



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**Efecto de las variables de fermentación sobre la
remoción de micotoxinas por acción de levaduras
comerciales utilizadas en la producción de cerveza
artesanal**

Que para obtener el grado de:
Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

Jaime Omar Sánchez Zaletas

DIRECTORES:

Víctor José Robles Olvera

Madeleine Hidalgo Morales

H. VERACRUZ, VER.

22 de enero de 2020



EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz
Subdirección Académica
División de Estudios de Posgrado e Investigación

"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

H. Veracruz, Ver., **11/junio/2020**
OFICIO No. ITV/DEPI/215/2020

Asunto: Autorización de impresión

C. JAIME OMAR SÁNCHEZ ZALETAS PRESENTE

Por este conducto se le comunica que su tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica titulada:

"Efecto de las variables de fermentación sobre la remoción de micotoxinas por acción de levaduras comerciales utilizadas en la producción de cerveza artesanal"

Fue aprobada en su totalidad en cuanto a formato y calidad del contenido a satisfacción del H. Jurado del examen, por lo que está Usted autorizado a editar la presentación definitiva del trabajo.

ATENTAMENTE

*Excelencia en Educación Tecnológica
Antorcha y Luz de Fuego Permanente*

BENIGNO ORTIZ MUÑOZ
JEFE DE LA DIV. EST. POSG. E INVEST.

VÍCTOR JOSÉ ROBLES OLVERA
PRESIDENTE



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

CAROLINA PEÑA MONTES
SECRETARIO

MIRNA L. SUÁREZ QUIROZ
VOCAL

MADELEINE HIDALGO MORALES
SUPLENTE

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar
C.P. 91897, Veracruz, Ver. Tel. (229) 934 1500

www.veracruz.tecnm.mx





"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

H. Veracruz, Ver., 11/junio/2020

OFICIO No. ITV/DEPI/215/2020

Asunto: Autorización de impresión

C. JAIME OMAR SÁNCHEZ ZALETAS PRESENTE

Por este conducto se le comunica que su tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica titulada:

"Efecto de las variables de fermentación sobre la remoción de micotoxinas por acción de levaduras comerciales utilizadas en la producción de cerveza artesanal"

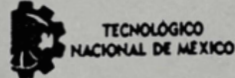
Fue aprobada en su totalidad en cuanto a formato y calidad del contenido a satisfacción del H. Jurado del examen, por lo que está Usted autorizado a editar la presentación definitiva del trabajo.

ATENTAMENTE

*Excelencia en Educación Tecnológica
Antorcha y Luz de Fuego Permanente*

BENIGNO ORTIZ MUÑOZ
JEFE DE LA DIV. EST. POSG. E INVEST.

VÍCTOR JOSÉ ROBLES OLVERA
PRESIDENTE



CAROLINA PEÑA MONTES
SECRETARIO

MIRNA L. SUÁREZ QUIROZ
VOCAL

MADELEINE HIDALGO MORALES
SUPLENTE

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



RESUMEN

Jaime Omar Sánchez Zaletas. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. “Efecto de las variables de fermentación sobre la remoción de micotoxinas por acción de levaduras comerciales utilizadas en la producción de cerveza artesanal”. Directores: Víctor José Robles Olvera, Madeleine Hidalgo Morales.

La cerveza es producida a base de malta de cereales (cebada, trigo, maíz) susceptibles a contaminarse por hongos que sintetizan micotoxinas, siendo deoxivalenol (DON) y zearalenona (ZEA) las toxinas más frecuentemente encontradas, estables a las condiciones del proceso de producción de cerveza. Se han evaluado métodos físicos, químicos y biológicos para la detoxificación de cereales por micotoxinas, entre estos últimos, se ha reportado que *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus*, levaduras utilizadas para la producción de cerveza, adsorben micotoxinas en su pared celular. El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto de las variables de fermentación sobre la remoción de DON y ZEA por acción de levaduras (*S. cerevisiae* y *S. pastorianus*) utilizadas en la producción de cerveza artesanal. Se evaluó el efecto de la temperatura de fermentación (15, 20 y 25 °C para *S. cerevisiae* y 10, 15 y 20 °C para *S. pastorianus*), de la concentración inicial de micotoxina (DON: 560 y 1164 µg/kg; ZEA: 284 y 440 µg/kg) producida por *F. graminearum* en malta tipo Pilsen, de la cepa de levadura (*S. cerevisiae*: S04 y M36; *S. pastorianus*: W34 y S23), de la segunda fermentación y de la maduración durante 4 semanas sobre los niveles residuales de DON y ZEA. Se determinó el efecto de la concentración de micotoxina sobre la producción de alcohol, el pH y la concentración celular. Se evaluaron los niveles de DON y ZEA en cada etapa del proceso de producción de cerveza. DON y ZEA se extrajeron de la malta y el mosto mediante columnas de inmunoafinidad y una técnica rápida, fácil, barata, eficaz, robusta y segura (QuEChERS), respectivamente; y se cuantificaron mediante UHPLC-UV (DON) y UHPLC-fluorescencia (ZEA). La concentración de micotoxinas no tuvo efecto significativo sobre la producción de alcohol, el pH y la concentración celular durante la fermentación. La temperatura influyó en las fermentaciones con *S. cerevisiae*, la mayor remoción de DON (34 %) y ZEA (90 %) se alcanzó con la temperatura más alta en mostos con alta concentración de micotoxina inicial (DON = 1164 µg/L; ZEA = 440 µg/L); mientras que para *S. pastorianus*, la mayor remoción de DON (26 %) y ZEA (72%) se alcanzó a 15 °C en mostos con alta concentración de micotoxina inicial. La segunda fermentación tuvo un efecto significativo en la disminución de DON y ZEA, sin embargo, no fue el caso con la maduración. Al final del proceso de producción de cerveza, la remoción fue de 45 % para DON y 87 % para ZEA con *S. pastorianus* W34, y de 46 % para DON y 96 % para ZEA con *S. cerevisiae* S04. Este trabajo permite concluir que la elección de variables adecuadas de fermentación es relevante para disminuir el contenido de micotoxinas durante la fermentación de la cerveza artesanal.

ABSTRACT

Jaime Omar Sánchez Zaletas. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. “Effect of fermentation variables on the removal of mycotoxins by commercial yeasts used in craft beer production”. Directores: Víctor José Robles Olvera, Madeleine Hidalgo Morales.

Beer is produced from cereal malt (barley, wheat, corn) which is susceptible to contamination by mycotoxins-producing fungi, deoxinivalenol (DON) and zearalenone (ZEA) are the most frequently found toxins stable to process conditions of beer production. Physical, chemical and biological methods for detoxification of mycotoxins in cereals have been evaluated, among the latter, it has been reported that *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus*, yeasts used for beer production, adsorb mycotoxins in their cell wall. The objective of this project was to evaluate the effect of fermentation variables on the removal of DON and ZEA by action of yeasts (*S. cerevisiae* and *S. pastorianus*) used in the production of craft beer. The effect of fermentation temperature (15, 20 and 25 °C for *S. cerevisiae* and 10, 15 and 20 °C for *S. pastorianus*), the concentration of mycotoxin produced by *F. graminearum* in Pilsen malt (DON: 560 and 1164 µg/kg; ZEA: 284 y 440 µg/kg), the yeast strain (*S. cerevisiae*: S04 and M36; *S. pastorianus*: W34 and S23), the second fermentation and 4 weeks of maturation on the levels of DON and ZEA was evaluated. The effect of mycotoxin concentration on alcohol production, pH and cell concentration was determined. DON and ZEA levels were evaluated at each stage of the beer production process. Mycotoxins were extracted from malt and wort by immunoaffinity columns and by a Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) technique, respectively, and quantified by UHPLC-UV (DON) and UHPLC-fluorescence (ZEA). The concentration of mycotoxins had no significant effect on the alcohol production, pH and cell concentration during fermentation. The temperature significantly influenced fermentations with *S. cerevisiae* reaching higher removal of DON (34%) and ZEA (90%) with the highest temperatures in wort with high concentration of mycotoxin; while for *S. pastorianus*, the highest removal of DON (26%) and ZEA (72%) were reached in fermentations at 15 °C. There is a significant effect on the decrease of DON and ZEA levels after the second fermentation, however the maturation stage did not contribute significantly to the removal. The removal percentages of the overall beer production process reached were 45% for DON (W34) and 87% for ZEA with *S. pastorianus* W34; and 46% for DON and 96% for ZEA with *S. cerevisiae* S04. This work allows us to conclude that the choice of suitable fermentation variables is relevant to decrease the mycotoxin content during the fermentation of craft beer.

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	ANTECEDENTES.....	2
2.1	Micotoxinas	2
2.1.1	Definición y grupos de micotoxinas.....	2
2.1.2	Características químicas y físicas de DON y ZEA	2
2.1.3	Hongos productores de micotoxinas.....	4
2.1.4	<i>Fusarium graminearum</i>	5
2.1.5	Desarrollo de micotoxinas en cultivos de cereales.....	7
2.1.6	Daño a la salud por ingesta de micotoxinas.....	8
2.1.7	Regulaciones mundiales sobre ingesta de micotoxinas	12
2.1.8	Métodos de remoción de micotoxinas.....	14
2.1.8.1	Tratamientos físicos para la remoción de micotoxinas.....	15
2.1.8.2	Tratamientos químicos para la remoción de micotoxinas.....	17
2.1.8.3	Tratamientos biológicos para la remoción de micotoxinas	19
2.1.9	Micotoxinas en cerveza	20
2.2	Cerveza.....	22
2.2.1	Definición de cerveza	23
2.2.2	Estilos de cerveza	23
2.2.3	Consumo mundial de cerveza	24
2.2.4	Consumo de cerveza en México.....	25
2.3	Materia prima para la elaboración de cerveza	26
2.3.1	Agua.....	26
2.3.2	Malta	28
2.3.3	Lúpulo	29
2.3.4	Levadura	32
2.3.4.1	Pared celular de la levadura	35
2.4	Proceso de producción de cerveza.....	37
2.4.1	Proceso artesanal de producción de cerveza	38
2.4.2	Principales diferencias entre producción industrial y producción artesanal	43
2.4.3	Presencia de micotoxinas durante el proceso de producción de cerveza	44

2.4.3.1	Malteado (remojo, germinación y horneado).....	44
2.4.3.2	Molienda.....	45
2.4.3.3	Maceración y lavado.....	45
2.4.3.4	Cocción	45
2.4.3.5	Fermentación.....	46
2.4.3.6	Maduración y estabilización.....	48
2.5	Síntesis de antecedentes	48
3	OBJETIVOS	50
3.1	OBJETIVO GENERAL.....	50
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
4.1	Materia prima	52
4.2	Métodos	54
4.2.1	Caracterización de la carga fúngica de la malta.....	54
4.2.2	Microcultivo de hongos aislados de la flora nativa de la malta	54
4.2.3	Reactivación e inducción de esporulación de <i>Fusarium graminearum</i>	54
4.2.4	Preparación de suspensiones de esporas de <i>F. graminearum</i>	55
4.2.5	Inoculación intencional de malta con <i>F. graminearum</i> e inducción a la producción de DON y ZEA.....	55
4.2.6	Extracción de DON y ZEA mediante columnas de inmunoafinidad, a partir de malta de cebada contaminada	56
4.2.7	Producción de mosto a partir de malta de cebada contaminada con <i>F. graminearum</i>	57
4.2.8	Primera, segunda fermentación y maduración.....	58
4.2.9	Extracción de DON y ZEA en mosto, mediante QuEChERS.....	60
4.3	Preparación de extractos de DON y ZEA	61
4.4	Sistema UHPLC	61
4.5	Validación de métodos analíticos	62
4.6	Análisis Estadístico	62
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
5.1	Caracterización de la flora nativa de la malta	63
5.2	Inóculo de <i>F. graminearum</i> (recuento de clamidosporas).....	64
5.3	Características del mosto	64

5.4	Niveles de micotoxina durante la elaboración del mosto	65
5.5	Efecto de la concentración de micotoxinas sobre los parámetros de fermentación	66
5.6	Efecto de la temperatura, la concentración de micotoxina y cepa de levadura sobre los niveles de DON durante la primera fermentación	69
5.7	Efecto de la temperatura, la concentración de micotoxina y cepa de levadura sobre los niveles de ZEA durante la primera fermentación	71
5.8	Efecto de la segunda fermentación y de la maduración sobre los niveles de DON y ZEA	73
5.9	Niveles de DON y ZEA durante el proceso global de producción artesanal de cerveza	75
6	CONCLUSIONES	77
7	BIBLIOGRAFÍA.....	78

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2-1. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL DEOXINIVALENOL	3
FIGURA 2-2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA ZEARELENONA.	3
FIGURA 2-3. MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA (A) Y MICROSCÓPICA (B) DE F. GRAMINEARUM.....	5
FIGURA 2-4. ASPECTO DE ESPIGAS DE CEREALES INFECTADAS CON F. GRAMINEARUM.....	7
FIGURA 2-5. CONSUMO PER CÁPITA EN LITROS DE CERVEZA EN EL MUNDO.....	25
FIGURA 2-6. VENTA DE CERVEZA ARTESANAL EN MÉXICO (2011-2017).	26
FIGURA 2-7. PLANTACIÓN DE LÚPULO Y FLOR.	29
FIGURA 2-8. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA (R)-HUMULONA.	30
FIGURA 2-9. REPRODUCCIÓN SEXUAL Y ASEJUAL DE UNA LEVADURA.	32
FIGURA 2-10. REPRODUCCIÓN POR GEMACIÓN DE UNA LEVADURA.	33
FIGURA 2-11. CINÉTICA DE CRECIMIENTO TÍPICA DE UNA LEVADURA.....	34
FIGURA 2-12. ORGANIZACIÓN QUÍMICA DE LA PARED CELULAR DE SACCHAROMYCES SP.	36
FIGURA 2-13. PROCESO DE FABRICACIÓN DE CERVEZA A NIVEL INDUSTRIAL.	38
FIGURA 2-14. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE CERVEZA ARTESANAL.	39
FIGURA 2-15. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DURANTE LA MACERACIÓN ESCALONADA.....	40
FIGURA 2-16. VISTA GENERADA POR COMPUTADORA DEL ACOPLAMIENTO ENTRE ZEA Y LA HÉLICE DE LA CADENA D-GLUCANO.....	48
FIGURA 4-1. DIAGRAMA DE BLOQUES DE LA METODOLOGÍA GENERAL.....	51
FIGURA 4-2. RAMPA DE TEMPERATURA UTILIZADA DURANTE LA MACERACIÓN.....	57
FIGURA 5-1. ESTRUCTURAS MORFOLÓGICAS DE HONGOS AISLADOS DE DISTINTAS MALTAS.....	63
FIGURA 5-2. CLAMIDOSPORAS DE F. GRAMINEARUM.	64
FIGURA 5-3. NIVELES DE MICOTOXINAS DURANTE LA ELABORACIÓN DE MOSTO.....	65
FIGURA 5-4. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE DON Y ZEA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL.	66
FIGURA 5-5. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE DON Y ZEA SOBRE EL PH.....	68
FIGURA 5-6. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE DON Y ZEA SOBRE LA POBLACIÓN CELULAR DE LEVADURA.	68
FIGURA 5-7. EFECTO DE LA CEPA DE LEVADURA, TEMPERATURA Y CONCENTRACIÓN INICIAL DE MICOTOXINA SOBRE EL NIVEL DE DON DURANTE LA FERMENTACIÓN DE MOSTO CON S. CEREVISIAE.	70
FIGURA 5-8. EFECTO DE LA CEPA DE LEVADURA, TEMPERATURA Y CONCENTRACIÓN INICIAL DE MICOTOXINA SOBRE EL NIVEL DE DON DURANTE LA FERMENTACIÓN DE MOSTO CON S. PASTORIANUS.	70
FIGURA 5-9. EFECTO DE LA CEPA DE LEVADURA, TEMPERATURA Y CONCENTRACIÓN INICIAL DE MICOTOXINA SOBRE EL NIVEL DE ZEA DURANTE LA FERMENTACIÓN CON S. CEREVISIAE.	71
FIGURA 5-10. EFECTO DE LA CEPA DE LEVADURA, TEMPERATURA Y CONCENTRACIÓN INICIAL DE MICOTOXINA SOBRE EL NIVEL DE ZEA DURANTE LA FERMENTACIÓN CON S. PASTORIANUS.	72
FIGURA 5-11. EFECTO DE LA SEGUNDA FERMENTACIÓN Y DE LA MADURACIÓN SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE DON EN MOSTO FERMENTADO.....	74
FIGURA 5-12. EFECTO DE LA SEGUNDA FERMENTACIÓN Y DE LA MADURACIÓN SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE ZEA EN MOSTO FERMENTADO.....	74
FIGURA 5-13. NIVEL DE DON DURANTE EL PROCESO GLOBAL DE ELABORACIÓN DE CERVEZA ARTESANAL.....	75
FIGURA 5-14. NIVEL DE ZEA DURANTE EL PROCESO GLOBAL DE ELABORACIÓN DE CERVEZA ARTESANAL.....	76

LISTA DE TABLAS

TABLA 2-1. MICOTOXINAS ASOCIADAS A HONGOS PRODUCTORES.	4
TABLA 2-2. MICOTOXINAS ENCONTRADAS EN CEREALES.	9
TABLA 2-3. AFECCIONES POR CONSUMO DE MICOTOXINAS.	10
TABLA 2-4. NIVELES MÁXIMOS DE MICOTOXINAS PERMITIDOS EN ALIMENTOS.	13
TABLA 2-5. INCIDENCIA DE MICOTOXINAS EN CERVEZA.	21
TABLA 2-6. PERFIL IÓNICO DEL AGUA DE DISTINTAS CIUDADES.	28
TABLA 2-7. VARIEDADES DE LÚPULO.	31
TABLA 2-8. COMPOSICIÓN DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE.	35
TABLA 4-1. PROCEDENCIA, TIPO Y CÓDIGOS ASIGNADOS A LAS MALTAS ESTUDIADAS.	53
TABLA 4-2. DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA LAS FERMENTACIONES.	59

1 INTRODUCCIÓN

La cerveza es una bebida que ha acompañado a la humanidad desde los orígenes de las civilizaciones hasta la fecha, hoy en día es consumida prácticamente en todo el mundo. Sin embargo, existe una problemática de contaminación por micotoxinas en cerveza debido a que algunos hongos filamentosos productores de micotoxinas pueden crecer en los cereales (maíz, cebada, trigo, sorgo) utilizados para la elaboración de la cerveza. Las micotoxinas son estables durante proceso de producción de cerveza, llegando finalmente al consumidor; por tanto, constituyen un problema para la salud humana por la ingesta y exposición a ellas.

Las micotoxinas de mayor incidencia en cervezas artesanales (> 70 %) y comerciales son deoxinivalenol (DON) y zearalenona (ZEA) (Bolechová *et al.*, 2015; Juan *et al.*, 2017; Peters *et al.*, 2017), superando en algunos casos 100 µg/L de DON. En consecuencia, la ingesta de DON a través del consumo de cerveza, dependiendo de su consumo y del tipo de cerveza, podría representar un porcentaje significativo de la ingesta diaria tolerable, que se conoce por sus siglas en inglés como “TDI”.

Diversos autores han demostrado que *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus*, levaduras utilizadas para la producción de cerveza, pueden adsorber micotoxinas en su pared (Scott *et al.*, 1995; Shetty y Jespersen, 2006; Corassin *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2014), por lo que el uso de *Saccharomyces* podría ser una alternativa para reducir el contenido de micotoxinas en la cerveza, sin embargo, no se ha estudiado el efecto de las variables de fermentación sobre la remoción de las micotoxinas por la levadura, ni el efecto de la doble fermentación y maduración de la cerveza, etapas del proceso en que aún está presente la levadura. Por ello, el objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto de la temperatura de fermentación, de la concentración inicial de micotoxina, del tipo de cepa de levadura (*S. cerevisiae* y *S. pastorianus*), de la doble fermentación y del tiempo de maduración sobre los niveles de DON y ZEA en cada etapa del proceso artesanal de producción de cerveza.

2 ANTECEDENTES

2.1 Micotoxinas

2.1.1 Definición y grupos de micotoxinas

Las micotoxinas son un grupo estructuralmente diverso, en su mayoría compuestos de bajo peso molecular, producidos por el metabolismo secundario de hongos filamentosos en respuesta a factores bióticos y abióticos. Existen más de 300 micotoxinas conocidas en la actualidad, pero para fines de esta tesis, este apartado es enfocado a aquellas que conciernen a la contaminación del grano de cebada, maíz y trigo; siendo de preocupación en el ámbito de producción de cerveza artesanal (JECFA, 2001).

La clasificación de micotoxinas más utilizada se basa en el género del hongo productor, y/o etapa de producción de la micotoxina, bien en campo o bien durante almacenamiento, pero conforme avanza la investigación en la materia, se descubre que esta clasificación es demasiado flexible, ya que un género puede producir diversos tipos de micotoxinas y lo puede hacer tanto en campo como durante el almacenamiento.

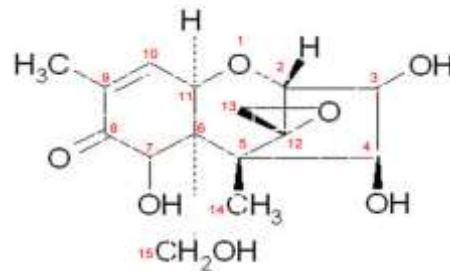
2.1.2 Características químicas y físicas de DON y ZEA

El deoxinivalenol (DON) y la zearalenona (ZEA) son las micotoxinas que más frecuentemente presentes en cultivos de cebada y trigo (Parry *et al.*, 1995), por lo que dada la naturaleza de la presente tesis, se considera pertinente abordar sobre las características químicas y físicas de estas micotoxinas.

DON es una micotoxina perteneciente al grupo de los tricotecenos, los cuales son ésteres de alcoholes sesquiterpenoides posicionados alrededor de un anillo tetracíclico que se caracteriza por un doble enlace entre el carbono 9 y 10 y un epóxido en el carbono 12 y 13 (Figura 2-1; Pestka, 2010).

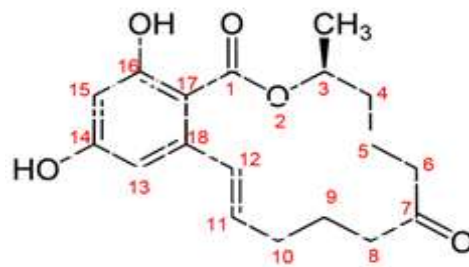
ZEA es una micotoxina estrogénica no esteroidal con estructura macrocíclica de un anillo de lactona (Fig. 2-2), su estructura es lo suficientemente flexible para

adoptar una conformación capaz de unirse a los receptores estrogénicos de ciertos mamíferos, sus grupos hidroxilo son los responsables de interactuar con dichos receptores (Shier *et al.*, 2001).



Pestka, 2010

Figura 2-1. Estructura química del Deoxinivalenol.



Shier *et al.*, 2001

Figura 2-2. Estructura química de la Zearalenona.

DON y ZEA presentan alta termoestabilidad y son capaces de soportar las temperaturas alcanzadas en distintos procesos alimentarios; de acuerdo con Tanaka y Ueno (1989) DON es estable a 120 °C, moderadamente estable a 180 °C y sufre cambios estructurales por encima de 210 °C después de 40 min; mientras que ZEA puede reducirse completamente a 225 °C por 30 min (Milani y Maleki, 2014). El alcance de la reducción de DON y ZEA durante el procesamiento térmico de alimentos parece ser bastante variable y dependiente de las condiciones de procesamiento: temperatura, tiempo, tipo de micotoxina y tamaño del producto de cereal.

En diversos estudios se ha evaluado la reducción de DON y ZEA en granos de cereales procesados; se ha encontrado que el horneado de granos favorece una reducción de 6.7 a 81 % para ambas micotoxinas a temperaturas que oscilan de 40 a

250 °C; de igual forma la cocción representa un proceso que favorece la remoción de estas micotoxinas (40-92 % de remoción); no obstante, es sustancial mencionar que la remoción no es debida a la temperatura sometida, sino a la solubilidad en agua de las toxinas (DON = 36000 mg/L; ZEA = 20 mg/L), lo que facilita la migración de gran parte de éstas desde la matriz al seno del líquido, posteriormente se puede separar el agua con micotoxinas por filtración y quedarse con el sólido de interés, como en el caso de la cocción de espaguetis, sin embargo, si el producto de interés es el líquido como en el caso de la cerveza, no se puede atribuir a la cocción la remoción de las toxinas (Wu *et al.*, 2017).

2.1.3 Hongos productores de micotoxinas

Dentro del reino *Fungi*, la división *Ascomycota* incluye a más de 30000 especies de hongos filamentosos, donde solo un número reducido de estas especies se relaciona con intoxicaciones que se producen por ingesta de alimento contaminado con micotoxinas (Soriano *et al.*, 2007). La Tabla 2-1 muestra algunos de los hongos productores de micotoxinas más comunes.

Tabla 2-1. Micotoxinas asociadas a hongos productores.

Micotoxina	Hongo productor
AFB1	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. Parasiticus</i> .
DON	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. pseudograminearum</i>
ZEA	<i>Fusarium crookwellense</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. semitectum</i>
T-2; HT-2	<i>Fusarium armeniacum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. musarum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. sporotrichioides</i>

Carrillo y Carina, 2007

2.1.4 *Fusarium graminearum*

Fusarium graminearum pertenece a la familia de los Hypocreaceae, y corresponde a la división *Ascomycota* (Leslie y Summerell, 2006).

Fusarium graminearum contiene esporodoquios a menudo escasos, pero cuando están presentes suelen ser de color naranja pálido, pudiendo estar ocultos bajo el micelio. El macroconidio es relativamente delgado, en forma de hoz de 2.5 x 35 – 63 μm , pudiendo contener entre 5 a 6 septos, presenta una célula basal con forma de pie bien desarrollada. Las clamidosporas son globosas con diámetros de 10 – 12 μm , pueden ser simples o en cadena; son ausentes de microconidios. *F. graminearum* es un hongo homotálico, con peritecios gregarios de coloración púrpura oscura a negro; los cuales se forman a partir de un estroma de forma ovoide con diámetro de 150 – 350 μm . Las ascas pueden contener 8 esporas hialinas, midiendo de 3.5 x 17-25 μm ; presentan de 0 a 4 septos, normalmente de 4 células (Leslie y Summerell, 2006). Se muestra en la Figura 2-3 la morfología macroscópica y microscópica de *F. graminearum*.

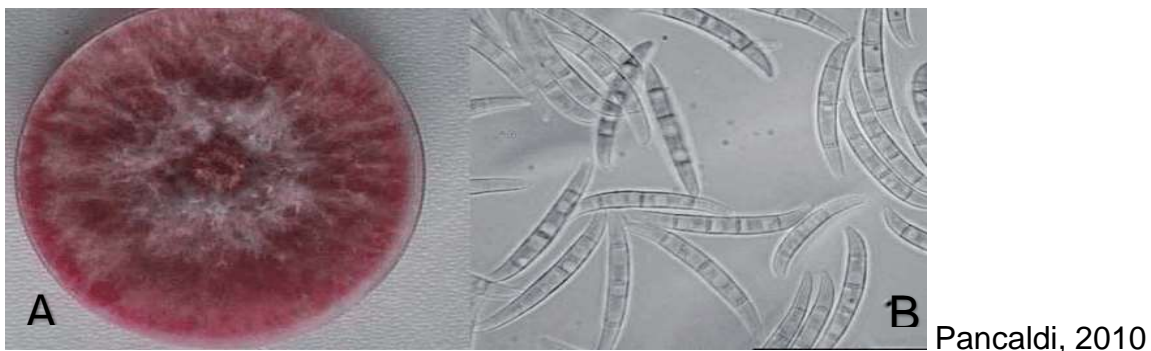


Figura 2-3. Morfología macroscópica (A) y microscópica (B) de *F. graminearum*.

F. graminearum ocupa glucosa como fuente de carbono y energía, por medio de respiración aeróbica. La composición heterogénea de su pared celular contiene múltiples proteínas de transporte de electrones, así como quitinasa, encargada de la degradación de la quitina (Shi *et al.*, 2008).

F. graminearum crece en granos como trigo, maíz y cebada principalmente, en un amplio rango de factores climáticos; esto incluye trigo y cebada en Norte América, Asia, Europa y Sur América; pudiendo crecer tanto en ambientes templados como en regiones semitropicales (Goswami, 2004).

Las condiciones favorables de proliferación de *F. graminearum* son principalmente alto contenido de humedad y temperaturas cálidas (24 - 29 °C) (McMullen *et al.*, 2008). Las esporas se propagan mediante el viento, lluvia e insectos, infectando espigas de cereales como cebada, trigo y maíz; puede extenderse al raquis e infectar las espiguillas por encima o por debajo del punto de infección. Las plántulas infectadas sobre las glumas coinciden con el punto de penetración del hongo, seguido por una decoloración por pérdida de clorofila en la espiguilla (Sutton, 1982).

Generalmente la primera manifestación de la enfermedad surge en la zona media de la espiga o el tercio superior. Bajo condiciones húmedas, la espiguilla infectada se cubre de micelio blanco y/o de una gran cantidad de esporas asexuales en masas viscosas, extensas y de color salmón/naranja intenso de conidios asexuales (Sutton, 1982). La enfermedad se propaga a las otras espiguillas tanto de forma apical como basípeta. El síntoma más severo es el resultante del crecimiento fúngico dentro del raquis. El hongo bloquea la translocación de agua y nutrientes y como consecuencia, la espiga adquiere la apariencia de madurez prematura (necrosis de los tejidos). También puede aparecer la forma sexual manifestándose como puntuaciones negras (peritecios) (Xu, y Nicholson 2009). En la Figura 2-4 se muestra la infección de *F. graminearum* en espigas de cereales.



Kohli *et al.*, 2015

Figura 2-4. Aspecto de espigas de cereales infectadas con *F. graminearum*.

2.1.5 Desarrollo de micotoxinas en cultivos de cereales

Los cultivos de cereales son una fuente de carbono donde hongos filamentosos encuentran las condiciones adecuadas para proliferar. La humanidad ha tenido serios problemas de contaminación en cultivos de cereales por este tipo de hongos que sintetizan micotoxinas, generando un severo daño a la salud humana y animal.

De acuerdo con la FAO, en 2013, el 25 % del cultivo mundial de cereales estaba contaminado con micotoxinas. En los cultivos de cereales podía existir más de un tipo de micotoxinas sintetizadas por la misma especie de hongo, o en otros casos debido a la presencia de varias especies de hongos coexistiendo en el mismo cultivo, y por consiguiente sintetizaban diferentes micotoxinas. La Tabla 2-5 muestra la presencia de diferentes micotoxinas en cultivo de cereales alrededor del mundo.

Los cultivos de trigo, cebada y maíz que sufren infecciones por *F. graminearum* reducen su rendimiento y calidad del grano, y en ocasiones contaminación por micotoxinas, siendo las más frecuentes DON, ZEA, NIV, y fumonisinas (Parry *et al.*, 1995).

La producción de micotoxinas en dichos cereales se produce en el campo y/o en el almacenamiento posterior a la cosecha; siendo la temperatura y la actividad de agua factores que influyen en la producción de micotoxinas. De acuerdo con Popovski y Celar (2013) el rango óptimo de temperatura de producción de DON es de 25 – 28

°C, manteniendo una actividad de agua de 0.97; mientras que para producción de ZEA el rango óptimo de temperatura es de 17 – 28 °C, con una actividad de agua de 0.97.

2.1.6 Daño a la salud por ingesta de micotoxinas

Las micotoxinas tienen diferentes efectos tóxicos (agudos y/o crónicos) en el hígado, riñón, sistema hematopoyético, toxicidad para la reproducción, efectos teratogénicos y carcinogénicos (JECFA, 2001; Creepy, 2002). Los efectos tóxicos vienen determinados por la dosis de ingestión, duración de la exposición, la interacción con otras sustancias tóxicas y la susceptibilidad genética del individuo. La Tabla 2-2 muestra las diferentes afecciones por consumo de diferentes micotoxinas. en la Tabla 2-3 se engloban las principales afecciones a la salud causadas por las micotoxinas mas comunes en los alimentos.

El DON se considera el tricoteceno del tipo B de menor toxicidad. En la evaluación de la toxicidad que ocasiona el DON en los animales se han considerado las influencias de diferentes variables (especie, edad, sexo, vía de administración, concentración de la micotoxina), resultando todas las especies estudiadas susceptibles al DON en el siguiente orden: cerdo > ratón > rata > aves y rumiantes. Esta sensibilidad está determinada, principalmente, por el metabolismo de cada especie. Para que DON cause la muerte o las lesiones hísticas marcadas en animales de experimentación se requiere de concentraciones muy elevadas (≥ 27 mg/kg de peso corporal) (Sosa *et al.*, 2017).

Tabla 2-2. Micotoxinas encontradas en cereales.

Año	Cultivo	Micotoxinas	Origen
2008	Trigo	NIV, DON, HT-2, T-2	Sur de Italia
2009	Avena Trigo Centeno	T-2, HT-2, NEO, DON	Alemania
2010	Maíz	DON	Sudáfrica
2010	Trigo	DON, NIV, FUS, BEA	Argentina
2010	Maíz	DON, ZEA, ZAN, MON, 3AcDON, 15AcDON, NIV, FUS -X, OTA, OTB	China
2011	Arroz	ENs (ENA, ENA1, ENB, ENB1), BEA, FUS	Marruecos
2011	Cebada	ENs (ENA, ENA1, ENB, ENB1)	España
2012	Trigo	OTA	India
2012	Trigo	CTN	Túnez
2013	Trigo	DON	Marruecos
2013	Arroz Maíz Sorgo Mijo	OTA	Nigeria
2013	Trigo Maíz Cebada	DON	India

Pereira *et al.*, 2014

Tabla 2-3. Afecciones por consumo de micotoxinas.

Micotoxina	Afecciones	Referencia
AFB1	Inducción a cáncer hepático.	Carrillo y Carina (2007)
DON	Diarrea, náuseas, vómitos, cefalalgia, dolor abdominal, anorexia, escalofríos, convulsiones, vértigo; inmunotoxicidad.	Carrillo y Carina (2007)
ZEA	Cambios puberales precoces.	Carrillo y Carina (2007)
T-2; HT-2	Sensación de quemazón en boca y garganta; vómitos, diarrea y dolor abdominal; hemorragias; destrucción de médula ósea; inmunosupresión; muerte.	Carrillo y Carina (2007)
NIV	Rechazo del alimento, disminución del aumento de peso, aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina en suero, elevación niveles de suero IgA.	Escriva, <i>et al.</i> (2015)
OTA	Genotoxicidad, daño renal	Creepy (2002)

La toxicidad de DON se basa en su capacidad para cruzar las barreras biológicas y afectar las funciones y la viabilidad de las células de los órganos (Maresca, 2013). A nivel celular, DON interfiere con el sitio activo de la peptidil transferasa en los ribosomas e inhibe la síntesis de proteínas. Además, la unión de DON al ribosoma de células eucariotas desencadena una respuesta al estrés ribotóxico, que implica la fosforilación de proteínquinasas activada por mitógeno (MAPK). La activación de

MAPK modula la expresión de genes asociados con la respuesta inmune, quimiotaxis, inflamación y apoptosis (Grenier *et al.*, 2012).

Los efectos más comunes que se observan en animales de experimentación ante la exposición prolongada al DON en la dieta son: disminución de la ganancia de peso y la eficiencia nutricional, anorexia y alteración de la función inmune (Pestka, 2007). Prelusky *et al.*, (1988) determinaron que el cerdo es la especie más susceptible porque la absorción del metabolito ocurre rápidamente, aumenta su concentración plasmática en los primeros 30 min de ingestión, con un tiempo de vida media de 3.9 h (Prelusky y Trenholm 1991), sumado a que su metabolismo presenta limitaciones en cuanto a la biotransformación del DON hacia un compuesto epoxidado menos tóxico (DOM-1) (Wu *et al.*, 2010). Todo lo opuesto sucede en las aves y los rumiantes, quienes pueden tolerar hasta 20 ppm en la dieta; sin embargo, en los cerdos una concentración de 1-2 mg/kg es suficiente para inducir efectos tóxicos (Sosa *et al.*, 2017).

En estudios de Awad *et al.* (2012) se demostró el potencial genotóxico de DON mediante la aplicación de alimento bajo en proteínas con una concentración de DON de 10 mg/kg en pollos de un día de nacido; se evaluó la fragmentación del ADN en los linfocitos y se demostró que el daño provocado en el ADN fue por la acción directa de esta micotoxina o a través de mecanismos epigenéticos, como la formación de aductos. No puede atribuirse algún efecto carcinogénico a DON, dado que no existe evidencia clara para demostrarlo.

El riesgo humano por consumo de DON concierne principalmente al sistema inmunológico, intestinal y daño al cerebro (Maresca, 2013).

Por otro lado, de acuerdo con Tiemann y Dänicke (2007) ZEA es considerada biológicamente potente. El objetivo principal de esta micotoxina es el sistema reproductivo debido a la similitud estructural de ZEA con algunas hormonas estrógenas, uniéndose competitivamente a los receptores de estrógenos y provocando alteraciones en el tracto reproductivo; a su vez, es capaz de inducir lesiones hepáticas con posterior desarrollo de hepatocarcinoma y alteraciones de algunos parámetros

enzimáticos de la función hepática en ratones de laboratorio, ratas, conejos, y hámsters. La ZEA ha demostrado ser inmunotóxica, hepatotóxica, nefrotóxica y potenciadora de la peroxidación lipídica (Pistol *et al.*, 2014).

Varios estudios in vivo informan sobre efecto toxicológico de ZEA en el sistema reproductivo, incluyendo alteraciones en el tracto reproductivo, agrandamiento del útero, disminución de la fertilidad, aumento de las resorciones embrioletales, tamaño reducido de la camada y cambios en los niveles séricos de progesterona y estradiol en animales de laboratorio (Koraichi *et al.*, 2012). Se ha informado que ZEA produce una variedad de efectos adversos para la salud en animales de granja. Tiene actividad estrogénica y esto se refleja en las alteraciones de la fertilidad y la reproducción en los cerdos, que se consideran las especies animales más sensibles (Tiemann y Dänicke, 2007). Los cerdos pueden volverse efectivamente estériles si el nivel de ZEA en el alimento es suficientemente alto (Kanora y Maes, 2010). En humanos, algunos estudios muestran una relación entre la pubertad precoz central o la incidencia de adenocarcinomas endometriales y la concentración de ZEA en suero, tejidos y alimentos (Koraichi *et al.*, 2012).

2.1.7 Regulaciones mundiales sobre ingesta de micotoxinas

En México no existen regulaciones para todas las micotoxinas antes mencionadas, a excepción de las aflatoxinas que según la NORMA Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, asigna un valor máximo permisible de 20 µg/kg de aflatoxinas totales en cereales (10 veces mayor que lo permitido por la Comisión Europea). No obstante, las regulaciones están evaluándose y cambiando con el tiempo; la Tabla 2-4 muestra los niveles máximos permitidos de las principales micotoxinas en ciertos alimentos.

Tabla 2-4. Niveles máximos de micotoxinas permitidos en alimentos.

Micotoxina	Alimento	Nivel máximo (µg/kg)
DON	Pan	500
	Cereales sin procesar, a excepción de trigo duro, avena y maíz.	1250
	Trigo duro, avena y maíz sin procesar	1750
	Cereales destinados al consumo humano directo	750
ZEA	Pan	50
	Cereales destinados al consumo humano directo	75
	Cereales sin procesar, a excepción de maíz	100
	Maíz sin procesar	200
OTA	Frutas secas de vid, café soluble	10
	Productos de cereales	3
	Cereales sin procesar	5
	Vino	2
	Cereales y productos derivados de cereales	2
AFB1	Frutas secas destinadas a procesos físicos previo al consumo humano	5
	Frutas secas destinadas al consumo humano	2
	Cacahuates y nueces	2
	Maíz sin procesar	2000
FB1 + FB2	Harina, sémola y germen de maíz	1000
	Alimento elaborado a base de maíz	400

Comisión Europea, 2006

Se introdujeron límites reglamentarios para las micotoxinas en muchos países, incluida la Unión Europea que aplica la política más rigurosa (Comisión Europea, 2006). Además, el Comité Mixto FAO / OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) llevó a cabo evaluaciones de riesgo detalladas para DON y ZEA, lo que resultó en una ingesta diaria máxima tolerable provisional (PMTDI) de 1.0 µg DON y 0.5 µg ZEA por kg de peso corporal al día (Joint FAO/WHO, 2001). En 2010, el JECFA actualizó su evaluación de DON y concluyó que incluía sus formas acetiladas 3-acetil-deoxinivalenol (3ADON) y 15-acetil-desoxinivalenol (15ADON) para definir el valor propuesto como un grupo PMTDI (Joint FAO/WHO, 2010). Debido a la falta de datos, el DON-3-glucósido (DON-3-G) no se incluyó en este cálculo hasta el momento, aunque estudios recientes en ratas e in vitro indicaron la posibilidad de que estos metabolitos se hidrolicen a la toxina precursora en humanos, contribuyendo a la toxicidad general (Berthiller *et al.*, 2011; Nagl *et al.*, 2012). El Comité Científico Europeo de Alimentos (SCF) realizó una evaluación de riesgos en ZEA y concluyó una TDI temporal de 0.2 µg / kg de peso corporal al día (SCF, 2000). Estos valores de TDI han sido una base importante para la legislación actual sobre micotoxinas establecida en la Unión Europea que están diseñados para proteger a los consumidores, evitando que consuman valores mayores a los establecidos por la TDI, para evitar los efectos negativos de las toxinas.

2.1.8 Métodos de remoción de micotoxinas

Existen dos etapas principales donde pueden proliferar hongos productores de micotoxinas en la cebada; la primera etapa es en el cultivo, donde el hongo puede contaminar y crecer en el cultivo de cebada de acuerdo a factores ambientales y técnicas de agricultura; la segunda etapa donde puede proliferar la vida fúngica se centra en el almacenamiento del grano; por lo cual es de suma importancia almacenar el grano de cebada en condiciones de temperatura y humedad de 14 % b.h., a las cuales los hongos no puedan crecer (Jouany, 2007). Sin embargo, en muchas ocasiones a pesar de las buenas técnicas de agricultura, es inevitable que los hongos

contaminen los cultivos de cebada y sinteticen micotoxinas, preservándose a lo largo del proceso de producción de cerveza y finalmente pasando al consumidor.

Dado a estas circunstancias, diversos autores han estudiado métodos físicos, químicos y biológicos para la remoción de micotoxinas en diferentes productos.

2.1.8.1 Tratamientos físicos para la remoción de micotoxinas

Los tratamientos físicos comúnmente usados para remoción de micotoxinas engloban la selección y separación del grano, lavado del grano, descascarillado, molido húmedo, tratamiento térmico e irradiación.

2.1.8.1.1 Separación de grano

Los granos del cereal rotos comúnmente contienen hasta concentraciones diez veces mayores de fumonisina y de otras micotoxinas que los granos que se encuentran enteros (Pierre, 2007). Los granos del cereal que se encuentran partidos son separados de los que se encuentran enteros mediante segregación por densidad.

2.1.8.1.2 Lavado de grano

Consiste en la aplicación de agua a presión, de manera tal que las micotoxinas solubles en agua puedan ser removidas por este método.

2.1.8.1.3 Descascarillado

Las micotoxinas generalmente se encuentran en la cáscara del grano (pericarpio y capa de aleurona), por lo que removiendo mediante una máquina que separe la cáscara del grano, se puede eliminar hasta un 34 % de los niveles de DON y ZEA de acuerdo con estudios reportados por Khatibi *et al.* (2014). No obstante, en el proceso de elaboración de cerveza es indispensable conservar la cáscara de la malta, debido a que en la etapa de recirculación y lavado, la cáscara favorece a que se forme

una cama, por la cual el mosto es filtrado, clarificándose a su paso por ésta, por lo que este método no resulta viable en el proceso de producción de cerveza.

2.1.8.1.4 Tratamiento térmico

El tratamiento térmico se basa en someter el grano a temperaturas elevadas (por encima de 160 °C por 25 min). En diversos estudios donde han realizado este método de remoción físico, se ha demostrado una eliminación de micotoxinas (FB1, FB2, ZEA, DON) desde 53 % hasta 100 % (Scott y Lawrence, 1994; Castelo *et al.*, 2001; Castells *et al.*, 2005).

En el proceso de elaboración de cerveza, la cebada previamente germinada es sometida a un malteado (secado y horneado) a diferentes tiempos y temperaturas, resultando en toda una gama de perfiles de maltas, desde las muy claras, hasta las muy tostadas; en dicho proceso las temperaturas que se utilizan para el malteo están muy por debajo de las que se plantea en el tratamiento térmico, inclusive para las maltas muy tostadas que alcanzan una temperatura máxima de 105 °C.

2.1.8.1.5 Irradiación

La irradiación con rayos gama se ha evaluado para la remoción de micotoxinas del grupo de los tricotecenos en granos de cereales, donde se demostró una mayor disminución de DON, 3-ADON y toxina T-2 en granos húmedos que en granos secos, esto debido a que el agua irradiada produce radicales libres que pueden reaccionar con las micotoxinas (He, 2010).

Azis *et al.* (2007) evaluaron el control de especies de *Fusarium* en granos de cebada, trigo y maíz sometidos a irradiación; encontraron que *Fusarium* spp. fue completamente inhibido con una irradiación de 4.0 kGy en cebada y 6 kGy en trigo y maíz.

2.1.8.1.6 Molido húmedo

Al moler el grano húmedo contaminado, las micotoxinas se distribuyen en los pedazos rotos, donde aquellas que son solubles en agua podrán ser removidas mediante filtración. La distribución de las micotoxinas en los fragmentos de granos molidos depende en gran parte de la penetración del hongo en el endospermo del grano. Este método puede ser combinado por un lavado previo del grano para disminuir en mayor medida la concentración de micotoxinas en el grano.

2.1.8.1.7 Adsorción

Existe una diversidad de compuestos orgánicos e inorgánicos que han sido probados con buenos resultados por ser buenos ligandos para ciertas micotoxinas por el mecanismo de adsorción. La primera generación de adsorbentes ocupados son de origen mineral, tratándose principalmente de filosilicatos del grupo mineral de arcilla, siendo la esmectita, el aluminosilicato de sodio hidratado y la bentonita los ejemplos más significativos de dicho grupo (Zhu, 2016).

2.1.8.2 Tratamientos químicos para la remoción de micotoxinas

Los tratamientos químicos más comunes que han sido utilizados para la remoción de micotoxinas en granos de cereal abarcan principalmente la alcalinización, la acidificación y la oxido-reducción.

2.4.7.2.1 Alcalinización

El grano de cereal es sometido a una inmersión en solución alcalina, donde las micotoxinas reaccionan con la base y sufren un cambio estructural de su molécula, disminuyendo total o parcialmente su toxicidad; por ejemplo, algunos tricotecenos como DON y NIV, son transformados a diferentes productos menos tóxicos en condiciones alcalinas, donde puede formarse un grupo lactona, puede romperse el epoxi o puede haber un rearreglo en el C15.

De igual manera el grano también puede someterse a alcalinización combinado con un tratamiento térmico, el cual potencializa el cambio estructural de la micotoxina, se demostró que un tratamiento térmico del grano en solución de N- α -acetil-L-lisina metil éster resultó en una rápida degradación de DON y NIV catalizada por el grupo amino (Bretz *et al.*, 2005).

El amoníaco y el hidróxido de sodio son bases que han sido evaluadas en solución con granos de maíz mohoso, se observó una reducción del 85 % de DON mediante la exposición en amoníaco (NH₃) durante 18 h a la temperatura ambiente del laboratorio (Young *et al.*, 1986). El tratamiento del maíz mohoso en solución 0.1 M de hidróxido de sodio (NaOH) a 75 °C durante 1 h, produjo 3 formas isoméricas de DON y de NIV (Bretz *et al.*, 2005); un estudio citotóxico con células del epitelio renal humano mostró que los productos modificados isoméricos de DON y NIV no causaban ningún efecto tóxico significativo a concentraciones de 100 μ mol/L, mientras que para DON y NIV las concentraciones límites fueron 0.89 μ mol/L y 1 μ mol/L respectivamente (Bretz *et al.*, 2005).

2.1.8.2.1 Acidificación

De acuerdo con Heathcote y Hibbert (1978), el tratamiento con ácidos fuertes elimina la actividad biológica de AFB1. Méndez-Albores *et al.* (2007) observaron una disminución de hasta 96 % de AFB1 en maíz contaminado (93 ng/kg) cuando se trató con una solución acuosa de ácido cítrico. El tratamiento con ácido cítrico resultó menos efectivo para el grano integral que para el maíz molido, ya que cualquier toxina dentro de los granos enteros tiene menos probabilidades de estar expuesta al tratamiento que la toxina en las partículas de maíz molido.

2.1.8.2.2 Oxidación

El uso de oxidantes como el ozono (O₃) y el hipoclorito de sodio (NaClO) se han estudiado por su potencial de transformación molecular de micotoxinas del grupo de

tricotecenos, disminuyendo así su actividad tóxica. El ozono ataca los dobles enlaces del C 9-10 de los tricotecenos añadiendo dos átomos de oxígeno (Young *et al.*, 2006).

Por otro lado, los tratamientos del grano del maíz mohoso sometidos a una solución de hipoclorito de sodio, revelan que DON sufre un cambio estructural, no existe una ruptura del grupo epoxi de los C-12,13; si no que a su vez forma otro grupo epoxi en los C-8,15 (Burrows y Szafraniec, 1986; 1987).

La humedad se considera un factor importante en la transformación molecular de DON por oxidación, de acuerdo con Burrows y Szafraniec (1986); los experimentos revelaron que el maíz contaminado con 1000 $\mu\text{g/g}$ de DON que fue sometido a un flujo de 150 mL/min durante 1 h de ozono húmedo (1.1 mol %), redujo los niveles de DON en 90 %; mientras que el tratamiento con ozono seco manteniendo las condiciones iguales, alcanzó niveles de reducción de DON de 70 %.

2.1.8.2.3 Reducción

Así como la oxidación, algunos compuestos provocan una reducción en las micotoxinas del grupo de tricotecenos modificando su estructura para formar nuevos productos con menor grado de toxicidad. El sulfito de sodio (NaHSO_3) y el metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) son compuestos con poder reductor que han demostrado una transformación de DON a DON-sulfonato (Young *et al.*, 1986).

Soluciones de ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) al 2 % han sido empleadas en tratamientos de trigo contaminado con DON durante 24 h a 22 °C, mostrando reducciones de DON de 50 %, el cual fue transformado a DON-sulfonato, el cual en medio alcalino puede ser hidrolizado nuevamente en DON (Young *et al.*, 1986).

2.1.8.3 Tratamientos biológicos para la remoción de micotoxinas

Los métodos biológicos para remoción de micotoxinas consisten en ocupar bacterias ácido lácticas (BAL), levaduras o enzimas; la remoción puede existir por medio de adsorción de las micotoxinas en la pared celular del microorganismo, o a

través de una biotransformación de la estructura de las micotoxinas (Alberts *et al.*, 2017).

Dada la naturaleza de esta tesis, se considera solo discutir el tratamiento de micotoxinas por acción de levaduras.

2.1.8.3.1 Remoción de micotoxinas por acción de levaduras

Existen reportes sobre producciones de alcohol a partir de la fermentación de maíz contaminado con ZEA, donde se encontró que dicha micotoxina pudo recuperarse en la levadura residual, removiéndose del alcohol producido, haciendo notar una posible interacción entre la levadura y la micotoxina (Bennet y Richard, 1996).

En otro estudio Moruno *et al.* (2005) encontraron una remoción del 60 % de OTA después de 7 días en la fermentación de mosto de uva con *S. bayanus*.

La capacidad de las cepas de *S. cerevisiae* y BAL para unirse a AFM1 fue evaluado por Corassin *et al.* (2013) utilizando muestras comerciales de leche descremada ultrapasteurizada; encontraron que *S. cerevisiae* removió el 90 % de la toxina, mientras que ocupando BAL solo se removió el 11 %.

En la sección 2.4.3.5 se presenta una revisión más extensa sobre la remoción de DON y ZEA por parte de *S. cerevisiae* y *S. pastorianus* durante la fermentación para la elaboración de cerveza.

2.1.9 Micotoxinas en cerveza

Se ha determinado la concentración de micotoxinas en cerveza artesanal e industrial en diversos estudios realizados en varios países; resultando en muchos casos una alta incidencia y concentración de éstas; la Tabla 2-5 muestra la incidencia de micotoxinas en diferentes estilos de cerveza evaluados en distintas partes del mundo.

Tabla 2-5. Incidencia de micotoxinas en cerveza.

Estilo de cerveza	Toxina	Porcentaje de incidencia % (n)	Concentración (µg/L)		Referencias
			Rango	Media	
Sin alcohol	D3G	47.4 (19) ^h	2 - 6.6	3	a Niessen, <i>et al.</i> , 1993. b Shim, <i>et al.</i> , 1997. c Mbugua y Gathumbi, 2004. d Lancova <i>et al.</i> , 2008. e Roger, 2011. f Kuzdraliński <i>et al.</i> , 2013. g Rubert, <i>et al.</i> , 2013. h Varga, <i>et al.</i> , 2013. i Piacentini, <i>et al.</i> , 2015.
	DON	66.7 (3) ^b	18 - 23	20.5	
		26.3 (19) ^h	3.2 - 26.1	8.7	
Cerveza con limón	D3G	80 (25) ^h	1.8 - 7.9	3.8	
	DON	52 (25) ^h	4.2 - 12.7	6.9	
Light ale	NIV	100 (6) ^b	3.3 - 38	17.97	
Lager	ADONs	85.7 (7) ^d	<5 - 27.6	11.65	
	ZEA	100 (75) ^c	4.3 - 107	8.16	
	DON	100 (75) ^c	1.56 - 6.4	3.42	
Ale	OTA	10 (10) ^g	3.2	ND	
	DON	100 (17) ^f	8.6 - 43.3	25.21	
Artesanal	FB1	100 (8) ⁱ	29 - 285	105	
	DON	100 (17) ⁱ	127 - 501	221	
Sorgo	FB1	87.5 (120) ^e	0 - 340	180	
	DON	89.2 (120) ^e	0 - 730	485	
Trigo	DON	74.6 (67) ^a	0 - 569	245	

ND = No determinada

Muchos estudios en cerveza han centrado su investigación en la incidencia de DON y ZEA, debido a que son las micotoxinas más abundantes y que representan la mayor preocupación de salud pública relacionada con el consumo de cerveza.

En un estudio reciente se determinó la concentración de micotoxinas del grupo de los tricotecenos en 1000 muestras de cerveza proveniente de 47 países, donde el 73 % de las muestras contaminadas con DON se trataba de cervezas artesanales; a su vez, se observó una correlación de niveles más altos de DON en cervezas oscuras producidas con maltas tostadas, como lo son las cervezas tipo Stout e Imperial Stout, superando en algunos casos 100 µg/L de DON. Dentro de las cervezas muestreadas se analizaron 4 cervezas mexicanas, y no detectó la presencia de ninguna micotoxina estudiada (Peters *et al.*, 2017).

En Brasil un grupo de investigadores determinó el contenido de micotoxinas en 53 muestras de cerveza artesanal a base de malta de cebada, reportaron una incidencia de DON y FB1 del 32 % y 15 % respectivamente; encontrándose niveles máximos de DON de 221 µg/L y de 501 µg/L para FB1 (Piacentini *et al.*, 2015).

Wall-Martínez *et al.* (2019) evaluaron la presencia de 23 micotoxinas en 61 cervezas de distintos estilos compradas en México. DON y sus metabolitos (D3G y 3ADON) fueron las micotoxinas encontradas en mayor proporción en muestras contaminadas. La ingesta combinada de DON y sus análogos varió de 5.24 a 86.59 ng/kg/día, que representan de 1.20 a 19.83 % de la ingesta diaria tolerable (TDI) de DON. Los resultados sugieren que, dependiendo del consumo individual de cerveza y del tipo de cerveza, la ingesta de DON a través de la cerveza podría representar un porcentaje significativo de la TDI.

2.2 Cerveza

La cerveza está relacionada con la humanidad prácticamente desde los inicios de ésta, siendo los sumerios la primera civilización en elaborar sus propias recetas de cerveza a partir de pan, la cual llamaban “Siraku” (Montes de Oca-Sicilia, 2012). Con

el paso del tiempo la forma de elaborar cerveza iría diversificándose en el mundo, convirtiéndose en un producto y muy valorado por sus reconfortantes efectos.

En la actualidad existe una gama distinta de estilos de cerveza y muchos pequeños productores de cerveza llamados “artesanales”, cuya calidad contrasta notablemente con los grandes productores de cerveza llamados “industriales”.

2.2.1 Definición de cerveza

De acuerdo con el código alimentario español (1984), la cerveza es una bebida resultante de fermentar, mediante levadura seleccionada, el mosto procedente de malta de cebada, solo o mezclado con otros productos amiláceos transformables en azúcares por digestión enzimática, sometido previamente a un proceso de cocción y aromatizado con flores de lúpulo, sus extractos, y/o sus concentrados, conforme al Código Alimentario Español (1984)

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) define la cerveza como una bebida que puede ser alcohólica o no alcohólica que consiste en la fermentación de cereales malteados (principalmente cebada), agua y lúpulos.

En México no existe una definición por algún organismo gubernamental, no obstante, la cerveza entra dentro de la definición de “Bebida Alcohólica Fermentada” expedida por la norma oficial mexicana NOM-142-SSA1-1995.

2.2.2 Estilos de cerveza

La Beer Judge Certification Program (BJCP) es una organización estadounidense sin fines de lucro que cataloga todos los estilos de cerveza, sidra e hidromiel que existen en el mundo; de acuerdo con la guía de estilos de cerveza BJCP (2015), la cerveza puede clasificarse generalmente de acuerdo con el tipo de levadura que se ocupe en el proceso de fermentación (ale y lager).

-*Cerveza tipo Ale*. Denominada también de fermentación alta, debido a que la cepa de levadura que se ocupa para el proceso de fermentación (*Saccharomyces cerevisiae*) fermenta en la parte superior del mosto a temperaturas entre 18-25 °C durante 3-7 días.

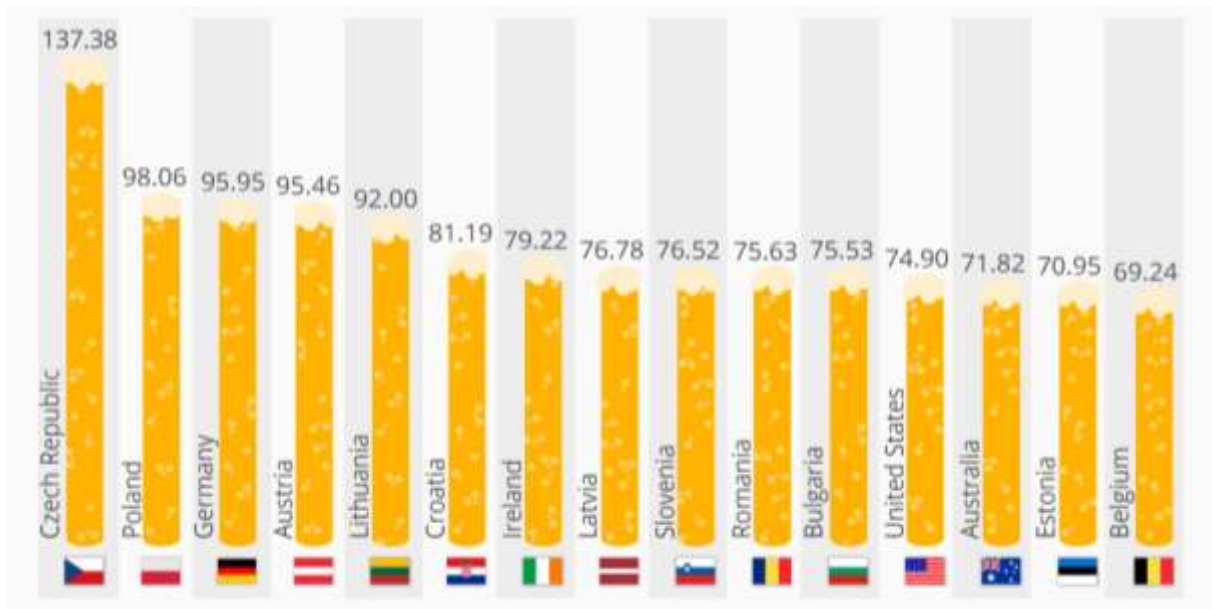
-*Cerveza tipo Lager*. Denominada también de fermentación baja, debido a que la cepa de levadura que se ocupa para el proceso de fermentación (*Saccharomyces pastorianus*) fermenta en la parte inferior del mosto a temperaturas entre 8 -15 °C durante 1-3 meses.

Las cervezas Ale y Lager también pueden subdividirse en diferentes categorías dependiendo del tipo de malta, tipo de lúpulo, tipo de agua, adjuntos que se ocupen, resultando una gran variedad de cervezas con diferencias sensoriales como el aroma, sabor, amargor color, cuerpo, espuma. Hoy en día de acuerdo con la BJCP existen 34 categorías de cerveza que a su vez tienen subdivisiones. Muchos estilos de cerveza derivan su nombre de acuerdo a su lugar de origen (denominados estilos clásicos), y muchos otros estilos son variaciones de los estilos clásicos.

2.2.3 Consumo mundial de cerveza

La cerveza es la bebida alcohólica más consumida en todo el mundo, en 2015 alcanzó un consumo mundial de 183.78 millones de kilolitros (Statista Alcoholic Drinks Report, 2018).

La Figura 2-5 muestra los 15 países con mayor consumo per cápita de cerveza. Su aceptación ha sobrepasado incluso bebidas tradicionales de algunos países y regiones, como es el caso del vodka en Rusia, el vino en algunos países europeos, el pulque en México, entre otros. Hoy en día se produce y consume en casi todo el mundo.



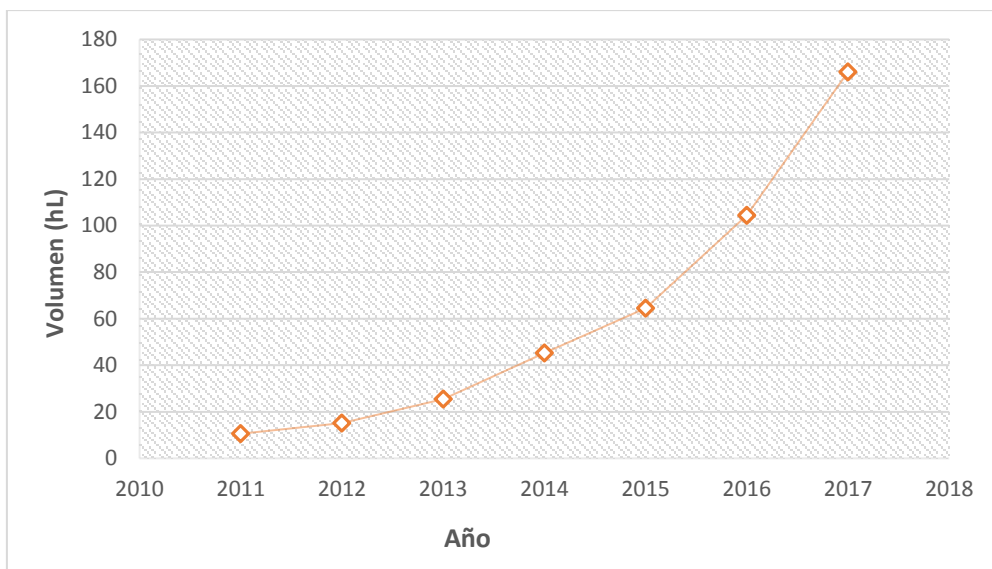
Statista Alcoholic Drinks Report, 2018.

Figura 2-5. Consumo per cápita en litros de cerveza en el mundo.

2.2.4 Consumo de cerveza en México

De acuerdo con datos de la Subsecretaría de Industria y Comercio, de la Secretaría de Economía (2015) México es el treintavo país en consumo de cerveza per cápita, con un valor de 60 L de cerveza por año. La cerveza industrial tiene un mayor consumo respecto a las cervezas artesanales, de acuerdo con los resultados obtenidos por una encuesta realizada por Deloitte (2017), la población prefiere consumir cerveza industrial en un 53 %, mientras que la cerveza artesanal en un 14 %, el porcentaje restante corresponde a bebidas alcohólicas destiladas (tequila, whisky, ron, brandy).

La venta de cerveza artesanal mantiene un fuerte crecimiento en el mercado nacional, y eso se debe a que las exigencias en cuanto a sabor por parte de la población mexicana son mayores, la gente ha encontrado que con la cerveza artesanal se puede maridar una amplia gama de alimentos, lo cual tiene una ventaja sobre las cervezas industriales. La tendencia del consumo se muestra en la Figura 2-6.



Deloitte, 2017

Figura 2-6. Venta de cerveza artesanal en México (2011-2017).

2.3 Materia prima para la elaboración de cerveza

La cerveza es elaborada principalmente con agua, lúpulo, malta de cereales (cebada, trigo, maíz) y levadura. Sin embargo, actualmente muchas cervezas contienen otros ingredientes llamados “adjuntos”, los cuales pueden ser fruta o concentrados de frutas, cereales sin maltear o especias; creándose así nuevos estilos de cerveza.

2.3.1 Agua

El agua es el componente mayoritario de la cerveza, representa el 95 % en peso respecto al total. En la Industria de cerveza el agua debe tener un perfil específico de acuerdo con el estilo de cerveza que se requiera elaborar, por tanto, una buena elección y tratamiento del agua se ve reflejado en la calidad de la cerveza. La concentración de iones (Ca^{2+} , Mg^{2+} , SO_4^{2-} , Cl^- , Na^+ , CO_3^{2-}) que contiene el agua varía dependiendo de la región geográfica en la que se encuentre la cervecera (Kunze, 2004).

Algunos estilos de cerveza son característicos del agua que tienen a su disposición las cerveceras, como es el caso de la cerveza tipo Pilsener, producida en

la ciudad de Pilsen, República Checa, la cual se caracteriza porque el agua ocupada para su elaboración contiene bajas concentraciones de iones y una dureza total muy baja; mientras que en contraparte en la región de Burton Upon Trent, Inglaterra, se empezó a producir una cerveza única debido a la gran cantidad de iones presentes en el agua utilizada propia del lugar, reflejándose en un perfil de sabor totalmente diferente que una Pilsener. La Tabla 2-6 muestra los perfiles de agua de algunas ciudades productoras de cerveza (Kunze, 2004).

Las cerveceras industriales son instaladas en lugares específicos dependiendo de muchos factores sociales, económicos, políticos, y por conveniencia para el proceso por la cercanía de la materia prima y el acceso al agua obtenida del subsuelo. El agua extraída es purificada y ajustada a las concentraciones de iones deseadas, así como al pH adecuado (Kunze, 2004).

Cuando el agua se pone en contacto con la malta en la etapa de maceración, el pH del mosto cambia de acuerdo con el tipo de malta ocupada, y debe ajustarse para una adecuada maceración, debido a que el pH afecta la actividad enzimática. Muchas de las cerveceras artesanales toman el agua potable que abastece la ciudad donde se encuentran y la someten a una filtración simple con cartuchos de filtros de carbón activado. En ocasiones dependiendo del estilo de cerveza que se desee elaborar, el agua ya filtrada se adiciona con sales (CaCO_3 , CaSO_4 , CaCl_2 , MgSO_4 , NaHCO_3) para ajustar las concentraciones requeridas y simular aguas como la de Burton on Trent, o alguna otra.

Tabla 2-6. Perfil iónico del agua de distintas ciudades.

Ciudad	Ca ⁺²	Mg ⁺²	HCO ₃ ⁻¹	SO ₄ ⁻²	Na ⁺¹	Cl ⁻¹	Estilo de cerveza
Pilsen	10	3	3	4	3	4	Pilsener
Dortmund	225	40	220	120	60	60	Export Lager
Vienna	163	68	243	216	8	39	Vienna Lager
Munich	109	21	171	79	2	36	Oktoberfest
Londres	52	32	104	32	86	34	British Bitter
Edinburgo	100	18	160	105	20	45	Scottish Ale
Burton	352	24	320	820	44	16	India Pale Ale
Dublin	118	4	319	54	12	19	Dry Stout

Palmer, 2006

2.3.2 Malta

El malteado se refiere al proceso en el que el grano es remojado, germinado, secado y sometido a horneado; diferentes combinaciones de tiempo, temperatura y humedad durante el malteado resultan en diferentes perfiles fisicoquímicos y sensoriales de cada malta, que puede notarse a simple vista por el color de ésta. La malta ocupada en la elaboración de cerveza proviene principalmente de granos de cebada, trigo y maíz (Kunze, 2004).

Existe una gran variedad de tipo de maltas ocupadas para la elaboración de cerveza que cumplen diferentes propósitos, pueden clasificarse en malta base y malta especial (Palmer, 2006).

- Malta Base. Se refiere a aquellas maltas que fueron muy poco tostadas durante el malteado, y por tanto tienen un alto porcentaje en azúcares fermentables (Kunze, 2004).
- Malta Especial. Son aquellas maltas que sus perfiles de malteado les han aportado diferentes tipos de tostados y generalmente tienen un bajo porcentaje en azúcares fermentables, pero a su vez contienen un alto porcentaje de azúcares no fermentables que aportarán propiedades organolépticas distintas a la cerveza, cambiando el color, cuerpo, sabor, aroma, retención de espuma (Kunze, 2004).

2.3.3 Lúpulo

El lúpulo (*Humulus lupulus*) es una de las tres especies de plantas del género *Humulus*, perteneciente al orden de las urticales; es una planta trepadora que carece de zarcillos, pero en vez de ellos posee tricomas que ayudan a agarrarse del soporte guía. En la Figura 2-7 se muestra una plantación de lúpulo (a), así como su flor (b) (Kunze, 2004).

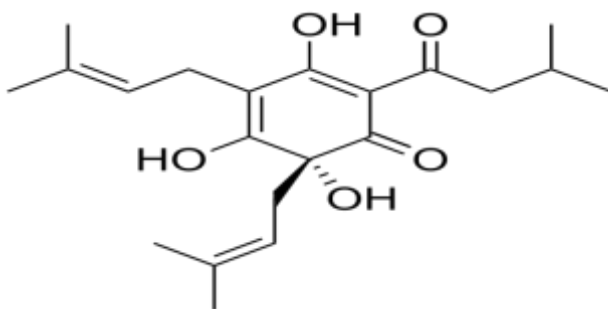


Figura 2-7. Plantación de lúpulo y flor.

En la Industria cervecera el lúpulo es uno de los cuatro ingredientes elementales, sin embargo, las primeras cervezas no se elaboraban con él; su origen se remonta a la edad media, debido a que tiene un suave efecto antibiótico, la cerveza podría durar más tiempo. En la actualidad se cuenta con procesos de producción de cerveza que aseguran mayor inocuidad en comparación con los procesos y tecnología de la Edad Media, sin embargo, el lúpulo sigue siendo ocupado por tradición y porque el amargor del lúpulo contrasta el sabor dulce proveniente de los azúcares de las maltas; brindándole un adecuado balance; y a su vez, ayuda a estabilizar la espuma de la cerveza (Kunze, 2004).

Para la producción de cerveza se ocupa únicamente las flores de la planta hembra, la cual contiene resinas y aceites esenciales que aportarán amargor y aroma a la cerveza. El compuesto responsable del característico amargor del lúpulo son los α ácidos como la humulona (Figura 2-8) que se encuentran en la resina de dichas flores (Kunze, 2004).

Existen más de 90 variedades de lúpulo que crecen en regiones específicas en el mundo, siendo los principales productores Estados Unidos, Alemania y últimamente China; y de acuerdo con su porcentaje de α -ácidos y aceites esenciales son usados para fines de amargor, para proporcionar aromas específicos o para uso mixto. Es por esta razón que la industria cervecera divide al lúpulo en esas tres categorías. La Tabla 2-7 muestra algunas variedades de lúpulo, así como su composición de α -ácidos, β -ácidos, aceites esenciales y su país de origen (Kunze, 2004).



(Kunze, 2004).

Figura 2-8. Estructura química de la (R)-humulona.

En la industria cervecera el lúpulo puede ser utilizado en diversas formas, ya sea en forma de pellets, en pastillas de flores comprimidas, en hojuelas de flores deshidratadas, o en extracto de lúpulo.

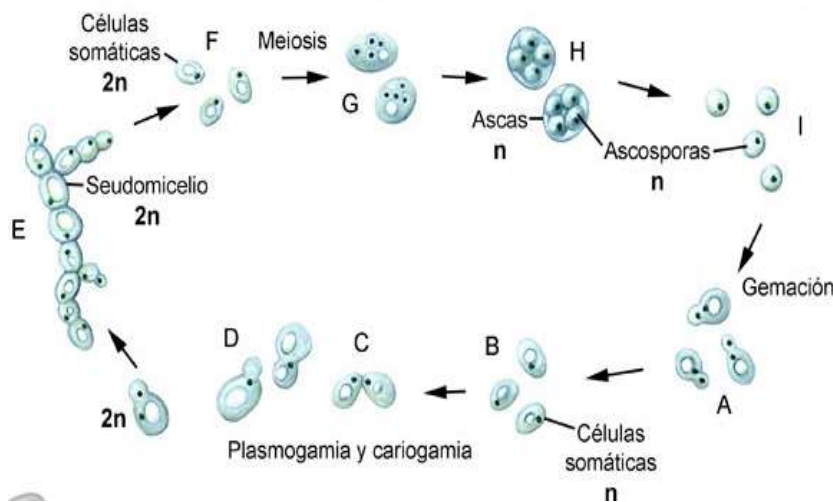
Tabla 2-7. Variedades de lúpulo.

Variedad	α-ácidos %	β-ácidos %	Aceites esenciales %	Propósito	País de Origen
AMARILLO	8.1-10.5	5.5-7.3	1.0-2.3	Mixto	Reino Unido
CASCADE	5.6-8.8	6.4-7.3	0.6-1.9	Mixto	Estados Unidos
CITRA	4.5-6	3.6-3.9	1.5-3.0	Aroma	América
CLUSTER	7.6-8.9	4.9-5.6	0.5-0.8	Mixto	Europa
GALENA	13.0-14.6	7.9-8.6	1.3-2.1	Amargor	Estados Unidos
GOLDING	3.2-5.2	1.4-2.5	0.4-1.0	Mixto	Reino Unido
MAGNUM	10.9-15.6	6.0-6.7	2.0-3.0	Amargor	Alemania
MT HOOD	3.7-6.6	4.4-7.2	1.0-1.5	Aroma	Estados Unidos
PERLE	5.9-8.0	3.1-3.6	0.7-0.9	Aroma	Estados Unidos

Palmer, 2006

2.3.4 Levadura

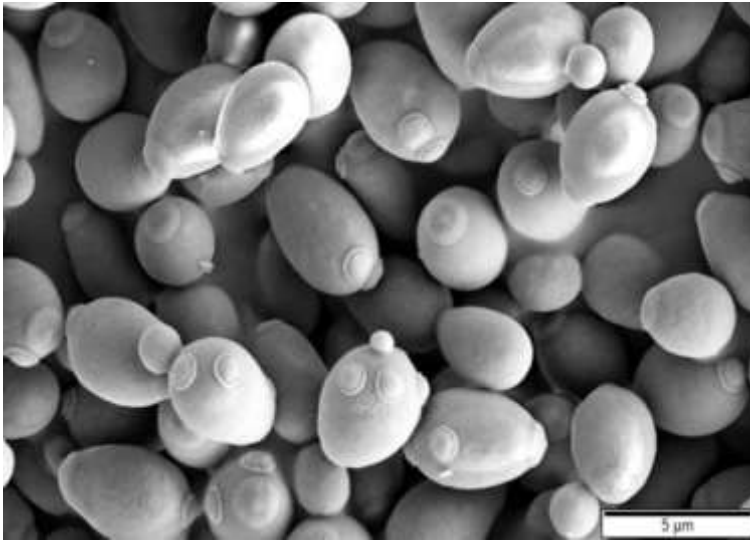
Las levaduras son hongos unicelulares, redondos u ovalados, con un diámetro entre 3 y 30 μm ; se reproducen asexualmente por gemación, a partir de una célula madre se forman protusiones protoplasmáticas que irán creciendo hasta separarse y formar una célula nueva; o mediante reproducción sexual mediante la unión de dos células haploides para formar un cigoto con una célula diploide. La Figura 2-9 presenta un esquema de la reproducción sexual y asexual de una levadura.



Herrera y Ulloa, 1998

Figura 2-9. Reproducción sexual y asexual de una levadura.

Las levaduras ocupadas en la elaboración de cerveza son del género *Saccharomyces*, siendo *S. cerevisiae* una levadura de fermentación alta (Ale) debido a que se encuentra en la parte alta del fermentador, mientras que *S. pastorianus* fermenta en la parte baja (Lager); a su vez, tienen diferentes rangos óptimos de temperatura de fermentación, *S. cerevisiae* fermenta a 17 – 23 $^{\circ}\text{C}$, mientras que *S. pastorianus* lo hace entre 7 y 13 $^{\circ}\text{C}$ (Kunze, 2004). Se muestra una fotografía ejemplificando la reproducción por gemación de una levadura, a través de un microscopio electrónico de barrido (Figura 2-10).



Das Murtey y Ramasamy, 2016

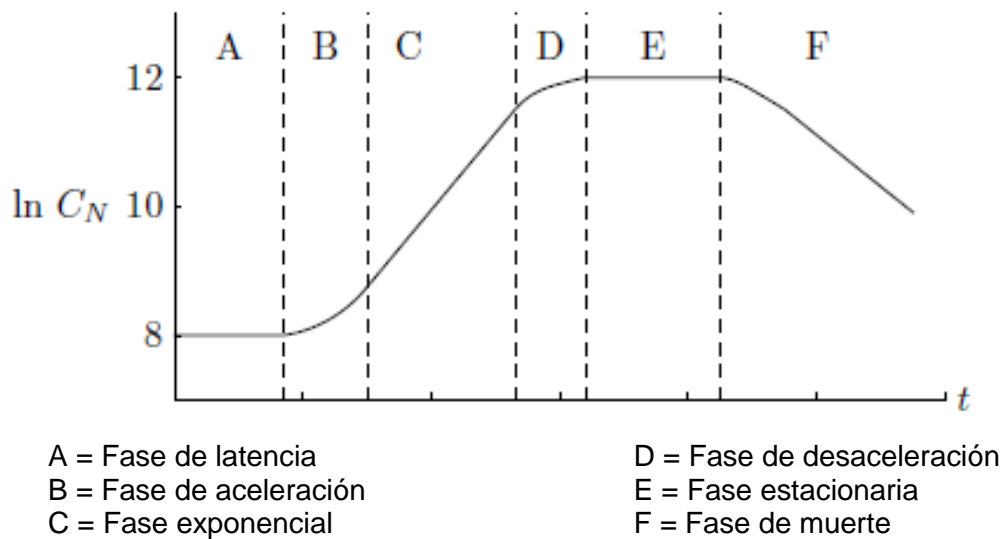
Figura 2-10. Reproducción por gemación de una levadura.

El crecimiento en la población celular de las levaduras comprende una curva de crecimiento, la cual se divide en varias fases.

- Fase lag o de latencia: Es la primera parte de la curva, en la que el número de unidades formadoras de colonias (UFC) permanece constante, es una fase de adaptación al medio. Aunque no tiene lugar división alguna, se da una considerable actividad bioquímica, especialmente síntesis de proteína y de ARN. La duración de la fase lag depende, principalmente de la temperatura de incubación, la composición del medio de crecimiento, su pH y potencial redox y del estado fisiológico del inóculo.
- Fase logarítmica o exponencial: Es cuando la multiplicación de las células de los microorganismos se da a velocidad óptima, el log de los números de UFC contra el tiempo muestra una relación en línea recta, la velocidad de crecimiento durante esta fase se puede calcular a partir de la pendiente de la curva de crecimiento y un modelo matemático.
- Fase estacionaria: Las UFC permanecen aproximadamente constantes durante un tiempo variable. El ritmo de reproducción y el ritmo de muerte son equivalentes.

- Fase de muerte: La muerte de las células va seguida de autólisis. Esta libera de nuevo al medio diversos componentes celulares que proporcionan nutrientes para que otras células viables se multipliquen. Existe una disminución paulatina de células vivas.

Se muestra en la Figura 2-11 una curva típica de crecimiento de celular de las levaduras, indicando las fases anteriormente descritas.



Lee, 1992

Figura 2-11. Cinética de crecimiento típica de una levadura.

La levadura del género *Saccharomyces* es rica, principalmente, en proteína, alcanzando hasta 39 % de la masa seca total de la célula (Suarez *et al.*, 2016); el resto de los componentes puede observarse en la Tabla 2-8.

Tabla 2-8. Composición de *Saccharomyces cerevisiae*.

Componente	(% Masa)
Proteínas	39
Polisacáridos	34.1
Trehalosa	5
Ácidos nucleicos y nucleótidos	10.8
Fosfolípidos	4.5
Triglicéridos	2.5
Esteroles	1
Ceniza	3.1

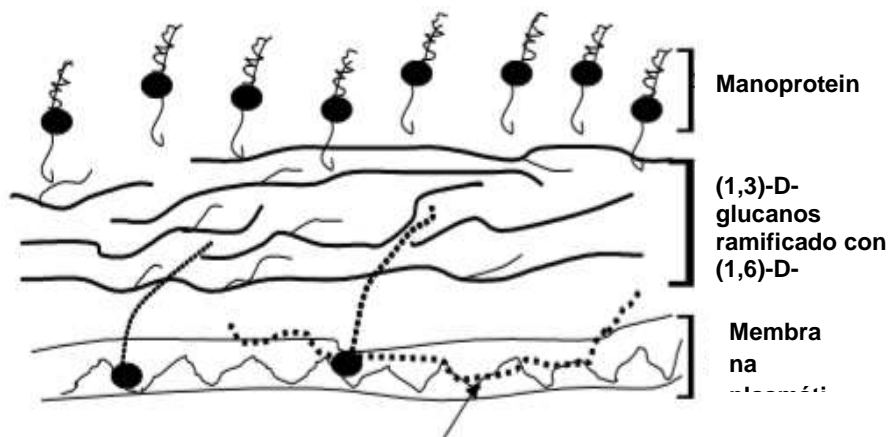
Suarez *et al.*, 2016

2.3.4.1 Pared celular de la levadura

La fracción de la pared celular está compuesta principalmente de polisacáridos (80 a 90 %), los que representan del 15 al 30 % del peso seco de la célula completa. La resistencia mecánica de la pared celular se debe a una capa interna compuesta de cadenas de D-glucano (50 a 60 % de la masa seca de la pared), que consisten en una red compleja de (1,3) -D-glucano y (1,6) -D-glucano, unida firmemente a la membrana plasmática a través de cadenas lineales de quitina formadas por alrededor de noventa unidades de N-acetilglucosamina. La quitina desempeña un papel importante en la insolubilidad de la estructura general y el empaquetamiento de los D-glucanos, que influyen en la plasticidad de la pared celular.

Los D-glucanos están unidos externamente con manoproteínas (más de 150 unidades de D-manosa), que juegan un papel importante en los intercambios con el medio exterior y el medio ambiente de las levaduras (Lipke *et al.*, 1998). Esta estructura es altamente dinámica y puede variar según la cepa de levadura, ya que alrededor de

1200 genes impulsan la síntesis de estos componentes de la pared celular. Las condiciones de cultivo que incluyen pH, temperatura, tasa de oxigenación, naturaleza del medio y concentración o naturaleza de la fuente de carbono modulan fuertemente la cantidad y las propiedades estructurales de los D-glucanos, manoproteínas y quitina en las paredes celulares (Jouany *et al.*, 2005). En la Figura 2-12 se muestra un esquema de la pared celular de *Saccharomyces sp.*



Jouany *et al.*, 2005

Figura 2-12. Organización química de la pared celular de *Saccharomyces sp.*

Químicamente, las manoproteínas son proteoglicanos que contienen un 5-20 % de porción peptídica y un 80- 95 % de cadenas de manosa. Su función biológica consiste en proporcionar estructura y rigidez a la célula, además de constituir un mecanismo de adaptación frente a condiciones adversas; actúan como coloides protectores, impidiendo la agregación de ciertas moléculas, ayudando a su suspensión en el medio e impidiendo su precipitación (Bastos *et al.*, 2015).

La composición cuantitativa de la pared celular de levaduras no es siempre la misma, sino que está fuertemente influida por las condiciones fisiológicas y la edad de las células. La proporción entre glucanos y manoproteínas aumenta con la cantidad de azúcar en el medio; a su vez, las paredes de las células viejas son más ricas en glucanos y quitina (que forma parte de las cicatrices de gemación) y menos abundantes en manoproteínas que las células jóvenes (López-Cordón 2010).

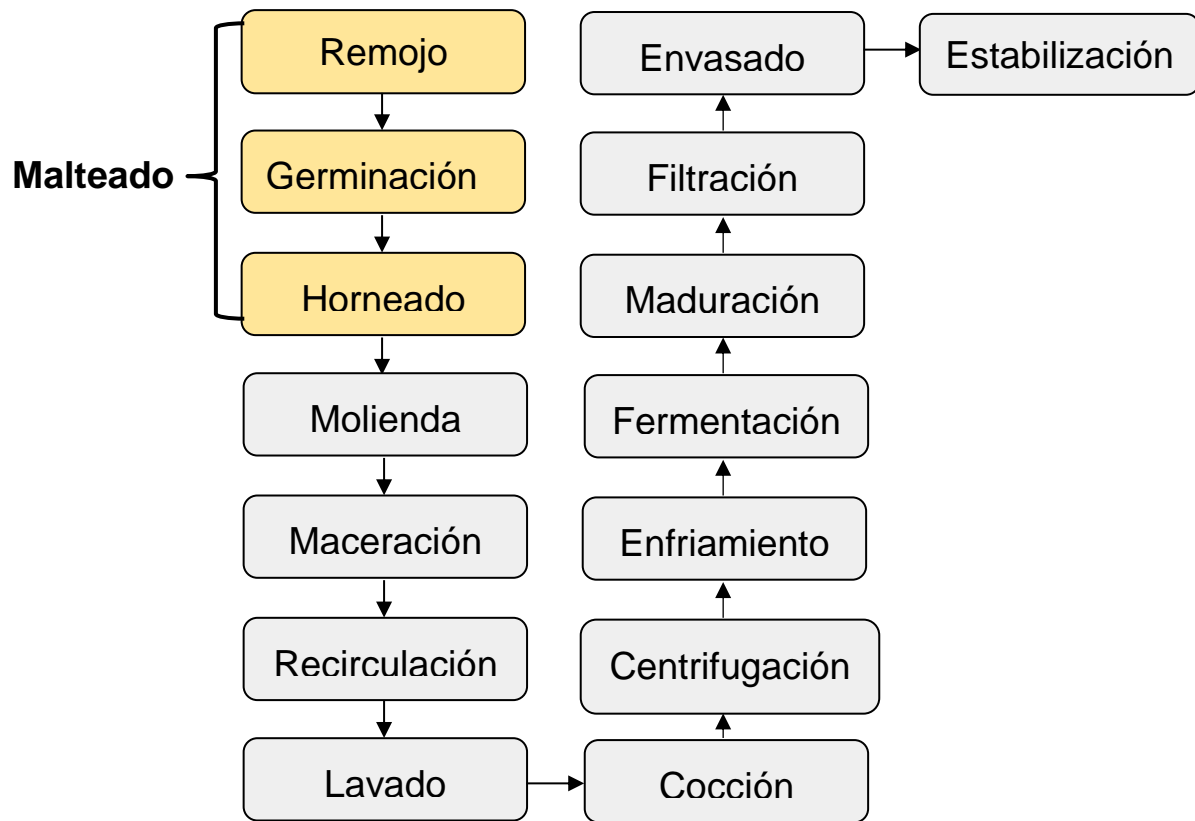
Las manoproteínas se liberan a lo largo de la vida de la célula, en mayor proporción durante la fase logarítmica y durante la autólisis, tras la muerte celular. Las manoproteínas están unidas a los β 1-3 glucanos de la pared celular mediante enlaces covalentes y no covalentes, éstas se desprenden de la pared celular por la acción de una β 1,3 glucanasa, localizada en el espacio periplásmico (López-Cordón 2010).

La liberación de manoproteínas durante la fermentación alcohólica depende de varios factores, siendo uno de los principales la cepa de levadura. Determinadas cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* manifiestan una elevada producción de β 1,3 glucanasas durante la fermentación (López-Cordón 2010). De acuerdo con Orlean (2012), diferentes cepas presentan grosores relativamente distintos de su pared celular, así como la proporción entre sus componentes, por lo que la liberación de manoproteínas en cada cepa puede ser diferente.

El proceso de autólisis, posterior a la muerte de la célula de levadura, implica una serie de reacciones sucesivas. Se inicia con la destrucción de las membranas intracelulares (membrana citoplasmática, mesosomas) de esta forma se liberan al espacio periplásmico las enzimas β -glucanasas, que provocan la desintegración de la pared celular, y la consecuente liberación de manoproteínas al medio (López-Cordón 2010).

2.4 Proceso de producción de cerveza

El proceso de producción de cerveza puede variar en cuánto a técnicas de producción, de acuerdo al equipo con el que cuente cada cervecería, y estilo de cerveza a elaborar, sin embargo, generalmente el proceso de producción de cerveza se realiza bajo el mismo procedimiento. La producción industrial de cerveza varía en ciertas operaciones unitarias respecto a la producción artesanal; en la Figura 2-13 se muestra un diagrama general de las etapas de producción industrial de cerveza.



Kunze, 2004

Figura 2-13. Proceso de fabricación de cerveza a nivel industrial.

2.4.1 Proceso artesanal de producción de cerveza

El proceso de producción de cerveza artesanal (Fig. 2-14) comienza con la recepción de la materia prima (malta, lúpulo, levadura y adjuntos); la malta es molida, sin triturarla, en un molino de rodillos donde se separa la cascarilla. Algunas casas cerveceras compran la malta previamente molida. La malta molida se somete a un proceso de maceración que puede ser escalonada o simple, la relación en peso más común entre agua y malta es de 3:1; sin embargo, varía de acuerdo a lo que el productor desee (Palmer, 2006).

Durante la maceración de la malta entran en actividad diversas enzimas, las más importantes son las de la α -amilasa y la β -amilasa, encargadas de hidrolizar las cadenas de almidón a glucosa, la cual consume la levadura durante la fermentación,

su rango óptimo de actividad es de 54 a 65 °C y 68 a 75 °C, respectivamente. Sin embargo, existen más enzimas que actúan y tienen otras actividades específicas; cada enzima actúa en un rango de temperatura diferente, por lo que si el productor desea puede realizar una maceración escalonando temperaturas (Kunze, 2004). Las otras enzimas que participan en la maceración son:

- a) β -Glucanasa. Esta enzima tiene como actividad degradar el β -glucano propio del grano de cereal, el cual es un polisacárido que afecta la turbidez de la cerveza debido a su gran peso molecular, y es el componente principal (70 %) de las paredes de las células del endospermo del grano de cebada. La β -glucanasa tiene una actividad óptima en un rango de 45 a 50 °C (Kunze, 2004).
- b) Proteasas. La actividad de estas enzimas consiste en hidrolizar las proteínas liberando aminoácidos y péptidos más sencillos; se requiere de su acción debido a que las proteínas enturbian la cerveza, y a su vez, al hidrolizarlas, dejan aminoácidos libres que las levaduras pueden ocupar como fuente de nitrógeno. El rango óptimo de actividad de estas enzimas es de 46 - 57 °C (Kunze, 2004).

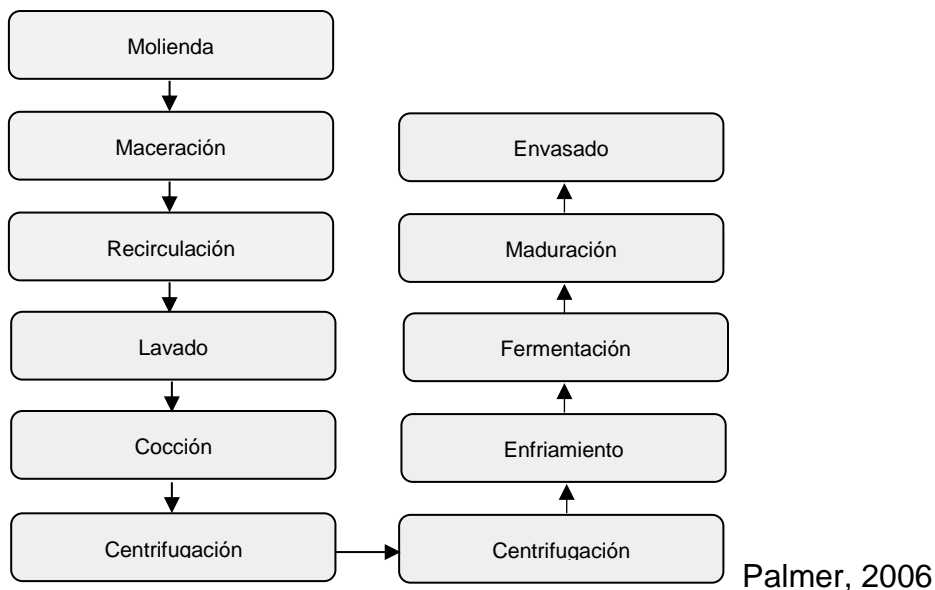
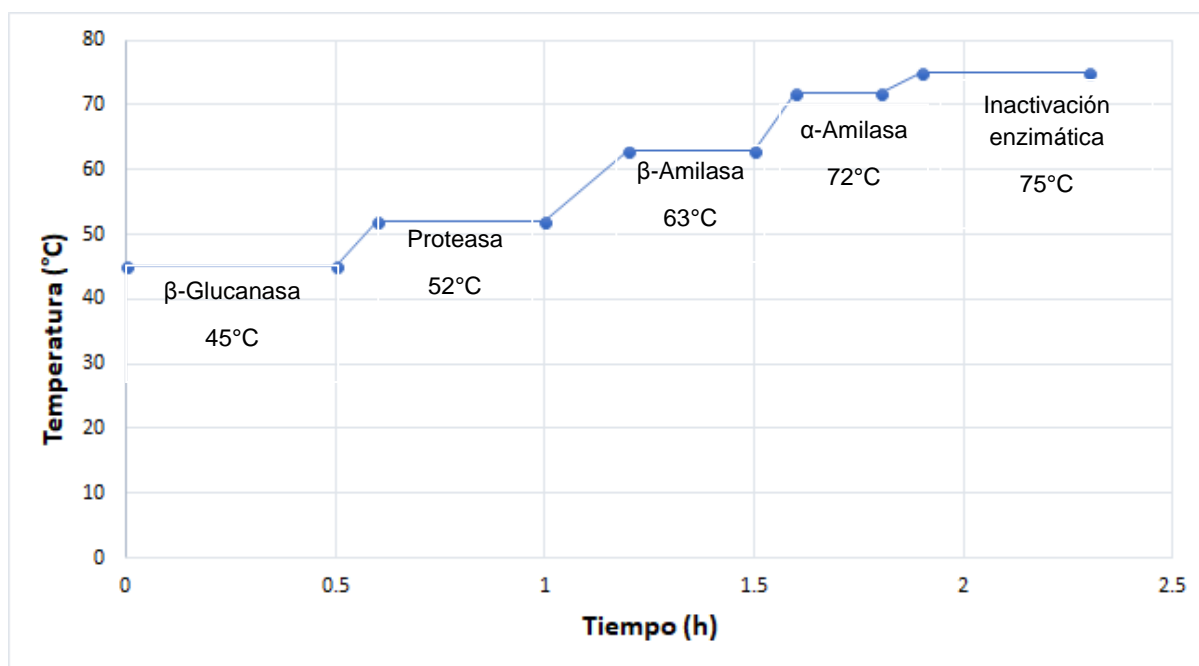


Figura 2-14. Proceso de producción de cerveza artesanal.

La Figura 2-15 muestra las enzimas que participan en la maceración y su rango de temperatura óptima. La maceración se puede hacer escalonando temperaturas para hacer actuar las diferentes enzimas dependiendo de los intereses del productor, o puede ser simple haciendo actuar solamente a las amilasas. Los tiempos adecuados para la maceración también se pueden observar en la Figura 2-15.

Después de la maceración el agua ha extraído a la mayoría de los componentes que contiene la malta, principalmente azúcares, y en ese momento al líquido se le conoce como “mosto”. Dicho mosto es recirculado para su clarificación (Palmer, 2006).



Kunze, 2004

Figura 2-15. Actividad enzimática durante la maceración escalonada.

Una vez recirculado el mosto, se lleva a cabo el lavado, que consiste en la adición de agua a la temperatura de maceración, de tal manera que puedan extraerse los azúcares restantes de la cama de grano en el recipiente de maceración; dicho lavado debe ser añadiendo agua a flujo bajo y esparciéndola por toda el área de la

cama de grano (Palmer, 2006). Posteriormente, el mosto es filtrado y llevado a punto de ebullición (Palmer, 2006).

Durante la ebullición del mosto, se adiciona el lúpulo; primero se añaden los lúpulos de amargor, luego los mixtos y posterior los de aroma. La adición de los lúpulos varía de acuerdo a estilos y depende de los propósitos gastronómicos que desea el productor. Asimismo, la variedad de lúpulo, la cantidad y el tiempo en que se adicionan varía dependiendo el productor; pero una regla simple es que la cocción del mosto sea de una hora y los lúpulos de amargor sean adicionados al inicio de la cocción, los lúpulos mixtos y los lúpulos de aroma se añaden antes de 30 min y de 10 min, respectivamente, de que termine la cocción (Palmer, 2006).

Después de la cocción, se realiza una operación llamada por los cerveceros como “*whirpool*”, que consiste en que, por medio de una pala o algún otro mecanismo, se aplica una fuerza mecánica para hacer girar el mosto de manera que la fuerza centrípeta precipite las proteínas que no fueron degradadas durante la maceración, restos de lúpulos y restos de harina de malta; el *whirpool* es aplicado para disminuir la turbidez de la cerveza final (Palmer, 2006).

El mosto debe ser enfriado previamente a la fermentación, y se puede realizar de diversas formas, ya sea haciendo circular agua fría por un serpentín o haciendo pasar el mosto caliente por un serpentín sumergido en agua fría; sin embargo, lo óptimo consiste en hacer pasar el mosto por medio de una bomba a través de un intercambiador de calor (*chiller*) depositándose en el fermentador a la temperatura (17-22 °C) adecuada para la fermentación (Palmer, 2006).

Paralelamente, a la mitad de la cocción, se adiciona la levadura previamente rehidratada y adaptada; para esto se pone en agua durante 15 - 30 min con agitación para que ésta pueda entrar en contacto con el oxígeno necesario en la fase de adaptación de la levadura (Palmer, 2006).

En ese momento comienza la fermentación a 17 - 22 °C, la levadura metaboliza anaeróticamente los azúcares monoméricos y diméricos como glucosa y maltosa, y se empieza a producir etanol y CO₂ como productos principales; también hay un

incremento en la concentración de la biomasa que empieza a formar un sedimento en la parte inferior del fermentador. La fermentación para una cerveza ale se completa entre 3 a 5 días dependiendo de la variedad de levadura utilizada, la concentración de azúcares y fuentes nitrogenadas, así como la temperatura y pH del medio (Palmer, 2006).

Completada la fermentación, se inicia una etapa de maduración o fermentación secundaria, en la primera etapa de fermentación la levadura consumió prácticamente todos los azúcares sencillos disponibles y empieza a metabolizar azúcares más complejos. A su vez, en la fermentación primaria la levadura genera subproductos como ésteres, fenoles, diacetilo, acetaldehído, alcoholes de peso molecular alto que ella misma metaboliza en la fermentación secundaria, los cerveceros le llaman “limpiar la cerveza”. Este proceso de maduración puede durar entre 3 y 5 semanas. La cerveza puede dejarse mayor tiempo en maduración, sin embargo, se corre el riesgo de que la levadura sufra autólisis, y estropee totalmente la cerveza (Palmer, 2006).

La maduración puede realizarse en el mismo fermentador, se puede trasvasar la cerveza a otro fermentador separándola de la biomasa que contiene el primer fermentador, para que se madure en el segundo fermentador, o puede madurarse directamente en el envase. La elección entre un método y otro es cuestión del modo de operación y gusto del productor, los tres métodos se reflejan en diferentes resultados organolépticos (Palmer, 2006).

Para ese momento la cerveza está ya madura, los subproductos de fermentación fueron metabolizados por la levadura remanente y debe ser envasada. Si la cerveza madura en fermentador, se le adiciona una solución esterilizada de azúcar (3-7) g/L, para que, una vez envasada la cerveza, la levadura remanente empiece a metabolizar los azúcares que se adicionaron, produciendo CO₂, el cual se solubiliza en la cerveza y de esta forma queda carbonatada. A dicho método se le conoce como “*priming*”, y se debe tener cuidado en la adición de la solución azucarada, porque si es mayor a 7 g/L la cerveza envasada corre el riesgo de explotar por un exceso de presión a causa de del CO₂. Existe otro método que consiste en inyectar gas carbónico directo a la cerveza en un barril (Palmer, 2006).

2.4.2 Principales diferencias entre producción industrial y producción artesanal

Las cerveceras industriales buscan satisfacer la demanda de las grandes poblaciones y tienden a disminuir los costos de producción ocupando materia prima de menor calidad en contraste con las cerveceras artesanales. Una cervecería artesanal busca más la calidad en lugar de producir volúmenes grandes de cerveza, se interesa por brindarle al consumidor una gama más amplia de cerveza con la mejor calidad posible.

El volumen de cerveza que generan las grandes empresas cerveceras es sumamente mayor al generado por las cerveceras artesanales, las grandes cerveceras tienen el monopolio de los cereales producidos en el país, mientras que las cerveceras artesanales consiguen la malta muchas veces importada de países como Estados Unidos, Alemania, Bélgica, entre otros, y mucho menor cantidad. A su vez, la diferencia abismal en volumen de producción entre una cervecería industrial y una artesanal es un factor considerable en cuanto a los costos operacionales, requiriendo una menor proporción de energía por litros de cerveza producidos en una cervecería industrial a comparación de su homóloga artesanal.

El proceso en las grandes plantas cerveceras comienza desde la recepción del cereal, y dentro de la planta es germinado, secado y malteado; mientras que las pequeñas cerveceras artesanales no cuentan con cámaras de germinación ni de malteado y compran el cereal previamente germinado y malteado, por lo que el proceso para una cervecería artesanal comienza con la molienda de dicha malta; a su vez es raro que una cervecería artesanal filtre su cerveza posterior a la maduración, mientras que para una cervecería industrial es indispensable filtrar su cerveza terminada.

La malta de cereales (cebada, trigo y maíz) que ocupan los cerveceros artesanales provienen de distintas partes del mundo, pudiéndose haber infectado de hongos filamentosos productores de micotoxinas perjudiciales para la salud humana; a su vez también durante el almacenamiento de la malta puede existir la proliferación

de diversas especies fúngicas a consecuencia de malas condiciones de almacenamiento.

2.4.3 Presencia de micotoxinas durante el proceso de producción de cerveza

El proceso de producción de cerveza implica tres reacciones bioquímicas principales: activación enzimática en el grano de cebada durante la germinación, degradación del almidón en azúcares fermentables gracias al conjunto enzimático del grano y la fermentación alcohólica realizada por las levaduras *Saccharomyces* con formación de etanol y CO₂. De acuerdo con Wolf y Bullerman (1998), las micotoxinas son compuestos altamente estables (resistentes a altas temperaturas y valores de pH extremos). Aunque las temperaturas máximas alcanzadas durante las operaciones de procesamiento de cerveza se encuentran por debajo de las capaces de destruir las micotoxinas, puede influir en la mitigación de las mismas debido a los cambios físicos, químicos y bioquímicos que tienen lugar.

2.4.3.1 Malteado (remojo, germinación y horneado)

El flujo de agua durante el ciclo de tratamiento respectivo al remojo del grano, reduce la contaminación por hongos en el lote en un 15 – 90 % (Vegi *et al.*, 2011); a su vez el remojo de cebada implica un tratamiento del grano con una cantidad bastante alta de agua, este proceso puede tener un impacto en el nivel de micotoxinas solubles en agua, como DON, al eliminarlas de la matriz (Schwarz *et al.*, 1995). De acuerdo con Maul *et al.* (2012), la posible razón para la glicosilación de DON durante la germinación está relacionada con el aumento en el contenido de glucosa que puede activar la enzima responsable de la reacción respectiva y la transformación de DON en D3G (aproximadamente el 50 % de DON se convierte después de 5 días de germinación).

Kostelanska *et al.* (2011) encontraron que DON puede degradarse mientras se hornea la malta a 150 °C, lo que conduce a la formación de compuestos depoxidados.

2.4.3.2 Molienda

De acuerdo con Pascari *et al.* (2018), no se produce un impacto directo en los niveles de micotoxinas en esta etapa, pero probablemente la molienda promovería la propagación homogénea de micotoxinas en todos los lotes de malta y su posterior solubilización en el mosto.

2.4.3.3 Maceración y lavado

Con respecto a la influencia en los niveles de micotoxinas, en este paso de producción, por un lado, existe una posible liberación de conjugados de DON ligándose a ciertas estructuras proteicas de la malta (debido a condiciones fisicoquímicas y bioquímicas y/o cambios enzimáticos), resultando en un aumento en la concentración total de DON (Wolf, 2007); sin embargo, un porcentaje de micotoxinas se queda en el grano posterior a la maceración, sobre todo aquellas que son menos hidrosolubles como ZEA.

Por otro lado, cuando se lava el grano para extraer azúcares residuales de éste, también pueden extraerse micotoxinas, mayormente las más hidrosolubles como DON y conjugados.

Inoue *et al.* (2013) encontraron que posterior a la maceración y al lavado, hubo una reducción de casi el 20 % en todos los niveles de micotoxinas analizados (14 micotoxinas analizadas) en el grano gastado.

2.4.3.4 Cocción

Con respecto al impacto de la ebullición del mosto en el contenido de micotoxinas, no existen estudios sobre este aspecto en particular; sin embargo, puede no haber una reducción significativa en los niveles de micotoxinas, debido a la termoestabilidad de éstas; sin embargo, puede ocurrir una interacción entre estructuras proteicas del lúpulo añadido en esta etapa del proceso, no obstante, la proporción de lúpulo con respecto al mosto puede resultar insignificante.

2.4.3.5 Fermentación

Se han publicado muchos estudios sobre el destino de las micotoxinas durante la fermentación, mediante el uso de distintas cepas de *Saccharomyces*, principalmente *S. cerevisiae* y *S. pastorianus*, usando distintos tipos de mostos y condiciones de fermentación.

En un estudio realizado por Shetty *et al.* (2006) se evaluó la capacidad de diferentes cepas de levadura para remover AFB1, alcanzándose un porcentaje de remoción mayor al 60 % con cepas de *S. cerevisiae*.

Inoue *et al.* (2013) estudiaron la variación en los niveles de 14 micotoxinas adicionadas a un mosto de cebada, durante 14 días de fermentación en agitación con una cepa de *S. pastorianus*; encontraron una remoción del 100 % de PAT, 95 % de ZEA y 40 % de remoción de OTA. Sin embargo, con respecto a las micotoxinas del grupo de tricotecenos como NIV, DON Y HT-2 solo alcanzaron una remoción de alrededor del 20 %.

Campagnollo *et al.* (2015) encontraron adsorción de micotoxinas en el residuo de fermentación de cerveza (biomasa), observándose una proporción muy alta de adsorción en el caso de ZEA (75.1 %) pero también para AFB1 (48.1 %) y OTA (59.4 %); no obstante, la reducción de DON alcanzó solo el 11.6 %.

Otros investigadores han evaluado la capacidad de remoción de micotoxinas de *S. cerevisiae* y *S. pastorianus* en la producción de cerveza artesanal, alcanzando un porcentaje de remoción de 13 % y 17 % de OTA y FB1. Se encontró que *S. pastorianus* en fermentación de cerveza artesanal pudo remover 34 % de DON (Scott *et al.*, 1995; Nathanail *et al.*, 2016).

En el estudio de Nathanail *et al.* (2016) observaron que la cepa de *S. pastorianus* fue tolerante a DON a concentraciones de hasta 10,000 µg/L; DON no afectó la producción de alcohol ni el crecimiento celular de la cepa durante la fermentación; sin embargo, en estudios previos se ha observado que en cepas de *Saccharomyces sp* existe un efecto inhibitorio de la producción de alcohol cuando se encuentran en presencia de micotoxinas como patulina, AFB1, ZEA, DON, FB1 (Ashoor y Chu, 1973);

Nathanail *et al.* (2016) sugirieron que dichas micotoxinas compiten por el sitio activo de la alcohol deshidrogenasa que es la enzima que cataliza la reducción del acetaldehído a etanol, resultando en una inhibición competitiva donde el grado de inhibición estaba en función de la concentración de la micotoxina.

Se ha investigado el efecto inhibitorio de las micotoxinas de *Fusarium* sobre el crecimiento de levaduras. Hernández y Cannon (1982) demostraron que los tricotecenos (trichodermol, DAS y verrucarina A) causan la inhibición de la síntesis de proteínas en *Saccharomyces cerevisiae*.

Sukroongreung *et al.* (1984) investigaron la sensibilidad de 12 géneros de levadura hacia T-2. Se informó que T-2 es capaz de inhibir el crecimiento y el metabolismo de *S. cerevisiae* y *S. pastorianus*, y la membrana juega un papel importante en la toxicidad en las células de levadura.

Jouany *et al.* (2005) compararon el porcentaje de adsorción de ZEA en distintas cepas de *S. cerevisiae* con composición de pared celular diferente; encontraron que aquellas con mayor concentración de D-glucanos tenían un mayor porcentaje de adsorción de DON y ZEA, mientras que en aquellas con una mayor proporción de quitina en su pared celular, disminuía la adsorción de micotoxinas, debido a que se aumentaba la insolubilidad de los D-glucanos, lo que disminuía la flexibilidad de la estructura general, y limitaba la accesibilidad de las micotoxinas a los sitios químicos de los D-glucanos. Jouany *et al.* (2005) encontraron que la adsorción de micotoxinas a la pared de la levadura se debe a enlaces de hidrógeno de grupos hidroxilo, ceto y lactona de DON y ZEA por un lado, y grupos hidroxilo de unidades de glucosa de los D-glucanos por otro lado; así como enlaces de van der Waals entre anillos de D-glucopiranososa y fenol de ZEA. La simetría geométrica de la molécula ZEA y el sitio abierto en la hélice de los D-glucanos favorece una estrecha asociación entre las dos moléculas. Como resultado, la molécula ZEA es totalmente atrapada dentro de la estructura de la hélice de los D-glucanos; la Figura 2-16 muestra un esquema computarizado de la interacción de ZEA con la hélice de D-glucanos. Con respecto a DON; se encontraron menos similitudes geométricas entre DON y la hélice de D-glucanos en comparación con ZEA, lo que lleva a una menor contribución de

interacciones de Van der Waals. Sin embargo, DON puede interactuar con la molécula de D-glucano a través de al menos dos enlaces hidroxilo.

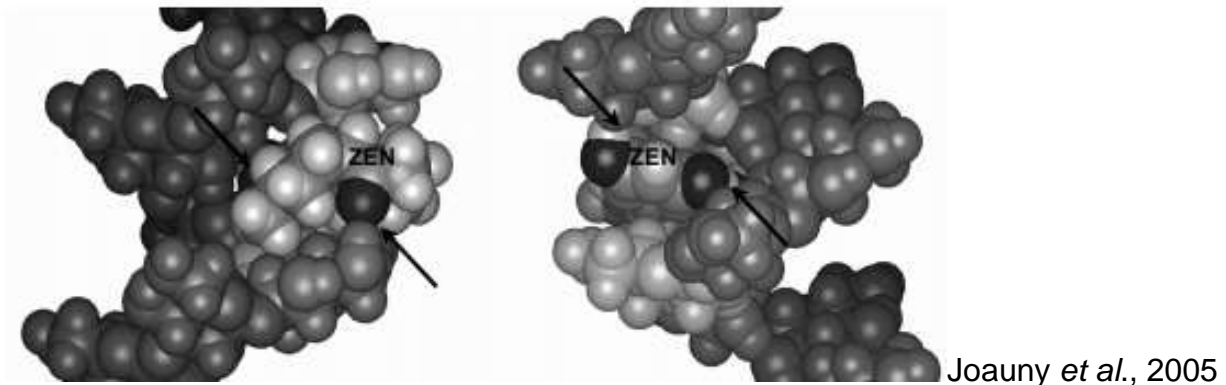


Figura 2-16. Vista generada por computadora del acoplamiento entre ZEA y la hélice de la cadena D-glucano.

2.4.3.6 Maduración y estabilización

Durante la maduración, la levadura remanente aún puede tener un efecto en la mitigación de micotoxinas, sin embargo, gran parte de la levadura es decantada posterior a la fermentación, por lo que queda una muy baja proporción de ésta durante la maduración. A su vez, el uso de adsorbentes inorgánicos para la clarificación del mosto está implicado con la eliminación de micotoxinas; la adsorción está en función de la estructura química del adsorbente y de la micotoxina en cuestión, así como sus polaridades y la solubilidad en agua (Belajová *et al.*, 2007).

2.5 Síntesis de antecedentes

La cerveza es consumida ampliamente a lo largo del mundo, alcanzando en 2015 un consumo mundial de 183.78 millones de kilolitros (Statista Alcoholic Drinks Report, 2018).

En diversos estudios se evaluó la incidencia de micotoxinas en cervezas internacionales y artesanales de diferentes estilos, resultando que muchas de éstas se encontraban contaminadas en niveles altos, siendo DON y ZEA las micotoxinas con

mayor incidencia en las investigaciones reportadas. En algunas de estas cervezas reportadas el TDI de DON ($1 \mu\text{g}/\text{kg p.c. d}^{-1}$) y ZEA ($0.5 \mu\text{g}/\text{kg p.c. d}^{-1}$) puede llegar a rebasarse fácilmente con el consumo de unos cuantos litros al día, que de acuerdo con el aumento en el consumo de cerveza artesanal, puede llegar a ocasionar un problema de salud pública. Dado a estas circunstancias, diversos autores han estudiado métodos físicos, químicos y biológicos para la remoción de micotoxinas en diferentes productos, siendo éstos últimos los de mayor interés en los últimos años.

Se ha evaluado la remoción de DON y ZEA mediante la fermentación de mostos intencionalmente y naturalmente contaminados, a partir de cepas de levaduras de *S. cerevisiae* y *S. pastorianus*, demostrando que estas toxinas pueden adsorberse en la pared celular de la levadura. A su vez se ha estudiado la interacción molecular entre las micotoxinas (DON y ZEA) con los componentes de la pared celular causantes de la adsorción (D-glucanos); encontrando que la adsorción está muy ligada con la proporción de los D-glucanos en la pared celular de la levadura, y ésta a su vez puede variar entre cepas de la misma especie. Es de notar que los porcentajes de remoción en diversos estudios concuerdan con una alta remoción para ZEA y baja remoción para DON, poniendo de manifiesto las diferencias estructurales y polaridades de cada una de estas micotoxinas; así como una mayor afinidad geométrica entre ZEA y la hélice de D-glucanos en comparación con DON.

Sin embargo, no se ha reportado el efecto de la concentración inicial de micotoxina, la temperatura de fermentación, el efecto de una segunda fermentación ni de la maduración, sobre los niveles de remoción.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de las variables de proceso sobre el contenido de DON y ZEA durante el proceso de producción de cerveza artesanal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de las etapas de elaboración de mosto de cebada previo a su fermentación sobre la concentración de DON y ZEA.
- Evaluar el efecto de la temperatura de fermentación, de la concentración inicial de micotoxinas y del tipo de cepa de levadura (2 *S. cerevisiae* y 2 *S. pastorianus*) sobre la remoción de DON y ZEA durante la fermentación.
- Estudiar el efecto de la segunda fermentación y de cuatro semanas de maduración sobre los niveles de DON y ZEA.
- Determinar si la concentración inicial de micotoxina tiene un efecto sobre la velocidad de crecimiento de la levadura y producción de etanol.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología general para llevar a cabo los objetivos planteados se esquematiza en la Figura 4-1.

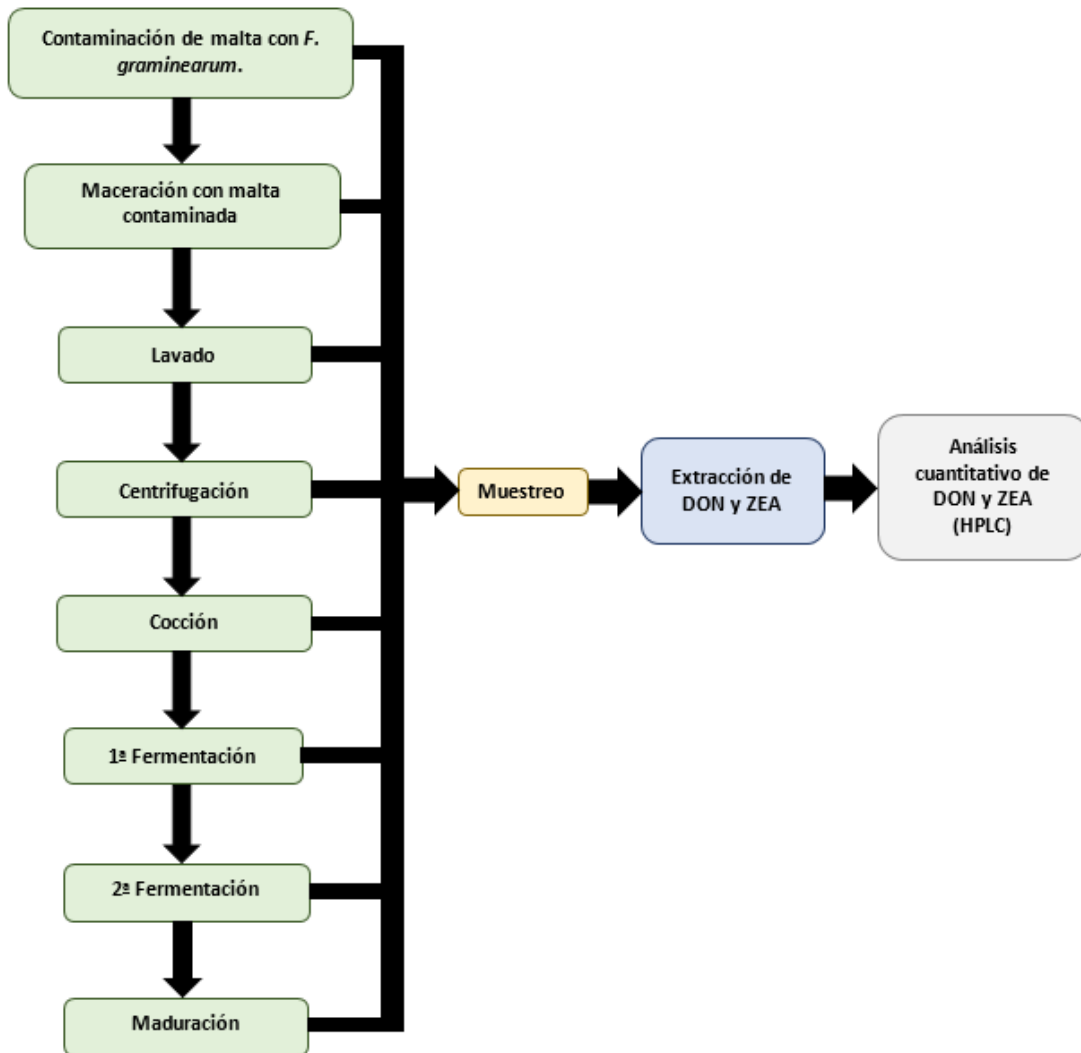


Figura 4-1. Diagrama de bloques de la metodología general.

4.1 Materia prima

Se utilizaron 10 maltas base y 10 maltas especiales (Fermentando, Chihuahua), las mayormente ocupadas en el proceso artesanal de producción de cerveza en México, y 2 kg de malta proveniente de la Malteria Morovia S.L. (Bell-lloc d'Urgell, España). La Tabla 4-1 muestra los diferentes tipos de malta, así como su marca y país de procedencia.

Se emplearon cepas liofilizadas de *S. cerevisiae* (SAFE ALE-04, codificada como S-04 y Mangrove Jack's M-36, como M-36) y de *S. pastorianus* (Saflager s-23, codificada como S-23 y Saflager W-34/70, codificada como W-34), todas de Fermentis (Francia). Estas son las levaduras típicas para producir cerveza tipo Ale y cerveza tipo Lager.

Tres cepas de cultivos monospóricos de *Fusarium graminearum* fueron donadas por la Dra. María Cristina Julia Pérez Reyes de UNIGRAS-UNAM. Dichas cepas fueron nombradas como "A", "B" y "C". Una cepa de un cultivo monospórico de *F. graminearum* productor de DON y ZEA fue donada por el Departamento de Tecnología en Alimentos de la Universidad de Lleida; a dicha cepa se le nombró "L".

Tabla 4-1. Procedencia, tipo y códigos asignados a las maltas estudiadas.

Malta Base	País	Código	Malta Especial	País	Código
Malta Premium Pilsen Americana (Rahr)	Estados Unidos	B-01	Malta Special Roast (Briess)	Estados Unidos	E-01
Malta Honey (Gambrinus)	Inglaterra	B-02	Malta Chocolate Malt (Muntons)	Inglaterra	E-02
Malta Pale Ale (Weyermann)	Alemania	B-03	Malta Carabelge (Weyermann)	Alemania	E-03
Malta Aromatic Munich 20L (Briess)	Estados Unidos	B-04	Malta Caramelo 120 L (Briess)	Estados Unidos	E-04
Malta Maris Otter	Inglaterra	B-05	Malta Negra (Briess)	Estados Unidos	E-05
Malta Munich II (Weyermann)	Alemania	B-06	Malta Light Chocolate Malt (Muntons)	Inglaterra	E-06
Malta Bonlander Munich 10L (Briess)	Estados Unidos	B-07	Malta Amber (Muntons)	Inglaterra	E-07
Malta 2H americana (Briess)	Estados Unidos	B-08	Malta Caramelo 40 L (Briess)	Estados Unidos	E-08
Malta de Viena (Weyermann)	Alemania	B-09	Malta Crystal Dark (Muntons)	Inglaterra	E-09
Malta de Trigo americana (Briess)	Estados Unidos	B-10	Malta CARAPILS CARAFOAM (Weyermann)	Alemania	E-10
Malta Pilsen	España	B-11			

4.2 Métodos

4.2.1 Caracterización de la carga fúngica de la malta

Para conocer la carga inicial fúngica de la malta, cada paquete de 1 kg fue homogeneizado en una máquina revolvedora de polvos (Readco Manufacturing Inc). 10 g de malta homogeneizada se mezclaron con 90 mL de agua peptonada y se agitaron durante 5 min, 1 mL de solución de cada malta se inoculó sobre agar papa dextrosa (PDA). Las cajas se incubaron a 20 °C durante 7 días.

Los hongos presentes en cada malta fueron aislados y resembrados en cajas Petri con PDA, se incubaron nuevamente a 20 °C durante 7 días.

4.2.2 Microcultivo de hongos aislados de la flora nativa de la malta

Los hongos filamentosos con características morfológicas diferentes, presentes en cada malta, fueron aislados y sembrados por la técnica de microcultivo para observar su morfología.

Sobre 2 varillas de madera esterilizadas en autoclave colocados en una caja Petri, se colocó un portaobjetos, y sobre él, un cubo (1 cm³) de PDA en cada extremo del portaobjetos, a manera de tener cada hongo por duplicado. Con un asa bacteriológica se inoculó la cara superior de cada cubo, se colocó un cubreobjetos y se agregaron 2 mL de agua destilada estéril a cada caja Petri para mantener la humedad. Se incubaron a 25 °C durante 5 días.

Se retiró el cubreobjetos, se agregó una gota de azul de metileno y se observó en un microscopio óptico (50x) para observar la morfología microscópica de los diferentes hongos cultivados.

4.2.3 Reactivación e inducción de esporulación de *Fusarium graminearum*

Las cepas de *F. graminearum* fueron reactivadas en tubos con 10 mL de caldo papa-dextrosa e incubadas a 28 °C por 24 h.

Las cepas reactivadas fueron inoculadas por estriado sobre la superficie de PDA, se colocó un disco de papel filtro estéril del tamaño de la caja para inducir la esporulación, de acuerdo con lo reportado por Nirenberg (1990). Las cajas fueron incubadas a 26 °C durante 30 días, y a 21 °C durante 7 días más.

4.2.4 Preparación de suspensiones de esporas de *F. graminearum*

Se recolectaron las esporas de cada cepa de *F. graminearum* contenidas en las cajas Petri, mediante la adición de una solución de Polisorbato 80 al 0.1 % y remoción con la ayuda de una espátula Drigalsky de vidrio. La suspensión de esporas fue filtrada por medio de una gasa estéril para evitar el paso del micelio a la suspensión. Se realizaron diluciones decimales seriadas en Tween 80 (0.1 %), hasta la dilución 10^{-3} .

El recuento de las esporas se realizó en una cámara de Neubauer, sumando el total de esporas presentes en los 25 cuadrados centrales de la cámara. La concentración de esporas se calculó multiplicando el promedio del número de esporas obtenidos por duplicado, por el inverso de la dilución empleada para el conteo (10^{-4}), y por el inverso del factor de la cámara (10^{-4}). Los cálculos realizados son los siguientes:

$$C = N * D * F$$

Donde:

C = Concentración de esporas [esporas/mL].

N = Número promedio de esporas visualizadas en 25 cuadrantes.

D = Inverso de la dilución empleada.

F = Inverso del factor de dilución de la cámara de Neubauer.

4.2.5 Inoculación intencional de malta con *F. graminearum* e inducción a la producción de DON y ZEA

La contaminación fúngica de la malta se realizó con cada una de las tres cepas de *F. graminearum* (A, B y C), utilizando 3 kg de una mezcla homogénea de malta

base (B01 + B02 + B03 + B08) esterilizada en autoclave, repartidas en cajas Petri desechables (diámetro 160 mm), a razón de 60 g por caja, a las cuales se les añadieron 15 mL de agua destilada estéril distribuida sobre toda el área de la malta; se almacenaron a 5 °C por 24 h hasta que la malta alcanzara un valor de aW de 0.99 (Aqualab). Se inocularon 10 mL de la solución de esporas (10^7 esporas/mL) repartidos homogéneamente sobre toda el área de la caja mediante el uso de una pipeta, a manera que la solución de esporas estuviera en contacto con cada cm^2 de la malta; posteriormente se incubaron por 28 días a 26 °C. La malta proveniente de la Maltería la Morovia se contaminó bajo el mismo método ocupando la cepa “L” de *F. graminearum*.

4.2.6 Extracción de DON y ZEA mediante columnas de inmunoafinidad, a partir de malta de cebada contaminada

La extracción se realizó por triplicado siguiendo las instrucciones de R-Biopharm. A partir de las maltas contaminadas por cada una de las cepas de *Fusarium graminearum* (A, B, C, L), se tomaron muestras (30 g) aleatorias de ellas y se molieron finamente.

Para la extracción de DON, se mezclaron 5 g de malta molida con 1 g de NaCl y 40 mL de agua Mili Q, seguido de 30 min de agitación. La suspensión se centrifugó por 10 min (1846 x g). El sobrenadante se filtró a través de un filtro de papel de microfibra de vidrio (1.6 μm), 2 mL del filtrado se pasaron a través de una columna de inmunoafinidad. La columna de inmunoafinidad se lavó con 10 mL de agua bidestilada y el DON se eluyó con 3 mL de metanol grado, realizando un contrareflujo para una mejor elución.

Para la extracción de ZEA, 5 g de malta molida se mantuvieron en agitación magnética con 25 mL de acetonitrilo:agua (75:25, v / v) durante 30 min. La suspensión se centrifugó por 10 min (1846 x g); 10 mL del sobrenadante se mezclaron con 40 mL de PBS a un pH de 7.4. Los 50 mL obtenidos se pasaron a través de una columna de

inmunoafinidad que luego se lavó con 20 mL de PBS. La ZEA se eluyó con 3 mL de acetonitrilo, realizando un contrareflujo para una mejor elución.

4.2.7 Producción de mosto a partir de malta de cebada contaminada con *F. graminearum*.

Se prepararon dos mostos con diferentes concentraciones (alta y baja) de DON y ZEA mediante proporciones apropiadas de malta de cebada contaminada con la cepa "L", y malta de cebada libre de micotoxinas.

La maceración se realizó mezclando 4.65 L de agua corriente con 1.55 kg de malta (previamente molida), realizando una rampa de temperatura como se muestra en la Figura 4-2.

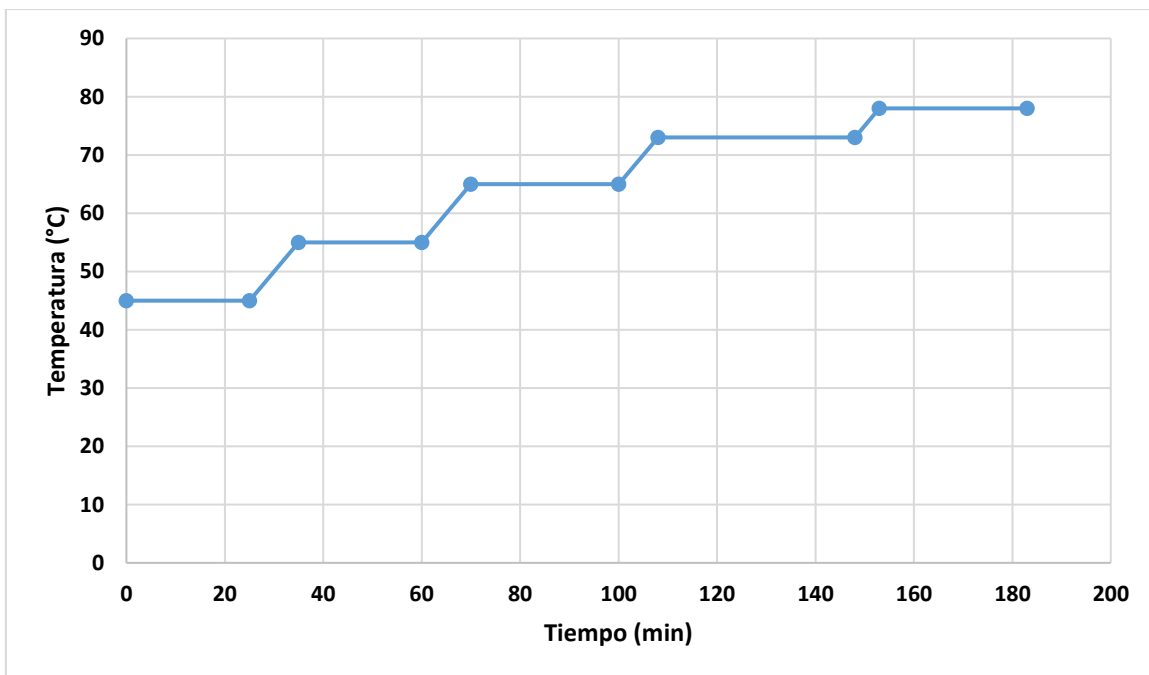


Figura 4-2. Rampa de temperatura utilizada durante la maceración.

Al final de la maceración, el grano, que se encontraba dentro de una bolsa de tela para filtrar, fue separado del mosto, quedando 3.1 L de mosto.

El grano fue lavado con 6.2 L de agua corriente, se obtuvieron 9.3 L de mosto, el cual se llevó a temperatura de ebullición durante 1.5 h, y posteriormente fue centrifugado (1846 x g, 8 min, 20° C). El mosto caliente (6.6 L) se transfirió a botellas-ISO (separando los restos sólidos por decantación) y se guardaron en refrigeración para su posterior fermentación.

Se tomaron 40 mL de muestra en cada etapa de elaboración del mosto (maceración, lavado, cocción y centrifugación) para análisis de micotoxinas, densidad inicial y pH, las muestras fueron guardados en congelación para su posterior análisis.

4.2.8 Primera, segunda fermentación y maduración

La primera fermentación se realizó siguiendo el diseño de experimentos mostrado en la Tabla 4-2.

Para cada experimento de fermentación, el mosto fermentado con *S. cerevisiae* se distribuyó en: 1 ISO-frasco conteniendo 300 mL, y en 4 ISO-frascos con 50 mL, mientras que el mosto fermentado con *S. pastorianus* se colocó en 6 ISO-frascos con 50 mL; de tal forma que los ISO-frascos pequeños fueron ocupados para muestras destructivas, para no alterar la atmósfera en el frasco de 300 mL.

La concentración de levadura empleada para inocular el mosto se seleccionó siguiendo las instrucciones de la marca. La concentración de levadura se ajustó a 10^6 UFC / mL para todos los mostos, se verificó un recuento inicial utilizando una cámara de Neubauer Improved. Se tomaron tres muestras a las 24 h, 48 h, 72 h, y 96 h para mosto fermentado con *S. cerevisiae* y 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h y 144 h para mosto fermentado con *S. pastorianus*. La primera muestra (10 mL) se usó para determinar el pH y el contenido de alcohol (con un densímetro portátil DMA 35, Anton Paar). La segunda muestra (30 mL) se usó para determinar el contenido de micotoxinas con la tercera muestra (1 mL) se realizaron diluciones decimales seriadas con agua peptonada estéril. 100 μ L de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} se extendieron superficialmente en placas con medio de agar YEPD y se incubaron a 25 °C. El recuento de levaduras se realizó a las 48 h.

Tabla 4-2. Diseño de experimentos para las fermentaciones.

Levadura	Concentración de micotoxina	Temperatura (°C)
<i>S. cerevisiae</i> (S-04)	Alta	15
		20
		25
	Baja	15
		20
		25
<i>S. cerevisiae</i> (M-36)	Alta	15
		20
		25
	Baja	15
		20
		25
<i>S. pastorianus</i> (W-34)	Alta	10
		15
		20
	Baja	10
		15
		20
<i>S. pastorianus</i> (S-23)	Alta	10
		15
		20
	Baja	10
		15
		20

Los dos tratamientos de cada especie de levadura (*S. cerevisiae* y *S. pastorianus*) con la mayor reducción de micotoxinas en el mosto fueron elegidos para una segunda fermentación.

Para la segunda fermentación, se transfirieron 250 mL del mosto previamente fermentado (decantando la levadura precipitada) a otro ISO-frasco del mismo volumen, al cual se le agregaron 30 mL de una solución estéril de sacarosa (116 g/L), y se añadió levadura liofilizada ajustando su concentración a 10^6 UFC / mL para todos los mostos, se verificó un recuento inicial utilizando una cámara de Neubauer Improved. Se fermentó a 25 °C durante 96 h, se tomó muestra al final de la segunda fermentación y se analizó de igual forma que las muestras de la primera fermentación.

Posteriormente, 200 mL del mosto doblemente fermentado se distribuyeron en 4 ISO-frascos de 50 mL (decantando la levadura precipitada) para la etapa de maduración, la cual fue realizada a 4 °C. Cada semana, se tomó una muestra de 30 mL de cada botella.

4.2.9 Extracción de DON y ZEA en mosto, mediante QuEChERS.

La extracción de DON y ZEA se realizó mediante el método QuEChERS que por sus siglas en inglés refieren a un método rápido, fácil, barato, eficiente, robusto y seguro, siguiendo la técnica referida en Rodríguez *et al.* (2015). El método consta de dos etapas: la primera etapa consiste en una extracción con acetonitrilo, $MgSO_4$ y NaCl, para favorecer la separación de fases y el reparto de las micotoxinas en la fase orgánica, sin necesidad de diluir el extracto con disolventes no polares; seguido de una segunda etapa de limpieza por extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) en gel de sílice enlazado con organosilano (C18) para retener ácidos grasos y esteroides, y $MgSO_4$ para eliminar el agua residual.

El procedimiento consistió en mezclar en un tubo Falcon 4 g de Mg_2SO_4 y 1 g de NaCl, se agregaron 6 mL de mosto contaminado y 14 mL de acetonitrilo; se agitó en un vortex durante 4 min, se agitó en agitador orbital durante 1 h a $10 \times g$ y se centrifugó a $1846 \times g$ durante 8 min. Se transfirieron 7 mL de la fase superior de

acetonitrilo a un tubo Falcon que contenía 0.9 g de Mg_2SO_4 y 0.3 g de C18 previamente mezclados; se llevó a vortex por 4 min y se centrifugó a 1846 x g durante 8 min. De la fase superior de acetonitrilo se tomaron 2.5 mL para análisis de DON y 2.5 mL para análisis de ZEA.

4.3 Preparación de extractos de DON y ZEA

Todas las muestras extraídas se evaporaron bajo una corriente suave de N_2 (40 °C), los extractos de DON se resuspendieron en 1 mL de ACN: MetOH: H_2O , 5: 5: 90, v / v / v; los extractos de ZEA se resuspendieron con 1 mL de ACN: H_2O , 50:50, v / v, ajustado a pH 7. Cada extracto se pasó por un filtro de nylon (0,4 μm) antes de ser inyectado (50 μL) en el UHPLC DAD / FLD. Todas las muestras fueron tomadas y analizadas por triplicado.

4.4 Sistema UHPLC

La determinación de DON se realizó utilizando un sistema Agilent Technologies 1260 Infinity UHPLC (California, EE. UU.) equipado con un detector de matriz de diodos Agilent 1260 Infinity II (DAD). Se usó una columna Gemini® C18 de Phenomenex 150x4.6 mm (California, EE. UU.) con un tamaño de partícula de 5 μm y un tamaño de poro de 110 Å. La longitud de onda de absorción se configuró a 220 nm. La fase móvil estaba compuesta de metanol:acetonitrilo:agua Mili Q (5:5:90, v/v/v) y se ajustó a un caudal de 1 mL / min. Para la determinación de ZEA, se usaron el mismo equipo y columna, pero el UHPLC se acopló a un detector de fluorescencia Infinity 1260 Agilent (FLD) (las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 274 nm y 455 nm, respectivamente). La fase móvil fue acetonitrilo:agua Milli Q (60:40 v/v) con pH ajustado a 3.2 con ácido acético. La velocidad de flujo se ajustó a 0.6 mL / min. La temperatura de la columna fue de 40 °C, el volumen de inyección de 50 μL y el tiempo de ejecución total de 20 min para ambas micotoxinas.

4.5 Validación de métodos analíticos

La selectividad se verificó inyectando 50 µL de solución estándar por triplicado (150 µg/L), comparando el tiempo de retención y la resolución máxima entre inyecciones. Para la verificación de linealidad, una curva de calibración de ocho niveles de concentración para cada toxina (20, 30, 50, 100, 250, 500, 1000, 3000 µg/L para DON; y 30, 50, 100, 300, 500, 1000, 1500, 3000 µg/L para ZEA) se prepararon e inyectaron en el sistema. Se realizó regresión lineal de concentración de soluciones versus área de pico.

La precisión se evaluó preparando muestras de mosto blanco enriquecidas con DON y ZEA y se determinaron porcentajes de recuperación: 75 – 90 % para DON, y 84 – 97 % para ZEA. El límite de detección (LOD) se consideró como tres veces la relación señal/ruido, siendo para DON (LOD = 20 µg/kg) y para ZEA (LOD = 2.5 µg/kg). El rendimiento del método se evaluó de acuerdo con el Reglamento (CE) 401/2006 de la Comisión (Comisión Europea, 2006).

4.6 Análisis Estadístico

Todos los resultados de los experimentos se representaron como la media de las pruebas por triplicado y se expresaron como media ± desviación estándar. Las evaluaciones estadísticas se realizaron mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y prueba de Tukey ($p = 0.05$) utilizando el software Minitab 18.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización de la flora nativa de la malta

De las maltas analizadas, el 76 % mostró crecimiento de hongos. La cuenta del crecimiento fúngico varió de 100 hasta > 10,000 UFC/100 g. Es de notar que el 75% de hongos nativos de las diferentes maltas analizadas que mostraron crecimiento son de coloración negros y blancos; posiblemente del género *Mucor* (E, C, A), y *Aspergillus* (D), en la visualización microscópica de la morfología de los hongos (E, C, A) se puede apreciar que presentan esporangios ovoides con endosporas, mientras que en la observación microscópica del hongo (D) se apreció la prolongación del conidióforo en forma bulbosa típica del género *Aspergillus*. Sin embargo, ningún hongo mostró evidencias de estructuras morfológicas típicas del género *Fusarium*, las cuales presentan presentes macroconidios relativamente delgados, en forma de hoz, pudiendo contener entre 5 a 6 septo; macroscópicamente en placas ningún hongo creció con coloración naranja pálido, ni rojo, que son las coloraciones típicas del género *Fusarium*. En la Figura 5-1 se pueden apreciar los distintos hongos aislados de las distintas maltas, muchos de ellos se encuentran en más de un tipo de malta.

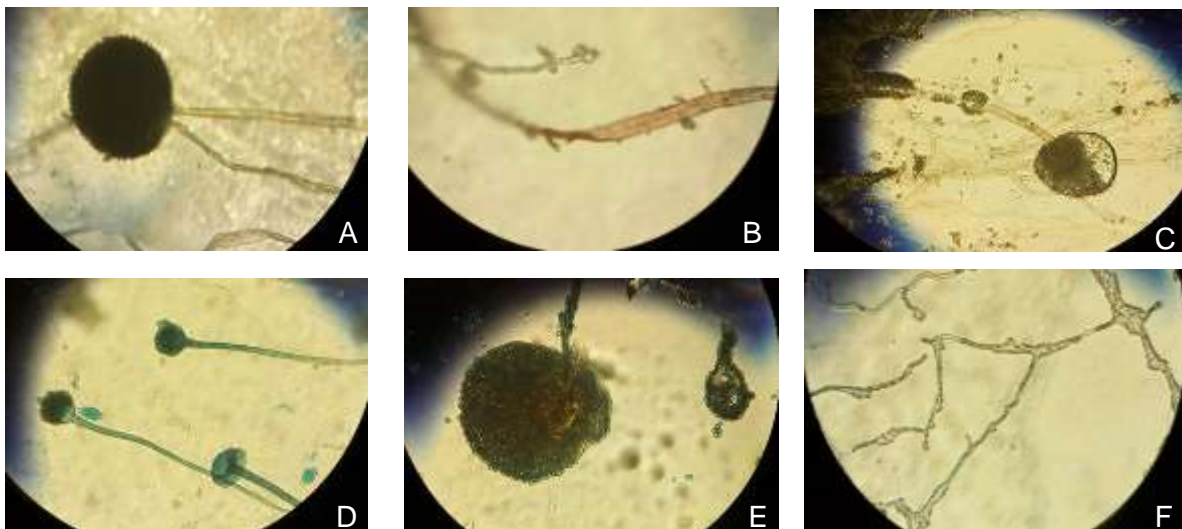


Figura 5-1. Estructuras morfológicas de hongos aislados de distintas maltas.

5.2 Inóculo de *F. graminearum* (recuento de clamidosporas)

Para asegurar la presencia de micotoxinas en la malta, ésta se inoculó con una suspensión de clamidosporas de *F. graminearum* (cepa L). La concentración de esporas de las distintas cepas de *F. graminearum* (A, B, C, L) en la suspensión se determinó por conteo en la cámara de Neubauer (Figura 5-2), la concentración de éstas fue de:

A: 1×10^8 esporas / mL.

B: 1×10^7 esporas / mL.

C: 1×10^7 esporas / mL.

L: 1×10^6 esporas / mL.



Figura 5-2. Clamidosporas de *F. graminearum*.

5.3 Características del mosto

Las densidades tanto del mosto testigo como del mosto contaminado con micotoxinas fueron 1.040 g / cm^3 y pH 4.96. La concentración inicial de micotoxina en el mosto contaminado fue de $1164 \pm 57 \text{ } \mu\text{g}$ de DON / kg de mosto y $440 \pm 16 \text{ } \mu\text{g}$ de ZEA / kg de mosto, al cual se llamó mosto altamente contaminado; y $560 \pm 49 \text{ } \mu\text{g}$ de

DON / kg de mosto y $284 \pm 14 \mu\text{g}$ de ZEA / kg de, al cual se le denominó mosto poco contaminado. Ambas micotoxinas no se detectaron en el mosto testigo.

5.4 Niveles de micotoxina durante la elaboración del mosto

En la Figura 5-3 se observa el cambio en la concentración de DON y ZEA a lo largo del proceso de elaboración del mosto.

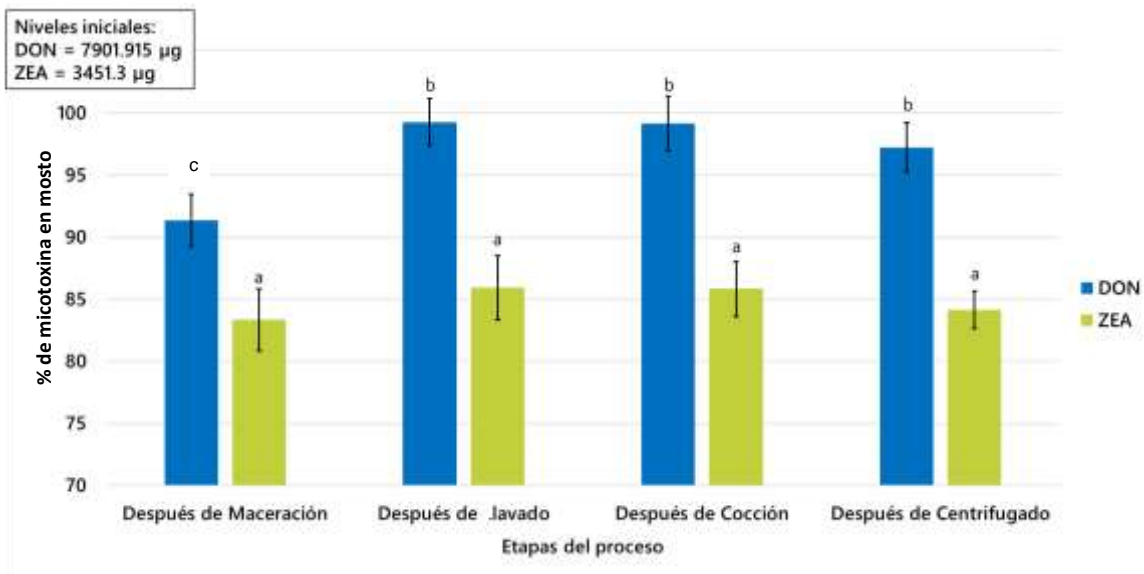


Figura 5-3. Niveles de micotoxinas durante la elaboración de mosto.

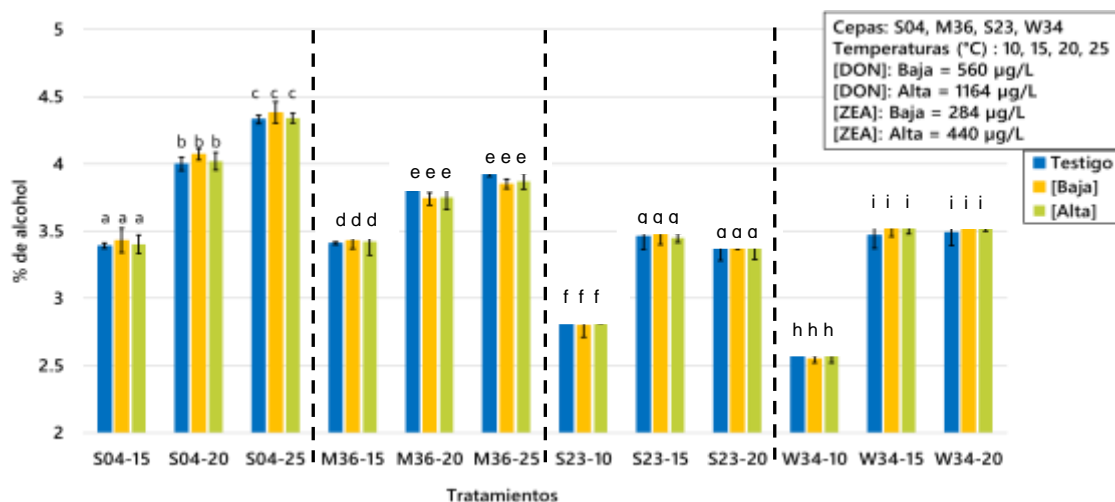
a-c Los niveles con letras distintas son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

La Figura 5-3 muestra el porcentaje de micotoxina en mosto, posterior a cada etapa de su elaboración. Presentar el porcentaje de remoción en lugar de concentración, evita la confusión que se generaría debido a los cambios de volumen en cada etapa. Durante la elaboración del mosto las micotoxinas, DON y ZEA, presentes en la malta, pasaron a la fase líquida, posterior a la maceración se extrajo el 92 % y 84 % respectivamente, sugiriendo que el resto de micotoxina se encontraba aún en la malta; en la etapa de lavado se extrajeron aún más debido a que el agua arrastró a las micotoxinas que no alcanzaron a solubilizarse durante la etapa de maceración, aumentando el porcentaje de micotoxina en mosto en 98 % de DON y 86

% de ZEA; las etapas posteriores al lavado, que incluyen la cocción y el centrifugado no contribuyeron significativamente al porcentaje de ambas micotoxinas, resultando al final del proceso de elaboración del mosto un porcentaje de DON de 97 % y de ZEA de 84 %. Estos resultados coinciden con los reportados por Inoue *et al.* (2013), quienes encontraron que la mayor disminución en los niveles de micotoxinas se observó durante el macerado, seguida de pequeños cambios en todos los pasos posteriores. En las etapas de maceración y lavado la diferencia de solubilidad entre DON (36000 mg/L) y ZEA (20 mg/L) en agua representa el factor determinante, y explica el hecho de porque el porcentaje de DON posterior a estas dos etapas fue mayor que el de ZEA. La temperatura del proceso de cocción del mosto no afectó significativamente la concentración debido a la termoestabilidad de ambas micotoxinas, ya que no sufren modificaciones estructurales a la temperatura de ebullición del mosto.

5.5 Efecto de la concentración de micotoxinas sobre los parámetros de fermentación

El alcohol producido, pH y población de levaduras al final de la primera fermentación se muestran en las Figuras 5-4, 5-5 y 5-6, respectivamente.



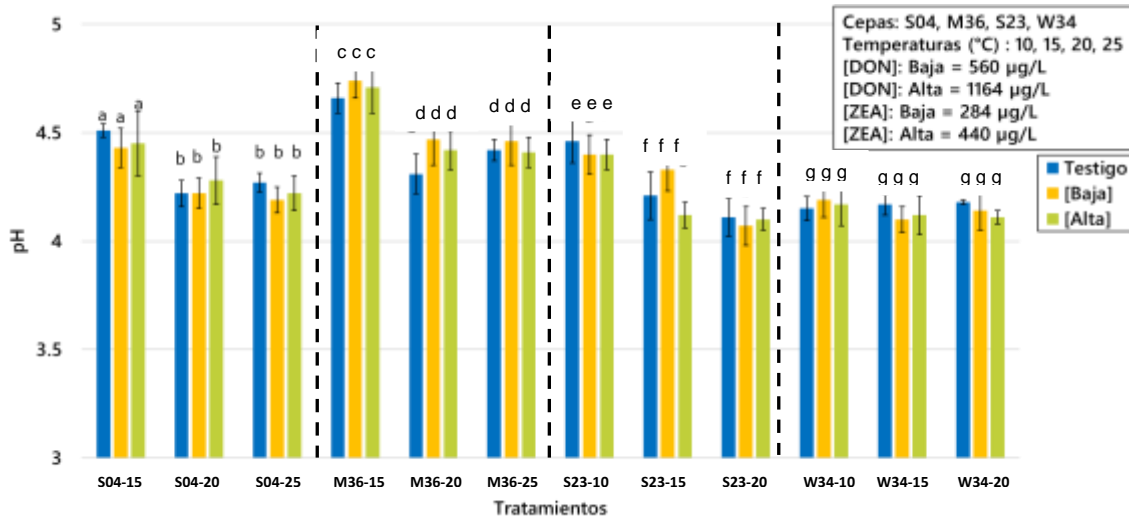
a-i Los niveles con letras distintas son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Figura 5-4. Efecto de la concentración de DON y ZEA sobre la producción de alcohol.

Las comparaciones estadísticas realizadas fueron para cada cepa, comparando las diferencias entre los tratamientos con los 3 niveles de temperatura diferentes, y comparando el mosto testigo, el de alta concentración inicial de micotoxina y baja concentración inicial de micotoxina.

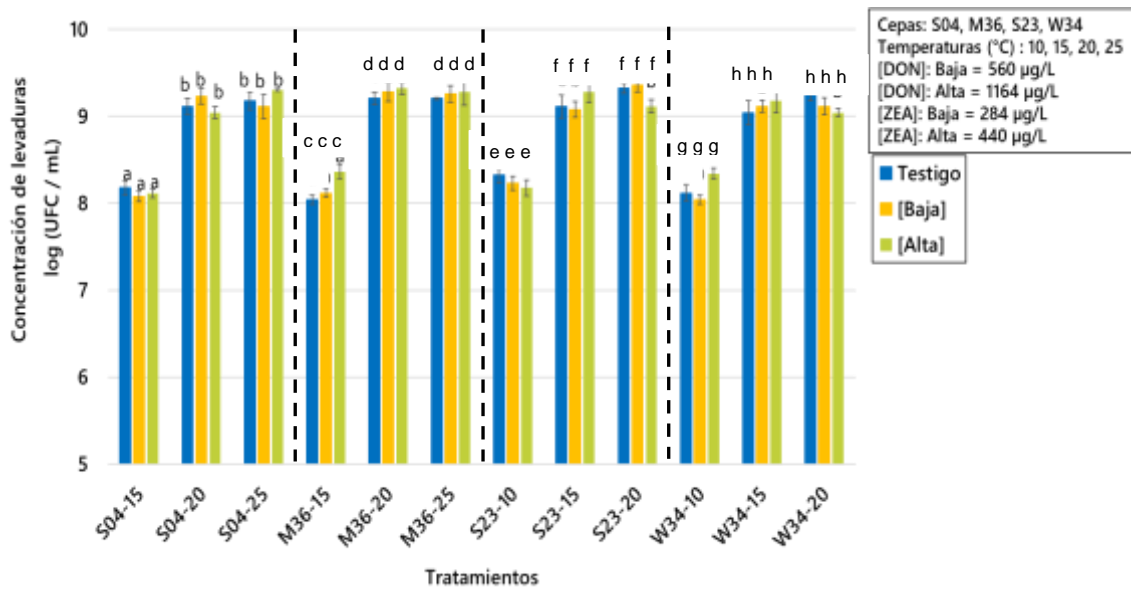
Puede notarse que la concentración de DON y ZEA en el mosto no tuvo un efecto significativo sobre el pH, la población celular de levadura y el alcohol producido durante la fermentación; los resultados coinciden con los reportados por Nathanail (2016) donde observaron que la fermentación no se ve afectada incluso con mostos altamente concentrados en micotoxinas (10,000 µg /L). Sin embargo, esto es contrastante con los resultados de Ashoor y Chu, (1973) y Hernández y Cannon (1982) donde la concentración de micotoxinas afectaba la producción de alcohol mediante inhibición competitiva de la enzima alcohol deshidrogenasa; no obstante, en éstos estudios trabajaron con la enzima aislada; donde la micotoxina interactuaba directamente con la enzima, sin embargo cuando se trata de una célula de levadura viva, las micotoxinas interactúan primero con la pared celular de la levadura, y dependiendo de la similitud geométrica entre las hélices de D-glucanos y la micotoxina, será el grado de adsorción, de tal forma que la micotoxina no afecta la actividad enzimática de la alcohol deshidrogenasa que se encuentra al interior de la célula.

Se sabe que la temperatura afecta la dinámica de la población de las cepas de *Saccharomyces* durante la fermentación alcohólica (Epifanio *et al.*, 1999; Torija *et al.*, 2003), por lo que con las temperaturas de fermentación mas altas se obtuvieron los niveles mas altos de alcohol y de población celular al término de la fermentación, para todas las cepas de levaduras evaluadas con cada uno de los mostos (mosto testigo, mosto altamente contaminado y mosto con baja contaminación).



^{a-g} Los niveles con letras distintas son significativamente diferentes (P < 0.05).

Figura 5-5. Efecto de la concentración de DON y ZEA sobre el pH.



^{a-h} Los niveles con letras distintas son significativamente diferentes (P < 0.05).

Figura 5-6. Efecto de la concentración de DON y ZEA sobre la población celular de levadura.

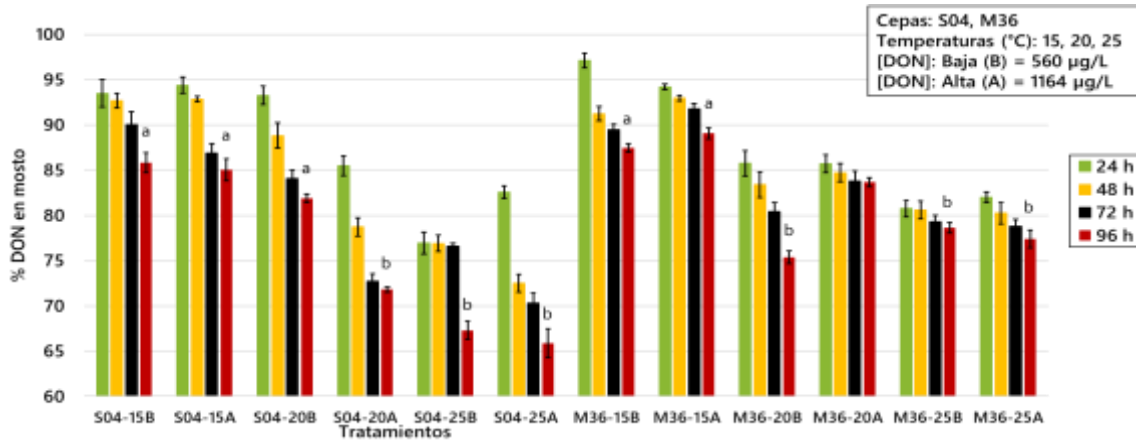
5.6 Efecto de la temperatura, la concentración de micotoxina y cepa de levadura sobre los niveles de DON durante la primera fermentación

El porcentaje de DON en los mostos durante la primera fermentación con *S. cerevisiae* y *S. pastorianus* se muestra en las Figuras 5-7 y 5-8, respectivamente.

Los porcentajes de DON disminuyeron entre 11 % y 34 % en los mostos fermentados con *S. cerevisiae* y entre 14 % y 25 % en aquellos fermentados con *S. pastorianus*; alcanzando una disminución mayor que la reportada por Nathanail *et al.* (2016) (15 %) y por Wall-Martínez *et al.* (2019) (del 2 % al 17.5 %). La concentración de micotoxina inicial en el mosto no tuvo una influencia significativa en la reducción de los porcentajes de DON, por lo que permite deducir que la concentración de DON en el mosto altamente contaminado no fue suficiente para saturar los sitios de enlace entre DON y las hélices de D-glucanos de la pared celular de la levadura.

Las temperaturas más altas de fermentación (25 °C y 20 °C para *S. cerevisiae* y 20 °C y 15 °C para *S. pastorianus*) alcanzaron una mayor reducción en los porcentajes de DON en el mosto; esto es atribuible al hecho de que el metabolismo y la tasa de crecimiento de las levaduras son más lentos a temperaturas de fermentación más bajas (Lee, 1992), disminuyendo la cantidad de levadura presente en el mosto, por lo que el efecto de biodegradación y los sitios activos de adsorción de β -glucanos de las paredes celulares se reducen.

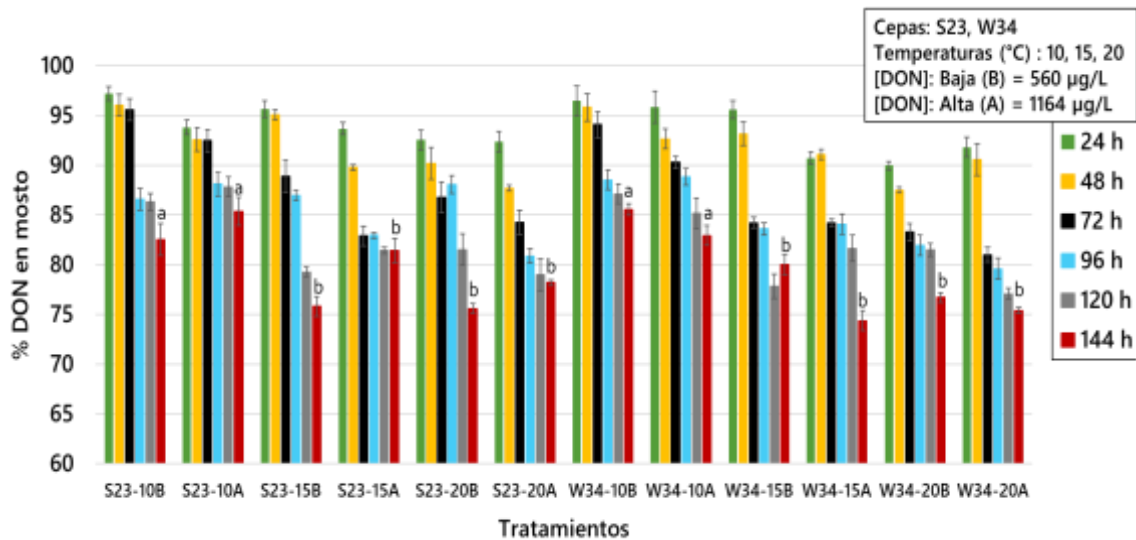
En cuanto a las cepas de *S. cerevisiae*, los porcentajes de DON más bajos alcanzados después de la primera fermentación ocurrieron utilizando la cepa S-04 a 25 °C, incluso, esta cepa tuvo una remoción significativamente mayor que la cepa M-36, a pesar de tratarse de la misma especie de *Saccharomyces*, son cepas genéticamente seleccionadas para la producción de metabolitos secundarios de interés, y estos pueden alterar la estructura dinámica de la pared celular de la levadura, y a su vez su capacidad de interacción entre los grupos hidroxilo de DON y ZEA y los grupos hidroxilo de las glucosas de las hélices de D-glucanos como se demostró en el estudio de Joauny (2005).



^{a-b} Los niveles con letras distintas son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

LOD de DON = 20 µg/kg.

Figura 5-7. Efecto de la cepa de levadura, temperatura y concentración inicial de micotoxina sobre el nivel de DON durante la fermentación de mosto con *S. cerevisiae*.



^{a-b} Los niveles con letras distintas son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

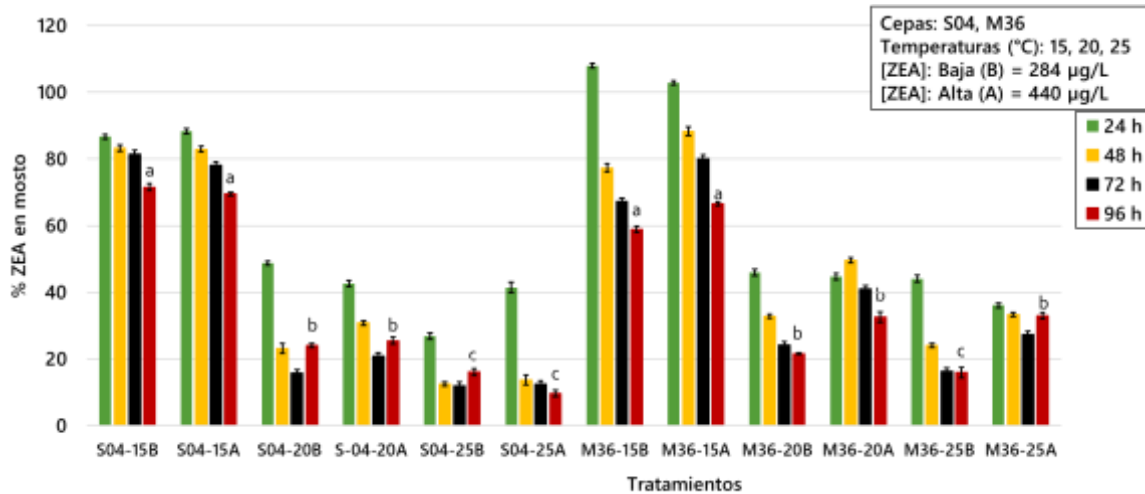
LOD de DON = 20 µg/kg.

Figura 5-8. Efecto de la cepa de levadura, temperatura y concentración inicial de micotoxina sobre el nivel de DON durante la fermentación de mosto con *S. pastorianus*.

En cuanto a los tratamientos con las cepas de *S. pastorianus*, no existió diferencia significativa entre las cepas S-23 y W-34; siendo el tratamiento con W-34 a 15 °C el mejor para la remoción de DON después de la primera fermentación.

5.7 Efecto de la temperatura, la concentración de micotoxina y cepa de levadura sobre los niveles de ZEA durante la primera fermentación

El cambio en el porcentaje de ZEA residual durante la primera fermentación usando *S. cerevisiae* y *S. pastorianus* se muestra en las Figuras 5-9 y 5-10, respectivamente.



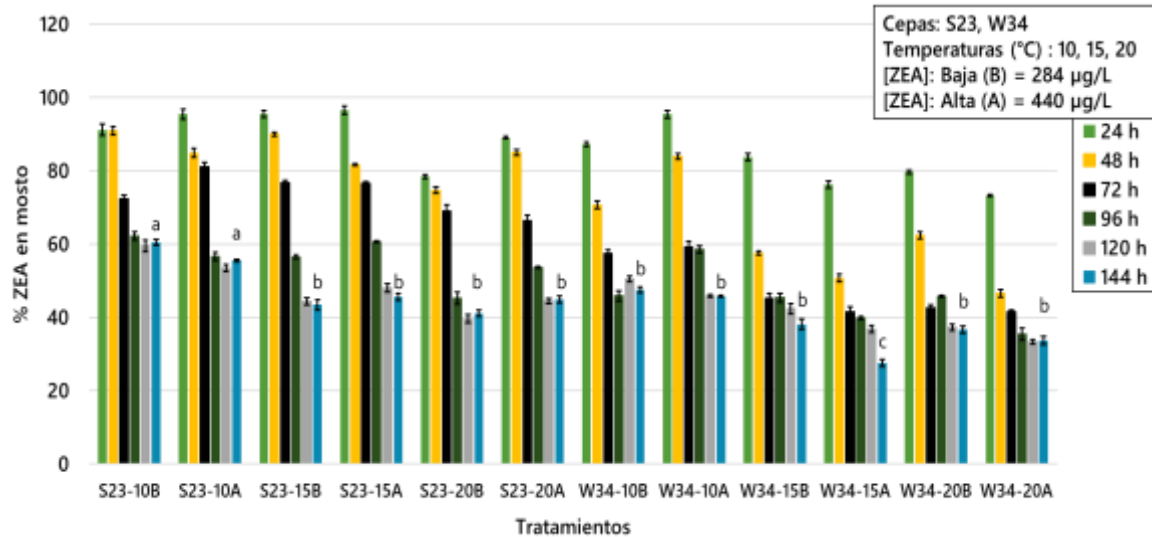
^{a-c} Los niveles con letras distintas son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

LOD de ZEA = 2.5 µg/kg.

Figura 5-9. Efecto de la cepa de levadura, temperatura y concentración inicial de micotoxina sobre el nivel de ZEA durante la fermentación con *S. cerevisiae*.

Se registró una mayor disminución en los porcentajes de ZEA residual en los mostos fermentados con *S. cerevisiae* (28 % - 91 %), comparada con la disminución de ZEA residual en aquellos mostos fermentados con *S. pastorianus* (40 % - 73 %). La disminución del porcentaje de ZEA residual durante la primera fermentación con las cepas de *S. cerevisiae* y *S. pastorianus* se muestran en las Figuras 5-9 y 5-10 respectivamente; la concentración inicial de micotoxina en el mosto no tuvo una influencia significativa en la reducción de los porcentajes de ZEA residual; sin embargo, se alcanzó una disminución mayor que la reportada por Wall-Martínez *et al.* (2019) (31-72 %). De igual forma que para DON, la concentración de ZEA en el mosto

altamente contaminado no fue suficiente para saturar los sitios de enlace entre ZEA y las hélices de D-glucanos de la pared celular de la levadura.



^{a-c} Los niveles con letras distintas son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

LOD de ZEA = 2.5 µg/kg.

Figura 5-10. Efecto de la cepa de levadura, temperatura y concentración inicial de micotoxina sobre el nivel de ZEA durante la fermentación con *S. pastorianus*.

La temperatura de fermentación también tuvo un efecto positivo sobre la disminución de los porcentajes de ZEA. En las temperaturas de fermentación más altas (25 °C para *S. cerevisiae* y 20 °C y 15 °C para *S. pastorianus*) se observó la mayor disminución de los porcentajes de ZEA residual al final de la primera fermentación.

Los porcentajes de ZEA residual mas bajos después de la primera fermentación con *S. cerevisiae* se alcanzaron utilizando la cepa S-04 a 20 °C; por otra parte, la cepa M-36 favoreció similarmente la remoción de DON en los tratamientos, sin embargo, hubo una diferencia significativa entre estas dos cepas en el tratamiento de fermentación a 25 °C, donde la cepa S-04 llegó a niveles tres veces menores de ZEA que la cepa M-36.

En cuanto a los tratamientos con las cepas de *S. pastorianus*, no existió diferencia significativa entre las cepas S-23 y W-34 (Figura 5-10); a excepción del

tratamiento con la cepa W-34 a 15 °C que presentó la mayor remoción (73 %) de ZEA residual después de la primera fermentación con *S. pastorianus*, pero aún menor que con la cepa de *S. cerevisiae* S04.

Al final de la primera fermentación, los niveles de ZEA disminuyeron 2 veces más que los de DON, estos resultados concuerdan con los reportados con varios autores donde observan una remoción mayor de ZEA que de DON en mostos fermentados con *S. cerevisiae* y *S. pastorianus* (Scott *et al.*, 1995; Inoue *et al.* 2013; Campagnollo *et al.* 2015; Nathanail *et al.*, 2016).

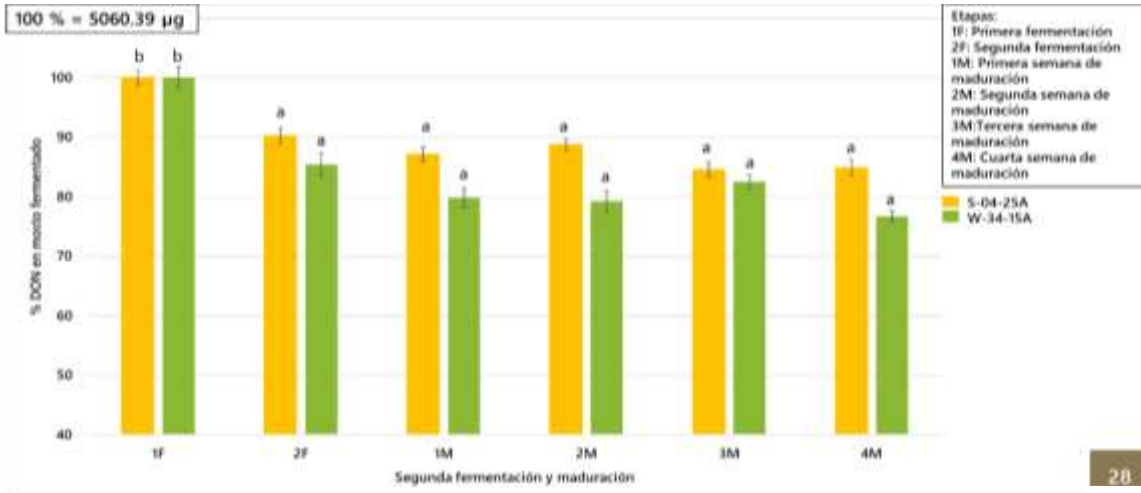
De acuerdo con Jouany *et al.* (2005) la diferencia de remoción entre ZEA y DON es debida a que ZEA tiene una simetría geométrica mayor que DON con los sitios abiertos de enlace de las hélices de los D-glucanos de la pared celular de la levadura, uniéndose mediante puentes de hidrógeno y enlaces de Van de Waals, de esta manera se favorece una estrecha relación entre éstas dos moléculas, sin embargo, DON a pesar de poseer una similitud geométrica menor con los sitios abiertos de los D-glucanos, aún puede interactuar con ellos mediante al menos dos enlaces hidroxilo.

5.8 Efecto de la segunda fermentación y de la maduración sobre los niveles de DON y ZEA

En las Figuras 5-11 y 5-12 se muestran los porcentajes de DON y ZEA residuales después de la segunda fermentación y maduración de la cerveza.

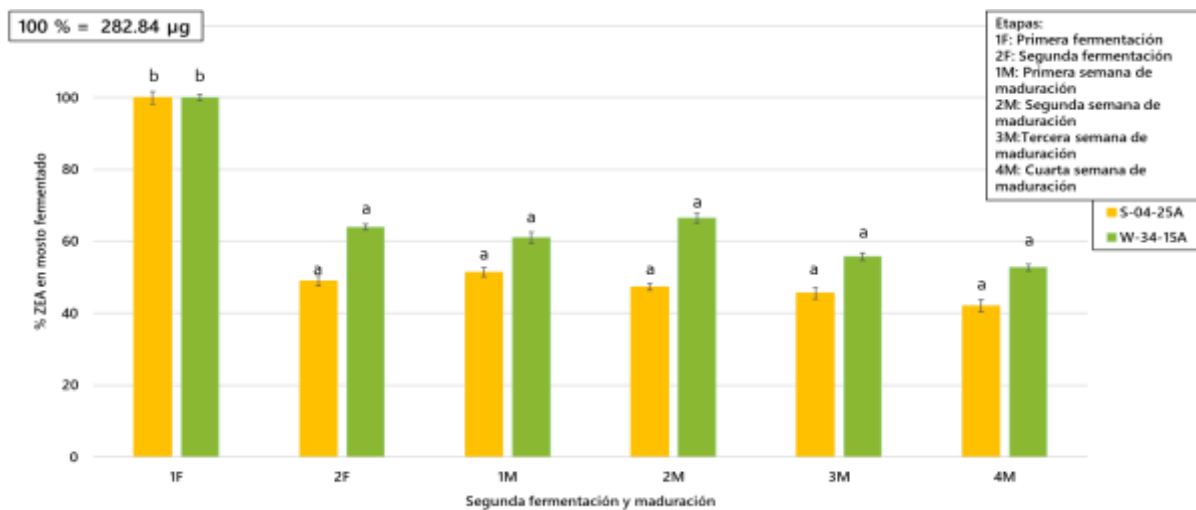
La aplicación de una segunda fermentación tuvo un efecto positivo en la disminución de los porcentajes de micotoxina residual. Después de la segunda fermentación y del periodo de maduración los porcentajes de DON residual disminuyeron en un 15 % en presencia de *S. cerevisiae* S-04 y 23 % con *S. pastorianus* W-34 respecto a los niveles con los que se encontraban al terminar la primera fermentación; en cuanto a los porcentajes de ZEA residual lograron reducirse en un 58 % con S-04 y 47 % con W-34; sin embargo, no existen cambios significativos en los porcentajes residuales de ambas micotoxinas durante las 4 semanas de maduración de la cerveza, debido a que en esta última etapa del proceso de elaboración de cerveza

artesanal, existe muy poca levadura en la cerveza fermentada en comparación con las etapas previas de fermentación.



^{a-b} Los niveles con letras distintas son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Figura 5-11. Efecto de la segunda fermentación y de la maduración sobre la concentración de DON en mosto fermentado.



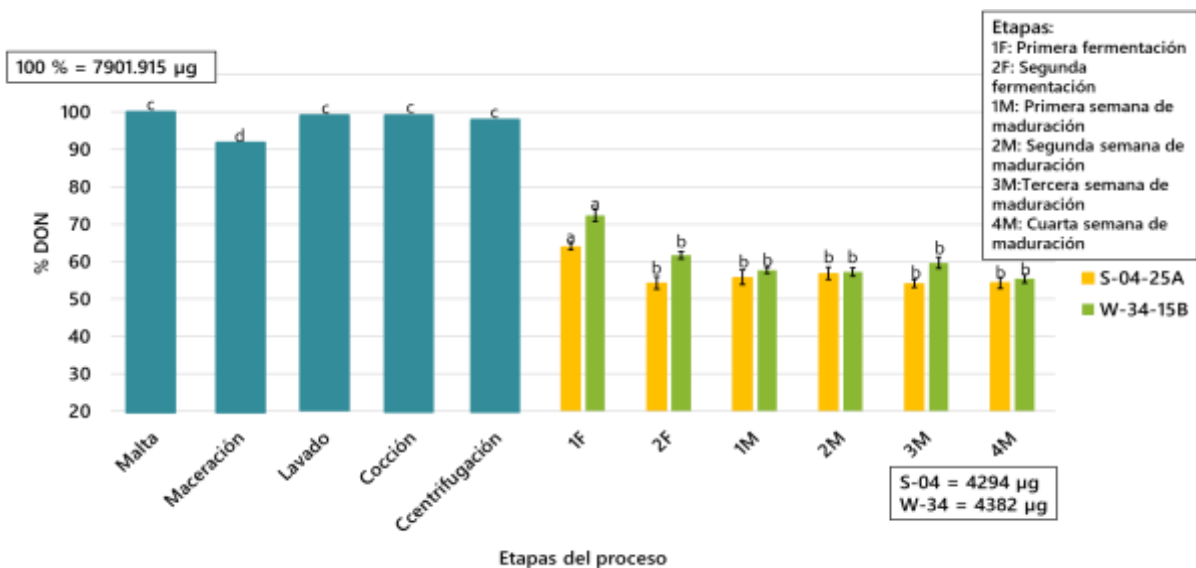
^b Los niveles con letras distintas son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Figura 5-12. Efecto de la segunda fermentación y de la maduración sobre la concentración de ZEA en mosto fermentado.

5.9 Niveles de DON y ZEA durante el proceso global de producción artesanal de cerveza

Al analizar los niveles de DON (Fig. 5-13) y ZEA (Fig. 5-14) durante cada etapa del proceso global de producción artesanal de cerveza, se observa que la mayor remoción de ambas micotoxinas se presenta después de la primera fermentación. Los porcentajes de DON residual disminuyeron en un 36 % con *S. cerevisiae* S-04 y 28 % con *S. pastorianus* W-34 mientras que para ZEA en un 92 % con S-04 y 77 % con W-34.

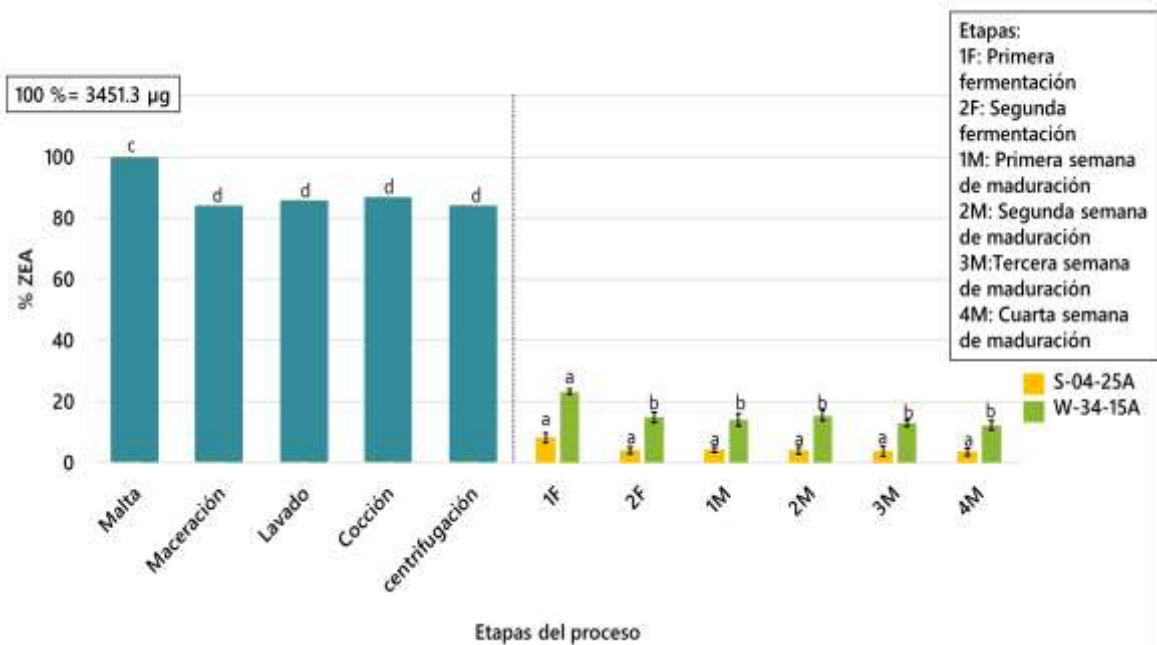
En las etapas previas de elaboración de mosto no contribuyen significativamente en la remoción de ambas micotoxinas, a excepción del macerado y lavado en donde una parte significativa de los niveles de ZEA no se transfieren al mosto en comparación con los niveles de DON; las etapas posteriores a la primera fermentación no contribuyen significativamente en la remoción de ambas micotoxinas debido a la baja concentración de levaduras presentes posterior a la primera fermentación.



^{a-b} Los niveles con letras distintas son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Figura 5-13. Nivel de DON durante el proceso global de elaboración de cerveza artesanal.

Al final del proceso global y considerando un volumen final en la cerveza de 6.5 L, la concentración de micotoxina presente en la cerveza final es de 0.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DON cuando se fermentó con la cepa S0-4 y 0.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con W-34; y para ZEA de 0.018 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con S-04 y 0.064 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con W-34. Estos valores son altos considerando el TDI de DON (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c. d^{-1}) y ZEA (0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c. d^{-1}) (considerando el peso promedio de un mexicano de 74 kg) para DON se alcanzarían ingiriendo 110 mL al día, mientras que para ZEA se necesitaría ingerir 2055 mL de la cerveza fermentada con S-04 y 1729 mL de la cerveza fermentada con W-34.



^{a-b} Los niveles con letras distintas son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Figura 5-14. Nivel de ZEA durante el proceso global de elaboración de cerveza artesanal.

6 CONCLUSIONES

Durante la elaboración del mosto las etapas de macerado y lavado de la malta favorecen una mayor transferencia de ZEA a comparación de DON, hacia el mosto; no obstante, las etapas posteriores (cocción y centrifugación) no contribuyeron significativamente en la remoción de ambas micotoxinas.

Durante la primera fermentación se alcanzaron mayores remociones con las mayores temperaturas empleadas. En cuanto al estilo de fermentación, las cepas de *S. cerevisiae* favorecieron más la remoción de DON y ZEA, siendo la cepa *S-04* la que resultó con las mejores remociones; en contra parte, las mejores remociones con los tratamientos con *S. pastorianus* se observaron utilizando la cepa *W-34*. No hubo diferencia en el porcentaje de remoción de DON y ZEA entre el mosto altamente contaminado y el mosto con baja contaminación. Después de la segunda fermentación y del periodo de maduración los niveles de DON disminuyeron en un 15 % con *S-04* y 23 % con *W-34* respecto a los niveles posteriores a la primera fermentación; mientras que los niveles de ZEA disminuyeron en un 58 % con *S-04* y 47 % con *W-34*.

Se determinó que la concentración inicial de micotoxinas en el mosto no tuvo efecto sobre la producción de etanol y el crecimiento de las levaduras durante la fermentación.

En el proceso global los niveles de ZEA disminuyeron más (91 %) que los de DON (45 %); sin embargo, aun así, los niveles finales de ambas micotoxinas se consideran altos considerando su TDI. No obstante, para fines de este proyecto se trabajó con malta intencionalmente contaminada con niveles altos de micotoxina inicial; empero, dichos niveles de contaminación no se encuentran comúnmente en malta naturalmente contaminada. La elección de parámetros adecuados es relevante para disminuir el contenido de micotoxinas durante la fermentación de la cerveza. Se deben realizar estudios futuros sobre la remoción de micotoxinas conjugadas, para una comprensión completa del proceso de descontaminación durante la fermentación de la cerveza.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, J. F., Lilly, M., Rheeder, J. P., Burger, H. M., Shephard, G. S., and Gelderblom, W. C. A. 2017. Technological and community-based methods to reduce mycotoxin exposure. *Food Control*. 73: 101-109.
- Ashoor, S. H., and Chu, F. S. 1973. Inhibition of alcohol and lactic dehydrogenases by patulin and penicillic acid in vitro. *Food Cosmet Toxicol*. 11(4): 617-624.
- Awad, W. A., Ghareeb, K., Dadak, A., Gille, L., Staniek, K., Hess, M., and Böhm, J. 2012. Genotoxic effects of deoxynivalenol in broiler chickens fed low-protein feeds. *Poult Sci S*. 91(3): 550-555.
- Aziz, N. H., Ferial, M., Shahin, A. A., and Roushy, S. M. 2007. Control of *Fusarium* moulds and fumonisin B1 in seeds by gamma-irradiation. *Food Control*. 18(11): 1337-1342.
- Belajová, E., Rauová, D., and Daško, L. 2007. Retention of ochratoxin A and fumonisin B1 and B2 from beer on solid surfaces: comparison of efficiency of adsorbents with different origin. *Eur Food Res Technol*. 224(3): 301-308.
- Bennett, G. A., and Richard, J. L. 1996. Main content area Influence of processing on *Fusarium* mycotoxins in contaminated grains. *Food Tech*. 50(5): 235-238.
- Berthiller, F., Crews, C., Dall'Asta, C., Saeger, S. D., Haesaert, G., Karlovsky, P. and Stroka, J. 2013. Masked mycotoxins: A review. *Molecular nutrition & food research*. 57(1): 165-186.
- Bolechová, M., Benešová, K., Běláková, S., Čáslavský, J., Pospíchalová, M., and Mikulíková, R. 2015. Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic. *Food Control*. 47: 108-113.
- Bretz, M., Knecht, A., Göckler, S., y Humpf, H. U. 2005. Structural elucidation and analysis of thermal degradation products of the *Fusarium* mycotoxin nivalenol. *Mol Nutr Food Res*. 49(4): 309-316.
- Burrows, E. P., and Szafraniec, L. L. 1986. Hypochlorite-promoted transformations of trichothecenes. *Verrucarol. J Org Chem*. 51(9): 1494-1497.
- Burrows, E. P., and Szafraniec, L. L. 1987. Hypochlorite-promoted transformations of trichothecenes, 3. Deoxynivalenol. *J Nat Prod*. 50(6): 1108-1112.
- Campagnollo, F. B., Franco, L. T., Rottinghaus, G. E., Kobashigawa, E., Ledoux, D. R., Daković, A., and Oliveira, C. A. 2015. In vitro evaluation of the ability of beer fermentation residue containing *Saccharomyces cerevisiae* to bind mycotoxins. *Food Res Int*. 77: 643-648.

- Carrillo, L., Carina, M. 2007. Manual de Microbiología de los Alimentos. 1st. Ed. Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias. Argentina, pp 40-45; 89-96.
- Castells, M., Marin, S., Sanchis, V., and Ramos, A. J. 2005. Fate of mycotoxins in cereals during extrusion cooking: a review. *Food Addit Contam.* 22(2): 150-157.
- Castelo, M. M., Jackson, L. S., Hanna, M. A., Reynolds, B. H., and Bullerman, L. B. 2001. Loss of fumonisin B1 in extruded and baked corn-based foods with sugars. *J Food Sci.* 66(3): 416-421.
- Código Alimentario Español. 1984. Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración, Circulación y Comercio de la Cerveza. Madrid, España.
- Comisión Europea, 2006. Recomendación de la Comisión sobre la presencia de deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 y HT-2 y fumonisinas en productos destinados a la alimentación animal. *Diario Oficial de la Unión Europea.* 229: 7-9.
- Corassin, C. H., Bovo, F., Rosim, R. E., and Oliveira, C. A. F. 2013. Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M1 in UHT skim milk. *Food Control.* 31(1): 80-83.
- Creppy, E. E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett.* 127(1-3): 19-28.
- Das Murtey, M. and Ramasamy P. 2016. Sample Preparations for Scanning Electron Microscopy. Pp. 163. En: Modern Electron Microscopy in Physical and Life Science, 1st, Ed., (Ed. Milos Janecek and Robert Kral), In Tech DTP Team., Rijeka Croatia.
- Deloitte 2017. La cerveza artesanal. Una experiencia multisensorial. Deloitte. México, DF.
- Epifanio, S. I., Gutierrez, A. R., Santamaría, M. P., y López, R. 1999. The influence of enological practices on the selection of wild yeast strains in spontaneous fermentation. *Am J Enol Viticult.* 50(2): 219-224.
- Escrivá, L., Font, G., and Manyes, L. 2015. In vivo toxicity studies of *Fusarium* mycotoxins in the last decade: A review. *Food Chem Toxicol.* 78: 185-206.
- FAO/OMS 2013. Las Aflatoxinas, D. D. D. S., y los cereales, E. N. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas Moscú, Rusia.
- Goswami, R. S., and Kistler, H. C. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol Plant Pathol.* 5(6): 515-525.
- Grenier, B., Bracarense, A. P. F., Schwartz, H. E., Trumel, C., Cossalter, A. M., Schatzmayr, G., and Oswald, I. P. 2012. The low intestinal and hepatic toxicity of hydrolyzed fumonisin B1 correlates with its inability to alter the metabolism of sphingolipids. *Biochem Pharmacol.* 83(10): 1465-1473.

Guo, X., Wen, F., Zheng, N., Luo, Q., Wang, H., Wang, H., and Wang, J. 2014. Development of an ultrasensitive aptasensor for the detection of aflatoxin B1. *Biosens Bioelectron.* 56: 340-344.

He, J., Zhou, T., Young, J. C., Boland, G. J., and Scott, P. M. 2010. Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. *Trends Food Sci Tech.* 21(2): 67-76.

Heathcote, J. G., and Hibbert, J. R. 1978. Aflatoxins: chemical and biological aspects. Elsevier Scientific Publishing Co.

Hernandez, F., and Cannon, M. 1982. Inhibition of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by the 12, 13-epoxytrichothecenes trichodermol, diacetoxyscirpenol and verrucarín A. *J Antibiot.* 35(7): 875-881.

Herrera, T., y Ulloa, M. 1998. El reino de los hongos: micología básica y aplicada. No. 589.2 H565r. Universidad Nacional Autónoma de México. CDMX, México.

Inoue, T., Nagatomi, Y., Uyama, A., and Mochizuki, N. 2013. Fate of mycotoxins during beer brewing and fermentation. *Biosci Biotech Bioch.* 130027.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) 2001. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Food Additives Series 47, FAO food and Nutrition Paper 74.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) 2010. Comité del codex sobre contaminantes de los alimentos. 4ª reunión Izmir, Turquía.

Jouany, J. P., Yiannikouris, A., and Bertin, G. 2005. The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* have been identified. *Arch Zootec.* 8: 26-50.

Jouany, J. P. 2007. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Anim Feed Sci Tech.* 137(3-4): 342-362.

Juan, C., Berrada, H., Mañes, J., and Oueslati, S. 2017. Multi-mycotoxin determination in barley and derived products from Tunisia and estimation of their dietary intake. *Food Chem Toxicol.* 103: 148-156.

Kanora, A., and Maes, D. 2010. The role of mycotoxins in pig reproduction: a review. *Vet Med-Czech.* 54(12): 565-576.

Khatibi, P. A., Berger, G., Wilson, J., Brooks, W. S., McMaster, N., Griffey, C. A., and Schmale III, D. G. 2014. A comparison of two milling strategies to reduce the mycotoxin deoxynivalenol in barley. *J Agr Food Chem* 62(18): 4204-4213.

Kolhi, M. M., Cubilla, L. E., and Viedma, L. 2009. Del grano al pan. Segundo Seminario Nacional de Trigo, Asunción, Paraguay. pp 140.

Koraichi, F., Videmann, B., Mazallon, M., Benahmed, M., Prouillac, C., and Lecoer, S. 2012. Zearalenone exposure modulates the expression of ABC transporters and nuclear receptors in pregnant rats and fetal liver. *Toxicol Lett.* 211(3): 246-256.

- Kostelanska, M., Zachariasova, M., Lacina, O., Fenclova, M., Kollos, A. L., and Hajslova, J. 2011. The study of deoxynivalenol and its masked metabolites fate during the brewing process realised by UPLC–TOFMS method. *Food Chem.* 126(4): 1870-1876.
- Kunze, W. 2004. Technology Brewing and Malting. 3rd. Ed. BLV Berlin. Alemania, pp 32, 40-90, 195-641.
- Kuzdraliński, A., Solarska, E., and Muszyńska, M. 2013. Deoxynivalenol and zearalenone occurrence in beers analysed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. *Food Control.* 29(1): 22-24.
- Lancova, K., Hajslova, J., Poustka, J., Krplova, A., Zachariasova, M., Dostálek, P., and Sachambula, L. 2008. Transfer of Fusarium mycotoxins and 'masked' deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. *Food Addit Contam.* 25(6): 732-744.
- Lee, J.M. 1992, Biochemical Engineering. 1st. Ed. Prentice-Hall Inc. Estados Unidos, pp 5.5, 6.6.
- Leslie, J. F., and Summerell, B. A. 2006. *Fusarium* laboratory workshops: A recent history. *Mycotoxin Res.* 22(2): 73-74.
- Lipke, P. N., and Ovalle, R. 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol.* 180(15): 3735-3740.
- López-Cordón, E. N. L. 2007. El papel de las manoproteínas en la elaboración de vinos de calidad. Ponencias del VI Curso de verano Viticultura y Enología en la DO Ribera del Duero, pp. 73-78. Manosalva, C. 2015. Guías de Estilos de Cerveza BJCP. BJCP Certified Judge & Cicerone. Estados Unidos.
- Maresca, M. 2013. From the gut to the brain: Journey and pathophysiological effects of the food-associated trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. *Toxins.* 5(4): 784-820.
- Maul, R., Müller, C., Rieß, S., Koch, M., Methner, F. J., and Irene, N. 2012. Germination induces the glucosylation of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in various grains. *Food Chem.* 131(1): 274-279.
- Mbugua, S. K., and Gathumbi, J. K. 2004. The contamination of Kenyan lager beers with Fusarium mycotoxins. *J I Brewing.* 110(3): 227-229.
- McMullen, M. P., y Stack, R. W. 2008. *Fusarium* head blight (scab) of small grains.
- Méndez, A., Del Río, J. C., y Moreno, E. 2007. Decontamination of aflatoxin duckling feed with aqueous citric acid treatment. *Anim Feed Sci Tech.* 135(3-4): 249-262.
- Milani, J., and Maleki, G. 2014. Effects of processing on mycotoxin stability in cereals. *J Sci Food Agr.* 94(12): 2372-2375.
- Montes de Oca-Sicilia, M. P. 2012. El delicioso mundo de la cerveza II 1st Ed. Otras Inquisiciones. CDMX, pp 63.

Moran, C. A. 2004. Functional components of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*: applications for yeast glucan and mannan. Proceedings of Alltech's 20th Annual Symposium: re-imagining the feed industry, Kentucky, USA. pp. 283-296.

Moruno, E. G., Sanlorenzo, C., Boccaccino, B., and Di Stefano, R. 2005. Treatment with yeast to reduce the concentration of ochratoxin A in red wine. *Am J Enol Viticult.* 56(1): 73-76.

Nagl, V., Schwartz, H., Krska, R., Moll, W. D., Knasmüller, S., Ritzmann, M. and Berthiller, F. 2012. Metabolism of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside in rats. *Toxicology letters.* 213(3): 367-373.

Nathanail, A. V., Gibson, B., Han, L., Peltonen, K., Ollilainen, V., Jestoi, M., and Laitila, A. 2016. The lager yeast *Saccharomyces pastorianus* removes and transforms *Fusarium* trichothecene mycotoxins during fermentation of brewer's wort. *Food Chem.* 203: 448-455.

Niessen, I., Böhm-Schrami, M., Vogel, H., and Donhauser, S., 1993. Deoxynivalenol in commercial beer screening for the toxin with an indirect competitive ELISA. *Mycotoxin Res.* 9: 99-109.

Nirenberg, H. I. 1990. Recent advances in the taxonomy of *Fusarium*. *Stud Mycol.* 32: 91-101.

Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1-1995. Bienes y servicios. Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial.

Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias.

Orlean, P. 2012. Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics.* 192(3): 775-818.

Palmer, John. 2006, How to Brew. 3rd. Ed. Brewers Publications. Estados Unidos, pp 23-36, 94-116.

Pancaldi, D., Tonti, S., Prodi, A., Salomoni, D., Dal Prà, M., Nipoti, P., and Pisi, A. 2010. Survey of the main causal agents of *Fusarium* head blight of durum wheat around Bologna, northern Italy. *Phytopathol Mediterr.* 49(2): 258-266.

Parry, D. W., Jenkinson, P., and McLeod, L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals a review. *Plant PatholL.* 44(2): 207-238.

Pascari, X., Ramos, A. J., Marin, S., and Sanchis, V. 2018. Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review. *Food Res Int.* 103: 121-129.

Pereira, V. L., Fernandes, J. O., and Cunha, S. C. 2014. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trend Food Sci Tech.* 36(2): 96-136.

Pestka, J. J. 2007. Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks. *Anim Feed Sci Tech.* 137(3-4): 283-298.

Pestka, J. 2010. Toxicological mechanisms and potential health effects of deoxynivalenol and nivalenol. *World Mycotoxin J.* 3(4): 323-347.

Peters, J., van Dam, R., van Doorn, R., Katerere, D., Berthiller, F., Haasnoot, W., and Nielen, M. W. 2017. Mycotoxin profiling of 1000 beer samples with a special focus on craft beer. *Plos One.* 12(10): e0185887.

Piacentini, K. C., Savi, G. D., Olivo, G., AND Scussel, V. M. 2015. Quality and occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in craft beer. *Food Control.* 50: 925-929.

Pistol, G. C., Gras, M. A., Marin, D. E., Israel-Roming, F., Stancu, M., and Taranu, I. 2014. Natural feed contaminant zearalenone decreases the expressions of important pro-and anti-inflammatory mediators and mitogen-activated protein kinase/NF- κ B signalling molecules in pigs. *Brit J Nutr.* 111(3): 452-464.

Popovski, S., and Celar, F. A. 2013. The impact of environmental factors on the infection of cereals with *Fusarium* species and mycotoxin production: a review. *Acta Agr Scand.* 101(1): 105.

Prelusky, D. B., Hartin, K. E., Trenholm, H. L., and Miller, J. D. 1988. Pharmacokinetic fate of 14 C-labeled deoxynivalenol in swine. *Toxicol Sci.* 10(2): 276-286.

Prelusky, D. B., and Trenholm, H. L. 1991. Tissue distribution of deoxynivalenol in swine dosed intravenously. *J Agr Food Chem.* 39(4): 748-751.

Rodríguez, Y., Fattore, M., Albrizio, S., Berrada, H., and Mañes, J. 2015. Occurrence of *Fusarium* mycotoxins and their dietary intake through beer consumption by the European population. *Food Chem.* 178: 149-155.

Roger, D. 2011. Deoxynivalenol (DON) and fumonisins B1 (FB1) in artisanal sorghum opaque beer brewed in north Cameroon. *Afr J Microbiol Res.* 5: 1565-1567.

Rubert, J., Soler, C., Marín, R., James, K. J., and Mañes, J. 2013. Mass spectrometry strategies for mycotoxins analysis in European beers. *Food Control.* 30(1): 122-128.

SCF, Scientific Committee on Food, 2000. Opinion of the scientific committee on food on fusarium toxins Part 2: Zearalenone (ZEA).

Schwarz, P. B., Casper, H. H., and Beattie, S. 1995. Fate and Development of Naturally Occurring *Fusarium* Mycotoxins During Malting and Brewing. *J Am Soc Brew Chem* 53(3): 121-127.

Scott, P. M. and Lawrence, G. A. 1994. Stability and problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods. *J AOAC Int.* 77(2): 541-545.

Scott, P. M., Kanhere, S. R., Lawrence, G. A., E.F., Daley and Farber J. M. 1995. Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisins B1 and B2. *Food Addit Contam.* 12(1): 31-40.

Secretaría de Economía, 2015. Industria de la Cerveza en México. CDMX, México.

Shetty, P. H., and Jespersen, L. 2006. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends Food Sci Tech* 17(2): 48-55.

Shi, Z., Shen, S., Zhou, W., Wang, F., and Fan, Y. 2008. *Fusarium graminearum* growth inhibition due to glucose starvation caused by osthol. *Int J Mol Sci.* 9(3): 371-382.

Shier, W. T., Shier, A. C., Xie, W., and Mirocha, C. J. (2001). Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicol.* 39(9): 1435-1438.

Shim, W. B., Kim, J. C., Seo, J. A., and Lee, Y. W. 1997. Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Korean and imported beers. *Food Addit Contam.* 14(1): 1-5.

Soriano del Castillo, J. M. 2007. Micotoxinas en alimentos 1st. Ed. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, pp. 47-52.

Sosa, D., Escobar, A., and Faure, R. 2017. Deoxinivalenol: métodos de análisis de residualidad en cereales. Toxicidad en animales de granjas. *Revista de Salud Animal.* 39(2): 01-10.

Statista 2018. Alcohol and Health. Hamburgo, Alemania.

Suárez, C., Garrido, N. A., y Guevara, C. A. 2016. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol: Revisión bibliográfica. ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar, 50(1): 20-28.

Sukroongreung, S., Schappert, K. T., and Khachatourians, G. G. 1984. Survey of sensitivity of twelve yeast genera toward T-2 toxin. *Appl Environ Microb.* 48(2): 416-419.

Sutton, J. C. 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Can J Plant Pathol.* 4(2): 195-209.

Tanaka, T., and Ueno, Y. 1989. Mycotoxins and Phycotoxins' 88. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Tokio, Japón, pp. 51.

Tiemann, U. and Dänicke, S. 2007. In vivo and in vitro effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: a review. *Food Addit Contam* 24(3): 306-314.

Torija, M. J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., and Mas, A. 2003. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol* 80(1): 47-53.

Varga, E., Malachova, A., Schwartz, H., Krska, R., AND Berthiller, F. 2013. Survey of deoxynivalenol and its conjugates deoxynivalenol-3-glucoside and 3-acetyl-deoxynivalenol in 374 beer samples. *Food Addit Contam.* 30(1): 137-146.

- Vegi, A., Schwarz, P., and Wolf, C. E. 2011. Quantification of Tri5 gene, expression, and deoxynivalenol production during the malting of barley. *Int J Food Microbiol.* 150(2-3): 150-156.
- Wall-Martínez, H. A., Pascari, X., Ramos, A. J., Marín, S. and Sanchis, V. 2019. Frequency and levels of mycotoxins in beer from the Mexican market and exposure estimate for deoxynivalenol mycotoxins. *Mycotoxin Res.* 35(2): 207-216.
- Wolf, C. E., and Bullerman, L. B. 1998. Heat and pH alter the concentration of deoxynivalenol in an aqueous environment. *J Food Protect.* 61(3): 365-367.
- Wolf, C. E. 2007. Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *Int J Food Microbiol.* 119(1-2): 89-94.
- Wu, Q., Dohnal, V., Huang, L., Kuča, K., and Yuan, Z. 2010. Metabolic pathways of trichothecenes. *Drug Metab Rev.* 42(2): 250-267.
- Wu, Q., Kuča, K., Humpf, H. U., Klímová, B., and Cramer, B. 2017. Fate of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside during cereal-based thermal food processing: a review study. *Mycotoxin Res.* 33(1): 79-91.
- Xu, X., and Nicholson, P. 2009. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annu Rev Pathol-Mech.* 47: 83-103.
- Young, J. C., Subryan, L. M., Potts, D., McLaren, M. E., and Gobran, F. H. 1986. Reduction in levels of deoxynivalenol in contaminated wheat by chemical and physical treatment. *J Agr Food Chem,* 34(3): 461-465.
- Young, J. C., Zhu, H., and Zhou, T. 2006. Degradation of trichothecene mycotoxins by aqueous ozone. *Food Chem Toxicol.* 44(3): 417-424.
- Zhu, Y., Hassan, Y. I., Watts, C., and Zhou, T. 2016. Innovative technologies for the mitigation of mycotoxins in animal feed and ingredients - A review of recent patents. *Anim Feed Sci Tech.* 216: 19-29.