



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“SELECCIÓN DE CEPAS DE LEVADURA PARA REDUCIR  
INSUMOS EN LA ELABORACIÓN DE CERVEZA”**

**TESIS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**ALFREDO TRUJILLO RODRÍGUEZ**

DIRIGIDA POR

**SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO 2015

# ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
1 ANTECEDENTES	1
1.1 La cerveza	1
1.2 Consumo de cerveza	5
1.3 Insumos	6
1.3.1 Malta	6
1.3.2 Lúpulo ( <i>Hummulus lupulus</i> )	8
1.3.3 Levaduras	9
1.4 Proceso de producción	11
1.4.1 Mosto	11
1.4.2 Fermentación	12
1.4.3 Maduración y embotellado	15
1.5 Formación de sabores	16
1.6 Modificaciones genéticas y su impacto en los perfiles de esteres	19
2 Hipótesis	22
3 OBJETIVOS	23
3.1 General:	23
3.2 Específicos:	23
4 METODOLOGÍA	24
4.1 Materiales	24
4.1.1 Medios de cultivo y reactivos	24
4.1.2 Aparatos e instrumentos	24
4.1.3 Insumos para elaboración de cerveza	24
4.1.4 Cepas	24
4.2 Métodos	25

4.2.1	Aislamiento de cepas existentes en cervezas artesanales, en busca de productos con sabores interesantes.	25
4.2.2	Identificación microscópica de las levaduras crecidas en el medio.	25
4.2.3	Cultivo de las cepas seleccionadas para la identificación de sabores y aromas interesantes.	25
4.2.4	Microfermentaciones para determinar el perfil de ésteres de cada levadura.	26
4.2.5	Cromatografía en capa fina.	26
4.2.6	Ciclo de mutaciones	27
4.2.7	Evaluación en la producción de CO <sub>2</sub> y biomasa de las cepas mutantes	27
4.2.8	Evaluación sensorial de cerveza producida a partir de las levaduras seleccionadas.	28
5.	Resultados y discusiones	29
5.1	Aislamiento de cepas existentes en cervezas artesanales en busca de productos con sabores interesantes.	29
5.1.1	Misterium	29
5.1.2	Tecolote	30
5.1.3	Delirium	31
5.2	Uso de diferentes levaduras, aisladas y liofilizadas, en microfermentación para determinar perfiles de producción de ésteres.	31
5.3	Cromatografía en capa fina	34
5.4	Mutagénesis de levaduras	35
5.4.1	Delirium	37
5.4.2	Misterium	38
5.4.3	Tecolote	38
5.4.4	Curva de supervivencia	40
5.5	Evaluación en la producción de CO <sub>2</sub> .	41
5.6	La evaluación sensorial.	44
6.	CONCLUSIÓN	47
7.	REFERENCIAS	48

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Cervezas importadas con más ventas en Estados Unidos	5
2	Valores de los umbrales mínimos de ésteres y su concentración en cervezas lager.	18
3	Producción de ésteres etílicos en levaduras con deleciones en los genes <i>eht1</i> , <i>eeb1</i> y <i>ymr</i> , simples y múltiples.	20
4	Resultados de las pruebas sensoriales con 4 criterios. Textura, aroma, sabor amargo y sabor alcohólico.	44
5	Análisis de contingencia sobre los criterios de amargor y sabor alcohólico.	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Comparación del sabor entre diferentes tipos de cerveza ale.	3
2	Comparación del sabor entre diferentes tipos de cerveza lager.	4
3	Origen metabólico de los principales compuestos aromáticos.	17
4	Levaduras aisladas de la cerveza Misterium, observadas a microscopio óptico con aumento 40x.	30
5	Levaduras aisladas de la cerveza Tecolote, observadas a microscopio óptico con aumento 40x.	30
6	Levaduras aisladas de la cerveza Delirium, observadas a microscopio óptico con aumento 40x.	31
7	Microfermentaciones del mosto inoculadas con diferentes cepas levaduras	32
8	Placa de cromatografía en capa fina, con benceno como solvente de corrida y revelada con spray de vainillina/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5	35
9	Estación de mutaciones con exposición de luz UV de 254 nm.	36
10	Resultado de las mutaciones de la cepa aislada de la cerveza Delirium Nocturnum.	37
11	Resultado de las mutaciones de la cepa aislada de la cerveza Misterium.	38
12	Resultado de las mutaciones de la cepa aislada de la cerveza Tecolote.	39
13	Curva de supervivencia de las levaduras expuestas al ciclo de mutaciones	41
14	Producción de CO <sub>2</sub> /Biomasa.	42
15	Producción de CO <sub>2</sub> en los tubos respecto al tiempo. Las mediciones fueron realizadas cada hora.	43

## RESUMEN

La cerveza es una de las bebidas más producidas y consumidas a nivel mundial; México es el sexto consumidor mundial *per cápita* y primer exportador, con una producción anual cercana a los 8,600 millones de litros; sin embargo los insumos mexicanos no son suficientes para obtener esa producción; por lo tanto las empresas deben importar cebada, maltas o extractos y en especial, lúpulo (*Humulus lupulus*), planta utilizada para aromatizar la cerveza, adicionar propiedades antimicrobianas y conseguir el sabor amargo que es tan característico de esta bebida; estamos obligados a importarla ya que no crece de manera natural en el país. Los altos precios de las materias primas obligan a la búsqueda de alternativas que nos permitan disminuir la importación de insumos, que pueden obtenerse mediante procesos biotecnológicos como es el caso de las levaduras. El objetivo general de este proyecto es el de reducir los costos para la producción de cerveza mediante mutagénesis de levaduras y así evaluar el impacto de estas sobre la cerveza obtenida por microfermentación. Se obtuvieron y aislaron diferentes cepas de levaduras a partir de cervezas artesanales mexicanas, cervezas importadas y liofilizadas. Se evaluó el vigor de crecimiento y capacidad de fermentación de las cepas aisladas y por último se seleccionó a las cepas más vigorosas para ser mutagenizadas por radiación UV, las cepas modificadas fueron evaluadas de nuevo para ambas capacidades y por último se usaron para producir cerveza por microfermentación; fueron catadas por un panel de consumidores habituales de cerveza para evaluar su aceptabilidad sensorial. El vigor de las levaduras aisladas de la cerveza importada Delirium fue menor al resto, 10 horas después de inocular no consiguió una producción estable de CO<sub>2</sub>, y las cepas derivadas de ésta, D01 y D02 no lograron fermentar el mosto; respecto a la levadura liofilizada, Windsor, se mostró vigorosa produciendo CO<sub>2</sub> desde la hora 5 después del inóculo. Sin embargo las levaduras aisladas de cervezas locales, Tecolote y Misterium, fueron las que respondieron mejor al ciclo de mutaciones llegando a la supervivencia objetivo en apenas 1'30" y fue posible aislar una cepa, M01, que mostró un metabolismo acelerado llenando el 56% del tubo con CO<sub>2</sub> y biomasa de 0.043g/L contra el 46% y 0.32 g/L de la cepa original, producción de biomasa y CO<sub>2</sub>, la cerveza obtenida utilizando la cepa modificada tuvo una aceptabilidad indistinguible a la original, este cambio podría producir ahorros energéticos y de tiempo para la producción; como un extra, se determinó la presencia de ésteres y compuestos volátiles de interés, mediante cromatografía de capa fina; abriendo la posibilidad de que trabajos posteriores puedan enfocarse en la cuantificación de compuestos específicos de sabor que podrían reducir el uso de agentes aromáticos y modificadores de sabor.

# 1 ANTECEDENTES

## 1.1 La cerveza

Una de las bebidas alcohólicas no destiladas más populares del mundo, además de ser uno de los productos biotecnológicos más antiguos en historia de la humanidad. Este producto es el resultado del proceso de fermentación de una mezcla de ingredientes, llamada mosto, que es preparado a partir de agua, cebada y algunas hierbas aromáticas, principalmente lúpulo. Diferentes civilizaciones han documentado de alguna manera su relación con las bebidas fermentadas de este tipo; cerca del año 3000 a.C y posiblemente desde el 5000 a.C los egipcios conocían el proceso de elaboración de cerveza, la cerveza formaba parte de su alimentación e incluso, a los trabajadores de la necrópolis se les pagaba ampliamente con pan y cerveza, basados en evidencia de los textos del antiguo pueblo Deir el-Medina en donde se describe que se les pagaba 1.5 khar de cebada y 4 khar de farro (Hornsey, 2003). Respecto a otras civilizaciones, en Mesopotamia también se tienen registros del consumo de cerveza, presente en todas las eras, así mismo era consumida por hombres y mujeres y su consumo era asociado con la felicidad y la vida civilizada. Aunque ninguna civilización tenía conocimiento del papel que desempeñaban las levaduras, o cuales eran los elementos para la óptima elaboración, por lo que las causas del proceso eran atribuidas a deidades, en el caso de los egipcios éstas fueron atribuidas a Osiris, por lo que fue hasta el año de 1876 que Louis Pasteur demuestra en su libro “Etudes sur la biere” que la fermentación alcohólica es producto de microorganismos. Ya una vez identificada la actividad microbiana surgen diferentes métodos de caracterización y se profundiza el estudio de los procesos de fermentación.

Durante la producción de cerveza, el metabolismo de las levaduras genera a su vez una gran variedad de metabolitos, que proveen a la cerveza de cualidades organolépticas específicas, actualmente podemos saber esto, gracias a que los procesos de fermentación y rutas metabólicas de los microorganismos han sido

ampliamente estudiados, y ha quedado más que demostrado el papel que juegan los microorganismos durante la elaboración de la cerveza.

A pesar de que el proceso de elaboración de cerveza se mantiene constante en sus bases, se han originado variedades o distintos tipos de cerveza, generalmente se pueden resumir todas en lagers y ales, pero éstas se han diversificado cada vez más con el paso de los años, gracias a las empresas que tienden a innovar sus productos, con nuevas recetas y la incorporación de nuevos elementos, que hacen que sea más difícil clasificar las cervezas en los grupos antes mencionados. Estos nuevos tipos de cerveza pueden basarse en el uso de otro tipo de cereales, maltas torrificadas, adición de otros azúcares, fermentables y no fermentables, caramelización de las maltas y de más.

A continuación se muestra un listado de los principales tipos de cerveza producidos por levaduras ale y sus principales características, posteriormente un gráfico mostrando diferentes tipos de cerveza ale y diferencias en sabores a malta y lúpulo (Fig.1) así el tipo de cerveza queda descrito por la predominancia del sabor principal.

English Pale Ale: De sabor amargo, con un contenido de alcohol que puede ir desde 3.5 hasta 7% en volumen. Son filtradas y se les remueve cualquier componente insoluble, por lo que por lo general son cervezas muy claras, para después ser llevadas a los envasados donde se les agrega azúcar para que la levadura residual en la cerveza comience a fermentarlo y llevar así una carbonatación natural.

India Pale Ale: Cervezas caracterizadas por tener un alto contenido de alcohol, un nivel bajo de azúcares residuales y un amargor producido por la gran cantidad de lúpulo añadido y tiempo de hervido, lo que permite impregnar más el sabor a lúpulos y concentrar los azúcares para llegar a un nivel más alto de alcohol.



Mild: Es una variedad inglesa, de sabor más dulce y un poco más obscura que las pale ales, las maltas usadas son calentadas ligeramente para obtener un tono más alto y sabores más desarrollados.

Porter: De origen inglés, elaborada con maltas gruesas y cafés/oscuroas, y aguas con pH más alcalino, provocando que se distinga por ser muy obscura, algunas llegando a negro, muy amarga y de mucho sabor aromático.

Stout: Una combinación de maltas claras y muy oscuras, a partir del año 1817 eran completamente disponibles, gracias a la tecnología del torrificado de maltas, en dónde las maltas son secadas con aire caliente y su temperatura es elevada hasta que los sabores comienzan a tornarse muy amargos y los colores muy oscuros, algunas maltas son torrificadas hasta casi ser carbonizadas, lo que cambia el color de la cerveza de un café oscuro hasta negro, lo cual le atribuye características aromáticas parecidas a las del café y suelen aplicarles gas nitrógeno para evitar la “dureza” de la cerveza y mejorar la calidad de la espuma.

Weizen: Cerveza de origen alemán, elaborada con por lo menos un 50% de malta de trigo, con un sabor afrutado, casi cítrico, con notas de limón y clavo. Generalmente tienen una alta carbonatación y son de color muy claro.

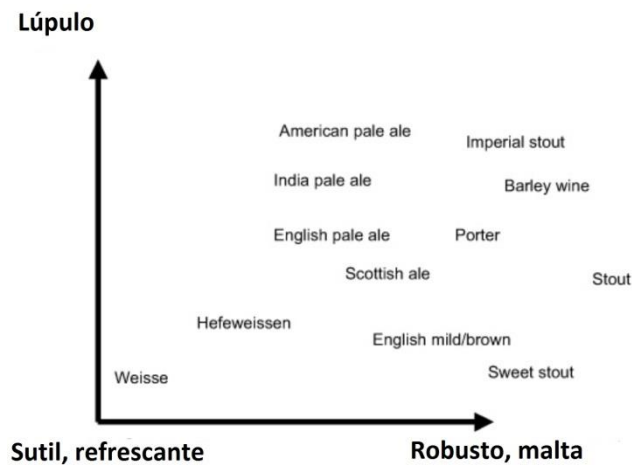


Figura 1. Comparación del sabor entre diferentes tipos de cerveza ale.

Las siguientes cervezas pertenecen a la categoría de las lagers, es común que estas cervezas sean de un sabor fuerte a lúpulo, claras (aunque existen excepciones) y refrescantes. Al final del listado de cervezas lager se muestra un gráfico comparativo de diferentes tipos de cervezas lager por diferencias en sabor a malta y lúpulo (Fig. 2).

**Pilsner:** De un color claro y dorado, con un volumen de alcohol entre 4.8% y 5.1% con un sabor a lúpulo dominante.

**Bock:** Esta cerveza contiene un volumen de alcohol entre 6%-8%, con sabores muy malteados y los colores pueden variar desde un color paja, hasta un café consistente.

**Helles:** cervezas claras, que van desde un amarillo claro hasta un color ambar muy claro, de poco amargor y sabor a lúpulo, muy refrescantes con un volumen de alcohol de entre 4.5%-5.5%.

**Lager americana:** Son muy similares a las helles, son claras, con tonos amarillos/dorados, muy líquidas y carbonatadas y refrescantes; suelen tener una versión light en dónde todos los azúcares residuales son removidos lo que produce cervezas más ligeras.

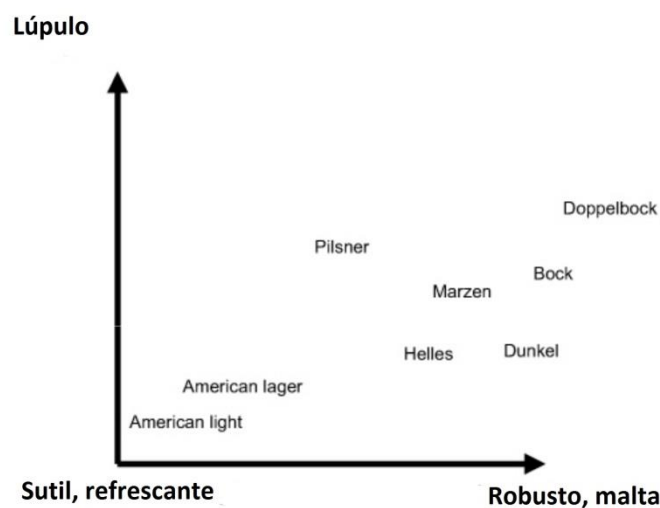


Figura 2. Comparación del sabor entre diferentes tipos de cerveza lager.

## 1.2 Consumo de cerveza

México ocupa el sexto lugar a nivel mundial en cuanto a consumo de cerveza, con un consumo anual de 62 litros por persona (PROFECO, 2013), el primer lugar lo ocupa República Checa (189 litros), el segundo Alemania (131 litros), tercer lugar Inglaterra (103 litros), Estados Unidos (85 litros) se ubica en cuarto lugar y finalmente España (66 litros) ocupa la quinta posición. México, además de ser uno de los principales consumidores, también es uno de los principales productores a nivel mundial de este producto; de acuerdo a la Encuesta Mensual de la Industria Manufacturera (EMIM) del INEGI en el año 2012 se producían 86,649,000 hectolitros de cerveza. Económicamente el impacto de la industria cervecera en México representa el 2% del valor que genera en conjunto la Industria Manufacturera de Mexicana, con datos estadísticos de la Cámara Nacional de la Industria de la Cerveza y de la Malta (CARNICEM).

Estados Unidos es uno de los principales consumidores de cerveza, y la cerveza mexicana es uno de los productos de importación más importante, para ellos, Corona es la marca extranjera más vendida (Cuadro 1), obteniendo ventas millonarias.

Cuadro 1. Cervezas importadas con más ventas en Estados Unidos (Ventas registradas en 52 semanas, terminando el 20 de abril del 2014).

Marca	Ventas en dólares
Corona Extra	\$1,257,222,000
Heineken	\$675,215,200
Modelo Especial	\$615,738,000
Dos Equis XX Lager Especial	\$253,205,400
Corona Light	\$220,644,800

A nivel mundial Corona comercializa sus productos en más de 170 países, y con la reciente compra de las principales cerveceras del país (grupo modelo comprado por Anheuser-Busch InBev, y grupo Cuauhtémoc-Moctezuma fue comprado por Heineken) las ventas a nivel mundial prometen elevarse; aunque la venta de las empresas que antes eran llamadas 100% mexicanas, no ha sido bien vista por la población mexicana. Uno de los motivos por los que la cerveza artesanal mexicana está comenzando a abrir paso en el mercado.

### 1.3 Insumos

El proceso de elaboración de cerveza ya está bien estudiado, pero eso no significa que no pueda haber innovaciones; el uso de insumos excepcionales, agua de excelente calidad, levaduras cuidadosamente seleccionadas, variedades de lúpulo y de más, pueden dotar a la cerveza de cualidades diferentes, por eso mismo es muy importante profundizar en la calidad de los elementos de la cerveza.

#### 1.3.1 Malta

La malta es el grano preparado que va a ser utilizado para la fermentación de azúcares, y diferentes cereales pueden ser sometidos a éste proceso denominado malteado.

En el proceso de malteado primero se hidratan los granos del cereal hasta llevarlos a un estadio de germinación, en el cual se comienzan a producir hormonas que inducen la producción de enzimas, que poco a poco hidrolizan las paredes del endospermo, y junto con otros cambios fisiológicos del grano, permiten al embrión nutrirse y comenzar el desarrollo; ese es el punto dónde las semillas en ese estado “vivo” se someten a un secado constante a temperaturas cercanas a los 50°C en dónde las enzimas que ya ha producido el germinado, van a tener actividad para hidrolizar los carbohidratos complejos, mientras se disminuye la humedad, hasta obtener una gran cantidad de azúcares fermentables, además de aminoácidos provenientes de la proteína degradada por actividad enzimática; después continúa una rampa de temperaturas más altas, en dónde se pierde la actividad enzimática y el nuevo objetivo es el de llevar el grano hasta un porcentaje de humedad menor al

5% (Bamforth, 2009). Los colores de las maltas cambian de diferentes maneras debido a las temperaturas a las que son sometidas los granos, es decir, depende de la manera de llevar a cabo el proceso de malteado, en conjunto con la variedad del grano. Existe otro proceso para dar origen a diferentes tipos de maltas, en donde las temperaturas de exposición no siguen el comportamiento de rampa, sino que son sometidos a un tratamiento con aire seco y caliente, lo cual comienza a tostar las maltas provocando 2 cambios buscados por el cervecero. Primero obscurecer las maltas para cambios de color en el producto y después provocando que los sabores se estabilicen por acción antioxidante (Meilgaard, 2001). Incluso se puede llegar a un punto cercano a carbonizar la malta; este proceso es conocido como torreficado.

Los granos que pueden ser utilizados son muy variados, pero no todos tienen los azúcares y aminoácidos suficientes para producir el crecimiento óptimo de las levaduras, y asimismo la calidad de la cerveza, ya sea por falta de azúcares, o de actividad enzimática; por estos motivos los granos más utilizados son la cebada y el trigo.

Para elaborar cerveza la cantidad de malta en cada receta varía bastante, y en algunos casos se utiliza extracto de malta como insumo, pero para resaltar la cantidad de malta necesaria para la producción tomaremos como referencia una receta de cerveza lager (que es la más elaborada), en la que se utilizan aproximadamente 4.2 kilogramos de cebada malteada para elaborar 19 litros de cerveza. Poniendo en contexto los datos citados del INEGI en 2012 en el que se registra una producción de 86,649,000 hectolitros de cerveza en ese año, siguiendo la relación de la receta mencionada se requerirían, 1,915,399 toneladas de cebada para obtener dicha producción. La cebada maltera, se precisó, representa en promedio 300 mil hectáreas de siembra a nivel nacional, representa alrededor de 50 mil jornales, integrados más de 20 mil productores, lo que se traduce en 600 mil toneladas al año que se comercializa al 100 por ciento, bajo contrato con la industria, con una derrama económica de dos mil quinientos millones de pesos. (SAGARPA, 2012), es decir, que en 2012 sólo se pudo producir el 31.32% de la

cebada necesaria para la producción, por lo tanto se tuvo que importar el 67.68% de la malta, en forma de cebada, malta, extracto de malta y otros cereales, para poder lograr la producción de la industria cervecera mexicana, y de esta manera dejando al cervecero artesanal, prácticamente sin acceso a uno de los principales insumos.

### 1.3.2 Lúpulo (*Hummulus lupulus*)

A pesar de que la historia de la cerveza nos remonta a civilizaciones antiguas, como la egipcia o sumerios, en una ubicación en el tiempo que nos lleva a antes de Cristo, los lúpulos en la elaboración de cerveza no se mencionan hasta el siglo 12; la cerveza en aquellos tiempos solía ser muy perecedera ante los microorganismos, por su alto contenido de azúcares, además de que su sabor también se describía de mucho dulzor, por lo que, con el paso del tiempo, durante la elaboración del mosto se utilizaban hierbas que dotaran a la bebida de amargor, aunque antes del lúpulo ya se saborizaba y aromatizaba con cilantro, romero, mirto, milhojas, jengibre, etc. Y para el siglo 13, el lúpulo, en Alemania ya se había instalado como una práctica común en la elaboración de cerveza (Bamforth, 2009).

La flor femenina de la planta, que es la parte usada para este propósito, es rica en resinas y aceites, precursores de los sabores amargos y aromas característicos de la cerveza. El lúpulo es una planta delicada, que crece en sitios pantanosos, de frecuentes precipitaciones y mucho sol; por lo que es complicado obtener un cultivo de lúpulo mexicano, capaz de sustentar a la amplia producción de la industria cervecera, es por eso la necesidad de reducir el uso de este insumo en la producción nacional de esta bebida; además es altamente susceptible plagas y enfermedades, como el áfido del lúpulo (*Phorodon humuli*), mildiu, etc. (Bamforth, 2009).

La problemática con este insumo comenzó en el año de 1992, cuando el lúpulo llega a un cultivo record de 236,067 acres a nivel mundial, las cosechas rindieron más de lo esperado, y una gran parte de ésta producción se transformó en extracto para aumentar la vida de anaquel del producto y durante los años siguientes se

comercializaba el exceso, manteniendo los precios bajos, a causa de esto, muchos contratos de producción se perdieron y tampoco se crearon nuevos cultivos, la oferta del producto no acordaba a la demanda y se cambiaron por cultivos redituables. Para el año 2006 la producción de lúpulo se limitaba a 113,417 acres, mientras que la producción de cerveza se elevó, pero fue hasta el año del 2007 que el problema estalló, gracias a un comportamiento inusual del clima, la producción de lúpulo en Europa se redujo en un 30%, provocando que los precios de lúpulo se dispararan, los lúpulos que se comercializaban en 2-3 dólares por libra llegaron a rondar los 26 dólares por libra (González, 2007).

A pesar de que en los años siguientes se aumentó el territorio de cultivo los precios no han disminuido, actualmente, la oferta de lúpulos en el mercado es amplia, y los precios son muy variados, aunque un lúpulo de calidad, en buenas condiciones no es más barato de 20 dólares por libra, con algunos productos llegando hasta 45 dólares por libra. Como consecuencia de ésta problemática, las empresas están interesadas en modificar el uso de éste insumo, y reducirlo o reemplazarlo tanto como sea posible.

### 1.3.3 Levaduras

El 90% de la producción de cerveza a nivel mundial es de cervezas lager, el 5% las Ale, y el 5% restante equivale a la mezcla de diferentes levaduras, e incluso bacterias (Verbelen and Delvaux, 2009). La diferencia entre ambos tipos de cerveza va ligada hasta la taxonomía de éstas levaduras; las levaduras lager son conocidas como las de fermentación baja (*Saccharomyces carlsbergensis*) mientras que las ale son de fermentación alta (*Saccharomyces cerevisiae*). Actualmente, la taxonomía de las levaduras del género *Saccaromyces* se divide en 2 grupos de especies, las *S. sensu stricto* (estrechamente relacionadas con *S. cerevisiae* que se dividen en cuatro *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus*, *S. bayanus*) *S. carlsbergensis* se incluye dentro de *S. pastorianus* y el otro grupo es el de las *S. sensu lato*, que son aquellas distantes de *S. cerevisiae*. (Rainieri *et al.*, 2003). Pero las diferencias no son únicamente taxonómicas, cada levadura tiene diferencias en cuanto a temperatura óptima para fermentación, floculaciones, fermentación de

azúcares diferentes, entre otras. Este es un gran problema cuándo se quiere estandarizar el proceso para elaborar cervezas con diferentes tipos de levaduras, por ejemplo, en África es común la preparación de una cerveza a partir de sorgo, y su sabor es muy diferente siempre (a esto se le denomina una cerveza artesanal), además del hecho de que se toma mientras sigue fermentando, no se utilizan únicamente levaduras *S. sensu stricto*, el 38% son *S. cerevisiae*, *Candida tropicalis* 19%, *Torulaspota delbrueckii* 14% y al menos otras 4 especies (Van der Aa-Kühle, 2001). A pesar de que éste tipo de cervezas no suelen llegar a un gran mercado, son de particular interés, ya que las levaduras que se encuentran en éstas cervezas artesanales tienen sabores únicos e interesantes, siendo objetivo del desarrollo de nuevas cepas, que aisladas y estudiadas tengan potencial como levaduras de uso a nivel industrial y obtener así nuevos productos.

Una característica muy importante de las levaduras en producción de cerveza es que no son haploides, sino poliploides, lo que provoca que sean más estables genéticamente; cualidad que se busca mucho, ya que si varía genéticamente una cepa, en una producción estandarizada, puede variar la calidad y el perfil de ésteres del producto. Éste resultado provoca que la variabilidad genética sea indeseable a nivel industrial, es por eso que se tiene que tener especial cuidado en el manejo de cepas, así como su mantenimiento adecuado para que no varíe la estabilidad de la levadura.

Las levaduras lager tienen la capacidad de flocular y precipitarse para llevar a cabo la fermentación, es por eso que son llamadas de baja fermentación, por otra parte las llamadas de fermentación alta, levaduras ale, se quedan en la parte superior para realizar la fermentación, otra característica comparativa es que las lager tienen la capacidad de fermentar a bajas temperaturas (10-15°C), lo cual es de gran importancia en los países productores de cerveza de clima frío, el nombre lager, de la cerveza, proviene del alemán “lagern” que significa “almacenar”, para fermentar su cerveza usaban estas cepas de fermentación a menores temperaturas, que reposaban en sus almacenes para llevar a cabo la fermentación, a consecuencia de esta ventaja, se comenzaron a identificar compuestos azufrados que modifican



el sabor de la cerveza; análogamente las levaduras ale tienen la capacidad de fermentar a temperaturas superiores (20-28°C), son cervezas de gran cuerpo y aroma, debido a que éstas levaduras metabolizan una alta producción de ésteres, que suelen dar aromas y sabores afrutados en la cerveza así como la disminución de compuestos azufrados. La diferencia taxonómica principal consiste en la capacidad de fermentar un azúcar en específico, la melibiosa ( $\alpha$ -d-galactosa-(1-6)- $\alpha$ -d-glucosa), las levaduras lager pueden metabolizar perfectamente este azúcar, mientras que las ale son completamente incapaces, ésta diferencia metabólica es lo que nos permite clasificar sin duda alguna qué tipo de levadura estamos identificando (Verbelen and Delvaux, 2009).

## 1.4 Proceso de producción

### 1.4.1 Mosto

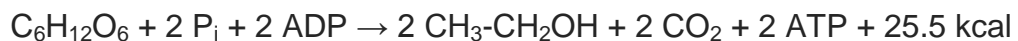
El mosto será el medio líquido lleno de nutrientes para que las levaduras comiencen su crecimiento, así como el proceso de fermentación; al hervir la malta en agua se propicia que los azúcares simples disponibles comiencen a disolverse, así como los ácidos del lúpulo, que comienzan a contribuir con precursores de sabor y elementos que generan resistencia a microorganismos contaminantes, y de más ingredientes variables en cada preparación; el objetivo es generar un mosto que cumpla diversas características.

Primero debe contener una alta concentración de azúcares fermentables, otra característica es el balance de aminoácidos disponibles, la cebada no solamente es fuente de carbohidratos, éste grano también contiene una cantidad considerable de proteína, la cual durante el proceso del malteado del grano, también queda disponible, no solo proteína como tal, sino que también proteína hidrolizada en pequeños péptidos y aminoácidos, indispensables para el crecimiento y síntesis de proteínas de las levaduras y finalmente el balance de sales, en las que la calidad del agua juega un papel importante, azufre y otros elementos que proveerán de lo necesario para la formación de espuma de calidad.

La temperatura también es un factor crítico en la preparación del mosto, el llevar el mosto a temperatura de ebullición por un tiempo tan prolongado termina por esterilizar el medio, lo cual facilitará el crecimiento de las levaduras, al no tener competencia en un medio pensado para el metabolismo de éstos microorganismos, éstos proliferarán rápidamente, pero no es el único objetivo, al momento de tener una alta temperatura se facilita la disolución de azúcares, proteínas y ácidos orgánicos del lúpulo, mientras que al reducir la temperatura, el cambio, hace que otros compuestos y proteínas no solubles tiendan a precipitar, reduciendo así la turbidez del producto y hace identificables las partes del mosto que se deberán evitar agregar en el fermentador en caso de querer obtener cerveza de poca turbidez. Una vez que el mosto disminuye su temperatura es importante airearlo, es decir, llenar de oxígeno el medio tan denso porque la cantidad de oxígeno en el medio es vital para el desarrollo inicial de la curva de crecimiento de las levaduras, este proceso es relevante, ya que si se oxigena muy poco el mosto la fermentación no será eficiente y es posible que otros organismos como bacterias comiencen a crecer antes de que la levadura predomine en el medio, lo cual afectará el rendimiento en la producción de etanol; una vez aireado y a temperatura ambiente el mosto está listo para ser inoculado.

#### 1.4.2 Fermentación

El proceso de fermentación es la parte más importante en la producción de cerveza, en el que se van a utilizar los hidratos de carbono disponibles, para aprovecharlos en forma de glucosa, para obtener como productos finales etanol, dióxido de carbono y moléculas de ATP, representado por la siguiente reacción:



El cálculo para que la levadura pueda transformar azúcares en etanol y dióxido de carbono, se ha establecido que 100gr/L de glucosa producirán 50gr/L de  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  y 50gr/L de  $\text{CO}_2$ , además de que estos azúcares son necesarios para que las levaduras obtengan la energía necesaria para su crecimiento. Aunque los productos de reacción no son lo único relevante durante el proceso, también se

generan una gran cantidad de metabolitos secundarios, que dan gran complejidad a los sabores y aromas producidos durante la fermentación. El análisis profundo de este proceso es necesario, este es el momento en donde todo el producto se va a desarrollar, madurará sus caracteres específicos y este proceso comienza desde el momento en el que se inocula el mosto con las levaduras.

Algo en común que toda bebida alcohólica tiene es un proceso de fermentación, en el caso de la producción de cerveza, se resume en la transformación de azúcares fermentables provenientes del mosto en etanol, ya sea por *Saccaromyces cerevisiae* o por *S. pastorianus*.

La fermentación es un proceso complicado, y por lo tanto, la bioquímica que está implicada es la base del desarrollo de todos los componentes de la cerveza. El mosto es una mezcla compleja, que contiene todos los elementos necesarios para que las levaduras que se inoculen comiencen rápidamente a accionar los mecanismos bioquímicos necesarios para su supervivencia, proliferación y desarrollo, siendo los siguientes los de mayor interés:

**Metabolismo de carbohidratos:** Los carbohidratos en el mosto representan del 90-92% de los sólidos, aunque no todos son azúcares fermentables, y esta composición de azúcares varía entre preparación y preparación, pero se ha considerado que aproximadamente el 25% de los azúcares son no fermentables, como las dextrinas por ejemplo, y dentro de los azúcares fermentables, el otro 75%, el más abundante es la maltosa (60-65%), seguido de la maltotriosa (20-25%) y glucosa finalmente (10-15%) fructosa y sucrosa también pueden estar presentes en bajas concentraciones (Verbelen and Delvaux, 2009). Primero se metaboliza la glucosa, después la maltosa y después la maltotriosa, en un principio el metabolismo de carbohidratos consume mediante respiración la glucosa, pero una vez que el oxígeno se termina, y el dióxido de carbono se desplaza, el proceso metabólico se dirige hacia el metabolismo de carbohidratos, pero para la producción de etanol y dióxido de carbono, aunque el proceso siempre se mantiene fermentativo. Por estas razones los carbohidratos se almacenan de manera puntual

en forma de trehalosa y glucógeno, esta reserva de glucógeno la obtiene la levadura desde el principio del proceso de fermentación, como una reserva de carbohidratos, que tiene un papel importante en la producción de esteroides, en presencia de oxígeno, así como de ácidos grasos insaturados. Y por otra parte la trehalosa es producida bajo condiciones de estrés, en donde puede pasar desde el 5% hasta el 15% del peso seco de la célula (Majara et al., 1996). Sirve como protección para proteínas, estabilizando membranas durante condiciones de cambio repentino.

**Metabolismo de nitrógeno:** La concentración en el mosto de nitrógeno es de entre 65-100mg/100ml, y éste viene en forma de proteínas, aminoácidos y pequeños polipéptidos, que no son asimilados intactos, primero pasan por un sistema de transaminasas que dejan libre el esqueleto de carbono para ser metabolizado; y producir a su vez aminoácidos faltantes, las reacciones de este sistema transaminasa son relevantes, debido a que producen alcoholes superiores, cetonas y aldehídos, que participan activamente en el sabor de la cerveza.

**Metabolismo de lípidos:** En la elaboración de cerveza, una práctica muy común es el uso de las levaduras que crecieron durante la producción de cerveza, como inóculo para la siguiente producción, pero esto tiene una limitante ligada al metabolismo de lípidos, los cuales se sintetizan a partir del glucógeno y derivados de la glucólisis, que requieren en un principio el uso de oxígeno, por la vía aerobia; por el que el problema viene después de la recuperación sucesiva de levaduras, la concentración de esteroides (estructuras lipídicas con función de regulación de fluidez y rigidez de membrana) y ácidos grasos insaturados en la membrana de las levaduras se vuelve insuficiente y va disminuyendo con el reuso de las mismas levaduras, debido a que la reproducción de las levaduras durante el proceso de elaboración de cerveza es el de gemación, en donde una parte de la célula madre se desprenderá para formar una célula hija, provocando que con cada gemación se pierdan lípidos irremediablemente, y sólo crecerán cuando los niveles de éstos sean apropiados, lo cual requiere de suficiente oxígeno, la adición de estos

compuestos de manera directa, puede suprimir el proceso de aireación del mosto (Verbelen and Delvaux, 2009).

Como resultado de cualquier tipo de metabolismo antes mencionado, además de los productos principales, obtendremos metabolitos secundarios, que son los que pueden establecer un perfil de sabores y aromas, que son de especial interés en la industria cervecera; con un perfil adecuado y con valores de concentración de éstos, el productor puede asegurar la continuidad del sabor de su producto.

Las fermentaciones provenientes de *S. pastorianus* frecuentemente producen una cantidad de compuestos activos de sabor menores que las fermentaciones realizadas con *S. cerevisiae*, las cuales tienden a tener cualidades más aromáticas, por contener más compuestos volátiles, como esteroides, por lo que las cervezas lager son un objetivo atractivo, para mejorar ese perfil de aromas de alto interés para la industria cervecera.

#### 1.4.3 Maduración y embotellado

Cuando una cerveza abandona el fermentador, el proceso no termina, la biomasa producida durante el proceso de fermentación es removida, mientras que la cerveza pasa a un segundo fermentador, en donde ésta aun contiene al menos un 1% de azúcares fermentables, y un poco de levadura, la cual se someterá a una fermentación más fría, en el caso de la cerveza lager, la temperatura se disminuye a 5°C o hasta 0°C, entonces la levadura, en un nuevo ambiente con oxígeno disponible, consumirá el resto de los azúcares y los transformará en dióxido de carbono, que se mantendrá en solución y carbonatará de manera “natural” el producto. Posteriormente la cerveza es clarificada, con agentes que permitirán la precipitación de moléculas en suspensión que causan turbidez, y poco a poco comenzará a clarificar la cerveza. Por último la cerveza es filtrada y embotellada para almacenar, distribuir y consumir, frecuentemente se agrega una pequeña porción de azúcar fermentable a la botella, para promover la producción de más dióxido de carbono, que permita que el producto se carbonate un poco más. A nivel industrial se han introducido también metodologías que permitan que el producto se

envase sin levaduras de la fermentación, o contaminantes bacterianos, existen 2 maneras de lograrlo, por filtración estéril, o la pasteurización de la cerveza (Bamforth, 2009), por motivos de higiene y sanidad.

### 1.5 Formación de sabores

Desde el punto de vista de composición, la cerveza es una matriz muy compleja, el total de constituyentes que contribuyen al sabor de una cerveza supera a los 800 compuestos químicos, el sabor de la cerveza consiste en una impresión de sabores y olores que son un factor altamente significativo en la aceptación del producto por parte del consumidor (Horák, 2010).

La naturaleza del sabor de cada bebida alcohólica, proviene desde las levaduras que fermentan el mosto, ya que no solo contribuyen con la formación de etanol, sino que los metabolitos secundarios, durante la fermentación se pueden establecer seis grandes grupos clasificados como compuestos activos de sabor: ácidos orgánicos, alcoholes superiores, compuestos de carbonilo, moléculas azufradas, compuestos fenólicos y ésteres volátiles (Saerens, 2009). Por esta razón la complejidad del sabor en las bebidas alcohólicas es alta, la concentración de estos metabolitos secundarios, aunque es mínima, tiene un gran impacto al momento de las pruebas sensoriales. Esto comprueba que los ácidos orgánicos que se incorporan al mosto, provenientes del lúpulo, u otras hierbas aromáticas, no son los principales factores que intervienen para desarrollar sabores específicos; los metabolitos secundarios producidos durante la fermentación son los principales aportadores de sabores y olores, la biosíntesis de éstos compuestos ha sido identificada, mediante la descripción detallada de rutas metabólicas, que nos permite observar el origen de los compuestos de manera esquemática (Fig.3).

Dentro del grupo de compuestos activos del sabor, en la categoría de ésteres volátiles, se pueden identificar dos grupos, el primero son los ésteres de acetatos (en donde el grupo ácido es el acetato y el alcohol es el etanol, o mezcla de alcoholes, derivados del metabolismo de aminoácidos) como el etanoato de etilo que provee de un aroma similar al de un solvente.

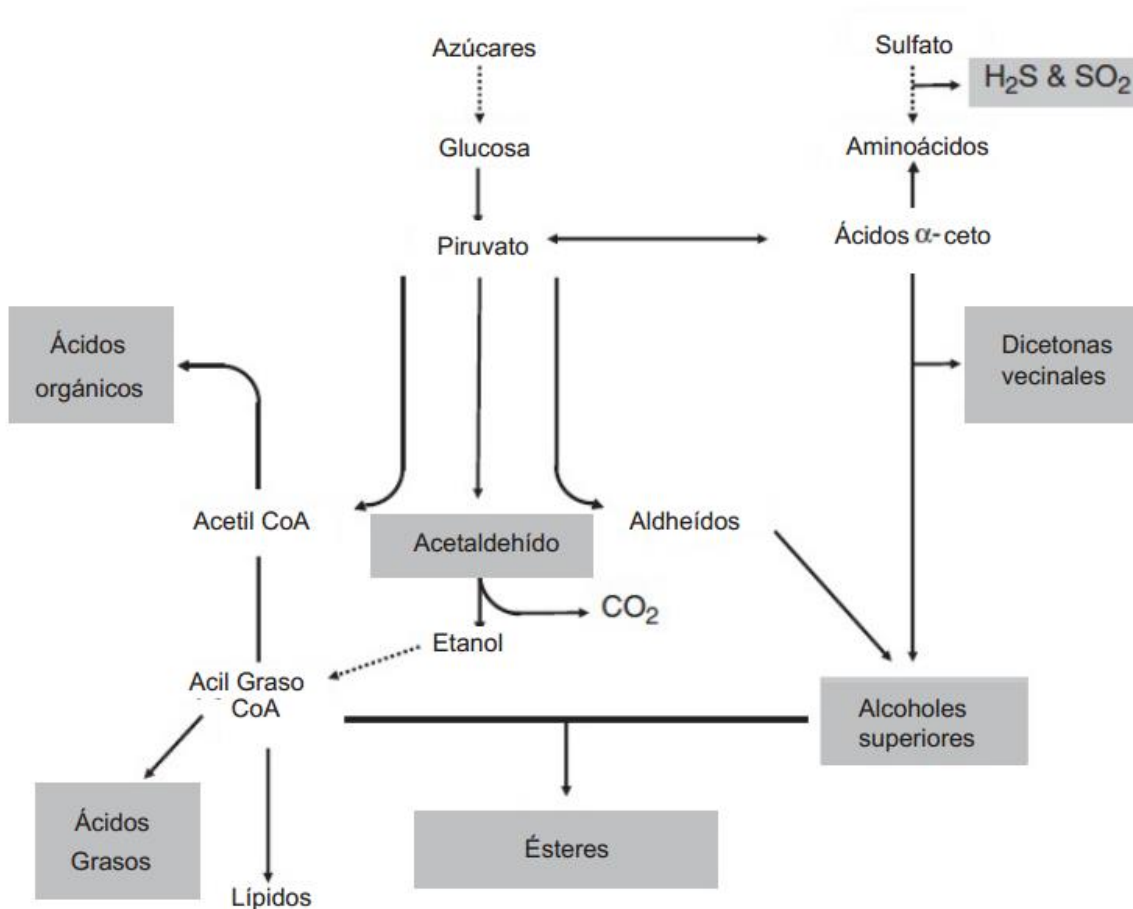


Figura 3. Origen metabólico de los principales compuestos aromáticos.

El segundo son los ésteres de etilo (en donde el grupo alcohol es el etanol y el grupo ácido es un ácido graso de cadena media) como el hexanoato de etilo, al que se le conceden los aromas anisados y frutales como a manzana (Searens, 2007). Estos dos grupos que difieren en sus componentes ácidos, son los principales ésteres volátiles aportadores de aromas, y fácilmente detectables, esto se debe a que se producen a niveles más altos y sus umbrales de efectividad son bajos.

Durante el estudio sobre la elaboración de cerveza y su sabor, algunos compuestos químicos se han hecho notar por su gran aporte al sabor del producto, éstos ya se encuentran caracterizados y en la bibliografía se pueden consultar los valores de concentración mínimos (umbrales de referencia) que hacen que se puedan apreciar las características de éstos compuestos, así como los rangos de concentraciones

comunes, y la descripción del sabor de los compuestos provenientes del metabolismo de levaduras (Cuadro 2).

Cuadro 2. Valores de los umbrales mínimos de ésteres y su concentración en cervezas lager.

Compuesto	Umbral (ppm)	Rango de concentración (ppm)	Descripción del sabor
Etanoato de etilo	30	8-32	Frutal, similar a solvente orgánico
Acetato de isoamilo	1.2	0.3 - 3.8	Plátano, pera
Acetato de fenetila	3.8	0.10 - .073	Rosas, miel
Hexanoato de etilo	0.23	0.05 – 0.21	Manzana, frutal, dulce
Octanoato de etilo	0.9	0.04 - 0.53	Manzana, anís

Los compuestos activos de sabor no provienen de una sola ruta metabólica, y el estudio de su desarrollo va más allá de estudiar las vías metabólicas independientemente. Todas las rutas metabólicas se activan y se detienen dependiendo de un estímulo específico, por lo que existen tres diferentes variables que pueden afectar la producción de los metabolitos secundarios de interés, éstos son: la cepa de levadura utilizada, ya sea *S. cerevisiae* o *S. pastorianus*, el perfil de ésteres producidos será muy diferente, y entre cepas provenientes de la misma especie también habrá diferencias significativas. En segundo lugar está la composición del mosto, los parámetros más importantes son la alta densidad, oxigenación del mosto, los niveles de ácidos grasos insaturados, la relación entre carbono y nitrógeno. Y en tercer lugar están las condiciones de fermentación, como la presión hidrostática y la temperatura.



La alta densidad del mosto es una característica notable para la producción de ésteres, además de aumentar la velocidad de la fermentación, para fermentar el mosto con una densidad de 1.080 hasta 1.020 se necesitó menos de la mitad del doble de tiempo requerido para fermentar un mosto con densidad de 1.040 hasta 1.010, y la producción de ésteres, principalmente de ésteres de acetato, aumentó comparado a la fermentación de una cerveza, después de igualar por dilución a la de alta densidad (Anderson, 1974). Esto refuerza la importancia en el estudio sobre un parámetro de densidad para la estandarización del sabor de una cerveza y por consiguiente, del perfil de ésteres.

Finalmente en cuanto a compuestos activos del sabor, un grupo delicado es el de los compuestos azufrados, los cuales son 2 principalmente, el dióxido de azufre y el sulfuro de hidrógeno, éstos compuestos que son indeseables (al rebasar su umbral mínimo) para el producto final y existen otros, como los sulfitos, que juegan un papel importante en la estabilidad de los sabores de la cerveza; el sulfuro de hidrógeno (olor a huevo podrido, umbral: 10 ppb) o DMS (col cocida, umbral: 30 ppb), además de tioles y tioésteres (Walker and Simpson, 1993). Estos son compuestos con un umbral de efectividad muy bajo, por lo que se debe tener cuidado con la formación abundante de estos compuestos, porque un incremento en estos metabolitos con un umbral tan bajo podrían afectar de manera negativa el aroma de la cerveza. Los sulfitos, por otra parte son un excelente estabilizador de la cerveza, gracias a las propiedades antioxidantes que contiene formando compuestos de sabor inactivos, por la unión de sulfitos a grupos carbonilo (Lodolo, 2008). Aunque un exceso del mismo puede producir que los sulfitos se ligen a los aldehídos, y de ésta manera, las levaduras son incapaces de reducirlos a etanol durante la fermentación.

#### 1.6 Modificaciones genéticas y su impacto en los perfiles de esteres

La síntesis de metabolitos secundarios está ligada a la acción enzimática durante las mismas rutas bioquímicas, por lo que si los genes que producen esas enzimas se ven alterados, pueden variar los parámetros de producción de los compuestos activos del sabor.

En el año 2006 Saerens y sus colaboradores, demostraron que los ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena media, son producto de una reacción de condensación regulada por 2 acil-CoA: etanol O-aciltransferasas: Eeb1 y Eht1. Además de otros genes que también sospechaban que participaban en la formación de compuestos activos del sabor, al alterar las levaduras, por delección de genes, comenzaron a observar cuales estaban estrechamente relacionados con la síntesis de éstos compuestos

Se asignó el valor 1 al total cuantificado de los diferentes ésteres producidos por las levaduras wt y los valores cuantificados de las levaduras con delecciones de genes fueron comparados con los éstos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Producción de ésteres etílicos en levaduras con delecciones en los genes *eht1*, *eeb1* y *ymr*, simples y múltiples. ( $\Delta$ =delección)

Compuesto	Wt	<i>eht1</i> $\Delta$	<i>eeb1</i> $\Delta$	<i>emr</i> $\Delta$	<i>eht1</i> $\Delta$ <i>eeb1</i> $\Delta$	<i>eht1</i> $\Delta$ <i>ymr</i> $\Delta$	<i>eeb1</i> $\Delta$ <i>ymr</i> $\Delta$
Butanoato de etilo	1	0.97	0.64	1.06	0.70	0.91	0.55
Hexanoato de etilo	1	0.64	0.12	0.95	0.08	0.84	0.08
Octanoato de etilo	1	0.8	0.55	0.89	0.28	0.85	0.24
Decanoato de etilo	1	1.18	0.60	1.11	0.56	0.90	0.20

Para los objetivos de éste trabajo de tesis, estos resultados son más que suficientes para comprobar que la síntesis de compuestos activos del sabor, son reguladas por la actividad genética de las levaduras, y como la presencia o ausencia de los genes modifican de manera contundente la síntesis de éstos metabolitos secundarios, por consiguiente el sabor de la cerveza. Por lo que los estudios demostrados dan pie a modificar genéticamente de manera aleatoria

levaduras, para modificar el perfil de compuestos activos de sabor, y generar así cepas modificadas que provean de elementos químicos alternativos, ajustar el perfil buscado de compuestos activos de sabor, y orientarlo hacia la reducción de insumos para su producción a nivel industrial.

## **2 HIPÓTESIS**

La modificación genética de cepas de levadura por radiación UV permitirá seleccionar cepas capaces de disminuir insumos o costos en la elaboración de cerveza.

### 3 OBJETIVOS

Este proyecto de investigación está asociado a la empresa AlimQro, existe un interés especial de esta empresa en el desarrollo de levaduras que tengan la capacidad de generar un perfil de ésteres que desarrollen sabores y aromas interesantes para la producción de cerveza, por lo tanto, nos hemos comprometido a llegar a diferentes puntos que hemos establecido como objetivos; los cuales se especifican a continuación:

#### 3.1 General:

- Creación de cepas sobreproductoras de CO<sub>2</sub>, que aporten sabores agradables y permitan una fermentación del mosto más acelerada.

#### 3.2 Específicos:

- Aislar cepas a partir de diferentes cervezas artesanales, con el fin de estudiar las diferencias en morfología, producción de CO<sub>2</sub> y biomasa, para seleccionar el mejor punto de partida para modificar.
- Identificación de ésteres de interés, responsables de sabores agradables mediante cromatografía de capa fina.
- Modificación genética por UV y seleccionar cepas con una sola mutación y evaluar su desempeño en fermentación.
- Selección de cepas de levaduras que muestren tener metabolismo acelerado respecto a las cepas de partida.
- Producción de cerveza con la(s) cepas seleccionadas por microfermentación.

## 4 METODOLOGÍA

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1 Medios de cultivo y reactivos

En el desarrollo del presente proyecto se prepararon diferentes medios de cultivo, medio YPD (líquido y agar) utilizando extracto de levadura, peptona y agar “BD Bioxon®”. Para los análisis de cromatografía en capa fina se utilizaron placas para cromatografía de capa fina de 20x20 centímetros base aluminio, benceno, hexano, vainillina, ácido sulfúrico, permanganato de potasio, trifluorotricloroetano y diclorometano (Sigma Aldrich®).

#### 4.1.2 Aparatos e instrumentos

Para la esterilización de los medios se utilizó una autoclave eléctrica, SM 200 (Yamato Scientific, U.S.A.), para crecer los cultivos, incubadora bacteriológica (Blue M, U.S.A.). En el ciclo de mutaciones se utilizó la lámpara de UV UVG-54 Entela de 254nm.

#### 4.1.3 Insumos para elaboración de cerveza

Para la elaboración de la cerveza se utilizó el kit de elaboración de cerveza Sol Arena Pale Ale, comercializado por BREWMASTERS, adquirido desde [www.brewmasters.com.mx](http://www.brewmasters.com.mx)

#### 4.1.4 Cepas

Las levaduras utilizadas fueron aisladas de cervezas artesanales comerciales mexicanas (Ticolote, Misterium) y una internacional de procedencia belga (Delirium Nocturnum) más cuatro levaduras de uso comercial para la elaboración de cerveza (Windsor, Safeale04, American West Coast, y CBC-1).

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Aislamiento de cepas existentes en cervezas artesanales, en busca de productos con sabores interesantes.

Para el aislamiento de las levaduras se consiguieron cervezas artesanales, de las cuales aún cuentan con levaduras en la botella. Las cervezas que fueron utilizadas para la recuperación y aislamiento de levaduras son: Tecolote, Misterium y Delirium Nocturnum.

Para la obtención de las muestras de levadura se prepararon 250 ml de medio YPD, con 2.5 gramos de extracto de levaduras, 5 gramos de dextrosa y 5 gramos de peptona. El medio preparado se repartió en tubos de fondo cónico de 50ml y fueron esterilizados en autoclave.

Para la inoculación de las levaduras en el medio, se destaparon las cervezas en una zona aséptica el volumen de la cerveza fue reducido hasta un 80% por decantación, sin revolver el sedimento, después de una resuspensión de las levaduras, se tomarán 700ul de las muestras y se añadió a los tubos con medio estéril, para ser incubados a 30°C de 24-36 horas. Cada cerveza se trabajó por duplicado.

### 4.2.2 Identificación microscópica de las levaduras crecidas en el medio.

La identificación a microscopio fue realizada por tinción de las células con azul de algodón. En la cual la muestra se colocó en un portaobjetos, utilizando flameo para evaporar el agua, para después teñir las células con azul de algodón, el exceso fue retirado con agua destilada y fueron observadas en microscopio.

### 4.2.3 Cultivo de las cepas seleccionadas para la identificación de sabores y aromas interesantes.

Se utilizó medio YPD en agar para cultivar en placa las levaduras con las cuales se produjo la cerveza. Para la preparación de 300ml se utilizaron 3 gramos de extracto de levadura, 6 gramos de peptona, 6 gramos de dextrosa y finalmente 4.5 gramos de agar; siendo así esterilizado y vaciado en cajas de Petri, y se inocularon las muestras previas por estriado. Dejándose crecer por 24 horas.

#### 4.2.4 Microfermentaciones para determinar el perfil de ésteres de cada levadura.

Sanitización del material con solución de cloro al 0.1%, tubos de fondo cónico y mangueras; también esterilización del material de vidrio. Se utilizó un vaso de precipitados de 1L como olla de hervido, en la cual se colocaron 600ml agua destilada y 50 gramos de malta vienna en una bolsa para grano, hecha a partir de gasas estériles. La bolsa se mantuvo en agitación, por un periodo de 45 minutos a una temperatura de 68°C. Después de este tiempo transcurrido se elevó la temperatura a punto de ebullición y se retiró la bolsa para grano, para poder incorporar el extracto de malta (135 gramos) y se mantuvo en ebullición por 60 minutos más. En un frasco estéril con rosca de 1L con agua estéril fría (500 ml) se mezcló con el preparado de azúcares, y fue llevada a 20°C. Y este mosto fue aireado agitando vigorosamente. Cada tubo de microfermentación se llenó con 30 ml de mosto y para ser inoculado con las diferentes levaduras aisladas, así como el uso de 4 levaduras de uso comercial, Windsor, American West Coast, Safeale04 y CBC-1. Después de ser inoculadas, se colocó una trampa de agua para fermentar por 3 días.

Estas muestras fueron trabajadas por duplicado, para tener en total 20 tubos en proceso de microfermentación.

#### 4.2.5 Cromatografía en capa fina.

Para el estudio por cromatografía de capa fina, se tomaron 0.1 µl de la muestra y se mezclaron con 10µl de hexano y para ser ubicados a 2 cm del fondo de la placa y se permitió que el solvente ascendiera hasta 15 cm. Se utilizaron 2 tipos de solventes, el primero benceno, mientras que para el segundo se utilizó una mezcla



de trifluorotricloroetano con diclorometano a razón de 60-40% respectivamente. Para los sprays de detección, el uso de permanganato de potasio en ácido sulfúrico 96% (500mg/15ml) y vainillina al 5% en ácido sulfúrico 96%. (Attaway, 1964)

#### 4.2.6 Ciclo de mutaciones

De las levaduras que mostraron tener un perfil de producción de ésteres similar al de las características buscadas, se tomó una muestra y se dejaron crecer las células por 16-24 horas en medio YPD, para posteriormente centrifugar los tubos y resuspender el pellet en buffer de fosfatos con glucosa (1%) y cloruro de sodio (0.9%) y se realizó un conteo en cámara de Neubauer y se ajustó la dilución hasta obtener  $2 \times 10^6$  cel/ml sobre una caja de Petri para ser expuestas a luz UV de 254 nm por 1 a 3'20" con incrementos de 20 segundos, la lámpara se colocó a 30 cms de la caja, y se mantuvo en la oscuridad.

Se inoculó con 100  $\mu$ l de cada exposición de células a UV sobre placas de YPG en agar, originando una curva de muerte celular buscando una supervivencia entre 5 y 1 %. Se incubaron a 25°C en la oscuridad por al menos 24 horas o hasta que las colonias fueron visibles.

#### 4.2.7 Evaluación en la producción de CO<sub>2</sub> y biomasa de las cepas mutantes

Una vez obtenidas las cepas interesantes como resultado del ciclo de mutaciones, fueron evaluadas para determinar si es que existen cambios morfológicos o fisiológicos, ya sea en la estructura de la levadura o en la velocidad para producir CO<sub>2</sub> y biomasa.

La cantidad de CO<sub>2</sub> producida fue evaluada por la técnica del tubo invertido. Se tomó un tubo pequeño y se llenó al máximo con medio YPD líquido y fue introducido boca abajo en un tubo más grande que fue volteado rápidamente. Posteriormente se llenó con más medio líquido hasta 1 centímetro por encima del tubo pequeño y fue esterilizado en autoclave. Una vez frío se inoculó con las cepas

a ser evaluadas siguiendo cada hora la producción de CO<sub>2</sub>, desplazando así líquido del tubo pequeño lleno de medio.

Para la evaluación de la relación CO<sub>2</sub>/biomasa se repitió el mismo proceso pero reemplazando el seguimiento por hora, por un plazo de 24 horas para observar el porcentaje de llenado del tubo que alcanzó cada cepa. Una vez concluida la evaluación de CO<sub>2</sub>, se retiró el tubo pequeño y se centrifugó el tubo para concentrar la biomasa en un pequeño pellet; posteriormente se realizó un lavado, añadiendo agua, centrifugando y decantando 3 veces. Una vez terminados los lavados se llevó a la estufa hasta que el agua se evaporó completamente y su se pudo pesar la levadura seca.

#### 4.2.8 Evaluación sensorial de cerveza producida a partir de las levaduras seleccionadas.

Se utilizó un panel de evaluación sensorial habituado al consumo regular de cervezas artesanales, acostumbrados a sabores más abrumadores y se les pidió que pusieran énfasis en la evaluación de los siguientes puntos: sabor alcohólico, sabor amargo, aroma y textura. Las muestras obtenidas de las levaduras mutantes fueron comparadas contra la cerveza producida por la levadura aislada no modificada. Esperábamos mantener o mejorar el sabor amargo y alcohólico, además de un aroma agradable y textura ligera; pese a las modificaciones en la fermentación de las levaduras.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Aislamiento de cepas existentes en cervezas artesanales en busca de productos con sabores interesantes.

Las cervezas artesanales regionales, son un campo prometedor para recolectar cepas de levaduras interesantes porque las cerveceras de este tipo producen cervezas únicas, lote por lote, debido a que no tienen un control estricto de mantenimiento de cepas como en las grandes empresas cerveceras; además, las cervezas artesanales se caracterizan por tener aroma y sabores, dándonos un punto de partida ideal a la hora de mejorar una levadura; también, se incluyó una cerveza que proviene de la casa cervecera de origen belga Huyghe en Melle, denominada Delirium Nocturnum, que tiene la peculiaridad de ser una cerveza de triple fermentación que aún conserva levaduras vivas, ésta levadura fue utilizada como un control para resaltar las diferencias entre cervezas de origen mexicano. Se utilizaron también levaduras liofilizadas especializadas para la producción de cerveza, que se enumeran en el apartado de cepas. El aislamiento de las cepas se realizó de acuerdo a la metodología y después de su crecimiento en medio fresco se observaron con el microscopio para evaluar la morfología de las mismas y observar sus diferencias.

### 5.1.1 Misterium

En la Figura 4 se muestran las células presentes en la cerveza Misterium, en la muestra se observaron levaduras de tamaño pequeño y forma circular-ovalada regular, sin señales de contaminación. En el tubo de origen se pudo observar un sedimento homogéneo y la presencia de dióxido de carbono disuelto, que al agitar produjo “espuma” como producto de la carbonatación del medio; por lo que podemos asumir que la levadura aislada es viable para su uso en fermentaciones.

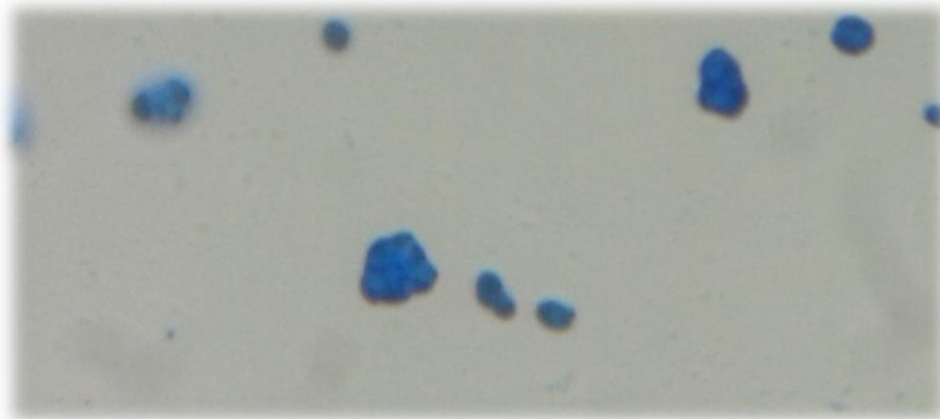


Figura 4. Levaduras aisladas de la cerveza Misterium, observadas a microscopio óptico con aumento 40x.

#### 5.1.2 Tecolote

Como se muestra en la Figura 5, las cepas de levadura presentes en la cerveza Tecolote fue más ovalada y pequeña de lo que fue para las células obtenidas a partir de la cerveza Misterium, éstas fueron de tamaño regular entre ellas y las características del medio obtenido también fueron las esperadas, aunque el crecimiento de biomasa en el tubo fue menor que en el resto de las muestras.

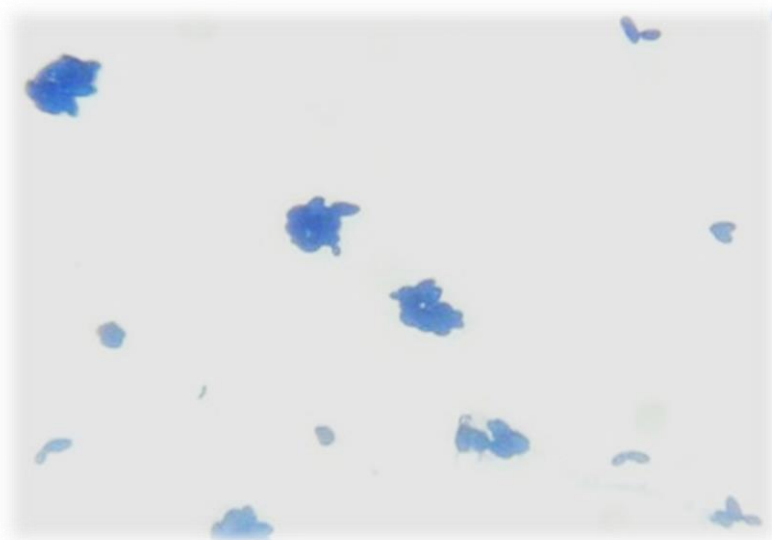


Figura 5. Levaduras aisladas de la cerveza Tecolote, observadas a microscopio óptico con aumento 40x.

### 5.1.3 Delirium

Las levaduras obtenidas a partir de la Cerveza Delirium se muestran en la Figura 6, estas fueron de menor tamaño que las cepas anteriores, lo que provocó que las imágenes obtenidas no tuvieron la misma definición debido a los problemas de enfoque, ya que se podían enfocar pequeñas levaduras además de otras de mayor tamaño, formando pequeños bloques; el medio de cultivo obtenido al final tuvo un olor dulce ligeramente carbonatado.

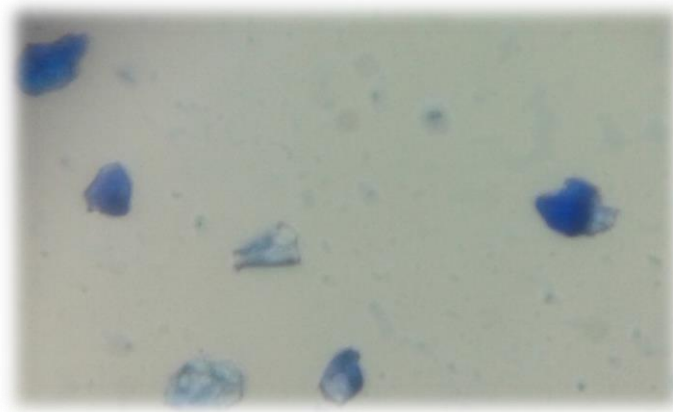


Figura 6. Levaduras aisladas de la cerveza Delirium, observadas a microscopio óptico con aumento 40x.

### 5.2 Uso de diferentes levaduras, aisladas y liofilizadas, en microfermentación para determinar perfiles de producción de ésteres.

La preparación del mosto fue realizada de acuerdo a la metodología. Después de que todas las levaduras fueron crecidas en YPD líquido se realizó una siembra en agar para poder aislar diferentes colonias; se seleccionaron 2 colonias para cada una de las levaduras regionales y la cerveza importada. Estas cepas se preservaron en glicerol y fueron utilizadas como inóculo en los tubos de microfermentación con el fin de evaluar su capacidad de fermentar el mosto y posteriormente utilizar como muestra en la cromatografía en capa fina.



Figura 7. Microfermentaciones del mosto inoculadas con diferentes cepas levaduras

Los tubos de fermentación que contenían 35 ml de mosto fueron inoculados con cada una de las cepas y se incubaron a 30°C para el periodo de fermentación. En la mayoría de los casos la fermentación completa fue alcanzada después de 3 días; algunas cepas terminaron la fermentación antes y se obtuvo cervezas con colores y carbonatación diferentes (Figura 7); esto puede deberse tanto al vigor de cada una de las cepas, como a que no se consideró importante inocular una cantidad de células igual en cada tubo de fermentación; en este caso el objetivo del experimento fue la obtención de muestras para la determinación de ésteres producidos y de acuerdo con la literatura para este propósito el punto crítico es la temperatura, que si se mantuvo constante durante todo el periodo de fermentación. Se han reportado una gran cantidad de ésteres que se producen con mayor intensidad a temperaturas más altas de incubación produciendo así sabores afrutados y compuestos aromáticos que pueden alterar el sabor y aroma de la cerveza (Šmogrovičová, 1999). Después de la evaluación sensorial, las cervezas fueron almacenadas en congelación a -20°C. La presencia de sabores poco dulces, de baja acidez, ligeros, aromáticos y poco dominantes es preferible en una cerveza como la que se pretendía obtener a partir del mosto preparado con una receta de una clásica Pale Ale, que es una cerveza refrescante y poco abrumadora al paladar así como una de las más demandadas a nivel mundial (Bamforth, 2009). Los

principales criterios a evaluar fueron aroma, color, y sabor; prestando especial atención en la acidez del producto.

Tecolote: En el color original del mosto no se mostraron grandes diferencias, se notó solamente una clarificación del tono; en cuanto al cuerpo de la cerveza se notó una carbonatación característica de la fermentación y el perfume alcohólico no resaltó dentro del olor dulce y perfumado del mosto.

Misterium: El color del mosto también tuvo un ligero cambio a un tono más claro, aunque la cualidad principal de ésta fermentación fue la alta carbonatación y los sabores menos dulces que el resto, el aroma no fue tan perfumado y el sabor denotaba cierta acidez.

Delirium: La cerveza obtenida de este par de cepas fue diferente entre ellas, en la fermentación con la primera colonia (Del1) fue lenta, obteniendo un producto de gran dulzor, la segunda colonia que sirvió de inóculo (Del2) mostró una carbonatación superior, disminuyendo el color oscuro notablemente, los olores aunque dulces, también dejaban notas de acidez y fermentaron a una velocidad superior.

La diferencia en los colores de los cultivos puede deberse a la presencia de levaduras y azúcares no fermentados en suspensión, falta de floculación; así como a metabolitos producidos. El resultado de las microfermentaciones nos indica que en realidad la cantidad de inóculo y el tiempo de fermentación si son un par de puntos críticos, que al no estar cuantificado hicieron más complicado seguir el proceso metabólico de las levaduras obteniendo productos muy diferentes. En un proceso normal la mayoría de las diferencias en color se pueden eliminar después de un proceso de clarificación.

El olor alcohólico no dominó en ninguna de las fermentaciones, esto puede deberse al volumen de la fermentación, falta de clarificado y maduración, así como la presencia de azúcares y levaduras en el mosto.

El sabor dulce presente en todas las fermentaciones se debe a la ausencia de lúpulo, que **no fue añadido a la receta de la fermentación**; este fue omitido con el propósito de no agregar compuestos interferentes provenientes del lúpulo durante las cromatografías en capa fina que serían realizadas posteriormente. Los ácidos orgánicos del lúpulo forman precursores de sabor de tipo éster y otros compuestos volátiles en el mosto que podrían traer consigo falsos positivos en la cromatografía, de ésta manera se realizaron estudios más acertados y fue más fácil percibir si la levadura podía tener un impacto significativo sobre el sabor final de la cerveza. Al finalizar este experimento pudimos concluir que logramos producir cerveza en muy

poco tiempo observando con atención cualidades fermentativas de las levaduras seleccionadas. Estas cervezas fueron almacenadas para determinar posteriormente el perfil de ésteres por cromatografía de capa fina, ya que las diferencias se deberán a las diferentes levaduras fermentando el mosto.

### 5.3 Cromatografía en capa fina

Determinar la presencia de ésteres y compuestos aromáticos es importante, porque las levaduras cambian el sabor de la cerveza al formar un perfil de producción de esteroides específico. El uso de la cromatografía de capa fina para un análisis cualitativo resulta relativamente sencillo y preciso, siendo éste un proceso mediante el cual los diferentes compuestos que se encuentran en la cerveza, se separan por afinidad con el solvente que los arrastra, una vez separados los compuestos fueron expuestos a la acción de compuestos de revelado que reaccionan con compuestos específicos en la cerveza y provocan un cambio en la coloración de las placas. La distancia a la cual se van separando los diferentes compuestos desde el punto de origen de corrida es llamada R y gracias a estudios previos sobre la evaluación de ésteres y compuestos volátiles por cromatografía de capa fina, se han descrito los valores de R y reacciones de color específicas que nos permiten determinar la presencia de una gran variedad de éstos compuestos arrastrados por afinidad a solventes específicos. El experimento se realizó de acuerdo a la metodología, basados en las publicaciones previas (Attaway, 1964) y ajustadas a las necesidades del experimento.

Todas las muestras aisladas fueron evaluadas por cromatografía de capa fina, junto con sus réplicas, y también fueron incluidas las cervezas provenientes de las microfermentaciones de levadura liofilizada, para dar un total de 13 muestras a evaluar, las muestras fueron colocadas a 2 centímetros del principio de la placa en el siguiente orden: de izquierda a derecha Delirium 1, Delirium 2, Misterium 1, Misterium 2, Tecolote 1, Tecolote 2, Réplica Delirium 1, Réplica Delirium 2, Réplica Misterium 1, Réplica Tecolote 1, CBC1, Windsor y Safale y se dejaron correr en una cámara saturada con los solventes adecuados, hasta que el solvente ascendió 15 centímetros sobre la marca de inicio, posteriormente fue rociada con los sprays de detección, la placa que obtuvo mejores resultados fue la de benceno con detección de vainillina como se muestra en la Figura 8.



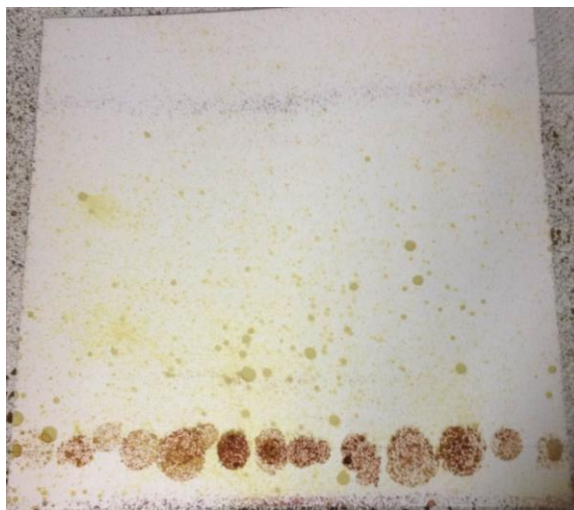


Figura 8. Placa de cromatografía en capa fina, con benceno como solvente de corrida y revelada con spray de vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5%.

En el experimento la dispersión de los reveladores por nebulización no fue uniforme y se manchó la placa lo que impidió obtener información precisa de la distribución de los ésteres. Sin embargo, fue posible observar en la parte superior de la placa una franja de color morado, que indica la presencia de ésteres reaccionando con la vainillina y ácido sulfúrico; esto indica la presencia de ésteres relacionados a compuestos responsables del sabor tal como lo describe Attaway (1964) en sus experimentos, estos ésteres pueden ser principalmente ésteres aromáticos de linalool, geraniol, nerol y nerolidol. La confirmación de la presencia de los ésteres se consideró suficiente para poder continuar con los experimentos, ya que los ésteres de mayor interés serán identificados y cuantificados mediante análisis más especializados como HPLC o cromatografía de gases en un trabajo posterior.

El resto de la cerveza fue congelada y almacenada para realizar una comparación entre ese experimento y la cerveza realizada con las levaduras que fueron mutagenizadas.

#### 5.4 Mutagénesis de levaduras

Se seleccionaron 3 levaduras de las siete utilizadas: Tecolote, Misterium y Delirium. Estas cepas lograron producir las cervezas con mejor sabor, color, aroma, velocidad de fermentación y carbonatación. El desempeño de estas levaduras fue superior probablemente porque son levaduras más frescas que las liofilizadas y por lo tanto, son metabólicamente más activas y de acuerdo con la literatura deberían ser más susceptibles a mutaciones. Para el experimento se ensambló una estación de mutación como la que se muestra en la imagen 9. Para irradiar las levaduras por

diferentes tiempos de exposición, se tomó la muestra que sería sembrada en caja de Petri, de acuerdo al protocolo de mutagénesis. En el protocolo original se pretendía irradiar desde uno hasta 5 minutos, con periodos crecientes de 30 segundos y la distancia de la lámpara a 15 centímetros; pero la intensidad de la lámpara era suficiente para matar todas las levaduras pasando los 2 minutos; así que los tiempos de exposición fueron reducidos a 0, 30", 1', 1'30", 2', 2'20", 2'40", 3' y 3'20" y la distancia fue aumentada a 30 cm de distancia sobre la caja de Petri como se muestra en la Figura 9.

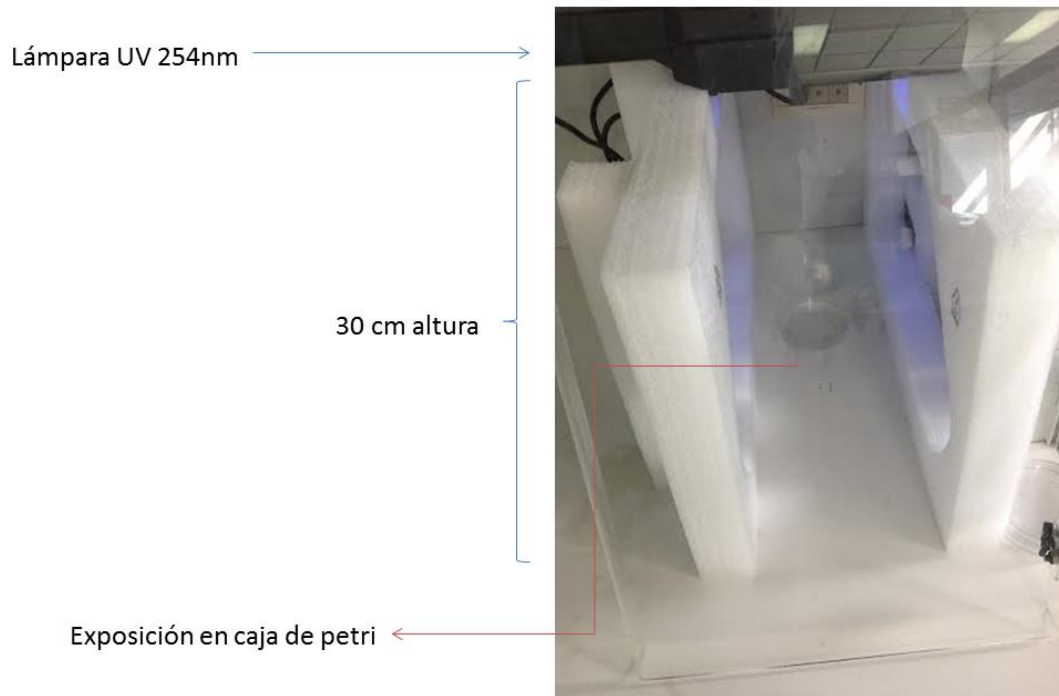


Figura 9. Estación de mutaciones con exposición de luz UV de 254 nm.

El objetivo del experimento fue el de llevar la supervivencia de las levaduras a un límite menor a 5% para aumentar las probabilidades de obtener cepas con una sola mutación favorable después de ser expuestas a la luz UV y en caso de presentar algún cambio interesante poder rescatar la colonia para evaluarla contra las originales. Para esta selección se puso especial atención en levaduras con indicadores de metabolismos alterados, como pueden ser: deformación de colonias, cambio en coloración, aumento en el volumen de colonias, o cualquier cambio no uniforme en la placa.

#### 5.4.1 Delirium

Ésta cepa en particular tardó más tiempo en crecer que el resto, pero las características de fermentación y el aroma específicamente, fue el motivo más importantes para continuar trabajando con ella, en caso de una mutación que permitiera acelerar el metabolismo de ésta cepa sería perfecto para poder elaborar cerveza. Aunque los resultados no fueron los esperados, con la cepa Delirium no se pudo observar ningún cambio interesante o fuera de lo ordinario en cultivos, así que las cepas utilizadas fueron simplemente las que lograron resistir la radiación, llegando al límite del 5% de supervivencia los resultados se muestran en la figura 10 dónde la caja superior izquierda muestra levaduras sin exposición a radiación UV. Arriba derecha: caja con levaduras después de 30 segundos de exposición. Abajo izquierda: caja con levaduras después de 1 minuto de exposición. Abajo derecha: caja con levaduras expuestas por 2 minutos a exposición UV.

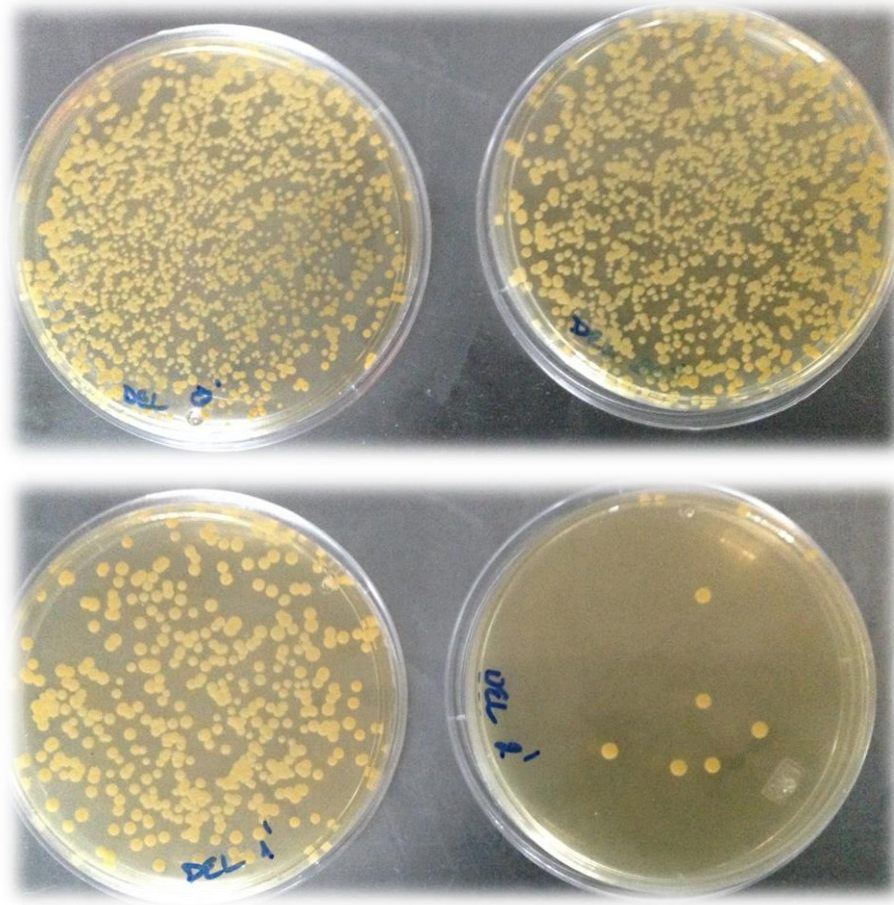


Figura 10. Resultado de las mutaciones de la cepa aislada de cerveza Delirium.

#### 5.4.2 Misterium

En la figura 11 podemos observar los resultados de éste ciclo de mutaciones, dónde las cajas se muestran de la siguiente manera: arriba izquierda: caja con levaduras sin exponer a luz UV. Arriba derecha: caja con levaduras después de ser expuestas 30 segundos a luz UV. Abajo izquierda: caja con levaduras después de ser expuestas a luz UV por 1 minuto. Abajo derecha: caja con levaduras después de ser expuestas a luz UV por 1 minuto con 30 segundos, en dónde sólo una colonia pudo crecer. En éste ciclo de mutaciones surgió una peculiaridad, en la caja MIS 30'' (figura 11 caja superior derecha) el crecimiento de algunas colonias fue considerablemente más rápido que el resto, mientras el resto de la cajas contenían colonias de pequeño tamaño, en ésta se encontraban algunas muy grandes, con un tamaño aproximado de las demás colonias. Inmediatamente, se convirtieron en el primer mutante candidato para tener un metabolismo acelerado con respecto a la cepa original, fue almacenada en glicerol al 25% y congelada a  $-20^{\circ}$  C para preservarla.

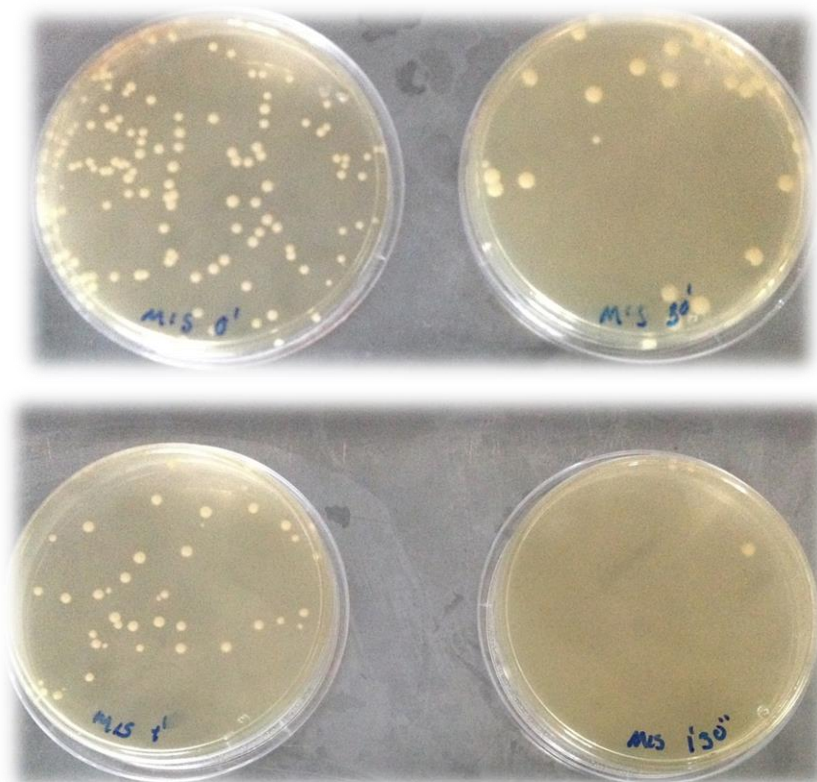


Figura 11. Resultado de las mutaciones de la cepa aislada de cerveza Misterium.

#### 5.4.3 Tecolote

Para cepas derivadas de Tecolote, se muestran los resultados en la imagen 12, dónde las cajas se ubican de la siguiente manera: superior izquierda: caja con levaduras sin exponer a luz UV. Superior derecha: caja con levaduras después de ser expuestas 30 segundos a luz UV. Inferior izquierda: caja con levaduras después de ser expuestas 1 minuto. Inferior central: caja con levaduras después de ser expuestas por un minuto con 30 segundos a luz UV. Inferior derecha: caja con levaduras después de ser expuestas por 2 minutos a luz UV, llegando al límite de supervivencia. No hubo un caso excepcional, por lo que las cepas mutagenizadas de ésta cepa fueron escogidas por tamaño sobre el resto, aunque con ninguna diferencia significativa, simplemente se escogieron de las cajas más cercanas al límite de supervivencia.

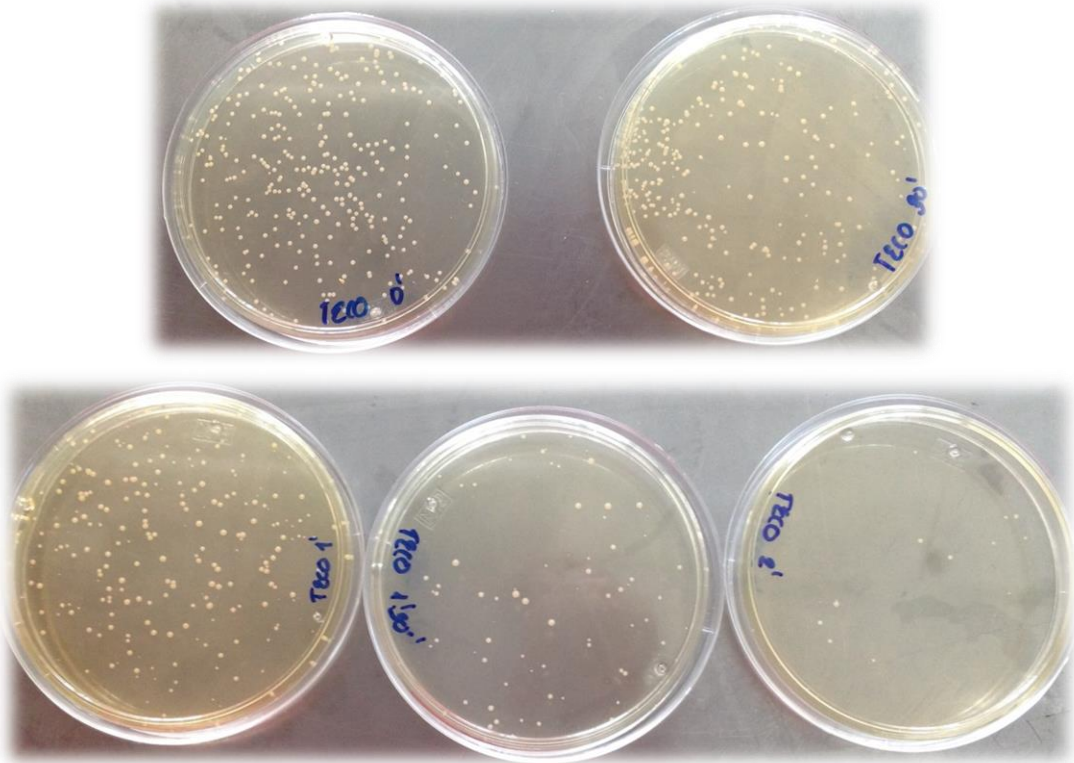


Figura 12. Resultado de las mutaciones de la cepa aislada de cerveza Tecolote.

Aunque todas las cepas de levaduras fueron expuestas al mismo tratamiento de mutagénesis, éstos cambios en las levaduras son completamente aleatorios y no suele haber repetitividad de los resultados, es por eso que fue necesaria la reiteración de diferentes ciclos de mutaciones con las diferentes cepas, con la esperanza de que alguna colonia se destacara por cambios morfológicos que fueran fácilmente distinguibles, así que se repitió el experimento ésta vez incluyendo levaduras liofilizadas, específicamente la cepa Windsor, así como el uso

de Misterium y Tecolote nuevamente. Los resultados de la reiteración de las mutaciones fueron favorables y en una de las cajas para mutación de la cepa Misterium, hubo crecimiento mayor de 8 colonias, las cuales fueron inmediatamente sembradas en medio YPD fresco en agar para su reproducción dando origen a las cepas M5 y M7.

#### 5.4.4 Curva de supervivencia

Se realizó un conteo de colonias de las cajas sometidas a mutagénesis para evaluar la supervivencia de las levaduras y llegar así hasta el punto dónde la supervivencia fuera igual o menor al 5%. La cepa Delirium, a pesar de que respondió de la manera esperada al ciclo de mutaciones y se mostró sensible a la mutagénesis, las cepas seleccionadas no mantuvieron la capacidad de fermentar los azúcares del medio o llegaban a hacerlo después de entre 18 y 24 horas después de inocular; esto puede deberse a que la alta exposición a luz UV provocara múltiples mutaciones. Además la cepa Delirium siempre fue menos vigorosa que el resto. Otro motivo por el los resultados no fueron los esperados con ésta cepa es porque proviene de la cerveza Delirium que es producida a través de una triple fermentación y al momento de aislar las colonias no se realizó una caracterización extensa dado que el proceso de fabricación es desconocido y no podemos saber si son el mismo tipo de levaduras, o si son levaduras que hayan ya sufrido múltiples gemaciones lo que provocaría una disminución en el vigor de las cepas.

La cepa liofilizada de uso comercial demostró ser especialmente resistente al proceso de mutagénesis, por eso se registró el 1000 como número máximo de conteo de colonias. No hubo disminución en la densidad de colonias hasta los 2 minutos con 40 segundos de exposición, mientras que el resto de las levaduras respondían apenas 30 segundos después de haber sido irradiadas, además de eso, no se observaron anomalías en el crecimiento de las levaduras y ninguna de las levaduras originadas a partir de la cepa fueron seleccionadas como candidatos para la obtención de la cepa de interés.

La cepa Misterium fue altamente sensible a la prueba, en apenas 30 segundos de exposición, la población de colonias visibles llegó al objetivo de supervivencia (Figura 13). Las levaduras mutagenizadas que se obtuvieron a partir de ésta cepa fueron las más eficientes en cuanto a producción de biomasa y CO<sub>2</sub>.

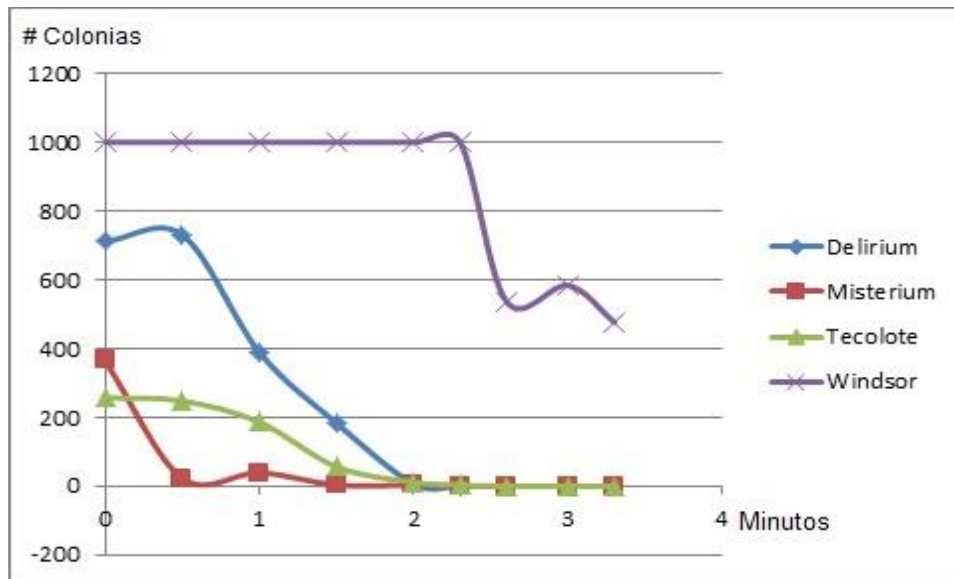


Figura 13. Curva de supervivencia de las levaduras expuestas al ciclo de mutaciones

Finalmente todas las levaduras mutagenizadas seleccionadas fueron almacenadas en glicerol al 25% y congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para su mantenimiento.

### 5.5 Evaluación en la producción de $\text{CO}_2$ .

Las levaduras de cerveza se crecieron en medio fresco y se utilizaron para realizar una evaluación de la producción de  $\text{CO}_2$  ligada a la producción de biomasa, después de 24 horas. Durante éste experimento se fue ajustando la densidad óptica necesaria para observar el desempeño de las levaduras con mayor resolución. Se consideró la densidad óptica de los medios líquidos como inóculo a 1.5 de absorbancia, a 630nm en espectrofotómetro.

De acuerdo a los resultados, la producción de  $\text{CO}_2$  parece estar asociada directamente con la cantidad de biomasa producida por las cepas, tal como se muestra en la figura 14, dónde el gráfico superior muestra la producción de  $\text{CO}_2$  (en porcentaje de llenado del tubo) y la inferior el peso seco de la biomasa producida en g/L; la cantidad de biomasa parece ser proporcional a la producción de  $\text{CO}_2$  en las cepas Misterium y Tecolote original, M5, T02, M01 y M7, en el caso de estas dos últimas cepas la cantidad de  $\text{CO}_2$  producida fue superior a la cepa original.

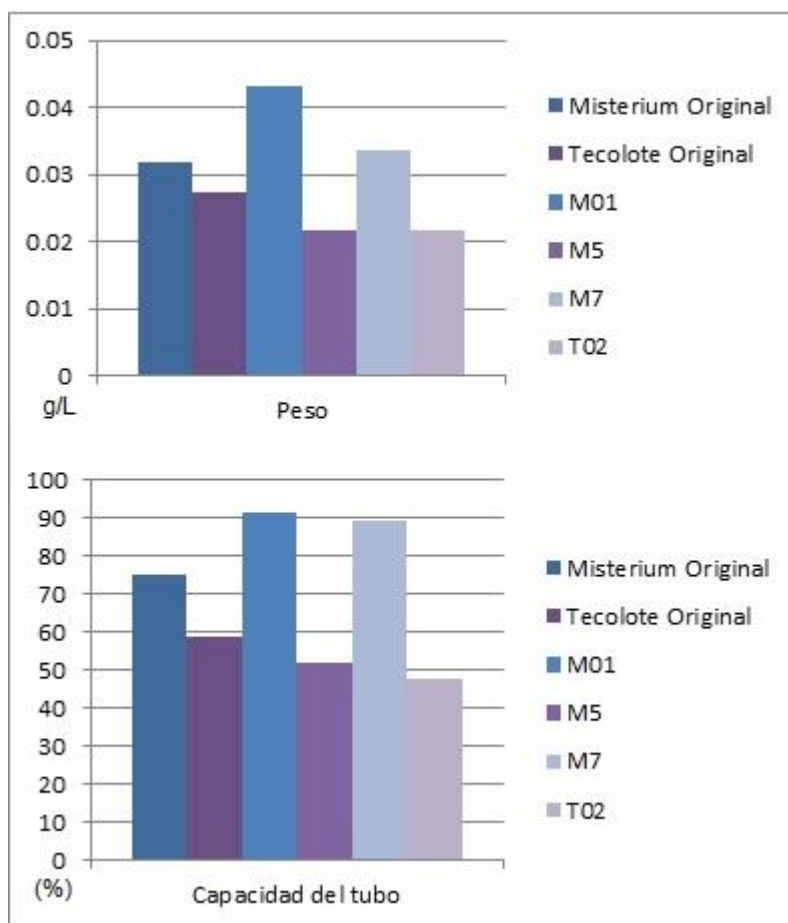


Figura 14. Producción de CO<sub>2</sub> /Biomasa.

Las dos cepas mutantes rindieron resultados positivos para la alteración de la velocidad de crecimiento y producción de CO<sub>2</sub> que puede atribuirse a un metabolismo acelerado bajo las condiciones de cultivo con respecto a las cepas originales, ya que todas las levaduras partieron de una alícuota de densidad óptica similar, fermentando durante el mismo periodo de tiempo. Los genes que se encargan del crecimiento son constitutivos en gran parte, así que después del tratamiento de mutagénesis diferentes genes debieron haber sido modificados para provocar el aceleramiento en el metabolismo de las levaduras. Técnicas de biología molecular podrían evaluar cambios en la expresión de los genes, para poder determinar cuáles fueron los cambios en el genoma.



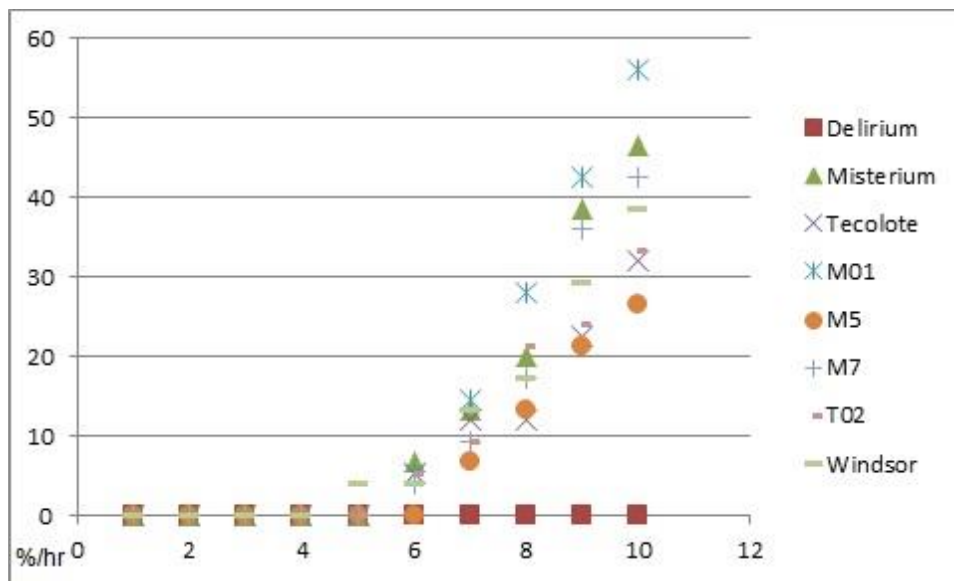


Figura 15. Producción de CO<sub>2</sub> en los tubos respecto al tiempo. Las mediciones fueron realizadas cada hora.

Una vez que los resultados mostraron que después de 24 horas la producción de CO<sub>2</sub> total parece estar ligada a la producción de biomasa, se decidió realizar una cinética de producción por lo que se registró la producción de CO<sub>2</sub> de las levaduras durante las primeras 10 horas después de ser inoculadas (Figura 15). En este experimento observamos que las levaduras que comienzan a fermentar antes, no son necesariamente las que rinden una mayor producción final, sino que éstas inician el crecimiento igual que el resto pero toman mayor velocidad entre 7 y 9 horas de cultivo. La levadura Windsor fue la primera en producir CO<sub>2</sub> de manera visible en el tubo, pero con el paso de las horas, fue rápidamente superada por las cepas Misterium, M01 y M7; esto es de especial interés en la industria cervecera porque la producción de etanol va de la mano con la de dióxido de carbono. M01 ha demostrado ser la cepa más prometedora para la industria cervecera, principalmente porque la producción de CO<sub>2</sub> es temprana, por lo tanto también debe ser la de alcohol, siendo la cepa original la que le sigue en desempeño durante las primeras 10 horas. Si asociamos las figuras 14 y 15 podemos concluir de los experimentos que las mutaciones en las cepas provenientes de Misterium, M7 y M01, sufrieron de mutaciones que provocaron un aceleramiento en el consumo de azúcares y por lo tanto en la producción de CO<sub>2</sub>; esto fue tanto en las primeras horas de fermentación, como en los resultados de biomasa y dióxido de carbono después de 24 horas. Mientras que el resto de las cepas que se obtuvieron de los ciclos de mutaciones se notaron con un rendimiento disminuido al de la cepa original, resultados que fueron confirmados tanto en el seguimiento hora por hora, hasta el momento de pesar la biomasa seca.

Una vez con los resultados definidos se prosiguió con la elaboración de cerveza para la prueba sensorial, en la que se esperaba no hubiera diferencias negativas en el producto de las cepas mutantes respecto a las cervezas producidas por la levadura aislada original.

## 5.6 La evaluación sensorial.

El panel de evaluadores fue integrado por estudiantes de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, a quienes se les explicó los atributos a evaluar: aroma, textura, sabor alcohólico sabor amargo; así como la manera en la que se realizaron las cervezas, tomando en cuenta las siguientes modificaciones con respecto a la cerveza original: ausencia de lúpulos, falta de segunda fermentación y maduración de la cerveza. Los objetivos de la evaluación sensorial van dirigidos explícitamente a los cambios producidos por las levaduras.

Cuadro 4. Resultados de las pruebas sensoriales con 4 criterios. Textura, aroma, sabor amargo y sabor alcohólico. Los resultados se muestran en porcentaje

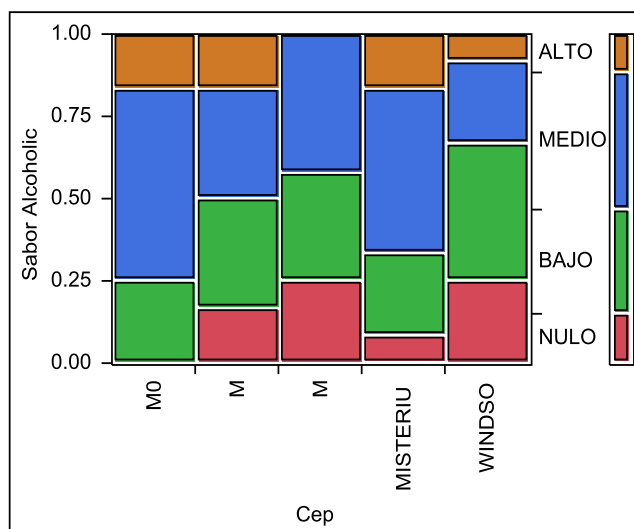
Cepas	Aroma				Textura			
	Fuerte	Agradable	Suave	Pesada	Media	Ligera		
MISTERIUM	8.3	58.3	33.3	8.3	58.3	33.3		
M01	16.7	66.7	16.7	16.7	33.3	50.0		
M7	0.0	58.3	41.7	8.3	41.7	50.0		
M5	8.3	58.3	33.3	0.0	66.7	33.3		
WINDSOR	8.3	41.7	50.0	8.3	50.0	41.7		
Cepas	Sabor Alcohólico				Sabor Amargo			
	Alto	Medio	Bajo	Nulo	Alto	Medio	Bajo	Dulce
MISTERIUM	16.7	50.0	25.0	8.3	25.0	58.3	16.7	0.0
M01	16.7	58.3	25.0	0.0	16.7	41.7	33.3	8.3
M7	0.0	41.7	33.3	25.0	8.3	16.7	50.0	25.0
M5	16.7	33.3	33.3	16.7	0.0	41.7	25.0	33.3
WINDSOR	8.3	25.0	41.7	25.0	8.3	25.0	33.3	33.3

Finalmente, después de haber realizado las evaluaciones sensoriales de las cervezas, se determinó que la cerveza producida por cepa Misterium demostró cualidades positivas, que son de especial interés en la elaboración de este producto, como lo son el sabor amargo con aroma y sabor alcohólico.

Se realizó un análisis estadístico sobre los criterios con datos obtenidos durante la evaluación sensorial, el objetivo del análisis de tablas de contingencia es el de mostrar que no existen diferencias significativas entre la cepa original tomada como referencia respecto a la cepas desarrolladas mediante la mutagénesis. En el Cuadro 5 se muestra el total de las observaciones, porcentaje por fila y columna mostrando así la dispersión de los datos. El análisis estadístico se realizó mediante el software JMP (SAS-INSTITUTE INC Ver 10.0.0, 2012). El análisis realizado sobre el criterio de textura es el que presenta mayores desviaciones; pero este criterio, aunque no existe más que una tendencia media-ligera. La cepa Misterium como se muestra en el Cuadro 5 exhibe desviaciones más amplias por lo que es la única dentro del criterio de sabor amargo que muestra una tendencia hacia medio-alto, el valor elevado en ji cuadrada nos indica que los cambios no son significativos entre cepas, aunque sí existan las tendencias antes mencionadas, en cuanto a sabor alcohólico todas las cepas tienden a ser percibidas como medio-bajo. El aroma en general permanece como agradable a la percepción del panel así como la tendencia de la textura a media ligera.

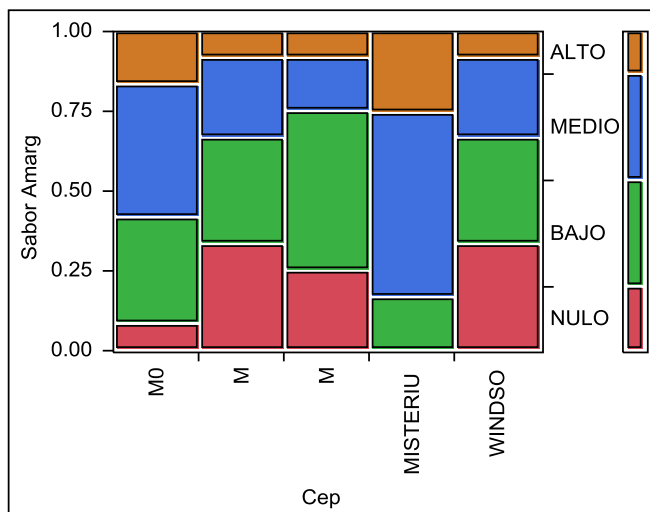
Cuadro 5. Análisis de contingencia sobre los criterios de amargor y sabor alcohólico.

Count Total % Col % Row %	NULO	BAJO	MEDIO	ALTO	
M01	0 0.00 0.00 0.00	3 5.00 15.79 25.00	7 11.67 28.00 58.33	2 3.33 28.57 16.67	12 20.00
M5	2 3.33 22.22 16.67	4 6.67 21.05 33.33	4 6.67 16.00 33.33	2 3.33 28.57 16.67	12 20.00
M7	3 5.00 33.33 25.00	4 6.67 21.05 33.33	5 8.33 20.00 41.67	0 0.00 0.00 0.00	12 20.00
MISTERIUM	1 1.67 11.11 8.33	3 5.00 15.79 25.00	6 10.00 24.00 50.00	2 3.33 28.57 16.67	12 20.00
WINDSOR	3 5.00 33.33 25.00	5 8.33 26.32 41.67	3 5.00 12.00 25.00	1 1.67 14.29 8.33	12 20.00
	9 15.00	19 31.67	25 41.67	7 11.67	60



Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Likelihood Ratio	11.760	0.4652
Pearson	8.800	0.7199

Count Total % Col % Row %	NULO	BAJO	MEDIO	ALTO	
M01	1 1.67 8.33 8.33	4 6.67 20.00 33.33	5 8.33 25.00 41.67	2 3.33 25.00 16.67	12 20.00
M5	4 6.67 33.33 33.33	4 6.67 20.00 33.33	3 5.00 15.00 25.00	1 1.67 12.50 8.33	12 20.00
M7	3 5.00 25.00 25.00	6 10.00 30.00 50.00	2 3.33 10.00 16.67	1 1.67 12.50 8.33	12 20.00
MISTERIUM	0 0.00 0.00 0.00	2 3.33 10.00 16.67	7 11.67 35.00 58.33	3 5.00 37.50 25.00	12 20.00
WINDSOR	4 6.67 33.33 33.33	4 6.67 20.00 33.33	3 5.00 15.00 25.00	1 1.67 12.50 8.33	12 20.00
	12 20.00	20 33.33	20 33.33	8 13.33	60



Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Likelihood Ratio	15.540	0.2132
Pearson	13.500	0.3338

De las mutantes derivadas de esta cepa, M01 también mostró aceptación en la prueba sensorial, tanto en sabor alcohólico, como en el sabor amargo. Ya que en general, la mayoría de las personas clasificaron las cualidades de interés similares en cuanto a amargor, sabor alcohólico, y aroma, mientras que los resultados de la textura fueron muy variados (Cuadro 4).

El análisis estadístico no permite demostrar diferencias significativas entre cepas, por lo tanto la modificación genética de cada cepa, así como las alteraciones en el metabolismo, no parecen haber modificado las características de producción de cerveza y el producto originado permanece constante con respecto al original.

De esta manera podemos afirmar que obtuvimos una cepa con resultados positivos de sobreproducción de CO<sub>2</sub> que mantiene los sabores característicos y de interés, para probar su desempeño en una producción de mayor tamaño.

## 6. CONCLUSIÓN

La producción de diferentes levaduras de cerveza con cualidades excepcionales fue el objetivo principal del proyecto, desarrollando así una cepa sobreproductora de CO<sub>2</sub> por la metodología de la mutagénesis por radiación UV. Un metabolismo acelerado en levaduras no implica una mutación puntual; desde la perspectiva biotecnológica podría resultar más directo el realizar mutaciones dirigidas pero el crecimiento máximo y velocidad de crecimiento implican una interacción de genes constitutivos provenientes del mantenimiento celular, anabolismo, transporte y catabolismo, principalmente glucólisis; además, se ha reportado que la regulación de las enzimas glucolíticas es baja (Groeneveld, 2008). Es por eso que se presenta un punto a favor de la metodología utilizada, ya que mutaciones aleatorias son un abordaje ideal cuando estamos hablando de caracteres cuantitativos susceptibles a mutaciones.

El resto de las cepas obtenidas del ciclo de mutaciones mostraron resultados diferentes que, aunque no mantuvieron las cualidades buscadas, pueden ser utilizadas en la industria de panadería, por el poco sabor amargo que propician y la producción de biomasa.

En el futuro, estudios más detallados deben ser llevados a cabo respecto a los ésteres en la cerveza, porque, una cepa de levadura de rápido crecimiento que sea capaz de producir ésteres específicos de sabor y aroma, como etanoato de etilo para generar el olor y sabor alcohólico; hexanoato y octanoato de etilo para obtener aromas afrutados y agradables, entre otros compuestos de interés puede ser obtenida a través de la metodología descrita en este trabajo de tesis.

## 7. REFERENCIAS

**Abaroa** SI, Que no te mareen. Comparativo de precios de cerveza [monografía en internet]. México, DF. PROFECO, 2013 [consultado 2014 septiembre 28]. Disponible en: [http://www.profeco.gob.mx/encuesta/brujula/bruj\\_2013/bol252\\_comparativo\\_cervezas.asp](http://www.profeco.gob.mx/encuesta/brujula/bruj_2013/bol252_comparativo_cervezas.asp)

**Anderson** RG, Kirsop BH. The control of volatile ester synthesis during the fermentation of wort of high specific gravity, *Journal of The Institute of Brewing*. **1974**; 80: 48-55.

**Attaway** JA, Wolford RW. Determination of esters by thin layer chromatography. *Analytical Chemistry*. **1964**; 37: 74-76.

**Bamforth** C. Beer, tap into the art and science of brewing. 198 Madison avenue, New York: Oxford press, inc. **2009**; 94-109. Edición digital.

**Coordinación General de Comunicación Social**. Principal proveedor de cebada de la industria cervecera nacional adopta MasAgro [monografía en internet]. México, DF. SAGARPA, 2012 [consultado 2014 octubre 4]. Disponible en: [http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/2012/julio/Documents/2012\\_B318.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/2012/julio/Documents/2012_B318.pdf)

**González** M. Qué sucede con el lúpulo..? [monografía en internet]. México, DF. Revista MASH, 2007 [Consultado 2014 octubre 4]. Disponible en: <http://www.revistamash.com/detalle.php?id=327>

**Groeneveld** P, Stouthamer AH, Westerhoff HV. Super life – how and why ‘cell selection’ leads to the fastest-growing eukaryote. *The febs journal*. **2008**; 276: 254-270.

**Horák** T, Čulík J, Kellner V, Jurková M, Čejka P, Hašková D, Dvořák J. Analysis of selected esters in beer: comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction. *The Institute of brewing & distilling*. **2010**; 116: 81-85.

**Hornsey** SI. A history of beer and brewing. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0WF, UK: RSC paperbacks, **2003**: 41-44.

**Huimin L**, Hongjun L, Xiuhua L, Bing C. Analysis of volatile flavor compounds in top fermented wheat beer by headspace sampling-gas chromatography. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*. **2012**; 5: 67-75.

**Lodolo EJ**, Kock JLF, Axcell BC, Brooks M. The yeast *Saccaromyces cerevisiae* – the main character in beer brewing. *Federation of European microbiological societies*. **2007**; 8: 1018-1036.

**Majara N**, O'Connor-Cox ESC, Axcell BC. Trehalose – a stress protectant and stress indicator compound for yeast exposed to adverse conditions. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **1966**; 54: 221–227.

**Meilgaard M**. Effects on flavour of innovations in brewery equipment and procesing: a review. *Journal of The Institute of Brewing*. **2001**;107: 271-286.

**Rai M**, Bridge P, comp. *Applied mycology*. London, UK: CABI. **2009**: 110-135.

**Rainieri S**, Zambonelli C, Kaneko Y. *Saccaromyces sensu stricto*: systematics, genetic diversity and evolution. Elsevier. **2003**; 96: 1-9.

**Saerens SMG**, Delvaux F, Verstrepen K, Thevelein JM. Production and biological funtion of volatile esters in *Saccaromyces cerevisiae*. *Society for applied microbiology*. **2009**; 3: 165-177.

**Saerens SMG**, Delvaux F, Verstrepen KJ, Van Dijck P, Thevelein JM. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccaromyces cerevisiae* during fermentation. *American Society for Microbiology*. **2007**; 74: 454-461.

**Šmogrovičová D**, Dömény Z. Beer volatile by-product formation at different fermentation temperature using immobilised yeasts. Elsevier. **1999**; 34: 785-794.

**Van der Aa-Kühle A**, Jesperen L, Glover RLK, Diawara B, Jakobsen M. Identification and characterization of *Saccaromyces cerevisiae* strains isolated from West African sorghum beer. John Wiley & Sons, Ltd. **2001**; 18: 1069-1079.

**Verbelen PJ**, Delvaux FR. *Applied mycology*. London, UK: CABI. **2009**: 110-135.

**Walker MD**, Simpson WJ. Production of volatile sulphur compounds by ale and lager brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Letters in Applied Microbiology*. **1993**; 16: 40–43.