 2011). *Agronoticias: Actualidad agropecuaria de América Latina y el Caribe.* Obtenido de Agronoticias: Actualidad agropecuaria de América Latina y el Caribe: http://www.fao.org/in-action/agronoticias/detail/es/c/508736/

FAO. (2 de diciembre de 2015). *Agrobiotecnología .* Obtenido de Agrobiotecnología : https://transgenicosforlife.wordpress.com/2015/12/02/principales-paises-productores-de-transgenicos/

FAO. (2003). *Manual Sobre la Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la Prevención y Control de las Micotoxinas.* Obtenido de Manual Sobre la Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la Prevención y Control de las Micotoxinas: http://www.fao.org/3/y1390s/y1390s00.htm#Contents

FAS, U. F. (24 de Julio de 2015). *Fundación caja rural Burgos.* Obtenido de Fundación caja rural Burgos: http://fundacioncajaruralburgos.es/situacion-de-los-ogm-en-distintos-paises/

Fonseca, M. D., Mateus, A., & Contreras, B. N. (2010). *Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular: su aplicación en genética básica.* Bogotá: Universidad del Rosario.

Frazier, W., & Westhoff, D. (2000). *Microbiología de los alimentos.* Zaragoza España: ABRIBIA, S.A.

Fundamentos de bioquímica metabólica. (s.f.). Obtenido de Fundamentos de bioquímica metabólica: https://books.google.com.mx/books?id=Iw_z2TPXvZgC&pg=PA21&dq=fermentaciones&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiFtu2vrI3aAhVE32MKHUAaCJA4ChDoAQhRMAc#v=onepage&q=fermentaciones&f=false

García, V. (2004). *Introducción a la microbiología .* Costa Rica: EUNED.

Garrido, F. (2014). La cerveza: Tipos y Clasificaciones. *Asociación madrileña de sumilleres*, 1-4.

Gimenos, A., & Martins, M. L. (2011). *Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos .* Douglas Road, Miami: Special nutrients INC.

Gobierno de México. (24 de febrero de 2019). *Análisis de la Balanza Comercial Agroalimentaria de México.* Obtenido de Análisis de la Balanza Comercial Agroalimentaria de México: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/463028/Balanza_Comercial_Agropecuaria_y_Agroindustrial_febrero_2019.pdf

Gonzales, M. R. (2017). *Principios de la elaboración de las cervezas artesanales.* USA: Lulu Press Inc.

Gort, J. A., & Querol, A. L. (2015). Rincosporiosis de la cebada, indentificación de síntomas y conocimiento de su ciclo. *Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria IRTA*, 2-6.

Guartaza, B. G., & Israel, M. P. (2015). Selección de una línea promisoria de cebada (Hordeum vulgarel.) bio –fortificada,de grano descubierto y bajo contenido en fitatos, en áreas vulnerables de la sierra sur ecuatoriana. *Universidad de Cuenca*.

Gutiérrez, G. D., Ruíz, M., & Xoconostle, C. B. (2015). *Estado actual de los cultivos genéticamnete modificados en México y su contexto internacional.* México: Instituto Politécnico Nacional.

Gutiérrez, L. A. (2010). Caracterizacion fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de las moras. *Microbiología industrial*, 37-54.

Hernández, A., Alfaro, I., & Arrieta, D. (2013). *Microbiología Industrial.* Universidad Estatal a Distancia.

Hernández, A., Alfaro, I., & Arrieta, R. (2006). *Manual de microbiología de alimentos.* EUNED.

Hongos y Levaduras. (2012). Obtenido de https://ecobiouvm.files.wordpress.com/2014/02/hongosmohosylevaduras.pdf

Hornsey, I. S. (2009). *Elaboracion de cerveza Microbiología, bioquímica y tecnología.* Zaragoza España: ACRIBIA, S.A.

Hough, J. S. (1990). *Biotecnología de la cerveza y malta.* Inglaterra: Cambridge University Press.

IATA. (2016). *Biotecnología de la fermentación: levaduras industriales.* Obtenido de Biotecnología de la fermentación: levaduras industriales: https://www.iata.csic.es/en/collaboration/capabilities-group-rd/biotecnologia-de-la-fermentacion-levaduras-industriales-0

Instituto de la cerveza artesana ICA. (25 de agosto de 2014). *Cerveza artesana*. Obtenido de Cerveza atesana : https://www.cervezartesana.es/quienes-somos

J, C., Puerta, B., & Ureña, P. C. (2005). *Prácticas de biología molecular.* Pontificia Universidad Javeriana.

J, S., & DW, R. (2008). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Labora-tory Press.* New York: www.MolecularCloning.com.

J.A. Suárez Lepe, B. Í. (2004). *Microbiología Enologíca. Fundamentos de la Vinificación.* Madrid, Barcelona, México: Mundi-Prensa.

J.W. Miles, B. M. (1998). *Brachiaria: Biología, Agronomía y mejoramiento.* Colobia: CIAT.

Jaffé, W. (1994). *Estrategías empresariales en agrobiotecnología: 21 estudios de caso.* San José (Costa Rica): Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).

Kaczewer, J. (2009). *La amenaza transgénica.* Buenos Aires: 3 Mundos.

Koolman, J., & Röhm, K.-H. (2005). *Bioquímica: Texto y atlas.* Alemania: Panamericana.

Kuhar, F., Castiglia, V., & Papinutti., L. (2013). Reino Fungi: morfologías y estructuras de los hongos . *Revista Boletín Biológica*, 1-8.

L, W., & Wilson, K. (1981). *Principios y técnicas de Bioquímica Experimental.* Barcelona, España: Omega.

Lappe, P., & Ulloa, M. (1989). *Estudios étnicos microbianos del tesguinio tarahumara.* México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Lázaro, M. G. (2014). *Caracterización bioquímica y biotecnológica de la levadura Saccharomyces cerevisiae.* Argentina: Univrsidad de la Rioja.

Legarreta, I. G., Almendárez, B. E., Rodarte, M. d., & González, C. R. (2014). *Microbiología de los alimentos.* Ciudad de México: LIMUSA S.A DE C.V.

Lezcano, E. (2014). Levaduras. *Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca*, 12.

Lovisoay, C. L., & Libkindb, D. (2018). Síntesis y regulación de los compuestos del aroma y sabor derivados de la levadura en la cerveza: alcoholessuperiores. *Revista Argentina de Micrbiología*, 12.

Mallol, J. L., Arroyo, A. G., & Lledías, F. (2009). La respuesta a estrés en la levadura Saccharomyces cerevisiae. *Revista latinoamericana de microbiología*, 2-22.

Manfred, M., & Moll, N. (2006). *Compendio de riesgos alimentarios.* Zaragoza España: Acribia S.A.

Marín, C. S. (Enero de 2016). LEVADURA SACCHAROMYCES CEREVISIAE Y LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña*, 20-28.

Mendoza, C. E. (2013). *Evaluación de l ´roducción de etanol y compuestos congnéricos en mostos de agave potatorum utilizando levaduras aisladas de fermentaciones de mezcal.*

Mendoza, R. S., Alvarado, G. R., Pavía, S. P., Marrufo, G. V., & Malvido, J. C. (2017). Micotoxinas: ¿Qué son y cómo afectan a la salud pública? *Revista Digital Universitaria UNAM*.

Mendoza, R. S., Alvarado, G. R., Pavía, S. P., Marrufo, G. V., & Malvido, J. C. (julio de 2017). Micotoxinas: ¿Qué son y cómo afectan a la salud pública? *Revista Digital Universitaria*.

Miriam Aidé Castillo Rodríguez, D. A. (2005). *Fundamentos de Electroforesis Capilar.* México: Universidad Nacional Autónoma de México.

MONSANTO. (2010). *Cultivos Genéticamente Modificados en el Mundo.* Obtenido de Cultivos Genéticamente Modificados en el Mundo: http://www.monsantoglobal.com/global/ar/productos/pages/cultivos-gm.aspx

Montgomery, R., Ph, D., W, T., Conway, p. D., & Spector, M. A. (1999). *Bioqumica: casos y texto.* Madrid España: Harcourt Brace.

Montori, I. F. (Enero de 2007). *Transferencia tecnológica: Técnicas de detección.* Obtenido de Mecanismos de detección de organismos genéticamente modificados: http://www.phytoma.com/tienda/articulos-editorial/220-185-enero-2007/8748-mecanismos-de-deteccion-de-organismos-geneticamente-modificados

Mora, P. T., Luna, A. P., & Velasco, A. F. (2012). Optimización del proceso de fermentación para la producción de tequila, utilizando la metodología de superficie de respuesta (msr). *Revista mexicana de ingeniería química*, 1-6.

Mora, S. Q. (2009). *Manueal de experimentos de laboratorio para BIOQUÍMICA.* Costa Rica: EUNED.

Morcillo, O., Cortés, R., & García, L. J. (2013). *Biotecnología y alimentación.* UNED.

Moreno, J. A. (2016). Los hongos: Heroes y villanos de la prosperidad humana. *RDU revista gigital universitaria*, 10.

Mossel, D. A., García, B. M., & Struijk, C. B. (2007). *Microbiología de los alimentos.* Zaragoza España: ACRIBIA S.A.

Muñoz, R., Barahona, E., Herrera, E., Martínez, T., Covarrubias, R. A., Ribeiro, S., . . . Olivé, M. L. (2004). *Alimentos transgénicos. Ciencia, ambiente y mercado: un debate abierto.* Ciudad de méxico: Siglo veintiuno.

Negroni, M. (2009). *Microbiología Estomatológica y fundamentos y guía práctica.* Buenos Aires Argentina: Panamericana.

NOM, N. O. (1994). Bienes y servicio. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

P.S, H. E. (2006). *Cerveza, calidad, higiene y características nutricionales.* Zaragoza España: ACRIBIA S.A.

Padilla, C. (2016). Principios y práctica de la electroforesis en gel de agarosa. *The Biotechnology education company*, 3-4.

Parés, R., & Juárez, A. (2002). *Bioquímica de los microorganismos.* Barcelona, España: Reverté S.A.

Perdones, P. L. (2000). *Inactivación del transportador de maltosa en levadura.* Madrid España: Universidad Complutense de Madrid.

Pérez, L. M. (s.f.). *Trnsgénicos: la realidad.* UAB.

Reinhard, E. (2006). *Defectos del vino.* Austria Zaragoza España: Osterreichischer Agrarverlag ACRIBIA S.A.

Roca, P., Oliver, J., & Rodríguez, A. M. (2003). *Bioquímica: técnicas y métodos.* Madrid: Hélice.

SAGARPA. (2014). *Balanza comercial agroalimentaria mexico ue.* obtenido de balanza comercial agroalimentaria México UE http://www.sagarpa.gob.mx/asuntosinternacionales/Documents/Balanza%20agroalimentaria%20Mexico%20UE%202014.pdf

SAGARPA. (Febrero de 2014). *Relaciones Comerciales del Sector Agroalimentario y Pesquero en 2014.* Obtenido de Relaciones Comerciales del Sector Agroalimentario y Pesquero en 2014: http://www.sagarpa.gob.mx/asuntosinternacionales/cooperacioninternacional/Documents/Febrero%202014/Expectativas%20de%20las%20Negociaciones%20Comerciales%20Internacionales.pdf

SAGARPA. (2017). *Planeación Agrícola Nacional 2017-2030.* Obtenido de Cebada, grano mexicano: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257069/Potencial-Cebada.pdf

Salazar, M. A., Sandoval, R. A., & Armendári, z. B. (2013). *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud.* México: McGRAW HILL Education.

Sc., D. B. (1983). *Manuales para educación agropecuaria. Trigo, cebada, avena.* Ciudad de México: Trillas México.

Segal, K. C., & Ortega, L. G. (2005). *Manual de Prácticas Biología Molecular de la Célula 1.* México: Las prensas de ciencias.

Serrato, D. A., & Flores, R. L. (2014). *PCR: reacción en cadena.* Iztapalapa, México: UAM-I.

Syred, P. A. (06 de Marzo de 2014). *Fine Art America - Buy Art Online*. Obtenido de Fine Art America - Buy Art Online: https://fineartamerica.com/featured/1-yeast-saccharomyces-cerevisiae-power-and-syred.html

Togores, J. H. (16 de Enero de 2015). *Descripción de las principales levaduras vínicas*. Obtenido de descripción de las principales levaduras vínicas http://urbinavinos.blogspot.mx/2015/01/descripcion-de-las-principales.html

Torrens, D. B. (2011). *¿Para que sirven los transgénicos?* Barcelona, España: Universidad de Barcelona.

Trujillo, J. A. (2012). *Micología Médica Básica.* Ciudad de México: Mc Graw Hill.

UNED. (2000). *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).* Madrid, España: UNED.

UNIÓN, C. D. (18 de Mrzo de 2005). *Ley de bioseguridad de organismos genéticamente modificados*. Obtenido de Ley de bioseguridad de organismos genéticamente modificados: http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LBOGM.pdf

Union, O. J. (26 de Enero de 2005). Amending Reguation (EC) 4666/2001as regards ochratoxin A. pág. Reg (EC) N°123/2005.

Valenzuela, A. G. (s.f.). Saccharomyces cerevisiae.

Vega, D. E. (2012). Producción de Alimentos por Actividad Bacteriana.

Vidal, Á. G. (2015 de abril de 2015). *Centro de Estudios de Consumo.* Obtenido de Noticias de Consumo: https://blog.uclm.es/cesco/files/2015/04/Directiva-UE-2015-412-del-Parlamento-Europeo-y-del-Consejo-de-11-de-marzo-de-2015.pdf

Wagner, R. J., Otero, R. M., & Guerrero, L. I. (2009). *Las levaduras y sus productos derivados como ingredientes en la industria de alimentos.* Bernal: Universidad Nacional de Quilmes 2008.

Williams, B. L., & Wilson, K. (1995). *Principios y técnicas de bioquimica experimental .* España: Omega.

Anexos

Anexo 1: (Casado, 2006)

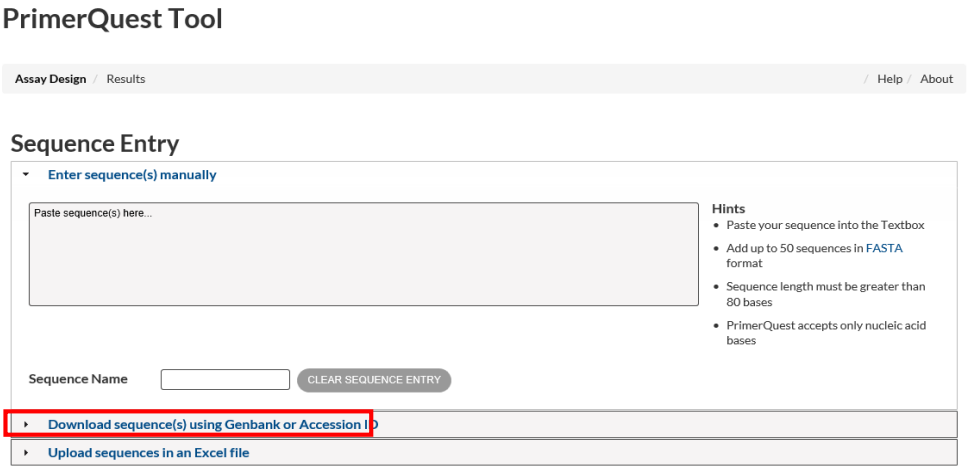
Diseño de Primers: (Marín, 2016)

Se diseñaron primers, para identificar la levadura *Saccaromyces cerevisae* mediante programas bioinformáticos, con estos primers, se verificó que sólo amplificaran para este tipo exclusivo de levaduras cumpliendo así, con el objetivo particular 1:

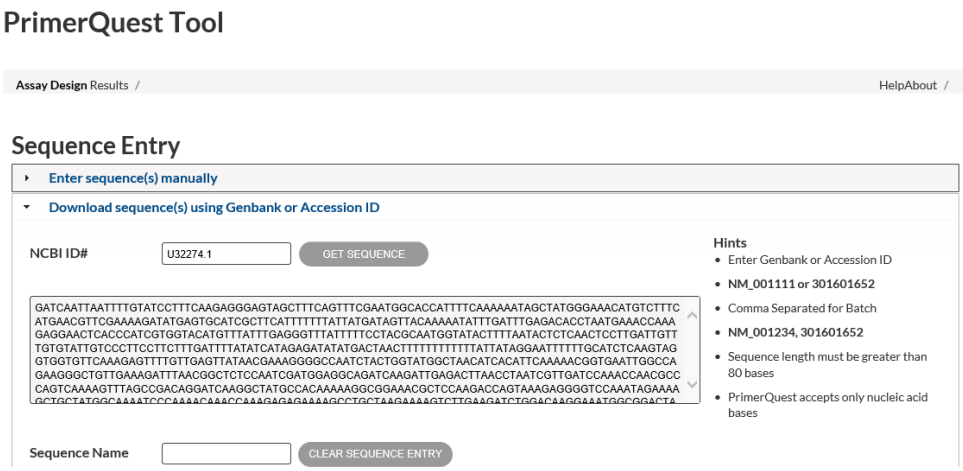
Entramos a la página de National Center for Biotechnology Information (NCBI), colocamos la sección de nucleotide para posteriormente ingresar el nombre de nuestra levadura y seleccionar la más adecuada y obtener el Gi.

2) Ya teniendo el Gi, nos dirijimos a la pagina PrimerQuest Tool | IDT - Integrated DNA Technologies.

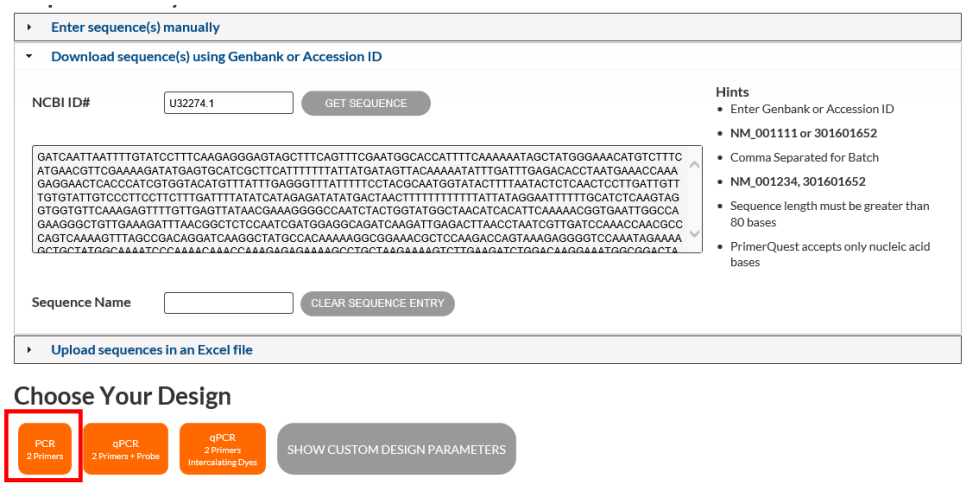
Dar clic en la parte inferior ID para posteriormente escribir el Gi



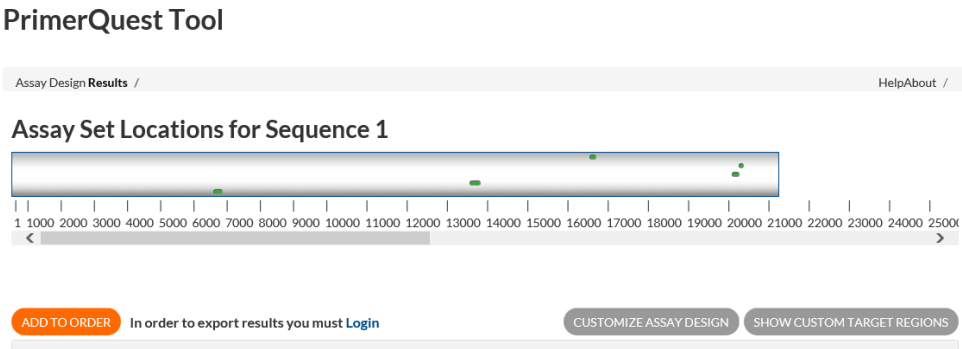
3) Ingresar el Gi en el recuadro NCBI ID#, despues dar clic en el botón Get Secuence, esperar unos segundos hasta que aparezca nuestra secuencia.



4) Dar clic en el boton PCR 2 Primers, esperar unos segundos para obtener la siguiente página.



5) La siguiente página nos da la secuenciacion y donde esta la presencia de los Primers



6) Elegir el correcto, esto se realizó mediante 3 parámetros importantes. Escoger el que tenga el mismo porcentaje de Guanina y Citosina, que sean la misma longitud entre los dos y la misma Tm. Despues de elegir la que cumpla las mejores caracteristicas, dar clic en la parte que dice View Assay Details.

ADD TO ORDER In order to export results you must Login CUSTOMIZE ASSAY DESIGN SHOW CUSTOM TARGET REGIONS

Set 1 *Sequence 1*

Amplicon Length: 509
View Assay Details

	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	41414	41434	20	62	50
Reverse	41901	41923	22	62	40.9

Set 2 *Sequence 1*

Amplicon Length: 382
View Assay Details

	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	52188	52210	22	62	50
Reverse	52548	52570	22	62	50

Set 3 *Sequence 1*

Amplicon Length: 564
View Assay Details

	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	51667	51689	22	62	50
Reverse	52209	52231	22	62	50

7) Nos muestra nuestra secuencia completa, así como la secuencia reversible, de cada una de ellas. Para ver los detalles de cada una de las secuencias, debemos entrar a su Blast y Hairpin.

PrimerQuest Tool

Assay Design Results / HelpAbout /

Sequence 1 Assay Set 3 Details

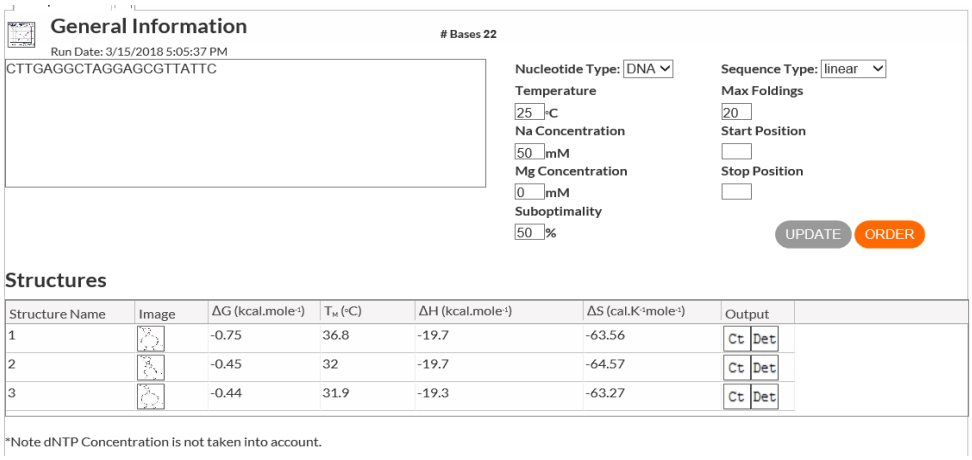
BACK TO RESULTS

Parameter Set: General PCR (Primers only)
Sequence Name: Sequence 1
Amplicon Length: 564

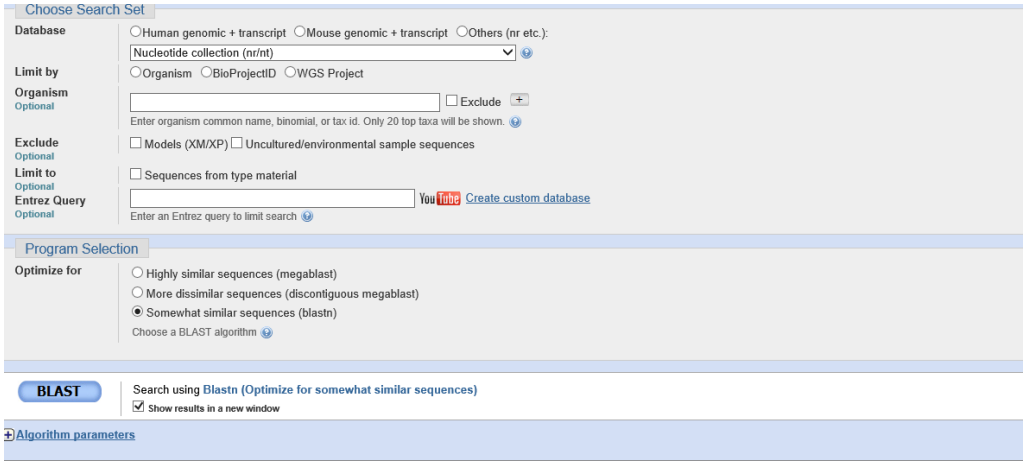
		Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	CTTGAGGCTAGGAGCGTTATTC (Sense)	51667	51689	22	62	50
Reverse	CCTCCACCTCGTTTCTTAGTTC (AntiSense)	52209	52231	22	62	50

```
51401  CCTTTGTATATGGGTATAGCGAACAAACCTTTGTGGGGATATTATTGTCCGCTGCCCTAGTTAACCCGTATGCCTTCTTGCTGGAAGATATGACAGAGAC
51501  AATATGAGCATCCTCGCCTAATTGGCCCTGCTTTTGGGCATCGATCAAGGCTTGCAAGTTGGAACCTGAGCCCGAAATTAATACGACAATTCTGGCCATA
51601  GCTTTTGGAAAGATTATTGATGTGTGTTGGCTCTCACCTGCGCTTGCTGCAAGTTAAATCATCAACCTTGAGGCTAGGAGCGTTATTCAACTTTAGAAGT
51701  GTCTTCTCTTCATAAACTACTCTATATAACTTTCCTCTTGCTGGAATAAAAAACAGGTCAGAGTCACTAGCAACGAGTCACTCATTCGAATCCTTGCTGA
51801  CGCTTTTAGTCTTTATGCTGAAATCTATCTTCGAAGTCGGAAGGAAAATGCATTTTTAAACTATCACTAGAACTACCATTTTAGAGCGAGCAGAAGGTTC
51901  CTCTTTTCTTAAACAAGTATAATTTTCCTTTTTGGATTGTACTTTATATTCTTACACTAAACGGCCCCTAGATGTCACCTGAGCTGTAGTCAATGTATAC
52001  ACCCATTCACCGCACCAGATAGTAAGTTGAAAAGTGTATCATCTTTAATATGAATATGAAAGAATGAAGTGGAGTTCATCCATATTTCACAAGAAAAGAA
52101  GACTCCAACTCAAACAGTTGAGTGTTCCATATACATTCTGTTTCAATGATAAATTTAGAGGATTACTGGGAAGATGAAACGCCTGGGCCTGATAGGGAAC
52201  CGACTAATGAACTAAGAAACGAGGTGGAGGAAACCATCACTCTGATGGAACTGCTGAAAGTGTCCGAATTGAAGGATATTTGCAGGTCTGTATCTTTCCC
52301  GGTTTCCGGTCGCAAGGCCGTTCTACAGGACCTTATCAGGAATTTCTTGCAGAACGCTTTAGTAGTAGGCAAGTCTGATCCTTATAGAGTTCAAGCCGTT
52401  AAATTTCTGATAGAACGGATCAGAAAGAATGAACCTTTGCCTGTTTATAAAGATCTTTGGAACGCTTTAAGAAAGGGTACCCCATTGAGTGCTATCACAG
52501  TACGTTCTATGGAGGGGCCTCCCACGGTGCAGCAGCAATCACCTTCCGTTATTAGGCAGTCTCCCACTCAACGGCGGAAAACGTCTACCACATCTTCCAC
52601  ATCTCGTGCACCACCACCTACAAATCCAGATGCCTCTTCTTCTTCATCATCTTTTGCTGTACCGACAATTCATTTTAAAGAGTCTCCATTTTACAAAATA
52701  CAAAGGCTAATCCCTGAATTAGTGATGAACGTGGAAGTCACAGGCGGAAGAGGTATGTGCTCTGCGAAATTTAAATTGTCCAAAGCAGACTATAATCTAT
52801  TAAGTAACCCGAATAGCAAACACAGGCTATACTTATTTTCTGGGATGATTAATCCATTAGGATCCCGAGGTAATGAACCCATCCAATTTCCATTCCCAAA
52901  TGAATTAAGGTGCAATAATGTTCAAATCAAAGATAATATAAGAGGTTTCAAGAGTAAGCCGGGCACAGCTAAGCCGGCGGATTTAACGCCTCATCTCAAA
53001  CCTTATACTCAACAAAACAATGTGGAGCTGATATATGCCTTCACCACGAAGGAATACAAGCTATTTGGGTACATTGTAGAAATGATCACTCCGGAGCAAC
53101  TCCTGGAAAAAGTATTACAGCATCCAAAAATTATTAAACAAGCCACGTTACTTTACTTGAAAAAAACACTTCGGGAGGATGAAGAAATGGGCTTGACTAC
53201  CACATCTACTATCATGAGTCTGCAATGTCCAATTTCGTACACAAGAATGAAATACCCTTCAAAATCAATAAATTGTAAGCATCTGCAATGTTTTGATGCA
53301  TTATGGTTCCTACACTCCCAACTACAAATTCCTACGTGGCAATGCCCAGTATGTCAAATTGATATAGCTTTGGAAAATTTAGCAATTTCCGAATTTGTTG
53401  ATGACATTTTACAGAACTGTCAAAAAAACGTTGAACAGGTAGAACTTACTTCTGATGGTAAGTGGACAGCCATATTGGAAGACGATGATGACAGCGACAG
```

8) Seleccionamos la opción “Hairpin”, de la secuencia de Forward. Ahí debemos comparar si las condiciones de Tm a la que forma otras estructuras, no coincidan con las temperaturas que obtenemos en el programa de la PCR. Si estas difieren, es correcta la elección.



9) Ahora en la parte de Blast, de la secuencia Forward, le damos clic, ya en la nueva página, nos dirigimos a buscar el botón de blast, antes de darle clic debemos poner la opción de mostrar los resultados en una nueva pestaña.



10) Este paso es de suma importancia, debemos verificar que nuestro primer seleccionado, en este caso, debe alinear al 100% para la levadura de *Saccharomyces cerevisiae,* la cual está indicada en color rojo. Y esto debe ser así porque si codifica para alguna especie más, no sabremos cuál de ellas es la que tenemos dentro de nuestro producto.

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Saccharomyces cerevisiae strain CEN.PK113-7D chromosome IV, complete sequence	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gil1329886529|CP022969.1
Saccharomyces cerevisiae strain UWOPS03-461.4 chromosome IV, complete sequence	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gil1163011376|CP020228.1
Saccharomyces cerevisiae strain YPS128 chromosome IV, complete sequence	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gil1163011074|CP020211.1
Saccharomyces cerevisiae strain Y12 chromosome IV, complete sequence	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gil1163002709|CP020194.1
Saccharomyces cerevisiae strain SK1 chromosome IV, complete sequence	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gil1163002325|CP020177.1
Saccharomyces cerevisiae strain DBVPG6765 chromosome IV, complete sequence	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gil1163001983|CP020160.1
Saccharomyces cerevisiae strain DBVPG6044 chromosome IV, complete sequence	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gil1163001656|CP020143.1
Saccharomyces cerevisiae strain S288c chromosome IV, complete sequence	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gil1163001453|CP020126.1
Saccharomyces cerevisiae YJM1573 chromosome IV sequence	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gil1115569198|CP004748.2
Saccharomyces cerevisiae YJM1447 chromosome IV sequence	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gil1115569196|CP004738.2
Saccharomyces cerevisiae YJM1402 chromosome IV sequence	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gil1115569195|CP004728.2
Saccharomyces cerevisiae YJM1381 chromosome IV sequence	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gil1115569193|CP004718.2
Saccharomyces cerevisiae YJM1307 chromosome IV sequence	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gil1115569189|CP004708.2
Saccharomyces cerevisiae YJM1199 chromosome IV sequence	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gil1115569188|CP004698.2
Saccharomyces cerevisiae YJM981 chromosome IV sequence	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gil1115569184|CP004688.2
Saccharomyces cerevisiae YJM627 chromosome IV sequence	44.1	44.1	100%	0.018	100%	gil1115569183|CP004678.2
Saccharomyces cerevisiae YJM326 chromosome IV sequence	44.1	44.1	100%	0.018	100%	

Questions/comm

11) Después de verificar que el primer amplifique solo para la levadura estudiada, nos dirigimos a darle clic al primer seleccionado, para ver las especificaciones que este tiene y que cumpla con los rubros que deseamos.

12) Ahora realizamos nuevamente del paso 7 al 11, pero ahora con la cadena Reverse. Verificando los mismos aspectos que los de la secuencia de Forward.

PrimerQuest Tool

Assay Design Results / HelpAbout /

Sequence 1 Assay Set 3 Details

BACK TO RESULTS

Parameter Set: General PCR (Primers only)
Sequence Name: Sequence 1
Amplicon Length: 564

		Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	CTTGAGGCTAGGAGCGTTATTC (Sense)	51667	51689	22	62	50
Reverse	CCTCCACCTCGTTTCTTAGTTC (AntiSense)	52209	52231	22	62	50

Base	Sequence
1	GATCAATTAATTTTGTATCCTTTCAAGAGGGAGTAGCTTTCAGTTTCGAATGGCACCATTTTCAAAAAATAGCTATGGGAAACATGTCTTTCATGAACGT
101	TCGAAAAGATATGAGTGCATCGCTTCATTTTTTTATTATGATAGTTACAAAAATATTTGATTTGAGACACCTAATGAAACCAAAGAGGAACTCACCCATC
201	GTGGTACATGTTTATTTGAGGGTTTATTTTTCCTACGCAATGGTATACTTTTAATACTCTCAACTCCTTGATTGTTTGTGTATTGTCCCTTCCTTCTTTG
301	ATTTTATATCATAGAGATATATGACTAACTTTTTTTTTTTTATTATAGGAATTTTTTGCATCTCAAGTAGGTGGTGTTCAAAGAGTTTTGTTGAGTTATA
401	ACGAAAGGGGCCAATCTACTGGTATGGCTAACATCACATTCAAAAACGGTGAATTGGCCAGAAGGGCTGTTGAAAGATTTAACGGCTCTCCAATCGATGG
501	AGGCAGATCAAGATTGAGACTTAACCTAATCGTTGATCCAAACCAACGCCCAGTCAAAAGTTTAGCCGACAGGATCAAGGCTATGCCACAAAAAGGCGGA
601	AACGCTCCAAGACCAGTAAAGAGGGGTCCAAATAGAAAAGCTGCTATGGCAAAATCCCAAAACAAACCAAAGAGAGAAAAGCCTGCTAAGAAAAGTCTTG

13) Seleccionamos la opción “Hairpin”, de la secuencia de Reverse. Ahí debemos ver si las condiciones que nos da de Tm no sean iguales a las obtenidas durante el programa de la PCR.

General Information

Run Date: 3/15/2018 5:14:54 PM

Bases 22

CCTCCACCTCGTTTCTTAGTTC

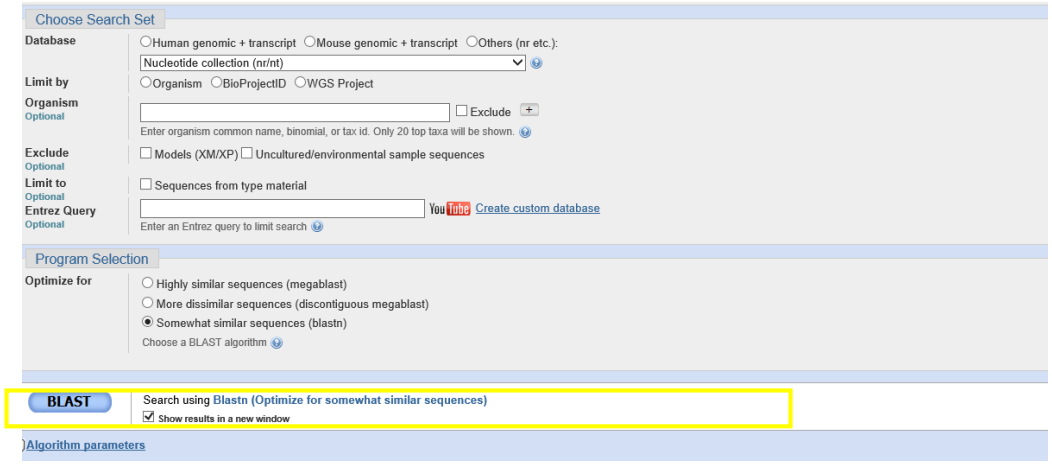
Nucleotide Type: DNA
Sequence Type: linear
Temperature: 25 °C
Max Foldings: 20
Na Concentration: 50 mM
Start Position:
Mg Concentration: 0 mM
Stop Position:
Suboptimality: 50 %

UPDATE ORDER

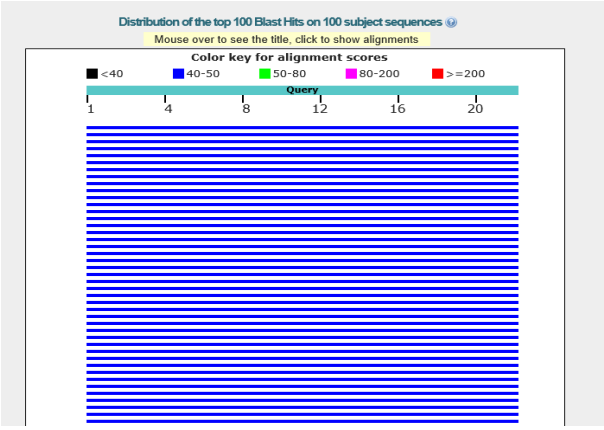
Structures

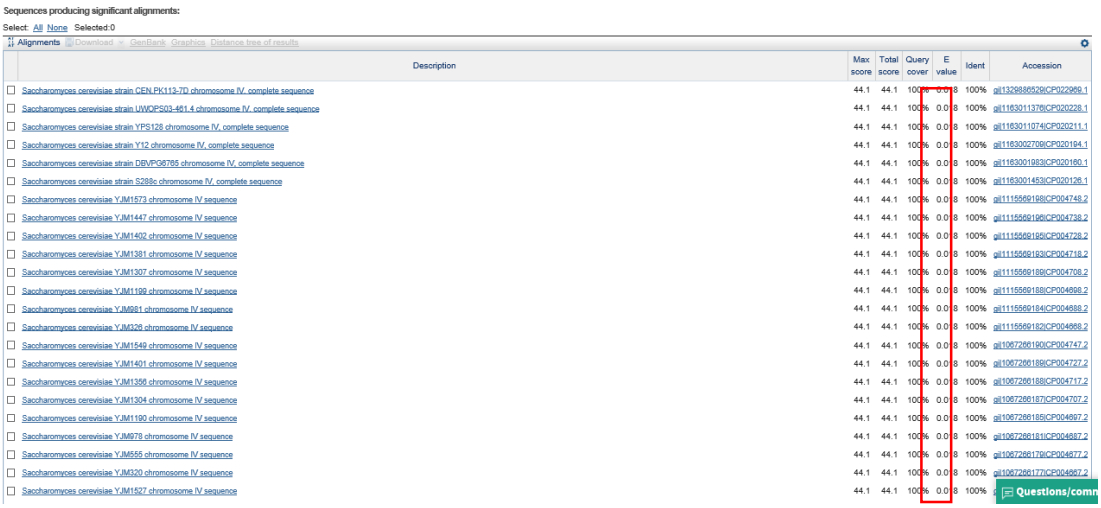
Structure Name	Image	ΔG (kcal.mole⁻¹)	T_M (°C)	ΔH (kcal.mole⁻¹)	ΔS (cal.K⁻¹mole⁻¹)	Output
1		1.5	3.6	-19.3	-69.75	Ct Det
2		1.78	-0.2	-19.3	-70.72	Ct Det
3		1.89	-232.4	-0.3	-7.36	Ct Det
4		1.9	-98.1	-2.7	-15.42	Ct Det
5		1.9	-56	-5.1	-23.48	Ct Det

14) Ahora en la parte de Blast de la secuencia Reverse, le damos clic, ya en la nueva página, nos vamos a buscar el botón de Blast, pero antes de darle clic debemos poner la opción, mostrar los resultados en una nueva pestaña.



15) En la selección de primers, en la parte final, debemos checar 100% la especie de estudio, en este caso debe codificar exclusivamente al 100% para la levadura de *Saccharomyces cerevisiae,* la cual está indicada en color rojo.





Anexo 2:

Se realiza el cálculo de la temperatura de hibridación del primer Tm, para poder comparar con el Tm, con el obtenido al momento de diseñar el primer, previamente realizado durante el objetivo 1.

Primer	Secuencia	Amplificado
PF	CTTGAGGCTAGGAGCGTTATTC	564 Pb
PR	CCTCCACCTCGTTTCTTAGTTC	

El cálculo de la temperatura de hibridación del primer Tm utilizamos la siguiente ecuación:

Tm=[(G+C)4+(A+T)2]-5

- Tm= Temperatura de hibridación del primer
- C= Numero de Citosinas
- G=Guanina
- A=Adenina
- T=Timina

PF: $Tm = [(8+3)4 + (9+2)2] - 5$

Tm= 61°C

PR: $Tm = [(6+5)4 + (5+7)2] - 5$

Tm= 61°C

Cuando obtenemos cada una de las Tm, sacamos el promedio de estas para obtener el Tm final.

Tm= 61°C

Anexo 3:

ANOVA de un solo factor: Ocratoxinas vs. Cerveza
Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	α = 0.05

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
C1	12	Blue Moon, Erdinger Dunkel, H y p, Hopulencia, Inextremis, Ingrata Tentación, Iron Maiden, La Trappe, Oaxaca de Noche, Porfirio, Sohnfeld, Tecate

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	11	828.40	75.309	49.16	0.000
Error	24	36.77	1.532		
Total	35	865.17			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1.23772	95.75%	93.80%	90.44%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Blue Moon	3	1.7333	0.1528	(0.2585, 3.2082)
Erdinger Dunkel	3	2.1000	0.1000	(0.6251, 3.5749)
H y p	3	2.867	0.681	(1.392, 4.342)
Hopulencia	3	1.4333	0.0577	(-0.0415, 2.9082)
Inextremis	3	7.933	0.651	(6.458, 9.408)
Ingrata Tentación	3	7.30	2.02	(5.83, 8.77)
Iron Maiden	3	2.233	0.850	(0.758, 3.708)
La Trappe	3	3.900	1.100	(2.425, 5.375)
Oaxaca de Noche	3	19.000	1.000	(17.525, 20.475)
Porfirio	3	8.17	2.80	(6.69, 9.64)
Sohnfeld	3	3.400	1.600	(1.925, 4.875)

Tecate	3	2.0333	0.1528	(0.5585, 3.5082)

Desv.Est. agrupada = 1.23772

Comparaciones en parejas de Tukey
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación			
Oaxaca de Noche	3	19.000	A			
Porfirio	3	8.17		B		
Inextremis	3	7.933		B		
Ingrata Tentación	3	7.30		B	C	
La Trappe	3	3.900			C	D
Sohnfeld	3	3.400				D
H y p	3	2.867				D
Iron Maiden	3	2.233				D
Erdinger Dunkel	3	2.1000				D
Tecate	3	2.0333				D
Blue Moon	3	1.7333				D
Hopulencia	3	1.4333				D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 4:
ANOVA de un solo factor: Levaduras vs. Cervezas

*** NOTA * No es posible dibujar la gráfica de intervalo para el procedimiento de Tukey. Las gráficas de intervalo para las comparaciones son ilegibles con más de 45 intervalos.**

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	α = 0.05

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
C1	12	Blue Moon, Erdinger Dunkel, H y p, Hopulencia, Inextremis, Ingrata Tentación, Iron Maiden, La Trappe, Oaxaca de Noche, Porfirio, Sohnfeld, Tecate

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C1	11	74060	6732.69	68.35	0.000
Error	24	2364	98.50		
Total	35	76424			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
9.92472	96.91%	95.49%	93.04%

Medias

C1	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Blue Moon	3	0.000000	0.000000	(-11.826217, 11.826217)
Erdinger Dunkel	3	16.000	1.000	(4.174, 27.826)
H y p	3	97.33	3.06	(85.51, 109.16)
Hopulencia	3	30.7	24.0	(18.8, 42.5)
Inextremis	3	0.000000	0.000000	(-11.826217, 11.826217)
Ingrata Tentación	3	0.000000	0.000000	(-11.826217, 11.826217)
Iron Maiden	3	0.000000	0.000000	(-11.826217, 11.826217)
La Trappe	3	0.000000	0.000000	(-11.826217, 11.826217)
Oaxaca de Noche	3	149.0	19.0	(137.2, 160.8)
Porfirio	3	18.00	14.42	(6.17, 29.83)
Sohnfeld	3	10.67	5.03	(-1.16, 22.49)
Tecate	3	0.000000	0.000000	(-11.826217, 11.826217)

Desv.Est. agrupada = 9.92472

Comparaciones en parejas de Tukey
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

C1	N	Media	Agrupación		
Oaxaca de Noche	3	149.0	A		
H y p	3	97.33		B	
Hopulencia	3	30.7			C
Porfirio	3	18.00			C	D
Erdinger Dunkel	3	16.000			C	D
Sohnfeld	3	10.67			C	D
Tecate	3	0.000000				D

La Trappe	3	0.000000	D
Iron Maiden	3	0.000000	D
Ingrata Tentación	3	0.000000	D
Inextremis	3	0.000000	D
Blue Moon	3	0.000000	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Erdinger Dun - Blue Moon	16.00	8.10	(-13.22, 45.22)	1.97	0.705
H y p - Blue Moon	97.33	8.10	(68.11, 126.56)	12.01	0.000
Hopulencia - Blue Moon	30.67	8.10	(1.44, 59.89)	3.78	0.034
Inextremis - Blue Moon	0.00	8.10	(-29.22, 29.22)	0.00	1.000
Ingrata Tent - Blue Moon	0.00	8.10	(-29.22, 29.22)	0.00	1.000
Iron Maiden - Blue Moon	0.00	8.10	(-29.22, 29.22)	0.00	1.000
La Trappe - Blue Moon	0.00	8.10	(-29.22, 29.22)	0.00	1.000
Oaxaca de No - Blue Moon	149.00	8.10	(119.78, 178.22)	18.39	0.000
Porfirio - Blue Moon	18.00	8.10	(-11.22, 47.22)	2.22	0.551
Sohnfeld - Blue Moon	10.67	8.10	(-18.56, 39.89)	1.32	0.969
Tecate - Blue Moon	0.00	8.10	(-29.22, 29.22)	0.00	1.000
H y p - Erdinger Dun	81.33	8.10	(52.11, 110.56)	10.04	0.000
Hopulencia - Erdinger Dun	14.67	8.10	(-14.56, 43.89)	1.81	0.798
Inextremis - Erdinger Dun	-16.00	8.10	(-45.22, 13.22)	-1.97	0.705
Ingrata Tent - Erdinger Dun	-16.00	8.10	(-45.22, 13.22)	-1.97	0.705
Iron Maiden - Erdinger Dun	-16.00	8.10	(-45.22, 13.22)	-1.97	0.705
La Trappe - Erdinger Dun	-16.00	8.10	(-45.22, 13.22)	-1.97	0.705
Oaxaca de No - Erdinger Dun	133.00	8.10	(103.78, 162.22)	16.41	0.000
Porfirio - Erdinger Dun	2.00	8.10	(-27.22, 31.22)	0.25	1.000
Sohnfeld - Erdinger Dun	-5.33	8.10	(-34.56, 23.89)	-0.66	1.000
Tecate - Erdinger Dun	-16.00	8.10	(-45.22, 13.22)	-1.97	0.705
Hopulencia - H y p	-66.67	8.10	(-95.89, -37.44)	-8.23	0.000
Inextremis - H y p	-97.33	8.10	(-126.56, -68.11)	-12.01	0.000
Ingrata Tent - H y p	-97.33	8.10	(-126.56, -68.11)	-12.01	0.000

Iron Maiden - H y p	-97.33	8.10	(-126.56, -68.11)	-12.01	0.000
La Trappe - H y p	-97.33	8.10	(-126.56, -68.11)	-12.01	0.000
Oaxaca de No - H y p	51.67	8.10	(22.44, 80.89)	6.38	0.000
Porfirio - H y p	-79.33	8.10	(-108.56, -50.11)	-9.79	0.000
Sohnfeld - H y p	-86.67	8.10	(-115.89, -57.44)	-10.69	0.000
Tecate - H y p	-97.33	8.10	(-126.56, -68.11)	-12.01	0.000
Inextremis - Hopulencia	-30.67	8.10	(-59.89, -1.44)	-3.78	0.034
Ingrata Tent - Hopulencia	-30.67	8.10	(-59.89, -1.44)	-3.78	0.034
Iron Maiden - Hopulencia	-30.67	8.10	(-59.89, -1.44)	-3.78	0.034
La Trappe - Hopulencia	-30.67	8.10	(-59.89, -1.44)	-3.78	0.034
Oaxaca de No - Hopulencia	118.33	8.10	(89.11, 147.56)	14.60	0.000
Porfirio - Hopulencia	-12.67	8.10	(-41.89, 16.56)	-1.56	0.906
Sohnfeld - Hopulencia	-20.00	8.10	(-49.22, 9.22)	-2.47	0.403
Tecate - Hopulencia	-30.67	8.10	(-59.89, -1.44)	-3.78	0.034
Ingrata Tent - Inextremis	0.00	8.10	(-29.22, 29.22)	0.00	1.000
Iron Maiden - Inextremis	0.00	8.10	(-29.22, 29.22)	0.00	1.000
La Trappe - Inextremis	0.00	8.10	(-29.22, 29.22)	0.00	1.000
Oaxaca de No - Inextremis	149.00	8.10	(119.78, 178.22)	18.39	0.000
Porfirio - Inextremis	18.00	8.10	(-11.22, 47.22)	2.22	0.551
Sohnfeld - Inextremis	10.67	8.10	(-18.56, 39.89)	1.32	0.969
Tecate - Inextremis	0.00	8.10	(-29.22, 29.22)	0.00	1.000
Iron Maiden - Ingrata Tent	0.00	8.10	(-29.22, 29.22)	0.00	1.000
La Trappe - Ingrata Tent	0.00	8.10	(-29.22, 29.22)	0.00	1.000
Oaxaca de No - Ingrata Tent	149.00	8.10	(119.78, 178.22)	18.39	0.000
Porfirio - Ingrata Tent	18.00	8.10	(-11.22, 47.22)	2.22	0.551
Sohnfeld - Ingrata Tent	10.67	8.10	(-18.56, 39.89)	1.32	0.969
Tecate - Ingrata Tent	0.00	8.10	(-29.22, 29.22)	0.00	1.000
La Trappe - Iron Maiden	0.00	8.10	(-29.22, 29.22)	0.00	1.000
Oaxaca de No - Iron Maiden	149.00	8.10	(119.78, 178.22)	18.39	0.000
Porfirio - Iron Maiden	18.00	8.10	(-11.22, 47.22)	2.22	0.551
Sohnfeld - Iron Maiden	10.67	8.10	(-18.56, 39.89)	1.32	0.969
Tecate - Iron Maiden	0.00	8.10	(-29.22, 29.22)	0.00	1.000
Oaxaca de No - La Trappe	149.00	8.10	(119.78, 178.22)	18.39	0.000

Porfirio - La Trappe	18.00	8.10	(-11.22, 47.22)	2.22	0.551
Sohnfeld - La Trappe	10.67	8.10	(-18.56, 39.89)	1.32	0.969
Tecate - La Trappe	0.00	8.10	(-29.22, 29.22)	0.00	1.000
Porfirio - Oaxaca de No	-131.00	8.10	(-160.22, -101.78)	-16.17	0.000
Sohnfeld - Oaxaca de No	-138.33	8.10	(-167.56, -109.11)	-17.07	0.000
Tecate - Oaxaca de No	-149.00	8.10	(-178.22, -119.78)	-18.39	0.000
Sohnfeld - Porfirio	-7.33	8.10	(-36.56, 21.89)	-0.90	0.998
Tecate - Porfirio	-18.00	8.10	(-47.22, 11.22)	-2.22	0.551
Tecate - Sohnfeld	-10.67	8.10	(-39.89, 18.56)	-1.32	0.969

Nivel de confianza individual = 99.86%