



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química

**RECUPERACIÓN DE LA NISINA A PARTIR DE LOS SUBPRODUCTOS QUE
CONTIENEN AZÚCARES FERMENTABLES DE UNA CERVECERÍA**

Pablo José Rosales Pineda

Asesorado por el Ing. Álvaro de León Marizuya

Guatemala, marzo de 2020

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**RECUPERACIÓN DE LA NISINA A PARTIR DE LOS SUBPRODUCTOS QUE
CONTIENEN AZÚCARES FERMENTABLES DE UNA CERVECERÍA**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA

POR

PABLO JOSÉ ROSALES PINEDA

ASESORADO POR EL ING. ÁLVARO DE LEÓN MARIZUYA

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO

GUATEMALA, MARZO DE 2020

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANA	Inga. Aurelia Anabela Cordova Estrada
VOCAL I	Ing. José Francisco Gómez Rivera
VOCAL II	Ing. Mario Renato Escobedo Martínez
VOCAL III	Ing. José Milton de León Bran
VOCAL IV	Br. Christian Moisés de la Cruz Leal
VOCAL V	Br. Kevin Armando Cruz Lorente
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO	Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
EXAMINADOR	Ing. Víctor Manuel Monzón Valdez
EXAMINADOR	Ing. Williams Guillermo Álvarez Mejía
EXAMINADOR	Ing. Jorge Emilio Godínez Lémus
SECRETARIA	Inga. Lesbia Magalí Herrera López

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

RECUPERACIÓN DE LA NISINA A PARTIR DE LOS SUBPRODUCTOS QUE CONTIENEN AZÚCARES FERMENTABLES DE UNA CERVECERÍA

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha 21 de marzo del 2019.

Pablo José Rosales Pineda

ACTO QUE DEDICO A:

- Dios** Danos la serenidad para aceptar todo aquello que no podemos cambiar, el coraje para cambiar lo que somos capaces de cambiar y la sabiduría para conocer la diferencia.
- San José** Ruega por nosotros y nuestro colegio.
- Mis padres** Por la vida, el amor y el esfuerzo. Por el amor incondicional y las lecciones de vida. Gracias por siempre luchar siempre y por ser la luz que nos encendió la vida.
- Mis abuelos** Por ser las estrellas que brillan en el cielo y nos llevan a soñar en alto, que nos cuidan y protegen. Por todo el amor, las bendiciones y el don que les hemos heredado.
- Duperly Acú** Porque en el momento de alcanzar los deseos más grandes que forman nuestros corazones, siempre estés tú. Por acompañarnos en la vida.

AGRADECIMIENTOS A:

Dios	Por el universo, la vida y por permitirnos conseguirlo todo. Por mis padres y un hogar lleno de calidez. Gracias por darme a todas las personas que han sido parte de este sueño.
Universidad de San Carlos de Guatemala	Por darnos la humildad y coraje necesario para cambiar el mundo.
Facultad de Ingeniería y Escuela de Ingeniería Química	Por marcar la diferencia en el mundo ingenieril y formar profesionales competentes.
Mis padres	José Francisco Rosales Martínez y Angélica Yolanda Pineda Pérez de Rosales. Por el amor, por los logros y sacrificios, por las noches en la máquina y junto al nebulizador. Gracias por la vida.
Mis hermanos	Maholia y Giovanni Rosales por ser siempre el mejor ejemplo de la vida, de esfuerzo y de amor. Por haberme crecido y cuidado como su hermano.

Mis sobrinos

Raquel, Andrea y Diego Rosales, Javier y José Manuel Cercado, por ser la alegría de la casa y darnos a todos las ganas de ser mejores cada día.

Duperly Acú

Por ser mi motor y fuerzas. Por ser mi pilar y darme paz. Por el amor. Por apoyarme en todos mis sueños, llenarme la vida de luz y darles inspiración a mis ganas.

Oswaldo Cercado

Por enseñarme matemáticas, por los consejos y la palabra de aliento.

Claudia Mazariegos

Por haber sido una segunda mamá interina y haberme apoyado estos últimos 20 años.

Mario Pineda y Nancy Reyes

Por apoyar siempre a mi madre y a mi familia. Por ser ejemplo de trabajo e inspiración de amor en una gran pareja.

Judith Rosales y Aura Rosales

Por haber recibido a mis padres como en casa. Por los *cassettes*, *sneakers* y el amor que nunca ha dejado de venir.

Héctor Mendoza y Honoria Mendoza

Gracias por ser la mayor inspiración de amor en pareja, compañía y familia. Gracias por siempre haber tenido un corazón cálido para con mi familia.

Jorge de León y Vilma de León

Mis padrinos. Gracias por siempre recordarse de mí y por haber aceptado ser mi guía desde antes de poder caminar. Gracias por habernos enseñado a los 3 patojos el sentido de la vida

Álvaro de León Marizuya

Por darme la oportunidad aprender de su experiencia, humildad y trabajo.

Fabiola Grijalva

Por inspirarme que, sin importar los inicios, los objetivos se pueden alcanzar por más grandes que parezcan. Por darme la oportunidad de realizar este trabajo y haberme permitido lograr el sueño de estar dentro de la empresa.

Familia Acú Recinos

Por recibirme como un hijo y darnos siempre la atención y cariño con cada uno de sus detalles

Familia Rodríguez Morales

Doña Olga y don Paco, gracias por representar un apoyo incondicional y ser un pilar fuerte de mi madre.

Familia Bolvito Marroquín

Por mantenernos cerca de ustedes, siempre afectuosos y amenos.

Mis amigos de la Facultad

Aarón Bendfeldt, Luis Emilio García, Gerson Ortega, César Quiroz, Astrid Solares, Jorge Pablo Obregón, Andrea Beteta.

Mis amigos

Ulises Grant, Luis Pedro Véliz, Mario Alarcón,
Luis Pedro Véliz, Alexander Ruíz, Gerardo Beb,
Héctor Beb, Eli Berto Lucero, Andrea Alarcón,
Benjamín Calderón, Carlos De León, Alejandro
Bolvito.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	VII
LISTA DE SÍMBOLOS	XI
GLOSARIO	XIII
RESUMEN	XXIII
OBJETIVOS	XXV
HIPÓTESIS	XXVII
INTRODUCCIÓN	XXIX
1. MARCO CONCEPTUAL	1
1.1. Antecedentes	1
1.1.1. Cheeseman, Gary. An improved method of preparing Nisin. 1956.	1
1.1.2. Parente, Eugenio. Production, recovery and purification of bacteriocin from lactic acid bacteria. 1999.	3
1.1.3. Weber, Peter. Resistance of Bacillus: preparation of nisin. 2004.	6
1.1.4. Xiao, Dan. Nisin extraction capacity of aqueous ethanol and and methanol from a 2,5 % preparation. 2010.	7
1.1.5. Suganthi, Vanessa. Lantibiotic Nisin: natural preservative from lactococcus lactis. 2012.	9
1.1.6. Müller-Auffermann, Keith. Nisin-producing microorganisms and their implementation in brewers' wort. 2014.	11

1.2.	Justificación	12
1.3.	Determinación del problema.....	14
1.3.1.	Definición.....	15
1.3.2.	Delimitación.....	16
2.	MARCO TEÓRICO	17
2.1.	Preservación alimentaria.....	17
2.1.1.	Biopreservación.....	17
2.2.	Microorganismos.....	18
2.2.1.	Lactobacterias LAB	18
2.2.2.	Lactococcus lactis	19
2.2.3.	Bactericidas.....	19
2.3.	Nisina.....	20
2.3.1.	Producción	21
2.3.2.	Factores que influyen en la producción de bactericidas a partir de lactobacterias LAB.....	22
2.3.2.1.	Cepa microbiana productora.....	22
2.3.2.2.	Medio de cultivo.....	23
2.3.2.3.	Composición de nisina comercial.....	25
2.3.2.4.	Composición de nisina comercial.....	25
2.3.2.5.	Estabilidad en procesos.....	26
2.3.3.	Fórmula química.....	28
2.3.4.	Fórmula química.....	28
2.3.5.	Aplicaciones industriales y comerciales.....	30
2.3.6.	Formas de aplicación e implementación.....	32
2.3.7.	Mecanismo de acción.....	33
2.3.8.	Espectro de inhibición de la nisina.....	36
2.3.9.	Sinergia de nisina con otros compuestos	36
2.4.	Cerveza.....	37

2.4.1.	Proceso de elaboración	37
2.5.	Métodos de recuperación	39
2.5.1.	Métodos y conceptos utilizados anteriormente para la extracción de nisina que imposibilitan su aplicación.....	40
2.5.1.1.	Métodos cromatográficos	42
2.5.1.2.	Métodos cromatográficos	42
2.5.1.3.	Extracción con solventes orgánicos	43
2.5.1.4.	Polaridad.....	45
2.5.2.	Métodos químicos de recuperación.....	46
2.5.3.	Métodos y conceptos viables para la extracción de nisina en grado alimenticio.....	46
2.5.3.1.	Polaridad.....	47
2.5.3.2.	Disminución de solubilidad por soluciones concentradas de sales (precipitación salina)	47
2.5.3.3.	Disminución de solubilidad por soluciones concentradas de sales (precipitación salina)	49
2.5.4.	Métodos mecánicos de recuperación.....	49
2.5.4.1.	Centrifugación	49
2.5.4.2.	Disminución de solubilidad a bajas temperaturas	50
2.5.4.3.	Microfiltración	51
2.5.4.4.	Rotoevaporación	52
2.5.4.5.	Secado por aspersion	53
2.5.4.6.	Floculación	53
2.6.	Determinación de la actividad antimicrobiana de la nisina	54

2.6.1.	Medios de cultivo de la bacteria identificadora (NBB-A, NBB-B, MRS)	54
2.6.2.	Método KB/DAS (difusión en agar sólido).....	55
3.	METODOLOGÍA	57
3.1.	Variables	57
3.2.	Delimitación del campo de estudio	58
3.3.	Recursos humanos disponibles	59
3.4.	Recursos materiales disponibles	59
3.4.1.	Caracterización de los posibles medios matrices ...	59
3.4.1.1.	Materia prima.....	59
3.4.1.2.	Reactivos.....	60
3.4.1.3.	Equipo	60
3.4.2.	Métodos de recuperación de la nisina	61
3.4.2.1.	Materia prima.....	61
3.4.2.2.	Reactivos.....	62
3.4.2.3.	Equipo	62
3.4.3.	Establecimiento de la curva de calibración y determinación de la concentración de nisina recuperada	63
3.4.3.1.	Materia prima.....	63
3.4.3.2.	Reactivos.....	64
3.4.3.3.	Equipo	64
3.5.	Técnica cualitativa o cuantitativa	65
3.5.1.	Técnica cualitativa	65
3.5.2.	Técnica cuantitativa.....	65
3.6.	Recolección y ordenamiento de la información	66
3.7.	Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información	67

3.8.	Análisis estadístico	69
3.8.1.	Análisis factorial	69
3.8.2.	Análisis de varianza (ANOVA)	71
3.9.	Plan de análisis de los resultados	72
3.9.1.	Modelo de los datos según tipo de variables.....	72
3.9.2.	Programas por utilizar para el análisis de datos	73
3.9.2.1.	Microsoft Excel 2016	74
3.9.2.2.	QtiPlot 0.9.8.9	74
4.	RESULTADOS.....	75
4.1.	Caracterización de posibles medios de cultivo.....	75
4.2.	Recuperación de nisina	81
5.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	85
5.1.	Caracterización de los posibles medios de cultivo	85
5.2.	Recuperación de la nisina.....	94
	CONCLUSIONES	105
	RECOMENDACIONES.....	107
	BIBLIOGRAFÍA.....	111
	APÉNDICES.....	115

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1.	Estructura química de la nisina	28
2.	Estructura química de la nisina y representación de los aminoácidos que la comprenden.....	29
3.	Estructura química de la nisina y señalización de los anillos lantínicos y metil-lantionínicos	30
4.	Mecanismo de acción de la nisina contra bacterias sensitivas	35
5.	Proceso de elaboración de la cerveza.....	38
6.	Comportamiento del pH de los posibles medios de cultivo	75
7.	Comportamiento de la turbidez a 25 ° y a 90 ° de los posibles medios de cultivo	76
8.	Comportamiento del color de los posibles medios de cultivo.....	76
9.	Comportamiento de la concentración de polifenoles en los posibles medios de cultivo	77
10.	Comportamiento del grado de fermentación de los posibles medios de cultivo.....	77
11.	Comportamiento del grado de alcohol de los posibles medios de cultivo	78
12.	Comportamiento del nivel de amargura de los posibles medios de cultivo	78
13.	Comportamiento de la densidad de los posibles medios de cultivo	79
14.	Comportamiento de la gravedad de los posibles medios de cultivo.....	79
15.	Comportamiento del valor calórico de los posibles medios de cultivo...80	

16.	Comportamiento de la concentración de antocianógenos en los posibles medios de cultivo	80	
17.	Eficiencia de recuperación de nisina en función del método de recuperación utilizado	81	
18.	Eficiencia de recuperación de nisina en función del posible medio de cultivo		82
19.	Promedio de la eficiencia de recuperación de nisina en función del método de recuperación utilizado	83	
20.	Actividad biológica de la nisina recuperada en función del método de recuperación utilizado	83	
21.	Miligramos de nisina pura recuperada en función del método de recuperación utilizado	84	
22.	Miligramos de nisina pura recuperada en función del posible medio de cultivo	84	

TABLAS

I.	Aspectos relevantes de la purificación de bactericidas	41
II.	Variables dependientes, independientes y de respuesta, de la caracterización de los posibles medios de cultivo	57
III.	Variables envueltas en la recuperación de la nisina a partir de los subproductos de una cervecería	58
IV.	Toma de datos originales diario para la caracterización de los posibles medios de cultivo	66
V.	Toma de datos originales para la medición de las zonas de inhibición para el método KB/DAS	67
VI.	Datos individuales de procesamiento de datos para la caracterización de los posibles medios de cultivo	68

VII.	Datos generales de ordenamiento de datos para la caracterización de los posibles medios de cultivo	68
VIII.	Datos individuales de procesamiento de datos para la evaluación de los protocolos de recuperación de nisina.....	69
IX.	Experimento de dos factores.....	70
X.	Varianza en un experimento de dos factores	72

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
Act.	Actividad antimicrobiana específica
Dzi	Diámetro de la zona de inhibición microbiana
°C	Grados Celsius
g	Gramo
H_i	Hipótesis alternativa
H_o	Hipótesis nula
µm	Micrómetro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
N. C.	Nisina comercial
N. P.	Nisina pura
N. R.	Nisina recuperada
PM	Peso molecular
%	Porcentaje
In	Pulgadas
F	Significancia
T	Temperatura
IU	Unidades Internacionales

GLOSARIO

- Actividad bactericida** Actividad antimicrobiana que produce la muerte de una bacteria, provocado por una sustancia bactericida.
- Actividad bacteriostática** Actividad antimicrobiana que no produce la muerte de la bacteria, sino que impide la reproducción microbiana.
- Afrecho** Es el término que se utiliza para denominar, en forma genérica, al material recuperado procedente de la molienda de los cereales cuya cáscara es desmenuzada en el mencionado proceso. Es un subproducto del proceso de molienda y cocimiento de los cereales para la elaboración de la cerveza.
- Agar** Carbohidrato complejo gelatinoso (hidrocoloide) extraído de algas marinas, utilizado en microbiología como un medio de cultivo de bacterias.
- Aminoácidos** Son biomoléculas formadas por un grupo carboxilo y uno amino. Son unidades químicas o elementos constitutivos de las proteínas que, a diferencia de los demás nutrientes, contienen nitrógeno.

ANOVA

Es una técnica estadística que utiliza la comparación de grupos de medias independientes entre sí para establecer semejanzas y diferencias entre tres o más grupos distintos, con el fin de determinar si los valores medios son iguales entre los distintos grupos estudiados.

Antocianógenos

Son una forma especial de antocianidinas, clasificados como un grupo de colorantes vegetales con una base fenólica que aporta el característico color a la cerveza. Son de alta importancia en el análisis de la calidad de la cerveza, ya que al combinarse con proteínas forman taninos que ocasionan turbiedad en la cerveza.

ATP

Abreviación de adenosín trifosfato, es un nucleótido de importancia fundamental como transportador de energía química en el organismo vivo.

Bactericida

Son sustancias con actividad antimicrobiana que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de determinadas bacterias sensibles. Son excretadas por los organismos como medios defensivos contra las bacterias.

BU	Responde a las siglas <i>Bittering Unit</i> (unidad de amargor), y mide la cantidad de alfa-ácidos isomerizados durante el hervido del mosto. Estos alfa-ácidos son los compuestos químicos que se encuentran en el lúpulo y que contribuyen al sabor amargo de las cervezas.
Cerveza	Es una bebida de bajo contenido alcohólico resultante de fermentar con levaduras seleccionadas, el mosto elaborado con malta de cebada, arroz, maíz, lúpulo y agua.
Curva de calibración	Es un método matemático muy utilizado en química analítica para determinar la concentración de una sustancia (analito) en una muestra desconocida. El método se basa en la relación proporcional entre la concentración y un determinado parámetro analítico (propiedad).
Difusión	Es un proceso físico irreversible, en el que partículas materiales se introducen en un medio que inicialmente estaba ausente y aumenta la entropía (desorden molecular) del sistema.

Diacetilos	Es un subproducto procedente del inicio de la fermentación del mosto. Se percibe como sabor a mantequilla en la cerveza. Los diacetilos suelen ser consumidos por las levaduras al final de la fermentación; sin embargo, si se ha producido una cantidad excesiva de diacetilos, debido a un inicio débil de la fermentación o por una oxigenación insuficiente, la levadura no lo absorberá y se considerará como una contaminación en la cerveza.
Esporas	Son microorganismos, tanto unicelulares como pluricelulares, que se separan de la planta con el fin de dispersarse y sobrevivir ante condiciones ambientales desfavorables.
Extracto aparente	Es la cantidad residual de sólidos disueltos en el mosto (azúcares) que queda en la cerveza luego de la fermentación, reportada normalmente como gravedad específica, y se mide en grados Plato (°P),
Extracto original	Es la cantidad total de sólidos disueltos que contiene el mosto previo al proceso de fermentación.
Extracto real	Es la cantidad real de sólidos totales en el mosto, corregida por la cantidad de alcohol en la solución luego de la fermentación.

FDA

Es el acrónimo de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA o USFDA con sus siglas en inglés), agencia federal del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos. La FDA es responsable de proteger y promover la salud pública a través del control de la inocuidad de los productos farmacéuticos y alimenticios.

Fermentación

Proceso anaeróbico de oxidación que genera un compuesto orgánico. La fermentación alcohólica es un proceso realizado por las levaduras que transforma carbohidratos fermentables en alcohol etílico y dióxido de carbono.

Grado Plato

Es una medida de la concentración de sólidos disueltos en el mosto de cerveza y son usados para cuantificar la concentración de extracto (azúcares principales provenientes de la malta) como un porcentaje del peso del extracto seco del mosto original contenido en 100 gramos de dicho mosto a 20 °C; por ejemplo, un mosto con 10°P contendrá 10 g de extracto por 100 g de mosto.

GRAS

Acrónimo de la FDA para identificar un compuesto generalmente reconocido como seguro (por sus siglas en inglés: *Generally Recognized As Safe*). Los aditivos GRAS son aquellos que están permitidos por para el consumo humano sin representar peligro alguno para la salud del consumidor.

Inhibición microbiana	Es la acción que posee una determinada sustancia para prevenir, contrarrestar, impedir y eliminar toda posible reproducción y crecimiento microbiano.
KB/DAS	Son las siglas del método Kirby-Bauer de difusión en el agar sólido para la determinación de la actividad antimicrobiana de una sustancia, mediante un modelo matemático de la concentración de la sustancia inhibidora en función del tamaño de halos de inhibición microbiana.
Lactobacterias	También conocidas como bacterias ácido lácticas (LAB), son un grupo de bacterias grampositivas, no esporulantes, anaeróbicas o aeróbicas facultativas, en forma de cocos o varillas, que producen ácido láctico como uno de los principales productos de fermentación.
Lisozima	Enzima lítico que actúa sobre bacterias grampositivas y destruye la pared bacteriana. Se encuentra naturalmente en las lágrimas, la saliva, mucosidades y en la leche materna.
Lúpulo	Planta de la familia de las <i>cannabáceas</i> , cuya flor es utilizada en la elaboración de la cerveza. Es la responsable de aportar el amargor y que la cerveza exprese mejor algunos aromas y sabores propios.

Medio de cultivo	Son una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permite el crecimiento de microorganismos. Diferentes concentraciones de bases carbohidratos, sales minerales y demás nutrientes permiten tener medios de cultivo para aplicaciones y microorganismos específicos.
Molécula anfifílica	Son moléculas que tienen propiedades hidrofílicas e hidrófobas a la vez, debido a que en su estructura molecular hay un extremo apolar que retiene las materias grasas y otro extremo polar que es miscible en agua.
MRS (agar)	El agar MRS fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe para proveer un medio de cultivo que pudiera evidenciar un buen crecimiento de lactobacilos y otras bacterias ácido-lácticas
NBB-A (agar)	Es un medio de cultivo selectivo tipo agar sólido con la característica de poder utilizarse mediante la simple licuefacción directa. Es utilizado para el aislamiento, cultivo y detección cuantitativa de cervezas filtradas.
NBB-B (agar)	Es un medio de cultivo líquido tipo caldo, utilizado para la fácil y rápida detección de trazas en muestras de levadura y microorganismos que estropean a la cerveza.

Nisina	Es un péptido pentacíclico compuesto por 34 aminoácidos, producido por ciertos tipos de la bacteria <i>Lactococcus lactis subp. lactis</i> bajo condiciones óptimas de fermentación.
Peptidasas	También conocidas como proteasas o proteinasas, son enzimas que separan 2 aminoácidos, lo que provoca una ruptura en los enlaces peptídicos, entre un átomo de carbono y un átomo de nitrógeno, en el seno de las proteínas.
Péptido	Son moléculas formadas por la unión de dos o más aminoácidos mediante enlaces peptídicos. Se diferencian de las proteínas al tener una cantidad menor de aminoácidos y un tamaño molecular menor.
Polaridad	Es una propiedad de las moléculas que representa la separación de las cargas eléctricas en la misma molécula. La polaridad es el grado con el cual la distribución de la densidad electrónica que rodea a una molécula no es homogénea. Son polares las moléculas en las cuales los elementos electronegativos se aglutinan en una cierta zona de esta; también son polares si no hay una simetría en la distribución de los átomos en la molécula.

Polifenoles	Son compuestos fenólicos provenientes de la malta y los lúpulos. La estructura y el tamaño de la molécula influyen en gran medida en diversas características de la cerveza; por ejemplo, el color, el sabor, la estabilidad del sabor, la espuma y la estabilidad fisicoquímica
Precipitación	Es el proceso en donde se forma un material insoluble en un fluido. La precipitación puede producirse por una reacción química de dos o más iones en solución o por un cambio de la temperatura de una solución saturada.
Preservante	Los preservantes o conservantes son sustancias añadidas a los alimentos (bien sea de origen natural o artificial) para detener o aminorar el deterioro causado por la presencia de diferentes tipos de microorganismos, como bacterias, levaduras, mohos, etcétera.
Surfactantes	También conocidos como tensoactivos, son compuestos anfifílicos que disminuyen la tensión superficial entre 2 líquidos o bien, 2 fluidos.
Zona de inhibición	Es la zona alrededor de un disco de antibiótico en donde no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen. Es una medida de la potencia del antibiótico frente a la bacteria.

RESUMEN

El objetivo principal del presente estudio es la evaluación de cuatro diferentes métodos de recuperación de nisina, tomando como parámetros de comparación los rendimientos obtenidos, la cantidad de nisina recuperada y las propiedades fisicoquímicas de cinco medios de cultivo que contienen azúcares fermentables provenientes de una cervecería.

Se analizaron cuatro métodos de recuperación, con el uso únicamente de reactivos de grado alimenticio: ácido cítrico, alcohol etílico al 70 % v/v, sulfato de amonio e hidróxido de calcio. Se utilizaron cinco posibles medios de cultivo para la inserción de la nisina: mosto, extracto de afrecho, extracto de trub, extracto de levadura y las últimas aguas del lavado del filtro Lauter. La actividad antimicrobiana de las muestras recuperadas fue determinada a través del método de Kirby-Bauer de difusión a través de agar sólido (KB-DAS).

Mediante el análisis estadístico se logró determinar que sí existe diferencia significativa entre cada uno de los métodos evaluados. El método con el mayor rendimiento fue el sulfato de amonio en mosto, con una recuperación del 80,07 %. El método de etanol + NaCl presentó las eficiencias de recuperación más altas para los cinco medios evaluados, con un promedio de recuperación del 61,35 %. Además, se determinó que las muestras de las últimas aguas del filtro Lauter y el extracto de afrecho son los medios con las características óptimas para la producción y recuperación de nisina.

Las condiciones promedio bajo las que se trabajaron fueron de 0,842 atm y 23 °C.

OBJETIVOS

General

Evaluar cuatro diferentes métodos de recuperación de nisina, utilizando como parámetros de comparación el rendimiento, la cantidad de nisina recuperada y las propiedades fisicoquímicas de cinco medios de cultivo provenientes de una cervecería.

Específicos

1. Establecer el método óptimo para la recuperación de nisina a partir de cinco medios de cultivo que contienen azúcares fermentables provenientes de una cervecería.
2. Evaluar y comparar el grado de eficiencia de los cuatro métodos de recuperación para cada uno de los cinco medios de cultivo, utilizando como parámetros de comparación el porcentaje de rendimiento y los miligramos de nisina recuperada.
3. Evaluar y comparar a los cinco medios de cultivo de la nisina para cada uno de los cuatro métodos de recuperación, utilizando como parámetros de comparación a las propiedades fisicoquímicas de los mismos.
4. Realizar la caracterización fisicoquímica de los cinco medios de cultivo utilizados: mosto de 2 tipos de cerveza, extracto de afrecho, extracto de levadura, extracto de trub y las últimas aguas de riego del filtro Lauter.

HIPÓTESIS

Hipótesis conceptual:

Es posible evaluar métodos de recuperación de nisina a partir de medios de cultivo que contienen azúcares fermentables provenientes de una cervecería.

Hipótesis estadística:

Hipótesis nula (H₀):

No existe diferencia significativa en la eficiencia de los métodos de recuperación de nisina en función de los posibles medios de cultivo.

$$\mu_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_n$$

Hipótesis alternativa (H_i):

Sí existe diferencia significativa en la eficiencia de los métodos de recuperación de nisina en función de los posibles medios de cultivo.

$$\mu_0 \neq \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \dots \neq \mu_n$$

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, el hombre ha buscado la manera de incrementar el tiempo de vida y preservar la calidad organoléptica de sus alimentos, mediante métodos empíricos de salteado, acidez, altas y bajas temperatura, así como otros métodos y procesos más modernos, como la adición de preservantes artificiales para extender el tiempo de vida de los productos.

Existe una amplia diversidad de preservantes artificiales utilizados en la industria alimenticia; sin embargo, algunos afectan y degradan las características sensoriales originales del alimento, además de ser un riesgo alérgico para personas sensibles.

Últimamente, los consumidores han estado cada vez más y más consternados por los efectos adversos a la salud producidos por aditivos químicos en los alimentos. Han aumentado la demanda de alimentos orgánicos y aditivos naturales. Esto ha incrementado las investigaciones de preservantes naturales tan efectivos como cualquier otro preservante artificial, para el posible reemplazo definitivo de estos.

Las bacterias ácido lácticas (LAB) son microorganismos seguros que han sido aprovechados desde hace miles de años por producir cambios deseables en olor, sabor y textura de ciertos alimentos, además de sus propiedades preservantes naturales. El efecto preservativo de las LAB se debe a su habilidad de liberar sustancias inhibitorias al crecimiento bacteriano, tales como el peróxido de hidrógeno, etanol, diacetilos, dióxido de carbono, y ciertos compuestos antimicrobianos conocidos como bactericidas.

Los bactericidas son un grupo heterogéneo de péptidos extracelularmente liberados por una síntesis ribosomal de la bacteria productora y se han clasificado en cuatro grupos: clase I, lantibióticos (< 5 kDa); clase II, pequeños no lantibióticos (< 10 kDa); clase III, proteínas grandes (> 30 kDa); clase IV, bactericidas complejos compuestos de una mitad proteica y una o más mitades químicas (lípidos o carbohidratos).¹

Varios bactericidas naturales pueden implementarse efectivamente como inhibidores bacterianos; sin embargo, únicamente la nisina está catalogada como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) por la FDA (Food and Drugs Administration), lo cual permite el uso comercial en alimentos como biopreservantes naturales, es aceptada en más de 48 países alrededor del mundo.

La nisina es un péptido pentacíclico compuesto por 34 aminoácidos, producido por ciertos tipos de la bacteria *Lactococcus lactis subsp. lactis* bajo condiciones óptimas de fermentación, en medios compuestos de sólidos lácteos no grasos o fuentes fermentativas no lácteas, tales como el extracto de levadura y carbohidratos sólidos.²

El proceso cervecero tiene subproductos que contienen azúcares fermentables y que representan una fuente fermentativa como potencial medio de cultivo para la inserción de la bacteria productora.

¹PARENTE, EUGENIO. *Production, recovery and purification of bacteriocin from lactic acid bacteria*. 12 p.

²SUGANTHI, VICTOR. *Lantibiotic Nisin: Natural preservative from Lactococcus lactis* 7 p.

La nisina posee actividad inhibitoria contra una amplia gama de bacterias grampositivas, incluyendo sus formas esporuladas. Cheeseman demostró que la nisina es estable a altas temperaturas, especialmente en condiciones ácidas, resiste a procesos de esterilización y pasteurización de alimentos.³

La nisina no interactúa con las propiedades organolépticas ni fisicoquímicas originales de los alimentos y tampoco representa un riesgo tóxico para los humanos, ya que se desintegra naturalmente en el intestino humano, por su estructura proteica.

La mayor limitante de los métodos de recuperación actualmente conocidos consiste en la utilización de reactivos nocivos para la salud del consumidor, además de ser métodos complejos, con bajo rendimiento y costos altos de operación. De modo que este estudio aplicará métodos de recuperación exclusivamente con uso de reactivos de grado alimenticio.

Con el fin de evaluar la efectividad de los métodos de recuperación empleados en función de la concentración de nisina recuperada, se utilizará el método de difusión en agar sólido (test de sensibilidad antibiótica Kirby–Bauer).

Se establecerá una curva de calibración logarítmica junto con un modelo matemático de las zonas de inhibición microbiana en función de la concentración de nisina pura/recuperada. Se inoculará el agar con *Micrococcus Luteus*, se verterá el agar en platos Petri y se dejará solidificar. Se abrirá 4 orificios de 5mm de diámetro en donde se inyectará las soluciones de nisina; se dejará incubar aeróbicamente a 28 °C por 4 días. Se evidenciarán zonas de inhibición de crecimiento microbiano ante la presencia de nisina.

³CHEESEMAN, GARY. *An improved method of preparing Nisin*. 6 p.

1. MARCO CONCEPTUAL

1.1. Antecedentes

A continuación, se presenta la información de los trabajos de investigación análogos utilizados para estructurar el proyecto:

1.1.1. **Cheeseman, Gary. An improved method of preparing Nisin. 1956.**

En el año 1957 se realizó un estudio con un método mejorado para la preparación de nisina donde se menciona al *Streptococcus lactis 354/07* como bacteria productora. Utilizaron el método turbidimétrico para controlar el crecimiento de la bacteria, basado en la densidad óptima de las muestras.

Se explica el procedimiento para preparar una fermentación a gran escala, a partir de una ampolla de 10 mL hasta un tanque de 150 L, mediante sucesivas inoculaciones e incubaciones. Se menciona que el rango de pH ideal del medio de cultivo para la producción de nisina está entre 5,9 a 6,1, y un pH de 1,8 a 2,0 para detener la fermentación del medio. Se describe también que ya se había observado el comportamiento de la nisina en condiciones ácidas, cuando presentaba su mayor producción y estabilidad.

Se presenta el método para la recuperación de nisina, el cual consiste, en general, en la implementación de solventes orgánicos (n-propanol, butanol, acetona, cloroformo, urea, petróleo ligero, amoníaco y ácido clorhídrico) junto con una precipitación salina (cloruro de sodio y fosfato monopotásico). Este método logra un 50 % a 60 % de recuperación de nisina.

Se determinó que en cada precipitación se observaba, al menos, dos fases en cada muestra: una fase flotante superior y otra de precipitados interfaciales o al fondo de las soluciones. La mayor cantidad de nisina se encontraba en la parte superior o inferior de las muestras, y se desechaba aproximadamente 20 % a 30 % de nisina presente en el resto de la solución.

Con el fin de incrementar el nivel de recuperación de nisina, se utilizaron las fases residuales y se concentraron más las fases recuperadas con mayor cantidad de soluto, en sucesivas precipitaciones salinas; sin embargo, se observaron pérdidas en la actividad antimicrobiana. Se recomienda siempre utilizar el primer precipitado obtenido del proceso.

Los autores Cheeseman y Berridge recomiendan el uso de la decantación, centrifugación y la adición de los reactivos en frío, para poder aprovechar al máximo la disminución de solubilidad de la solución a bajas temperaturas, y así obtener una mayor cantidad de precipitados. Los autores también recomiendan la concentración de las soluciones mediante rotoevaporación (evaporación al vacío en baño maría).⁴

⁴CHEESEMAN, GARY. An improved method of preparing Nisin. 6 p.

Se observó que el precipitado era mucho mayor con las soluciones donde se utilizó solamente alcohol en vez de acetona, y que la adición de grandes cantidades de este último, disminuían la actividad antimicrobiana de la nisina, por lo que se evitará el uso de este solvente en investigaciones futuras.

Se concluyó que el uso de cloroformo, butanol, propanol y acetona presentó pérdidas de recuperación de soluto debido a que, además de disminuir la actividad antimicrobiana, estos solventes lograban precipitar proteínas desnaturalizadas debido a la formación de complejos entre la nisina y las proteínas derivadas de la bacteria, posiblemente por reacciones químicas.

1.1.2. Parente, Eugenio. Production, recovery and purification of bacteriocin from lactic acid bacteria. 1999.

El trabajo aborda la investigación desde un sentido teórico, presenta información sobre la producción y purificación de bactericidas de clase I y clase II, factores que influyen en la producción y técnicas para la recuperación y purificación de nisina.

Dentro de la estructura y modo de acción de la nisina, la operación de los bactericidas siempre incluye genética especial para inmunidad específica; es por eso por lo que las células de las bacterias productoras no se ven afectadas por sus propios bactericidas.

Se describe que en la producción de nisina existen ciertos factores que disminuyan el rendimiento de producción, como por ejemplo la adsorción de bactericidas a las células productoras o la degradación por proteasas específicas y no específicas.

Este efecto tiene el punto máximo en un rango de pH de 5,5- 6,5 y decrece conforme disminuya el pH, lo cual indica que un control sobre el pH de las soluciones es crítico para el desempeño de la bacteria; se recomienda trabajar en pH cercanos a 2.⁵

La producción de bactericidas se ve significativamente afectada por el nivel y el tipo de fuente de carbono, nitrógeno y fosfatos, así como los cationes, detergentes e inhibidores presentes en los medios matrices de cultivo. nisina Z puede producirse de fuentes de carbohidratos como la glucosa, sacarosa y xilosa, pero los mejores resultados se observaron al utilizar glucosa (4000 IU/mL).

En procesos por lote, bajo condiciones controladas, la tasa de producción y la cantidad final bactericida producida están afectadas directamente por la concentración inicial de carbohidratos. Sin embargo, ya que las lactobacterias son microorganismos nutricionalmente delicados, el crecimiento y la producción de bactericida están frecuentemente limitados por las fuentes de nitrógeno orgánico más que de las fuentes de carbono, ya que se encontró que la máxima concentración de nisina incrementaba frente al aumento de contenido de nitrógeno orgánico.

El autor menciona haber utilizado varios medios alternativos como fuentes de nutrientes: harinas de semillas de algodón, harinas de pescado, suero de productos lácteos, residuos de filtrados y extracto de levadura.

⁵PARENTE, EUGENIO. *Production, recovery and purification of bacteriocin from lactic acid bacteria*. 12 p.

Se menciona también los beneficios de la presencia de los iones Mg^{+2} y Ca^{+2} en las soluciones matrices, ya que estos desplazan las moléculas de nisina de la superficie de las células de la bacteria productora y decrecen la adherencia celular entre sí.

Además, el Ca^{+2} neutraliza la actividad de la peptidasa (NisP), la cual representa el precursor de la proteólisis que decrece significativamente la actividad antimicrobiana de la nisina.

Se recomienda basarse en la naturaleza catiónica e hidrofóbica de los bactericidas para mejorar la eficiencia de los procesos de recuperación y purificación. Se fracciona las fases mediante una precipitación salina, con sulfato de amonio; se sigue con una centrifugación y varias combinaciones de cromatografías de intercambio iónico e interacción hidrofóbica, y se termina con una RP-HPLC.

Este procedimiento presenta una muy buena opción en términos de recuperación; sin embargo, esta metodología es impráctica para recuperaciones de bactericidas a escala industrial, debido a los altos costos de operación y a la pequeña cantidad de nisina recuperada; es decir, que los métodos cromatográficos recuperan una muy buena proporción de nisina presente en la solución, pero en cantidades muy pequeñas, insuficientes como para su posible aplicación en lotes industriales de producción alimenticia.

Los métodos cromatográficos pueden ser remplazados y complementados por el concepto de precipitaciones isoeléctricas. Además, se recomienda que todos los procedimientos se realicen a bajas temperaturas, para disminuir la solubilidad de las soluciones e incrementar la cantidad de precipitados.

1.1.3. Weber, Peter. Resistance of Bacillus: preparation of nisin. 2004.

En este trabajo se evaluaron 5 medios de cultivo (BHI puro, BHI + 1 % de glucosa, BHI + 1 % de sacarosa, BHI + 3 % de extracto de levadura y leche descremada) y un método de purificación de nisina, mediante una precipitación salina con sulfato de amonio (saturación al 40 %, 50 % y 60 %).

Se inocularon los medios con *Lactococcus lactis* para la producción y recuperación de nisina. Se procede a concentrar, centrifugar y filtrar las soluciones. Se utiliza una unidad de ultrafiltración con membranas con poro de corte de peso molecular específico (10000 Da).

Para la determinación de la concentración de nisina recuperada, se utilizó el método de zonas de inhibición con 2 bacterias identificadoras: *Lactobacillus viridescens* y *Bacillus cereus*; sin embargo, hay que inocular el agar completo con la bacteria identificadora y permitir la difusión de la nisina a través del agar. Evitar el método de una película de la bacteria sobre el agar solidificado.

El mejor medio para trabajar fue el de BHI + 3 % de extracto de levadura, ya que fue el medio más apegado al estándar con nisina pura. Se determinó que una saturación del 50 % de sulfato de amonio fue suficiente para precipitar todas las sales de nisina de la solución.

A partir del método estadístico indica que la actividad y cantidad recuperada de nisina no dependen del medio de cultivo empleado, sino de las características del método de recuperación por utilizar.

1.1.4. Xiao, Dan. Nisin extraction capacity of aqueous ethanol and methanol from a 2,5 % preparation. 2010.

En el estudio se decidió utilizar alcoholes y basarse en la extracción de las proteínas de una solución mediante la adición de solventes polares. Se utilizaron concentraciones de 0, 10, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 % v/v para ambos alcoholes con 1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000 y 15000 ppm de nisina agregada.

Para determinar la concentración de nisina recuperada, se utilizó el método de difusión en agar sólido con *Micrococcus luteus* como bacteria identificadora de presencia de nisina. Se estableció una curva de calibración con soluciones estandarizadas de nisina pura, con concentraciones de 50 hasta 1500 IU/mL.⁶

Se aplica la depuración de métodos cromatográficos para la purificación de la nisina, debido a que su costo es demasiado alto para la producción de ingredientes alimenticios; además, se discrimina la utilización de triton X-100, tolueno y cloroformo, debido a que son solventes tóxicos e impedirían la utilización de la nisina recuperada en aplicaciones alimenticias.

Se realizaron pruebas control con diferentes concentraciones de alcohol, con el fin de verificar que la inhibición microbiana ocurre por las propiedades antimicrobianas de la nisina exclusivamente.

⁶ TAYLOR, TRUCE MARTIN. *Extraction of Nisin from a 2.5 % commercial Nisin product using methanol and ethanol solutions*. 16 p.

Se observó que, a mayor grado de alcohol, se obtenía una menor recuperación (arriba de 90 %). Las concentraciones bajas de alcohol (0-10 %) no fueron suficientes para recuperar nisina. El grado de alcohol óptimo para el metanol es de 80 % y 50 % de etanol, ambos para 1000 ppm de nisina. Se observó que la mayor recuperación se obtuvo para 2000 ppm de nisina y 70 % de etanol, y se recuperó 84,7 % de nisina.

No se observaron zonas de inhibición en ninguna prueba de control, en ninguna concentración de metanol ni de alcohol, inclusive el etanol de 70 %, el cual es utilizado ampliamente como agente antimicrobiano.

Durante el método de difusión en agar sólido, la nisina es el péptido hidrofóbico que debe difundirse a través del agar para lograr las zonas de inhibición microbiana, por lo que la presencia de un alcohol en concentraciones suficientemente altas ayuda a la difusión de nisina a través del agar y permite que las zonas de inhibición sean más grandes.

Se realiza la comparación básica entre estos dos alcoholes, una de ellas es la polaridad, la cual decrece al aumentar el número de carbonos en la cadena del compuesto, lo cual indica que el etanol es más no polar que el metanol; por lo tanto, la mayor solubilidad de nisina en una solución acuosa de alcohol corresponderá a una menor concentración de etanol que en una de metanol. Además, la diferencia de polaridad puede no favorecer a la difusión en el agar.

Se debe trabajar con etanol al 70 % v/v para futuros estudios. La polaridad intermedia y el grado GRAS, a diferencia de que la ingestión de metanol representa peligro para el consumo humano.

Para lograr un mejor terminado en el producto final, se recomienda la rotoevaporación para separar los alcoholes y concentrar la solución, así como la utilización del secado por aspersión, para disminuir la humedad del producto y obtenerlo en una presentación en polvo.⁷

1.1.5. Suganthi, Vanessa. Lantibiotic Nisin: natural preservative from lactococcus lactis. 2012.

El trabajo se maneja desde un sentido de investigación teórica, recopila información del *Lactococcus lactis*, de la nisina, su estructura y características químicas, su modo de acción e interacción con ingredientes alimenticios. Se menciona los conceptos básicos utilizados en la producción y purificación de la nisina. Se incluye también algunas aplicaciones actuales de la nisina en el mercado alimenticio.

Se menciona la solubilidad y estabilidad de la nisina en soluciones ácidas: a un pH de 2 en solución acuosa, la solubilidad de la nisina es de 57 mg/mL. En contraste, se habla que la solubilidad decrece dramáticamente en soluciones básicas, donde también pierde su actividad biológica natural.

Se describe los factores generales que influyen la producción de bactericidas, como el pH, la temperatura, la concentración de nitrógeno, las fuentes de carbohidratos y la presencia de elementos esenciales como vitaminas y oligoelementos.

⁷XIAO, DAN. *Nisin extraction capacity of aqueous ethanol and methanol from a 2,5 % preparation.* 6 p.

Generalmente, los procesos de purificación consisten en 4 pasos: una concentración de la solución, seguida con una precipitación salina de la fase supernadante, una cromatografía de intercambio catiónico y terminando con una cromatografía HPLC de fase reversa.

Una de las limitantes de estos procedimientos son las bajas eficiencias, las concentraciones bajas de producto y los altos costos de operación. Se recomienda la utilización de medios alternativos, como medios residuales o subproductos de procesos establecidos; por ejemplo, los desechos del cultivo de papa o extractos fermentados de cebada, ambos contienen fuentes suficientes de carbohidratos.

Para la concentración de las soluciones, el autor recomienda aprovechar las propiedades de los bactericidas y sus características hidrofóbicas como la afinidad con solventes orgánicos, la variación de solubilidad en soluciones salinas concentradas (utilizando sulfato de amonio o silicato de calcio hidratado) y a un pH determinado (punto isoeléctrico de la nisina).

Se presenta algunas de las aplicaciones más comunes de la nisina en la industria de productos lácteos, cárnicos, marinos, así como algunas recientes investigaciones para su aplicación en la medicina humana y veterinaria.

Una de las aplicaciones más interesantes de la nisina es la preservación de bebidas alcohólicas, como la cerveza y el vino. La nisina es agregada al proceso para controlar y prevenir posibles contaminaciones, reducir el tiempo de pasteurización, brindar una mayor seguridad durante el trasiego y llenado, así como extender el tiempo de vida del producto final.

La adición de nisina permite incrementar la producción de alcohol, ya que, al erradicar posibles bacterias del medio, permite que la levadura tenga un mejor desempeño al tener menos competencia por el sustrato. Se ha demostrado que las levaduras fermentativas no son afectadas por la presencia de la nisina.

1.1.6. Müller-Auffermann, Keith. Nisin-producing microorganisms and their implementation in brewers' wort. 2014.

En el año 2014 se realiza el informe de los microorganismos productores de nisina y su implementación en mosto cervecero, y la nisina y su uso en cervecerías: una revisión y discusión.

En ambos trabajos se evaluó la implementación del mosto como posible medio de cultivo para la inserción de la bacteria productora de nisina, el *Lactococcus lactis subsp. lactis* y varias cepas de esta misma bacteria. Se determinaron las características y parámetros ideales para el adecuado desempeño de la bacteria para la producción de bactericidas.

En dichos trabajos se recomienda la evaluación de mosto diluido, extracto de afrecho, extracto de trub, extracto de levadura y las últimas aguas, entre otros efluentes del proceso cervecero, para su posible aplicación como medio matriz para la producción de nisina.

A partir de los antecedentes y trabajos análogos, se recopilaron detalles relevantes para ejecutar la experimentación tomando en cuenta las recomendaciones indicadas. Además, se recopilaron, depuraron y diseñaron los protocolos y estrategias de recuperación adecuados a la experimentación.

1.2. Justificación

Las tendencias en el mercado han tenido un interés creciente hacia el consumo de alimentos naturales, de modo que se busca la reducción y sustitución de aditivos químicos por aditivos naturales. Un preservante ideal deberá asegurar la preservación, inocuidad, seguridad y calidad del producto, sin que ello afecte negativamente a las características sensoriales y nutritivas originales del alimento.

Comúnmente, se ha practicado la adición de preservantes artificiales a los alimentos, tales como el benzoato de sodio, sorbato de potasio, lactato de sodio, diacetato de sodio, leche y nitrito de sodio, ácido sórbico, entre otros; sin embargo, estos preservantes limitan, cambian y degradan las características originales del alimento; asimismo, aproximadamente un 2,5 % de la población mundial presenta algún tipo de alergia antes alguno de estos preservantes artificiales.

Una alternativa trabajada desde hace miles de años es el aprovechamiento de las características preservantes de las lactobacterias (por ejemplo, *Lactococcus lactis*), presentes naturalmente en productos lácteos. Se descubrió que la actividad antimicrobiana de las lactobacterias se debe a que estas producen naturalmente, en condiciones óptimas, biopreservantes naturales, llamados bactericidas, de los cuales, solo la nisina está acreditada para su uso comercial en más de 48 países.

La producción, purificación e incorporación de compuestos naturales con actividad antimicrobiana a los alimentos ha tomado auge debido a que estas tienen un amplio rango antimicrobiano, son estables a altas temperaturas en condiciones ácidas y no interfieren con los demás componentes del alimento.

Por otro lado, una de las desventajas de la nisina es que su costo de producción es relativamente alto, debido a la dificultad de encontrar y mantener las características y condiciones óptimas del medio de cultivo para el eficiente desempeño de las bacterias ácido lácticas productoras de esta.

Existen ciertas limitaciones en la producción de nisina: eficiencias bajas, bajos rendimientos de recuperación y medios de cultivo costosos; de modo que se busca producirla en medios de cultivo provenientes del proceso cervecero, los cuales contienen cierta cantidad de azúcares fermentables, que significan una muy buena fuente de vitaminas y sustratos para la vida de la lactobacteria productora y la producción de nisina.

La utilización de estos subproductos del proceso representa un nuevo uso de materiales que, anteriormente, se pudo haber desechado o desempleado y significarían una mejora en la eficiencia económica del proceso y un aprovechamiento potencial como fuente de ingresos.

Otro factor que incrementa el costo de la producción de nisina son los métodos de recuperación, extracción y purificación parcial actualmente conocidos y aplicados en la industria. Los métodos comúnmente aplicados para la purificación de bactericidas están basados en sus propiedades bioquímicas y características catiónicas y anfifílicas.

Entre los métodos se encuentra la precipitación salina, la adición de solventes polares y orgánicos, las cromatografías de intercambio catiónico y las cromatografías de fase reversa HPLC; sin embargo, la mayoría de estos métodos son costosos y presentan baja eficiencia de recuperación de nisina, lo que dificulta y encarece el proceso de producción.

Generalmente los procedimientos de purificación consisten en la utilización de compuestos tóxicos para el consumo humano, tales como el cloroformo y metanol, lo que impide la reutilización del precipitado en productos alimenticios. Se busca recuperar la nisina (o soluciones concentradas de esta) mediante métodos y compuestos de grado alimenticio, para posibles aplicaciones en productos alimenticios, como preservante natural.

La implementación de la nisina permite reducir tiempos y cantidades de energía consumida en procesos tradicionales de preservación alimenticia (por ejemplo, pasteurización, ebullición y autoclave), así como permite eliminar bacterias patógenas que puedan presentarse durante el proceso de producción (por ejemplo, cocimientos, fermentación y llenado). Estos beneficios permiten la reducción de mermas y costos, así como a un incremento en la seguridad e inocuidad en estos procesos.

En general, el proyecto de recuperación de la nisina caracteriza los posibles medios para la inserción de la bacteria productora *Lactococcus lactis*. Se extrae y purifica la nisina mediante procesos efectivos, seguros y rentables, para la efectiva reutilización como preservante natural en alimentos. La implementación de métodos simples permite la reducción de costos en la viabilidad de la producción de nisina a escala industrial. Se busca un uso alternativo de los subproductos de una planta de producción de cerveza.

1.3. Determinación del problema

El fundamento del trabajo y la delimitación del problema se describen a continuación.

1.3.1. Definición

La necesidad de la reducción y completa sustitución de aditivos químicos ha llevado a la investigación y experimentación con nuevos aditivos naturales; por ejemplo, la implementación de bactericidas (por ejemplo, la nisina) producidos por lactobacterias (por ejemplo, *Lactococcus lactis subsp. lactis*) como biopreservantes naturales, debido a sus propiedades antimicrobianas.

Trabajos análogos han evaluado diversas metodologías de trabajo con el fin de optimizar la producción de bactericidas e inclusive optar por producciones a escala industrial. Esta última se ha visto limitada debido a la dificultad de encontrar y mantener las características y condiciones óptimas del medio de cultivo para el eficiente desempeño de las bacterias ácido lácticas productoras de nisina.

Algunas limitaciones de la producción de nisina a gran escala son las bajas eficiencias de producción, pobres concentraciones de producto, medios de cultivo costosos, procedimientos de recuperación y purificación de bajo rendimiento, larga duración, alto costo de operación, compleja laboriosidad e implementación de reactivos tóxicos o nocivos.

Se busca producir nisina en medios de cultivo provenientes o excedentes de algún proceso industrial; por ejemplo, del proceso cervecero, del cual la mayoría de los subproductos contienen una cantidad considerable de azúcares fermentables. Esto significa una muy buena fuente de vitaminas y sustratos para la vida de la lactobacteria productora y de la producción de nisina.

La utilización de estos subproductos del proceso representa un nuevo uso de estos materiales que, anteriormente, se pudo haber desechado y significarían una mejora en la eficiencia económica del proceso y un aprovechamiento potencial como fuente de ingresos.

Se busca concentrar, recuperar y purificar la nisina mediante diferentes estrategias y protocolos, comprendidos por procesos rentables y asequibles, con el uso exclusivo de reactivos de grado alimenticio. Esto optimizará la producción de nisina y su efectiva aplicación como preservante natural.

1.3.2. Delimitación

El proyecto de recuperación de la nisina a partir de los subproductos de una cervecería que contienen azúcares fermentables caracterizará al mosto, extracto de levadura, extracto de afrecho, extracto de trub y las últimas aguas de dos tipos de cerveza diferentes, para su posible aplicación como medios de cultivo para la inserción de la bacteria productora y la producción de nisina.

Se busca diseñar y evaluar diferentes estrategias y protocolos para concentrar, recuperar y purificar la mayor cantidad posible de nisina, mediante procesos económicos y efectivos, con la utilización exclusiva de reactivos de grado alimenticio. Esto con el objetivo de la efectiva aplicación de nisina como preservante natural en alimentos.

Este trabajo determinará métodos cada vez más baratos (compuestos y procesos) con el fin de disminuir costos en la viabilidad de producir nisina a escala industrial, de manera confiable, eficaz y eficiente; y encontrar un uso alternativo a los subproductos (de desecho, no utilizados o usados en otras aplicaciones) de una planta de producción de cerveza.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Preservación alimentaria

La preservación alimentaria es una lucha continua e incesante contra microorganismos, por diversos propósitos: disponibilidad ante la escasez de alimentos en determinadas temporadas, transportar y comercializar alimentos de una manera fresca y segura, mantener las propiedades organolépticas originales del producto o incrementar el tiempo de vida de algún alimento.

Los productos alimenticios procesados disponibles en el mercado contienen una diversa variedad de preservantes químicos, los cuales alteran los constituyentes químicos, nutricionales y las cualidades organolépticas originales del alimento. Las nuevas tendencias de consumo han optado por alimentos no procesados, ni químicos y con beneficios adicionales saludables, lo que ha creado una alta demanda por alternativas como los biopreservantes.

2.1.1. Biopreservación

Los preservantes naturales han tomado auge dentro del mercado debido a su acción antimicrobiana de amplio espectro contra bacterias patógenas y bacterias descomponedoras, que conservan las características fisicoquímicas y organolépticas originales del producto.

Los bactericidas producidos por lactobacterias (LAB) han sido categorizados como los biopreservantes con mejor desempeño para la preservación de productos lácteos, productos fermentados, carnes, vegetales, entre otros, debido a la actividad antimicrobiana de alto espectro y alta estabilidad en diferentes condiciones de producción y composición de alimentos.

2.2. Microorganismos

A continuación, se presentan los microorganismos envueltos en la producción y recuperación de nisina.

2.2.1. Lactobacterias LAB

Las lactobacterias (LAB) han sido utilizadas desde hace miles de años en la producción de diversos productos alimenticios fermentados, debido a su contribución en el desarrollo y en cambios deseables del sabor, olor y textura de los alimentos, así como por sus propiedades conservantes.

El efecto preservativo de las lactobacterias se debe no solo a las condiciones ácidas que estas bacterias crean en los alimentos, sino también a su capacidad de producir y excretar una variedad de sustancias inhibitorias, tales como el peróxido de hidrógeno, etanol, diacetilos, dióxido de carbono y ciertas sustancias con actividad antimicrobiana, conocidas como bactericidas.⁸

⁸RIBEIRO, SUSANA. *Isolation and characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. 4 p.

2.2.2. **Lactococcus lactis**

El *Lactococcus lactis* es una bacteria homofermentativa, acidoláctica y probiótica, derivada de productos lácteos; es uno de los principales precursores de fermentaciones lácteas. La función primaria del *Lactococcus lactis* es la producción rápida de ácido láctico a partir de la lactosa.

Existen dos subespecies y una biovar de la bacteria: *Lactococcus lactis subsp lactis*, *Lactococcus lactis subsp cremoris* and *Lactococcus lactis subsp lactis* biovar *diacetylactis*.

El *Lactococcus lactis* ha sido empleado en la industria alimenticia por la producción de compuestos con actividad bactericida, además que se ha reportado que mejora la salud gastrointestinal, estimula las funciones inmunológicas y se indica seguro para el consumo humano, ya que, por sus propiedades proteicas, se descompone naturalmente en el intestino humano.⁹

2.2.3. **Bactericidas**

Los bactericidas son proteínas o péptidos naturales, segregados extracelularmente por diversas bacterias productoras como productos primarios o modificados, provenientes de una síntesis ribosomal bacteriana.

Los bactericidas tienen un amplio espectro de actividad bactericida contra bacterias patógenas y bacterias descomponedoras de alimentos; además de tener un sistema de inmunidad inclusivo para la cepa productora y presenta un mecanismo de autoprotección específica.

⁹ BANERJEE, SHIBA PROSAD. *Detection, partial purification and characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus brevis isolated from freshwater fish*. 9 p.

Los bactericidas producidos por bacterias ácido lácticas se han clasificado en cuatro grupos. La clase I, lantibióticos (< 5 kDa), son péptidos de membrana activa que contienen lantionina, β-metil-lantionina y residuos deshidratados (por ejemplo, nisina); clase II, pequeños no lantibióticos (< 10 kDa) son péptidos compuestos de 37-58 aminoácidos, de membrana activa, termoestables y con ausencia de lantionina (por ejemplo, pediocina AcH/PA1); clase III, proteínas grandes (> 30 kDa) termosensibles (por ejemplo, Helveticina J); clase IV, bactericidas complejos compuestos de una parte proteica y una o más partes químicas (lípidos o carbohidratos).¹⁰

Algunos bactericidas clase II han demostrado ser más efectivos que la nisina contra algunos microorganismos patógenos (como el *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*); sin embargo presentan problemas de efectividad y estabilidad en productos alimenticios.

La nisina es catalogada como un bactericida termoestables en condiciones ácidas, no tóxicos y susceptibles a la degradación por las enzimas proteolíticas (proteasas) presentes en el tracto gastrointestinal.

2.3. Nisina

La nisina es un bactericida clase I, compuesto de 34 aminoácidos, con un peso molecular de 3,354 kDa y es producida por ciertas cepas del *Lactococcus lactis subsp. lactis*.¹¹

¹⁰KLAENHAMMER, TONY. *Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. 23 p.

¹¹ABTS, ANDRÉ. *Easy and rapid purification of highly active Nisin*. 10 p.

Tiene un modo de acción inhibitorio de amplio espectro contra bacterias grampositivas, incluidas sus formas esporuladas. Es un bactericida termoestable, sintetizada por el proceso post-traslacional de precursores ribosomalmente sintetizados.

No ha reportado impactos adversos en la salud humana, incluso luego de un consumo a largo plazo, lo cual la ha hecho como el primer y único bactericida usado ampliamente en la industria alimenticia y a escala comercial como preservante alimenticio. Está reconocida como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) por la FDA (*Food and Drugs Administration*) y está permitida como aditivo alimenticio en más de 50 países alrededor del mundo.¹²

Es soluble y sumamente estable en soluciones ácidas; en una solución acuosa de pH 2, la solubilidad es de 57 mg/mL. No obstante, en condiciones básicas, la solubilidad varía dramáticamente, se degrada y convierte en un compuesto biológicamente inactivo debido a modificaciones químicas.

Es un péptido con características catiónicas y anfifílicas. Las regiones hidrofóbicas en las moléculas de la nisina son cruciales para la efectiva actividad contra las bacterias sensibles, debido a que la inactivación de microorganismos por bactericidas depende de la interacción hidrofóbica entre las células bacterianas y las moléculas bactericidas.

2.3.1. Producción

La nisina es producida en medios esterilizados de sólidos lácteos no grasos o en fuentes fermentativas no lácteas, tales como el extracto de levadura y carbohidratos sólidos.

¹²YANG, RON. *Novel method to extract bacteriocins from lactic acid bacteria*. 18 p.

La producción de bactericidas está asociada con el crecimiento de la bacteria productora, pero el rendimiento de la producción de bactericida por unidad de biomasa se ve afectada por diversos factores, en donde influye la cepa productora, el medio de cultivo (fuentes de nitrógeno y carbohidratos, cationes, etc.) y las condiciones de fermentación (pH, temperatura, agitación, aireación y en la tasa de dilución en fermentaciones continuas).¹³

2.3.2. Factores que influyen en la producción de bactericidas a partir de lactobacterias LAB

Se ha mencionado que la producción de bactericidas a partir de lactobacterias está relacionada directamente con el crecimiento bacteriano; sin embargo, debido a la compleja interacción de diversos factores que afectan la producción bactericida y la adsorción celular, una maximización del crecimiento puede no implicar necesariamente en una maximización de la producción bactericida.

Algunos de los factores que influyen significativamente en la eficiencia de la producción de bactericidas son: la cepa productora, el medio de cultivo y las condiciones de fermentación.¹⁴

2.3.2.1. Cepa microbiana productora

Un determinado bactericida puede ser producido por varias cepas o especies de bacterias productoras y se ha demostrado que el rendimiento de la liberación de bactericidas varía en función del tipo de cepa. De Vuyst definió 21 cepas de *Lactococcus lactis* productoras de nisina y 6 no productoras.

¹³DE VUYST, LUC. *Nisin a lantibiotic produced by Lactococcus lactis subsp. lactis: properties, biosynthesis, fermentation and applications*. 11 p.

¹⁴BURIANEK, LOUIS. *Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures*. 6 p.

La resistencia de la nisina depende de la calidad y disponibilidad de nutrientes básicos e incrementa la autoinmunidad de la nisina cuando se encuentra en el mismo medio que la bacteria productora. Esto representa un incremento en el crecimiento de la bacteria productora, de la liberación de nisina y en una mayor productividad de bactericida.¹⁵

2.3.2.2. Medio de cultivo

Es necesario que los medios de cultivo tengan una suficiente disponibilidad de nutrientes tales como los niveles de las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo, de los cationes, surfactantes e inhibidores presentes en el medio matriz.

El rendimiento y la concentración de bactericidas producidos están relacionados directamente con la concentración inicial de carbohidratos y pH controlados. La importancia de las fuentes de carbono es regular la síntesis y actividad de las enzimas formadoras de la pre-nisina.¹⁶

La nisina puede ser producida en medios con diferentes fuentes de carbohidratos como la glucosa, sacarosa y xilosa, en donde la glucosa es la mejor fuente de carbohidratos, seguido de la sacarosa y xilosa.

La producción de bactericidas está limitada por las fuentes de nitrógeno orgánico, ya que la concentración máxima de nisina aumenta ante un incremento del contenido de nitrógeno en el medio de cultivo.

¹⁵ PINGITORE, E. V. *Different strategies for purification of antimicrobial peptides from lactic acid bacteria (LAB)*. 4 p.

¹⁶ PARENTE, E. *Production, recovery and purification of bacteriocin from lactic acid bacteria*. 6 p.

Se ha observado que al utilizar el extracto de levadura como medio matriz, se obtiene nisina con actividad >2000 IU/mL. De igual manera, se observó que al agregar la bacteria productora *Lactococcus lactis subsp. Lactis* ATCC11454 en medios de flujos residuales de procesos de filtración, se obtenía 1,5 más cantidad de nisina.

Los aniones (fosfatos) y cationes (Mg^{+2} , Ca^{+2}) afectan a la producción de bactericidas. Se ha demostrado que el magnesio Mg^{+2} incrementa la producción de pediocina AcH y decrece significativamente la adherencia celular de la nisina al *Lactococcus lactis subsp. Lactis*. Por otro lado, agregar 0,1 M de cloruro de calcio $CaCl_2$ incrementará la cantidad y el ritmo de producción de nisina. El calcio Ca^{+2} activa e incrementa la inmunidad de la peptidasa líder (NisP) y protege la integridad de la membrana citoplasmática o desplazando la nisina Z fuera de la superficie celular.¹⁷

Los medios con porcentajes bajos de alcohol 1 % (v/v) mejoraron la producción de ciertos bactericidas, debido a las propiedades tensoactiva, que provienen de la adsorción de la nisina en la superficie de paredes de polipropileno y vidrio.

La reutilización de subproductos efluentes de un proceso que contengan suficientes niveles de azúcares y proteínas, representan fuentes alternativas de carbono y nitrógeno para el crecimiento y desarrollo de las cepas productoras para la producción de bactericidas.

¹⁷PARENTE, EUGENIO. *Production, recovery and purification of bacteriocin from lactic acid bacteria*. 12 p.

2.3.2.3. Composición de nisina comercial

Podemos encontrar la nisina en presentaciones comerciales, la cual contiene 2,5 % w/w de nisina pura (de acuerdo con el fabricante) y es producida por la fermentación de leche no grasa por ciertas cepas de *Lactococcus lactis subsp. lactis*.

Esta presentación de nisina al 2,5 %, tiene aproximadamente 1×10^6 unidades internacionales (IU) por gramo de masa, la cual generalmente se compone de 74 % de cloruro de sodio, 23 % de sólidos lácteos desnaturalizados y subproductos de la fermentación, entre los cuales se incluyen proteínas y carbohidratos, y 0,5 % de humedad.¹⁸

2.3.2.4. Composición de nisina comercial

La actividad antimicrobiana de la nisina es expresada en Unidades Internacionales (IU), que se refieren a la cantidad de nisina requerida para inhibir el crecimiento de 1 célula bacteriana en 1 mililitro de cultivo. Una IU de nisina representa un equivalente de 0,025 gramos; esto se debe a que la nisina en presentaciones comerciales consiste típicamente de 2,5 % w/w de nisina pura, junto con cloruro de sodio y sólidos lácteos.¹⁹

¹⁸FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) / WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Compendium of food additive specifications, vol. 1: Nisin*. 32 p.

¹⁹RIBEIRO, SUSANA. *Isolation and characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. 4 p.

2.3.2.5. Estabilidad en procesos

La estabilidad de la nisina permite su apto y óptimo desempeño en condiciones habituales de producción y almacenamiento, no afecta directamente a levaduras de fermentación, ejerce su actividad antimicrobiana sin influir en las cualidades organolépticas originales de los productos.

La termoestabilidad es un factor importante si se busca que el bactericida en cuestión tenga aplicaciones alimenticias como preservante natural, debido a los diferentes procesos de producción alimenticia que envuelven al calentamiento como la manera más eficaz de inhibición bacteriana.

La nisina es estable a altas temperaturas en condiciones ácidas (debajo de pH 3); incluso luego de exponerse a autoclaveado a 121 °C por 60 min, como tiempo y temperatura máxima. No obstante, la actividad antimicrobiana decrece drásticamente en condiciones básicas.²⁰

La nisina conserva sus propiedades y actividad antimicrobiana a bajas temperaturas. Banerjee y Ribeiro reportan que la nisina es estable por 60 días a -20 °C y por 20 días a 4 °C. Luego de este tiempo, la actividad decrece. Esto indica que las bajas temperaturas son la técnica más apropiada para la conservación de bactericidas.

La inactivación de bactericidas se puede dar ante tratamientos y procesos que utilicen enzimas proteolíticas, que reportan una disminución en la estabilidad o una pérdida parcial o total de la actividad antimicrobiana, ante la presencia de proteinasa K, proteasa B, tripsina, quimotripsina, papaína, pepsina, proneasa E.

²⁰CHEESEMAN, G. C. *An improved method of preparing Nisin*.3 p.

La actividad antimicrobiana de la nisina no se vio afectada negativamente ante la presencia de lipasa, catalasa, lisozima, α -amilasa y mitomicina C, lo cual confirma su naturaleza proteica.

Se reportó la estabilidad de la actividad antimicrobiana de la nisina en concentraciones salinas de cloruro de sodio al 2 % a 4 %; sin embargo, se observó una disminución en la producción de bactericida en concentraciones mayores de 10 %.

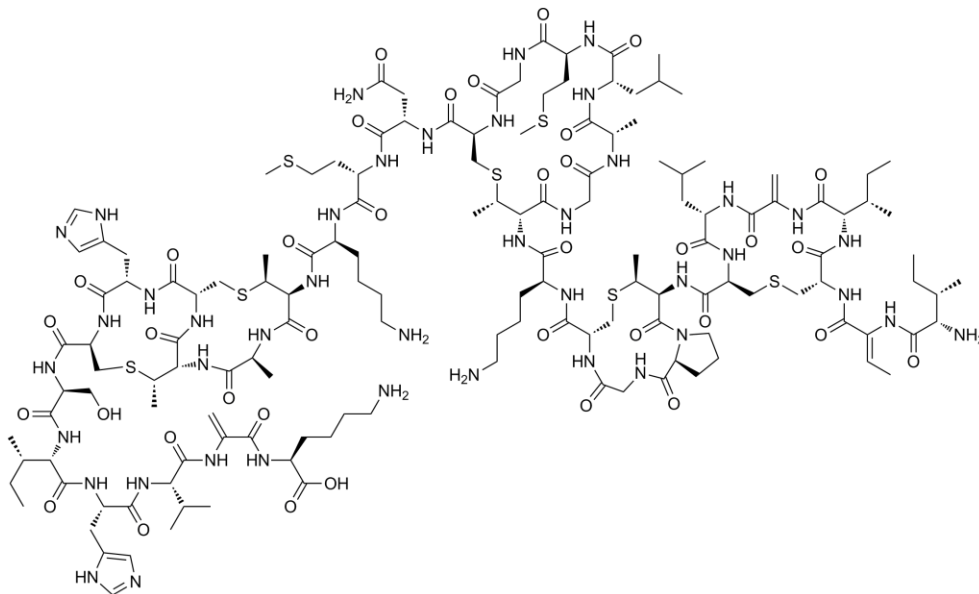
Algunas de las limitaciones que tienen la nisina para su aplicación en productos alimenticios dependen de la actividad ante las interacciones de los bactericidas con los constituyentes alimenticios. La estructura y composición de los alimentos, la capacidad buffer, pH, temperatura, actividad del agua (a_w), atmósfera (O_2 , CO_2), potencial red-ox y la carga microbiana pueden influir significativamente en la actividad de la nisina en productos alimenticios.²¹

²¹BANERJEE, SHIBA PROSAD. *Detection, partial purification and characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus brevis FPTLB3 isolated from freshwater fish.* 9 p.

2.3.3. Fórmula química

Se describe la fórmula química de la nisina A como $C_{143}H_{230}O_{37}N_{42}S_7$.

Figura 1. Estructura química de la nisina



Fuente: FAO-JECFAWHO consulta. *Superseding specifications for Nisin*. 2014. 44 p.

2.3.4. Fórmula química

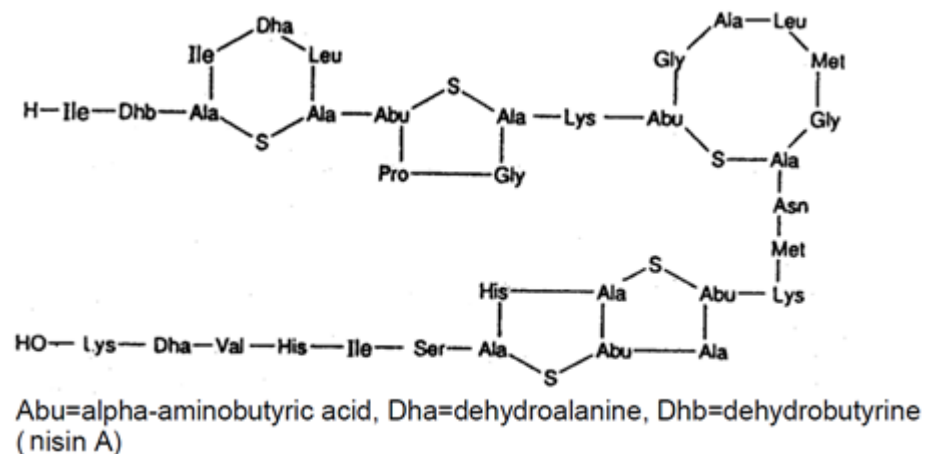
La estructura de la nisina (véanse figuras 1, 2 y 3), reportada por primera vez por Gross en 1971, contiene 34 aminoácidos. La nisina se caracteriza del resto de bactericidas por albergar 4 aminoácidos poco comunes, como la lantionina (Lan), β -metil-lantionina (MeLan), dehidroalanina (Dha) y ácido dehidro-aminobutírico (Dhb), de los cuales, los últimos dos son aminoácidos deshidratados.²²

²² GROSS, ERICK. *Structure of Nisin*. 68 p.

La nisina presenta 5 puentes internos sulfurados también conocidos como anillos intramoleculares, comprenden un anillo lantionínico y cuatro anillos metil-lantionínicos. Son particularmente estos cinco anillos intramoleculares sulfurados los responsables de la actividad biológica de la nisina.²³

Existen solo 3 variantes naturales de la nisina que han sido descubiertas: nisina A, nisina Z y nisina Q. La primera es la forma más prominente y abundante en la mayoría de las condiciones. La nisina Z difiere al tipo A, debido a que contiene asparagina en vez de histidina en la posición 27; sin embargo, ha demostrado una actividad antimicrobiana y modo de acción bastante similar al de la nisina A.

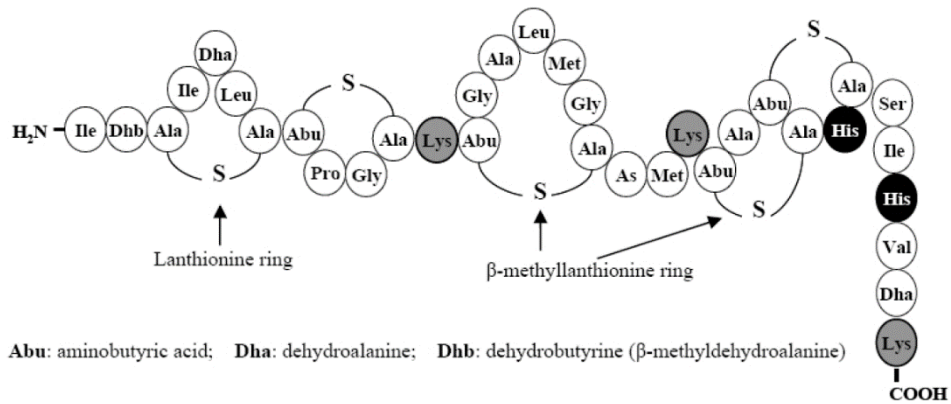
Figura 2. Estructura química de la nisina y representación de los aminoácidos que la comprenden



Fuente: FAO-JECFA/WHO consulta. *Superseding specifications for Nisin*. 44 p.

²³ CHOI, HUBERT-JAY. *Production of a Nisin-like bacteriocin by Lactococcus lactis subsp. lactis. A164 isolated from Kimchi*. 27 p.

Figura 3. **Estructura química de la nisina y señalización de los anillos lantínínicos y metil-lantionínicos**



Fuente: FAO-JECFA/WHO consulta. Superseding specifications for Nisin. 2014. 44 p.

2.3.5. Aplicaciones industriales y comerciales

La nisina (bactericida clase I) es el único bactericida reconocido como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) por la FDA (*Food and Drugs Administration*). Se ha producido industrialmente desde 1953, ha sido empleada como preservante alimenticio natural con el fin de mejorar la seguridad e incrementar el tiempo de vida del alimento. Su uso en alimentos es permitido en más de 50 países alrededor del mundo.

Se ha utilizado para la inhibición de las especies *Clostridium* en quesos procesados, productos lácteos y productos enlatados.²⁴

Tiene la característica de tolerar condiciones ácidas, de altas y bajas temperaturas, lo que permiten su amplio y diverso uso en la leche y productos lácteos, productos cárnicos, con huevo y enlatados, entre otros.

²⁴SUGANTHI, VANESSA. *Lantibiotic Nisin: Natural preservative from lactococcus lactis*. 14 p.

El uso de la nisina en productos lácteos representa la mayor aplicación de nisina hasta el día de hoy. Ha sido aprobada en los Estados Unidos para su uso como agente antibotulinal, en queso procesado. Los usos más populares para el control microbiano contra bacterias ácido lácticas son para su aplicación en cerveza, vino, producciones alcohólicas y comidas de pH bajo.

Varios trabajos han demostrado que las proteínas y los péptidos pueden desempeñar un papel importante en la estabilización de emulsiones. Esto tiene gran importancia, ya que muchos alimentos naturales y procesados consisten en parte o en su totalidad de emulsiones o han estado en estado de emulsión en algún momento durante su producción.

La capacidad de las proteínas y los péptidos para actuar como surfactantes y estabilizar emulsiones depende de su capacidad para absorber en las interfases, reducir en gran medida la tensión interfacial y formar una película cohesiva. Como todas las proteínas son anfifílicas, tienen tendencia a adsorber en las interfases.

Una producción de nisina altamente purificada y mejorada con agentes quelantes, se ha tornado interesante para la aplicación en terapias de úlcera en humanos y para el control de mastitis en ganado.

Un tratamiento con calor logra matar la mayoría de las bacterias patógenas encontradas en el alimento. Sin embargo, ciertas bacterias y esporas son más resistentes a altas temperaturas, por lo que no se garantiza una sanitización completa. Agregar nisina junto con los tratamientos de temperatura significaría una doble barrera ante el crecimiento bacteriano, reduciendo costos y tiempos en un proceso más seguros.

2.3.6. Formas de aplicación e implementación

Las propiedades preservantes de la nisina pueden ser implementadas en diferentes formas de aplicación al producto alimenticio: al agregar el bactericida purificado o concentrado como cualquier otro aditivo alimenticio, con constituyentes inertes o ingredientes secundarios del alimento.

Los métodos actuales de recuperación, concentración y purificación de los bactericidas representan un incremento significativo en los costos de producción, debido a la complejidad y bajo grado de eficiencia.

Existe una segunda alternativa de implementación, la producción de bactericida *in situ*, que consiste en la adición de iniciadores (“*starters*”) de la bacteria productora matriz, en ambientes controlados, que libera a las bacterias directo dentro del mismo alimento. Sin embargo, a pesar de que las lactobacterias son reconocidas como GRAS por la FDA y que estas, junto a sus bactericidas, están presentes en todos los medios naturalmente fermentados, en muchos productos alimenticios, el crecimiento de lactobacterias y sus subproductos puede ser indeseable.²⁵

Por ejemplo, la implementación de la bacteria productora de nisina en productos lácteos representaría un serio problema, debido a que el amplio espectro de inhibición de la bacteria incluye a bacterias ácido lácticas presentes en el producto lácteo. La nisina resistiría al proceso de pasteurización a los cuales la mayoría de los productos lácteos son expuestos.

²⁵ PARENTE, E. *Production, recovery and purification of bacteriocin from lactic acid bacteria*. 3 p.

Ha existido cierta preocupación de los altos niveles de nitrito en carne cruda, lo cual ha motivado la consideración de alternativas de preservación. El objetivo principal es la disminución de los niveles de nitrito; sin embargo, se ha demostrado que la utilización de nisina por sí sola no es lo suficientemente potente, por lo que se le ha utilizado combinada con niveles reducidos de nitrito: 100-250 ppm.

Cuando la nisina es agregada a maltas fermentadas que están contaminadas naturalmente por bacterias ácido lácticas y demás, estas últimas serán controladas e inhibidas, lo que representa un incremento significativo en la producción de alcohol que permite que las levaduras tengan una menor competencia por el sustrato. Las levaduras no se ven afectadas, en ningún momento, por la presencia de nisina o cualquier otro bactericida.

La mayor ventaja de la aplicación de nisina a este tipo de procesos es que cuando esta es agregada a los fermentadores, permite controlar y prevenir contaminaciones, reducir tiempos y energías del proceso de pasteurización e incrementar el tiempo de vida de productos no pasteurizados.²⁶

2.3.7. Mecanismo de acción

La nisina actúa de dos maneras contra las bacterias sensitivas: de manera bacteriostática y bactericida al inhibir la reproducción y el crecimiento de sus formas esporuladas y matar sus células en estado vegetativo.²⁷

²⁶BURIANEK, LOUIS. *Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures*. 6 p.

²⁷RIBEIRO, SUSANA. *Isolation and characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. 4 p.

La actividad contra las endoesporas se debe a los residuos del aminoácido 2,3 didehidro presentes en la nisina, los cuales interactúan con los grupos sulfhidrilo (-SH) de la membrana celular de las esporas germinantes, inactivan a las esporas liberadas, impiden el crecimiento post-germinación y previenen la posible proliferación de más esporas.

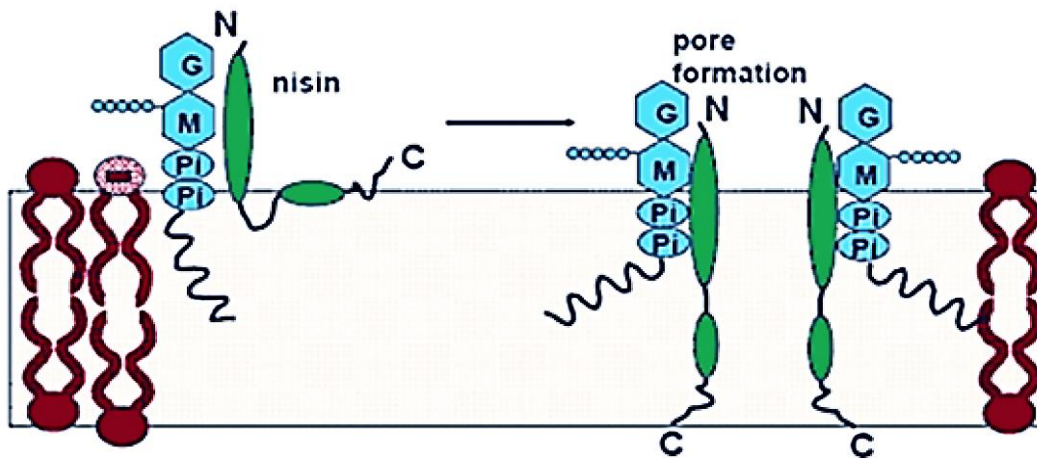
La nisina es activa contra bacterias grampositivas y el mecanismo acción que ejerce en contra de células en estado vegetativo comprende 2 fases: inhibe la biosíntesis del peptidoglucano de la membrana plasmática, mediante la interacción con los lípidos II anclados en la membrana, los cuales son los principales constituyentes y precursores esenciales de la formación de la membrana celular.

El mecanismo de acción toma a la membrana citoplasmática como el principal objetivo de ataque. Este modo de acción se describe como una despolarización voltaje-dependiente de la membrana celular. Esta interacción disipa el potencial de la membrana celular y de sus vesículas citoplasmáticas y artificiales (liposomas) lo que induce a una debilitación, autólisis y ruptura de la membrana celular.

La membrana se permeabiliza mediante la inserción de la nisina dentro de la membrana citoplasmática y forma un poro o canal iónico (ver figura 4) a través del cual se abre paso un flujo de salida de componentes intracelulares vitales como el ATP, solutos de bajo peso molecular como el potasio, protones y aminoácidos. La pérdida de grandes cantidades de potasio influye negativamente en la operación de la presión osmótica celular, provoca una pobre activación enzimática y en una mala la regulación de pH intracelular.²⁸

²⁸MÜLLER-AUFFERMANN, KEITH. *Nisin and its usage in breweries: a review and discussion*. 13 p.

Figura 4. **Mecanismo de acción de la nisina contra bacterias sensitivas**



Fuente: SUGANTHI, VICTOR consulta. *Lantibiotic Nisin: Natural preservative from Lactococcus lactis*. 7 p.

La eficiencia de inserción de la nisina dentro de la membrana citoplasmática depende de la composición de los fosfolípidos y de las características iónicas de los liposomas en la membrana celular, ya que la actividad de la nisina puede verse significativamente reducida por enlaces iónicos que neutralizan la carga negativa de los grupos de fosfolípidos y condensan los lípidos, lo que da resultado una membrana más rígida, lo que dificulta inserción de nisina para la formación de poros.

2.3.8. Espectro de inhibición de la nisina

La nisina es un bactericida producido por la lactobacteria *Lactococcus lactis subsp. lactis* y presenta un amplio espectro de inhibición contra bacterias grampositivas y sus formas esporuladas, en especies tanto móviles (vía flagelos) como inmóviles, con forma de bacilos (*Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Listeria*) o cocos (*Staphylococcus*, *Streptococcus*); con gruesas paredes celulares o sin ellas (*Mycoplasma*).²⁹

Se caracteriza por exhibir una actividad antagonista contra microorganismos estrechamente relacionados a la cepa de la misma especie de la bacteria productora, pero también posee un sistema de inclusión de inmunidad para la cepa productora, presentando una especie de mecanismo de protección específica.

Esto se debe a que la genética que compone la estructura química principal de la nisina y el mecanismo de secreción para la biosíntesis está compuesto de genes proteicos con inmunidad específica, los cuales protegen a las células productoras de sus propios bactericidas.

2.3.9. Sinergia de nisina con otros compuestos

El característico y relativo amplio espectro antimicrobiano de la nisina solo incluye, principalmente, a bacterias grampositivas. Sin embargo, la actividad antimicrobiana de la nisina puede ser asistida mediante un tratamiento complementario, que da lugar a un sistema sinérgico de inhibición.

²⁹PARENTE, EUGENIO. *Production, recovery and purification of bacteriocin from lactic acid bacteria*. 12 p.

La eficacia de la nisina puede ser ampliada para inhibir bacterias grampositivas resistentes y gramnegativas, como la *Escherichia coli* (MTCC 1563) y *Salmonella typhumurium* mediante la combinación con surfactantes, agentes quelantes y adyuvantes, como el ácido EDTA o tratamientos de shock osmótico, para así debilitar o romper la membrana celular.³⁰

2.4. Cerveza

La cerveza es una bebida no destilada procedente de la fermentación alcohólica de los hidratos de carbono de cereales malteados. De la germinación de la cebada surge la malta, la cual se fermenta por acción de ciertas levaduras la que liberan dióxido de carbono, alcohol y derivados.

Según el tipo de fermentación producida, se habla de dos tipos de cerveza distintas:

- Cervezas ligeras o tipo Ale
- Cervezas tipo lager

2.4.1. Proceso de elaboración

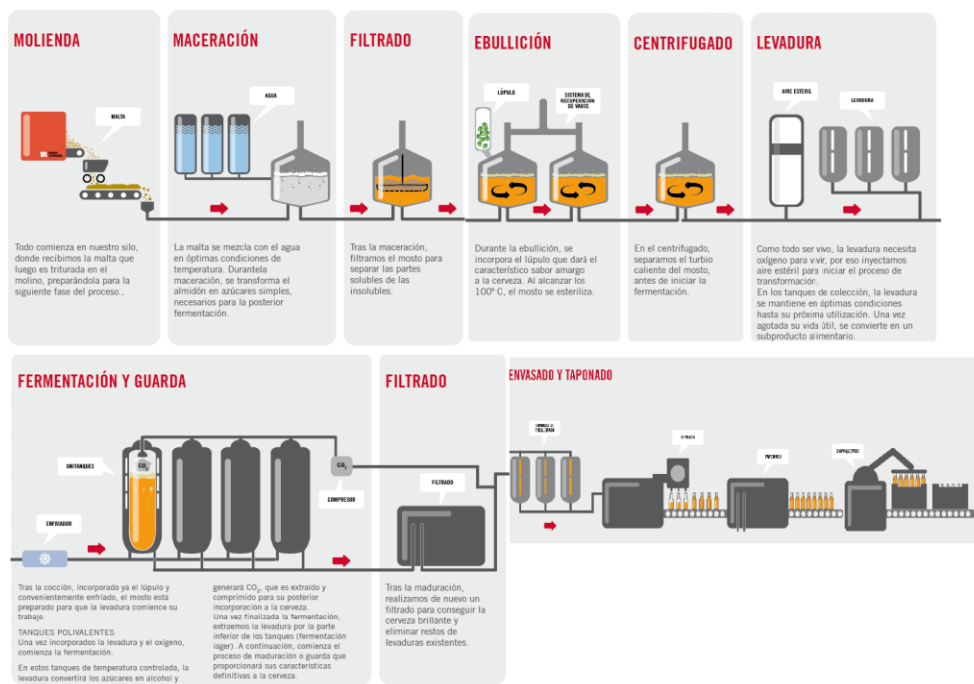
El primer paso para la fabricación de la cerveza es el malteado de la cebada, proceso de germinación de la cebada donde se obtiene la malta. Se tritura la malta, se cuece y se deja macerando con agua templada. Las enzimas presentes en la malta degradan la pared celular, extraen y descomponen el almidón del interior del cereal, libera azúcares, proteínas y aminoácidos que pasan al líquido.

³⁰XIAO, DAN. *Nisin extraction capacity of aqueous ethanol and methanol from a 2,5 % preparation*. 6 p.

Se filtran los componentes sólidos de la malta (afrecho de la malta y trub de proteína) y se añade el lúpulo, ingrediente aromatizante con propiedades antimicrobianas, aceites esenciales y resinas, responsables del sabor amargo característico de la cerveza. Se origina así el mosto de la cerveza.

El mosto de cerveza se vierte en un tanque de fermentación por un tiempo determinado, pasa a las unidades filtradoras y luego, la cerveza resultante se traslada a un tanque para su almacenamiento y maduración.

Figura 5. Proceso de elaboración de la cerveza



Fuente: RIBEIRO, SUSANA consulta. *Isolation and characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. 4 p.

2.5. Métodos de recuperación

Los procedimientos habituales de purificación de bactericidas utilizan sus propiedades bioquímicas: péptidos catiónicos y anfifílicos. Se utilizan también diversos tipos de cromatografías, precipitaciones salinas, adsorciones celulares, separaciones micelares y división de fases con solventes orgánicos, floclulantes de partículas suspendidas, variaciones de la solubilidad mediante la acidificación en el punto isoeléctrico, interacciones polares con determinados solventes, entre otros.

El proceso convencional de purificación consiste en un proceso directo de pocos pasos, usa frecuentemente un aislamiento, concentración y purificación del bactericida, mediante una precipitación salina, una extracción con solventes orgánicos y una purificación mediante diversos métodos cromatográficos.

Ciertos métodos presentan severas limitaciones para la adecuada producción de nisina, como los bajos rendimientos reportados, bajos niveles de concentraciones de producción, altos costos de los medios de cultivo, reactivos y equipo, así como por la toxicidad de los reactivos utilizados, que impiden la viabilidad para la producción de nisina para su aplicación en productos alimenticios.

La selección de los métodos para concentrar, recuperar y purificar una determinada sustancia depende no solo de las propiedades de la sustancia misma, sino también en las propiedades de los medios de cultivo en donde se inyecte la bacteria productora y libere la sustancia deseada.

2.5.1. Métodos y conceptos utilizados anteriormente para la extracción de nisina que imposibilitan su aplicación

Basados en la naturaleza heterogénea característica de los bactericidas y debido al extenso número de bactericidas conocidos, así como la amplia diversidad de posibles medios de cultivo de lactobacterias (LAB) como bacterias productoras, es imposible generalizar un método o protocolo único de recuperación, por lo que se han evaluado e implementado una diversa variedad de metodologías para la purificación de bactericidas, provenientes de lactobacterias. Se presenta un resumen en la tabla I.

Tabla I. Aspectos relevantes de la purificación de bactericidas

Bacteriocin	Purification	Steps	Yield
Plantaricin ST31	Ammonium sulfate precipitation - Sep-pack C18 cartridge – RP-HPLC	3	0.8%
	Cation exchange Chromatography	1	5.9%
Nisin Z	Expanded bed, Ion-exchange chromatography (EB-IEC)	1	90%
Enterocin AS48	Cation exchange – Reverse Phase Chromatography	2	24.3%
Plantaricin C19	Adsorption/release – RP-HPLC	2	15%
Pediocin ACM	Adsorption-desorption – RP-HPLC	2	40.4%
Salivaricin	Ammonium sulfate precipitation – C ₁₈	2	7.3%
Unnamed bacteriocins	Ammonium sulfate – Trichloroacetic acid Precipitation - Ultrafiltration	3	1.0 - 1.2%
Pediocin PA-1	Etanol precipitation - Isoelectric focusing	3	29
Lactococcin B	- Ultrafiltration	3	41
Mesentericin Y105		3	60%
Sakacin A		3	10%
Sakacin P	Cation exchange chromatography – C ₁₈ – HPLC	3	10%
Enterocin A		3	66%
Pediocin A-1		3	25%
Divercin V41		3	10%
Acidocin D20079	Ammonium sulphate precipitation - Cation exchange chromatography - Octyl Sepharose column.	3	16%
Lacticin Q	Acetone precipitation - Cation exchange chromatography – RP-HPLC	3	64%
Lactobin A	Ammonium sulfate precipitation - Chloroform-methanol extraction - RP-FPLC	3	0,07%
Divergin M35	Cation exchange chromatography - Sep-Pack C ₁₈ - RP-HPLC	3	10%
Enterocin CRL35	Ammonium sulfate precipitation - Molecular filtration Biogel P-6 - Cation exchange chromatography - HPLC	4	2%
Bozacin 14	Ammonium sulfate precipitation – Sep-Pack C ₁₈ – RP-HPLC	4	4.4%
Mutacin B-Ny266	C ₁₈ column - HPLC (x3)	4	1.0 %
Abp118	Ammonium sulfate precipitation - Hydrophobic interaction - Cation exchange chromatography – C ₈ /C ₁₈ RP-FPLC.	4	6,4%
Macedocin	Ammonium sulfate precipitation - Anion exchange chromatography - Cation exchange chromatography - Reverse-phase chromatography - Gel filtration	5	1,6%
Michiganin A	Ammonium sulfate precipitation - Cation exchange chromatography - RPC column - pepRPC HR 5/5 column - μRPC C ₂ /C ₁₈ column.	5	3%
Piscicocin CS526	Ammonium sulfate precipitation - gel-filtration - cation exchange chromatography - C ₁₈ cartridge - RP-HPLC.	5	7%
Propionicin F	Ammonium sulphate precipitate - Anion-exchange chromatography - Reverse-phase chromatography (x3)	5	0,5%
Pediocin PD-1	Ammonium sulphate precipitation – dialyses – lyophilization – methanol – chloroform extraction – cation exchange.	6	34%

Fuente: CHEESEMAN, GARY consulta. *An improved method of preparing Nisin*. 6 p.

2.5.1.1. Métodos cromatográficos

Se ha reportado que es posible realizar una purificación de nisina A en un único paso, mediante una cromatografía de inmunoafinidad, con una recuperación de bactericida arriba del 95 %. La cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) junto con resinas de intercambio catiónico, han reportado una recuperación casi homogénea (cerca del 100 %) de bactericidas.³¹

Muchos estudios han usado varias técnicas cromatográficas para purificar nisina; sin embargo, pese a que estos procedimientos presentan excelentes resultados y recuperaciones con altos grados altos de pureza, resultan demasiado costosos y con bajas eficiencias, por lo que son inadecuados y poco rentables para la producción de bactericidas a escala industrial.

Esto los categoriza como una opción no viable para la producción de nisina como ingrediente alimenticio, por lo que los métodos no cromatográficos han tomado un notorio auge y han sido evaluados en recientes estudios. Por ejemplo, Parente y Xiao proponen el remplazo de los métodos cromatográficos por un enfoque de una preparación isoelectrónica.

2.5.1.2. Métodos cromatográficos

Los bactericidas pueden ser recuperados mediante una adsorción del péptido de interés a las células de la bacteria productora, en condiciones de pH neutro, con el método descrito en las literaturas: se ajusta el pH de la solución de 6 a 7 con NaOH al 10 %, seguido de una separación/desadsorción con ácido fosfórico hasta alcanzar un pH de 2 a 2,5.³²

³¹YANG, RON. *Novel method to extract bacteriocins from lactic acid bacteria*. 18 p.

Banerjee evaluó la adsorción celular de los bactericidas a las células de sus bacterias productoras y obtuvo un 50 % a 100 % de adsorción en un rango de pH de 3 a 6,5, para la nisina y un punto máximo en un pH de 6 a 6,5. No se observó ninguna adsorción en pHs debajo de 3, lo que significa que los compuestos inhibitorios no se adhieren a la superficie de las células productoras en condiciones ácidas.

Los reactivos utilizados en este método para ajustar el pH para la adsorción (hidróxido de sodio) y desadsorción celular (ácido fosfórico) no existen en presentación de grado alimenticio.

Se ha utilizado métodos tales como una precipitación salina con NaCl, la centrifugación fría, para la recolección de los compuestos extraídos.

2.5.1.3. Extracción con solventes orgánicos

La utilización de solventes orgánicos para la recuperación de bactericidas se basa en las propiedades polares en conjunto con las propiedades anfífilas de los bactericidas, lo que permite la migración y concentración del bactericida hacia la interfase o en un punto extremo de la solución heterogénea (fase supernadante o fase inferior) y la recuperación del bactericida con algún procedimiento posterior.³²

Muchos estudios han utilizado diversos solventes orgánicos para la recuperación de nisina. Sin embargo, encuentra el limitante de su posible reutilización en productos alimenticios, debido al grado de toxicidad de los reactivos utilizados.

³²PARADA, JOSÉ LUIS. *Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives* 21 p.

Por ejemplo, Parada utilizó tolueno; Banerjee, Ribeiro, Cheeseman y Burianek utilizaron el cloroformo; Burianek utilizó mezclas de cloroformo con iso-propanol y metanol; Ribeiro, Suganthi, Cheeseman y Pingitore utilizaron acetona; Cheeseman y Pingitore usaron urea y acetonitrilo; Banerjee, Ribeiro, Cheeseman, Burianek y Pingitore utilizaron iso-propanol, hexano y dietil éter, como solventes orgánicos extractivos; sin embargo, todos estos solventes son tóxicos para el consumo humano y hacen imposible la reutilización de la nisina recuperada para fines consumibles o comerciales.³³

Burianek reportó que las mezclas de cloroformo junto con iso-propanol y metanol, produjeron abundantes precipitados en la fase acuosa con una considerable actividad bactericida y acreditó el efecto al cloroformo; sin embargo, en posteriores y alternos estudios, se ha observado que la polaridad de los alcoholes es la verdadera responsable de la transmigración de las moléculas del bactericida a la fase acuosa, lo que permite una adecuada precipitación.

Cheeseman, Burianek, Ribeiro y Banerjee reportan que los tratamientos con solventes orgánicos pueden representar pérdidas parciales o totales de la actividad antimicrobiana. Cheeseman interpreta estas pérdidas a la formación irreversible de complejos entre la nisina y las proteínas derivadas de la bacteria, ya que la mayoría de los métodos que utilizaron estos solventes producen precipitados abundantes, pero desnaturalizan casi todas las proteínas que puedan estar presentes en la solución.³⁴

³³ PINGITORE, VERA. *Different strategies for purification of antimicrobial peptides from lactic acid bacteria (LAB)*. 11 p.

³⁴ BANERJEE, SHIBA PROSAD. *Detection, partial purification and characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus brevis isolated from freshwater fish*. 9 p.

Cheeseman menciona que se obtiene un mayor fraccionamiento con un mayor precipitado al usar alcoholes, lo cual hace innecesario el fraccionamiento con solventes orgánicos.

2.5.1.4. Polaridad

La utilización de reactivos polares permite utilizar las propiedades anfífilas naturales de los bactericidas para la concentración y extracción del bactericida, el cual va a migrar de la fase polar a la fase no polar, es el mismo concepto utilizado por los métodos de extracción con solventes orgánicos.

La utilización de diferentes alcoholes, como el iso-propanol y el iso-amil alcohol, permite la efectiva remoción del bactericida hacia la parte orgánica, lo cual confirma que al menos una parte de la molécula del bactericida tiene un carácter hidrofóbico.

Se ha evaluado la utilización de varias concentraciones metanol acuoso, en donde se encontró una dependencia directa para la concentración de alcohol; a mayores concentraciones de metanol se obtenía un mayor factor de purificación, con una eficiencia de 76 % al usar metanol a 98 %.³⁵

El etanol, al ser menos polar que el metanol, se desempeña de mejor manera para la reducción de solubilidad de la nisina en solución. Además, la desventaja principal del metanol es que no es GRAS, debido a que presenta riesgos importantes a la salud humana.

³⁵XIAO, DAN. *Nisin extraction capacity of aqueous ethanol and methanol from a 2,5 % preparation.* 6 p.

2.5.2. Métodos químicos de recuperación

Se tiene el inconveniente de que la mayoría de los métodos de recuperación utiliza compuestos tóxicos o no aptos para el consumo humano, lo que hace imposible la implementación de estos bactericidas en productos alimentación por su aplicación como preservantes naturales.

Para recuperar y purificar el bactericida con la mayor heterogeneidad posible, es necesario realizar la mayor concentración de las sustancias con supuesta concentración de bactericida con efectiva actividad antimicrobiana. Esto se puede lograr a través de sistemas individuales o combinados de procedimientos químicos y mecánicos.

La mayoría de los protocolos de recuperación implementa un concepto de extracción químico, seguido de conceptos de extracción mecánicos, para lograr en cada etapa una concentración y recuperación más pura. Por ejemplo, Pingitore utilizó la adición de sulfato de amonio a bajas temperaturas, la referencia FAO-JECFA/WHO utiliza siempre la centrifugación en frío y una filtración después de una extracción con solventes o sales.³⁶

2.5.3. Métodos y conceptos viables para la extracción de nisina en grado alimenticio

A continuación, se describen los métodos de recuperación que son viables para aplicaciones en grado alimenticio.

³⁶FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) / WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Compendium of food additive specifications*, vol. 1: Nisin. 44 p.

2.5.3.1. Polaridad

La solubilidad de la nisina se ve afectada por la polaridad de los alcoholes, ya que es un péptido relativamente hidrofóbico y presenta su mayor solubilidad a una hidrofobicidad intermedia; es decir que una mayor concentración de alcohol, se presenciara una menor solubilidad proteica.

Se ha evaluado la utilización de etanol acuoso para la extracción de nisina al mezclar agua destilada, suspender la nisina en la solución, agitar durante 4 a 5 horas a temperatura ambiente antes de centrifugar y obtener la fase supernadante por evaluar. Se determinó que usar etanol al 50 % a 70 % permite recuperar la mayor cantidad de nisina que cualquier otra concentración de etanol o de metanol.³⁷

Xiao ha realizado esta verificación con un método basado en la densidad óptica de la solución, de donde no se reportó ninguna zona de inhibición para ninguna concentración de etanol o metanol, inclusive el etanol a 70 %, el cual es conocido como agente antimicrobiano.

2.5.3.2. Disminución de solubilidad por soluciones concentradas de sales (precipitación salina)

Las sales tienen la habilidad de disminuir la solubilidad de los compuestos de naturaleza proteica debido a una unión de los cationes de las sales a las cadenas con carga negativa del dominio hidrofílico de las moléculas peptídicas;

³⁷XIAO, DAN. *Nisin extraction capacity of aqueous ethanol and methanol from a 2,5 % preparation.* 6 p.

permite la insolubilización al disminuir la carga de las moléculas, provocando una repulsión electrostática molécula-molécula.³⁸

Luego de la insolubilización y la aparición de una solución heterogénea, el precipitado en la fase superior o inferior presentará la mayor concentración del bactericida con la mayor carga de actividad. Se ha determinado que el grado de saturación salina necesario para lograr una adecuada extracción depende directamente de la cepa de la bacteria productora y el tipo de sal por utilizar.

Pingitore utilizó una saturación del 70 %; Banerjee y Ribeiro utilizaron el 80 % de saturación con sulfato de amonio, mediante el método descrito por Klaenhammer; mientras Burianek experimentó saturaciones desde 40 % hasta 80 % y reportó la mejor recuperación de bactericida con la mayor cantidad y actividad, en el rango de 0 – 50 % de saturación, indicando una saturación del 50 % de sulfato de amonio como punto óptimo.³⁹

Cheeseman reporta que la utilización de sales de sulfatos para la precipitación salina incrementa (40 a 200 %) la actividad antimicrobiana. Por otro lado, Cheeseman usó saturación con cloruro de sodio al 50 % y Pingitore trabajó con 40% de peso de cloruro de sodio en función con el peso original del medio de cultivo.

³⁸CHEESEMAN, GARY. *An improved method of preparing Nisin*. 6 p.

³⁹WEBER, PETER. *Resistance of Bacillus: preparation of nisin*. 8 p.

2.5.3.3. Disminución de solubilidad por soluciones concentradas de sales (precipitación salina)

Para llevar a cabo el procedimiento de acidificación celular hasta alcanzar el punto isoeléctrico se ajusta el pH cercano a 2 - 3; se saltea con cloruro de sodio para la partición de fases, se centrifuga y se procede a realizar una diálisis con un poro de corte de tamaño específico para poder así evaluar la actividad antimicrobiana de la fase recuperada.⁴⁰

Parente menciona el reemplazo de los métodos cromatográficos por tratamientos de punto isoeléctrico. Banerjee y Cheeseman reportan el punto máximo de adsorción celular de la nisina a las células productoras en un pH de 6 a 6,5, y una adsorción casi nula en pHs debajo de 3. La nisina se precipitará en pHs de 1,8 a 2,0, por lo que se debe acidificar la solución hasta alcanzar el punto isoeléctrico con una solución en el punto máximo de insolubilidad.

2.5.4. Métodos mecánicos de recuperación

A continuación, se presentan conceptos mecánicos que optimizan los métodos de recuperación de la nisina.

2.5.4.1. Centrifugación

La utilización de la centrifugación para la recolección de posibles sólidos suspendidos y compuestos proteicos se presenta, muchas veces, más de una vez en los procedimientos comunes.

⁴⁰PINGITORE, VERA. *Different strategies for purification of antimicrobial peptides from lactic acid bacteria (LAB)*. 11 p.

Se ha trabajado a 4000 g durante 10 minutos a -15 °C. Se recomienda también la centrifugación a 4500 g durante 20 minutos a 4 °C; Abts trabajó a 6000 g durante 30 minutos a 4 °C; Burianek trabajó a 7100 g durante 15 minutos a 12 °C; Banerjee y Pingitore trabajaron a 8000 g durante 5 minutos a 5 °C, y Weber trabajó a 10000 g durante 20 minutos a 15 °C. La tendencia es que la temperatura de trabajo será inversamente proporcional a la velocidad de centrifugación y directamente proporcional al tiempo de exposición.

En los trabajos se presentan la centrifugación como la alternativa más viable para la recolección de bacteriocidas producidos a escala industrial.

2.5.4.2. Disminución de solubilidad a bajas temperaturas

La solubilidad de la mayoría de las soluciones líquidas presenta una relación directamente proporcional a la temperatura; es decir, que la solubilidad disminuirá a temperaturas menores.

Este efecto permite potenciar y trabajar sinérgicamente en conjunto a otros métodos de recuperación, tanto químicos como mecánicos, tal como la precipitación salina realizada en Banerjee, Ribeiro y Parente⁴¹ o bien, mediante la adición de solventes fríos, la recolección mediante centrifugación, agitación y decantación a bajas temperaturas, como se realizó en Ribeiro, Cheeseman, Burianek, entre otros.⁴¹

⁴¹RIBEIRO, SUSANA. *Isolation and characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. 4 p.

Cheeseman menciona la importancia de decantar apropiadamente a las soluciones de los posibles medios matrices; la omisión de este procedimiento representaría grandes y significativas cantidades importantes de sólidos suspendidos, así como una pobre cantidad de precipitados y la reducción de la recuperación del bactericida a un tercio de la eficiencia normal.

Se realizaron diversos procesos combinados a bajas temperaturas; por ejemplo, Cheeseman⁴² empleó la centrifugación en cubetas metálicas a -15 °C durante 10 minutos y Ribeiro a -4 °C durante 30 minutos.

2.5.4.3. Microfiltración

La microfiltración se realiza con membranas filtrantes de un determinado tamaño de corte y tipo de fibra. Las membranas de microfiltración separan partículas que tienen un tamaño de entre 0,1 mm y 10 mm y pueden ser de polietileno, polipropileno, entre otros.

Pingitore y Weber mencionan que la mayoría de los bactericidas tienen un tamaño menor a 10000 Da; un tamaño de corte muy alto permitiría el paso del bactericida sin lograr su filtración, y un tamaño de corte muy bajo retendría una gran cantidad de sólidos ajenos al interés del estudio. Ambas referencias utilizaron una unidad de microfiltración (Amicron) con una membrana con un tamaño de corte de 2500-3500 Da para la recuperación de nisina.

Esta materia retenida del filtrado se resuspendió en ácido clorhídrico 0,02 para obtener la actividad específica original de las muestras patrón y así evaluar la actividad antimicrobiana de la materia recuperada. Se presenta más detalles del método de determinación de actividad antimicrobiana en el inciso 4.7.

⁴² CHEESEMAN, G. C. *An improved method of preparing Nisin*. 6 p.

Parente recomienda la implementación de un sistema de recirculación para disminuir las probabilidades de que cierta cantidad de bactericida se pierda en el líquido filtrado, además de permitir la recuperación del bactericida sin intervenir negativamente en el desempeño de la bacteria productora.

2.5.4.4. Rotoevaporación

Xiao, Cheeseman y Burianek evalúan la utilización de alcoholes, acetona y cloroformo para la extracción de nisina, respectivamente. La necesaria concentración de las soluciones opta por la rotoevaporación, en donde se evaporaría la mayor cantidad de la fracción volátil, sin exponer el resto de compuesto a una temperatura que degrade sus características originales. Ambos utilizaron una presión reducida de trabajo y un calentamiento en baño de agua a 45-75 °C.⁴³

La evaporación, condensación y recuperación de las fases orgánicas o de los alcoholes permitiría reutilizarlos en futuros procedimientos de recuperación. Esto implicaría la optimización de los recursos y una mejora en la rentabilidad de los protocolos de recuperación.

Varias referencias implementaron la rotoevaporación como un proceso clave para la optimización de los reactivos utilizados y una mejora en la rentabilidad del proceso de recuperación de nisina. Esto se logra al rotoevaporar, condensar y recuperar el alcohol y los solventes orgánicos que pudieran ser implementados, según el protocolo.

⁴³BURIANEK, LOUIS. *Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures*. 6 p.

2.5.4.5. Secado por aspersión

Con el fin de preparar una presentación en polvo de nisina con la mayor concentración posible, luego de concentrar la solución y ejecutar el método de recuperación, se obtendrá una fase supernadante o un precipitado como la fase más rica en nisina. Esta solución se transferirá y secará en un sistema de secado por aspersión, se recomienda un flujo de 5-6 mL/min, una temperatura de entrada de 105 °C y de salida a 70 °C.⁴⁴

2.5.4.6. Floculación

Se ha evaluado la adición de compuestos de sílice poroso digerible (silicato de calcio y dióxido de silicio) y compuestos con iones de Mg^{+2} y Ca^{+2} , los cuales han demostrado incrementar y mejorar la producción de determinados bactericidas (pediocina AcH y nisina), así como disminuir la adsorción de la nisina en las células del *Lactococcus lactis subsp. lactis*. Además, el Ca^{+2} ha permitido concentrar las soluciones de nisina Z e incrementar la tasa de producción específica.

Estas ventajas, producidas por la adición de Ca^{+2} , se deben a la activación del aumento de inmunidad de la peptidasa líder (NisP) al proteger de la integridad de la membrana citoplasmática; además de desplazar las moléculas de nisina fuera de la superficie celular de la bacteria productora.⁴⁵

⁴⁴PARENTE, EUGENIO. *Production, recovery and purification of bacteriocin from lactic acid bacteria*. 12 p.

⁴⁵WEBER, PETER. *Resistance of Bacillus: preparation of nisin*. 8 p.

2.6. Determinación de la actividad antimicrobiana de la nisina

Además de una adecuada concentración, recuperación y purificación del bactericida, la evaluación de su actividad antimicrobiana depende significativamente del método de análisis, es esencial y necesario un método rápido, sencillo, confiable, cuantitativo y sensible para la identificación del bactericida y la determinación de la cantidad y actividad recuperada.

Existe una gran variedad de métodos disponibles para la determinación de actividad antimicrobiana de soluciones recuperadas con posible concentración de bactericidas: a) vertido en la superficie, b) difusión en discos, c) ensayo de microtitulación en placas, d) ensayo de placas en múltiples pocillos, d) difusión en agar sólido, entre otros.⁴⁶ Todos estos métodos tienen en común que consisten en una medición cuantitativa de inhibición de crecimiento microbiano, utilizando un microorganismo identificador.

2.6.1. Medios de cultivo de la bacteria identificadora (NBB-A, NBB-B, MRS)

Se demostró en la investigación de Weber que el tipo de medio no afectó la actividad antimicrobiana de la nisina contra las bacterias identificadoras; sin embargo, estas sí son significativamente relevantes para la producción de bactericidas a partir de lactobacterias. Siempre se ha mantenido la búsqueda de aplicaciones alternativas de efluentes de los procesos industriales que puedan contener ciertas características relevantes para un determinado efecto.⁴⁷

⁴⁶RIBEIRO, SUSANA. *Isolation and characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. 4 p.

⁴⁷WEBER, PETER. *Resistance of Bacillus: preparation of nisin*. 8 p.

A través del proceso cervecero se podrá encontrar subproductos con contenido considerable de proteínas, carbohidratos, nitrógeno, levaduras, alcohol, ente otros. Estas características representan una fuente suficientemente viable como para el crecimiento de cualquier cepa bacteriana para una determinada función; por ejemplo, lactobacterias para la producción de bactericidas.

Se decidió trabajar las pruebas de medición de los halos de inhibición descrito por el método KB/DAS, con MRS como agar sólido, nombrada así por las iniciales de sus inventores (de Man, Rogosa and Sharpe), el cual es un medio de cultivo complejo que varias bibliografías recomiendan, debido a sus adecuados niveles nutritivos, con suficientes fosfatos y ácidos grasos necesarios para el óptimo rendimiento de la bacteria productora.⁴⁸

2.6.2. Método KB/DAS (difusión en agar sólido)

La actividad antimicrobiana de la nisina fue determinada por el método de difusión en agar sólido utilizando *Micrococcus luteus* como microorganismo indicador. El método está respaldado por varios trabajos análogos como el mejor método para la determinación de la actividad antimicrobiana.

El método consiste en la medición de zonas claras de inhibición de crecimiento microbiano del organismo identificador dentro de cajas de Petri con agar sólido, como representación de la efectiva presencia de la nisina. A estas zonas de inhibición fácilmente visualizadas se les conocen también como halos de inhibición, los cuales crecerán de manera proporcional a la cantidad de nisina en la muestra evaluada.

⁴⁸TAYLOR, TRUCE MARTIN. *Extraction of Nisin from a 2.5 % commercial Nisin product using methanol and ethanol solutions*. 16 p.

Se prepara una solución patrón con una concentración de 10000 IU/mL y se disuelve 0,1 g de la presentación de nisina al 2,5 % en 10 mL de 0,02 N de ácido clorhídrico (grado alimenticio).

Se diluyó la solución patrón, con ácido clorhídrico 0,02N, en una serie de soluciones estandarizadas desde 10000 hasta 15,625 IU/mL, las cuales se inyectan en el agar sólido previamente inoculado con la bacteria identificadora.

Después de la incubación a 25°C durante 3 días, se presentarán halos como zonas de inhibición, las cuales se miden tres veces en tres diferentes direcciones para establecer una curva de calibración logarítmica de las zonas de inhibición en función de las concentraciones de las soluciones estandarizadas de nisina pura. Este mismo procedimiento se realiza para evaluar y determinar la actividad antimicrobiana de los extractos recuperados.

Una regresión lineal, según Xiao, de la curva obtenida se representa de la siguiente manera:

$$D = a \log_{10}[Nisina] + b$$

En donde D es el diámetro (en milímetros) de las zonas de inhibición, (nisina) es la concentración de nisina en IU/mL, a y b son la pendiente e intercepto de la regresión lineal, respectivamente.

Se recomienda trabajar el método de KB/DAS el mismo día para todas las muestras de nisina estandarizada y realizarlas paralelamente con las muestras de nisina recuperada, con el objetivo de disuadir el factor de la posible variación de un día a otro para la vitalidad y la concentración de la bacteria identificadora presente en la solución.

3. METODOLOGÍA

3.1. Variables

A continuación, se presentan las variables envueltas en el proyecto.

Tabla II. **Variables dependientes, independientes y de respuesta, de la caracterización de los posibles medios de cultivo**

<i>Fase</i>	<i>Variable</i>	<i>Dep.</i>	<i>Indep.</i>	<i>Var. Resp.</i>	<i>Dimensional</i>
<i>Identificación posibles medios de cultivo</i>	Mosto, cerveza tipo A	x			adimensional
	Mosto, cerveza tipo B	x			adimensional
	Extr. de afrecho, cerveza tipo A	x			adimensional
	Extr. de afrecho, cerveza tipo B	x			adimensional
	Extracto de levadura	x			adimensional
	Extr. de trub, cerveza tipo A	x			adimensional
	Extr. de trub, cerveza tipo B	x			adimensional
	Últimas aguas, cerveza tipo A	x			adimensional
	Últimas aguas, cerveza tipo B	x			adimensional
<i>Caracterización de los posibles medios de cultivo</i>	pH		x	X	adimensional
	Turbidez a 25 °		x	X	EBC
	Turbidez a 90 °		x	X	EBC
	Grado de Alcohol		x	X	% (v/v)
	°Plato		x	X	°p
	ER		x	X	(%w/w)
	EA		x	X	(%w/w)
	Densidad		x	X	g/cm ³
	RDF		x	X	(%w/w)
	ADF		x	X	(%w/w)
	Calorías		x	X	kCal/100 mL
	BU		x	X	EBC
	Color		x	X	EBC
	Polifenoles		x	x	ppm
	Antocianógenos		x	x	ppm

Fuente: elaboración propia.

Tabla III. **Variables envueltas en la recuperación de la nisina a partir de los subproductos de una cervecería**

<i>Fase</i>	<i>Variable</i>	<i>Dep.</i>	<i>Indep.</i>	<i>Var. Resp.</i>	<i>Dimensional</i>
<i>Recuperación de nisina</i>	Etanol + NaCl	x			adimensional
	Ácido cítrico + NaCl	x			adimensional
	Sulfato de amonio	x			adimensional
	Hidróxido de calcio	x			adimensional
	Eficiencia de recuperación		x	x	% (porcentaje)
	Diámetro de la zona de inhibición		x		mm
	Cantidad de nisina recuperada		x	x	mg

Fuente: elaboración propia.

3.2. Delimitación del campo de estudio

La investigación es de carácter cuantitativo-experimental y consiste en la caracterización de mosto, extracto de levadura, extracto de afrecho, extracto de trub y últimas aguas como los 5 subproductos de una planta de producción de cerveza que contienen azúcares fermentables, con el fin de evaluar su posible aplicación como medios de cultivo para la inserción de la bacteria productora de nisina.

Además, se evaluará los protocolos de etanol + NaCl, ácido cítrico + NaCl, sulfato de amonio e hidróxido de calcio como las diferentes estrategias para concentrar, recuperar y purificar la mayor cantidad posible de nisina, mediante procedimientos relativamente económicos y efectivos, con la utilización exclusiva de reactivos de grado alimenticio. Todo esto con el fin de incrementar las posibilidades de la nisina para su efectiva aplicación como preservante natural en alimentos.

3.3. Recursos humanos disponibles

Investigador: Br. Pablo José Rosales Pineda

Asesor: Ing. Álvaro de León Marizuya

3.4. Recursos materiales disponibles

A continuación, se presentan los recursos utilizados para la caracterización de los posibles medios matrices, los métodos de recuperación de la nisina y establecer la curva de calibración utilizada para la determinación de la cantidad de nisina recuperada.

3.4.1. Caracterización de los posibles medios matrices

A continuación, se presentan los recursos utilizados para la caracterización de los posibles medios matrices.

3.4.1.1. Materia prima

- Mosto de cerveza con 5 °P
- Extracto de levadura cervecera
- Extracto de afrecho
- Extracto de trub (proteína precipitada)
- Agua de últimos riegos de filtro Lauter

3.4.1.2. Reactivos

- Isooctano ((CH₃C(CH₃)₂CH₂CH(CH₃)CH₃), 99 %, CAS No. 540-84-1, EMD Millipore de Merck KGaA, Alemania).
- Bisulfito de sodio (NaHSO₃, 39 % (v/v), CAS No.7631-90-5, EMD Millipore de Merck KGaA, Alemania).
- Hidróxido de sodio (NaOH, 99-100 %, CAS No.1310-73-2, EMD Millipore de Merck KGaA, Alemania).
- Ácido clorhídrico (HCl, 37 % (v/v), fumante, CAS No. 7647-01-0, EMD Millipore de Merck KGaA, Alemania).
- Agua desmineralizada (H₂O sin minerales, CAS No.7732-18-5, purificada y embotellada por agua pura Salvavidas, Guatemala).

3.4.1.3. Equipo

- Densímetro (Anton Paar, modelo 4500M).
- Viscosímetro (Anton Paar, modelo AM/VN).
- Agitador orbital (Lab Companion, modelo SK-71).
- Molino (Buhler, modelo DLFW1060).
- Turbidímetros (Sigrist, modelo Labscat 2; Haffmans, modelo Vos Rota 90).
- Dispensador de 50 mL tipo pipeta (Hirschmann, modelo Solarus).
- Macerador / Lochner (Stifland Elektronik, modelo LB8).
- Plancha térmica agitadora (ThermoScientific, modelo Cimarec Basic).
- Balanza de 2 cifras decimales (Mettler-Toledo, modelo P65002-5).
- Balanza de 4 cifras decimales (Mettler-Toledo, modelo XS204).
- Medidor de pH en rango ácido (WTW, modelo inoLab 7110).
- Espectrodensitómetro (Merck, modelo Spectroquant Nova 60; Merk, modelo Spectroquant Pharo 300).

- Bomba de succión (Sartorius Stedim, modelo Biotech).
- Agitador magnético (Sybron, modelo Thermolyne).
- Centrifugadora (Sigma, modelo 3-15).
- Computadora (HP, modelo G70-460US).
- Micropipeta (Eppendorf, modelo Research Plus).
- Punta para micropipeta de 1000 y 100 μ L (Eppendorf-Research Plus).
- Termómetros de mercurio.
- Erlenmeyers de varias capacidades.
- Balones de vidrio de varias capacidades.
- Kitasato de 1 L.
- Embudos cónicos de varios tamaños.
- Embudo Buchner.
- Papel filtro.

3.4.2. Métodos de recuperación de la nisina

A continuación, se presentan los recursos utilizados para los métodos de recuperación de la nisina.

3.4.2.1. Materia prima

- Mosto de cerveza con 5 °P
- Extracto de levadura cervecera
- Extracto de afrecho
- Extracto de trub (proteína precipitada)
- Agua de últimos riegos de filtro Lauter

3.4.2.2. Reactivos

- Cloruro de sodio (NaCl, 99,5 %, grado industrial, CAS No. 7647-14-5, EMD Millipore de Merck KGaA, Alemania).
- Ácido cítrico ((HOOCCH₂)₂C(OH)COOH, 99 %, grado alimenticio, CAS No. 77-92-9, EMD Millipore de Merck KGaA, Alemania).
- Ácido clorhídrico (HCl, 37 %, fumante, CAS No. 7647-01-0, EMD Millipore de Merck KGaA, Alemania).
- Sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄, 99,5 %, grado alimenticio, CAS No. 7783-20-2, EMD Millipore de Merck KGaA, Alemania).
- Hidróxido de calcio; cal hidratada especial (Ca(OH)₂, >90 %, grado alimenticio, CAS No. 1310-73-2, Calera San Miguel, Guatemala).
- Alcohol etílico (CH₃CH₂OH, 70 %, CAS No. 64-17-5, Químicos Ferkica, S.A., Guatemala).
- Agua desmineralizada (H₂O, agua pura Salvavidas, Guatemala).
- Nisina (C₁₄₃H₂₃₀N₄₂O₃₇S₇, producido a partir de *Lactococcus lactis*, 2,5 %, CAS No. 1414-45-5, MP Biomedicals, LLC, Francia).

3.4.2.3. Equipo

- Plancha térmica agitadora (ThermoScientific, modelo Cimarec Basic).
- Balanza de 2 cifras decimales (Mettler-Toledo, modelo P65002-5).
- Balanza de 4 cifras decimales (Mettler-Toledo, modelo XS204).
- Medidor de pH en rango ácido (WTW, modelo inoLab 7110).
- Centrifugadora (Sigma Zentrifugen, modelo 3-15).
- Agitador magnético (Sybron, modelo Thermolyne).
- Bomba de succión (Sartorius Stedim, modelo Biotech)

- Membranas de filtración
- Termómetros de mercurio
- Erlenmeyers de varias capacidades
- Balones de vidrio de varias capacidades
- Kitasato de 1 L
- Embudos cónicos de varios tamaños
- Embudo Buchner

3.4.3. Establecimiento de la curva de calibración y determinación de la concentración de nisina recuperada

A continuación, se presentan los recursos utilizados para establecer la curva de calibración utilizada para la determinación de la cantidad de nisina recuperada.

3.4.3.1. Materia prima

- Mosto de cerveza con 5 °P
- Extracto de levadura cervecera
- Extracto de afrecho
- Extracto de trub (proteína precipitada)
- Agua de últimos riegos de filtro Lauter

3.4.3.2. Reactivos

- Ácido clorhídrico (HCl, 37 %, fumante, CAS No . 7647-01-0, EMD Millipore de Merck KGaA, Alemania).
- Caldo NBB-B (Medio de cultivo líquido indicador de microorganismos descomponedores de cerveza. Art. No. 2.04710.782. Provisto por Doehler Microsafety Design de Doehler GmbH, Alemania).
- Nisina ($C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7^*$, producido a partir de *Lactococcus lactis*, 2,5 %, CAS No. 1414-45-5. Proveído por MP Biomedicals, LLC, Francia).
- Agar MRS para microbiología (Medio de cultivo sólido para *Lactobacillus*, según De Man, Rogosa y Sharpe. Proveído por EMD Millipore de Merck KGaA, Alemania).
- *Micrococcus luteus* (Lote 1608-1 del Centro de Investigación para la Elaboración de la Cerveza y el Control de la Calidad de los Alimentos “Weiherstephan” y de la Colección Nacional de Bacterias Marinas, Alimentarias e Industriales de la Universidad Técnica de Múnich TUM, Alemania).

3.4.3.3. Equipo

- Autoclave (Tuttnauer, modelo 5075ELC-D).
- Plancha térmica agitadora (ThermoScientific, modelo Cimarec Basic).
- Microscopio (Leica, modelo DMLB).
- Balanza de 2 cifras decimales (Mettler-Toledo, modelo P65002-5).
- Balanza de 4 cifras decimales (Mettler-Toledo, modelo XS204).
- Medidor de pH en rango ácido (WTW, modelo inoLab 7110).
- Calibrador Vernier (Mitutoyo, modelo Dial 505-646-30).
- Computadora (HP, modelo G70-460US).
- Agitador magnético (Sybron, modelo Thermolyne).

- Campana de flujo laminar. (Thermo Forma, modelo 1828).
- Incubadora aeróbica. (Precisión, modelo 6).
- Micropipeta (Eppendorf, modelo Research Plus).
- Puntas desechables para micropipeta de 1000 y 100 μ L (Eppendorf, para el modelo Research Plus).
- Balones y Erlenmeyers de vidrio de varias capacidades.
- Kitasato de 1 L.
- Platos de Petri.

3.5. Técnica cualitativa o cuantitativa

La investigación es meramente cuantitativa; sin embargo, se tomará en consideración otros aspectos de calidad.

3.5.1. Técnica cualitativa

Las partes más importantes de un procedimiento es su capacidad su reproducibilidad, laboriosidad, facilidad, tiempo de ejecución, rentabilidad y confiabilidad, por lo que se busca diseñar un protocolo de recuperación con estas cualidades. Además, se deberá trabajar única y exclusivamente con reactivos de grado alimenticio.

3.5.2. Técnica cuantitativa

Durante la caracterización de los posibles medios de cultivo, se tomará mediciones de pH, turbidez a 25° y 90°, porcentaje de alcohol, grado Plato, extracto real y aparente, densidad, grado de fermentación real y aparente, nivel calórico, BU, color, bisulfito, polifenoles y antocianógenos.

Por otra parte, para la evaluación de los protocolos de recuperación de nisina, se utilizará el método KB/DAS para la determinación de la actividad antimicrobiana, mediante mediciones de zonas de inhibición microbiana proporcionales a la cantidad de nisina recuperada. Se correrá una curva de calibración para luego hacer las respectivas mediciones de las zonas de inhibición producto de la nisina en las soluciones recuperadas y determinar así la cantidad y actividad de nisina recuperada y determinar la eficiencia de recuperación de cada método.

3.6. Recolección y ordenamiento de la información

El trabajo se subdividirá en dos partes: inician con una caracterización de 5 posibles medios de cultivo, medición de sus parámetros fisicoquímicos y elementos nutritivos. Se proseguirá con la evaluación de 4 protocolos para la recuperación de nisina, tomando como puntos críticos su eficiencia de recuperación, la cantidad y actividad de la nisina recuperada.

Tabla IV. Toma de datos originales diario para la caracterización de los posibles medios de cultivo

Día #1		Fecha:		Tipo de Cerveza:		Pablo José ROSALES PINEDA										
Matriz	Rep.	T (°C)	pH	Turbidez	Densidad (g/cm ³)	*Plato (No/w)	EA (No/w)	ER (No/w)	% (v/v) Alcohol	Calorías (kcal/100ml)	ADF	RDF	BU (EBC)	Color (EBC)	Poliifenoles	Antocian.
Mosto	1															
	2															
	3															
	Prom.															
Extracto de levadura	1															
	2															
	3															
	Prom.															
Extracto de afrecho	1															
	2															
	3															
	Prom.															
Trub	1															
	2															
	3															
	Prom.															
Últimas Aguas	1															
	2															
	3															
	Prom.															

Fuente: elaboración propia.

Tabla V. Toma de datos originales para la medición de las zonas de inhibición para el método KB/DAS

Medio de cultivo	Método de recuperación	Zona de Inhibición (in)												Promedio (in)	Promedio (mm)
		Orificio 1, i	Orificio 1, ii	Orificio 1, iii	Orificio 2, i	Orificio 2, ii	Orificio 2, iii	Orificio 3, i	Orificio 3, ii	Orificio 3, iii	Orificio 4, i	Orificio 4, ii	Orificio 4, iii		
Mosto	Etanol + NaCl														
	Ácido Cítrico + NaCl														
	Sulfato de Amonio														
	Ca(OH) ₂														
Extracto de afrecho	Etanol + NaCl														
	Ácido Cítrico + NaCl														
	Sulfato de Amonio														
	Ca(OH) ₂														
Extracto de levadura	Etanol + NaCl														
	Ácido Cítrico + NaCl														
	Sulfato de Amonio														
	Ca(OH) ₂														
Extracto de trub	Etanol + NaCl														
	Ácido Cítrico + NaCl														
	Sulfato de Amonio														
	Ca(OH) ₂														
Últimas aguas	Etanol + NaCl														
	Ácido Cítrico + NaCl														
	Sulfato de Amonio														
	Ca(OH) ₂														

Fuente: elaboración propia.

3.7. Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información

El trabajo se subdividirá en dos partes: inician con una caracterización de 5 posibles medios de cultivo, medición de sus parámetros fisicoquímicos y elementos nutritivos. Se proseguirá con la evaluación de 4 protocolos para la recuperación de nisina, tomando como puntos críticos su eficiencia de recuperación, la cantidad y actividad de la nisina recuperada.

Tabla VI. **Datos individuales de procesamiento de datos para la caracterización de los posibles medios de cultivo**

Matriz	Dia	T (°C)	pH	Turbidez		% (v/v) Alcohol	°Plato (%w/w)	ER (%w/w)	EA (%w/w)	Densidad (g/cm3)	RDF (%)	ADF (%w/w)	Calorías (kcal/100ml)	BU (EBC)	Color (EBC)	Polifenoles	Antocianógenos
				a 25°	a 90°												
Mosto	1																
	2																
	3																
	4																
	5																
	6																
	7																
	Prom.																
Extracto de Afrecho	1																
	2																
	3																
	4																
	5																
	6																
	7																
	Prom.																
Extracto de Levadura	1																
	2																
	3																
	4																
	5																
	6																
	7																
	Prom.																
Extracto de Trub	1																
	2																
	3																
	4																
	5																
	6																
	7																
	Prom.																
Últimas Aguas	1																
	2																
	3																
	4																
	5																
	6																
	7																
	Prom.																

Fuente: elaboración propia.

Tabla VII. **Datos generales de ordenamiento de datos para la caracterización de los posibles medios de cultivo**

	Mosto cerveza A	Mosto cerveza B	Ext. de afrecho cerveza A	Ext. de afrecho cerveza B	Ext. de levadura	Ext. de trub cerveza A	Ext. de trub cerveza B	Últimas aguas cerveza A	Últimas aguas cerveza B
pH									
Turbidez a 25°									
Turbidez a 90°									
% (v/v) Alcohol									
°Plato (%w/w)									
ER (%w/w)									
EA (%w/w)									
Densidad (g/cm3)									
RDF (%)									
ADF (%w/w)									
Calorías (kcal/100 ml)									
BU (EBC)									
Color (EBC)									
Polifenoles									
Antocianógenos									

Fuente: elaboración propia.

Tabla VIII. **Datos individuales de procesamiento de datos para la evaluación de los protocolos de recuperación de nisina**

Medio de cultivo	Método	Promedio Dzi (mm)	Valor más repetido	IU/ml (con modelo lineal)	mg de Nisina Pura recuperada	% de recuperación
Mosto	Etanol + NaCl					
	Ácido Cítrico + NaCl					
	Sulfato de Amonio					
	Ca(OH) ₂					
Extracto de Afrecho	Etanol + NaCl					
	Ácido Cítrico + NaCl					
	Sulfato de Amonio					
	Ca(OH) ₂					
Extracto de Levadura	Etanol + NaCl					
	Ácido Cítrico + NaCl					
	Sulfato de Amonio					
	Ca(OH) ₂					
Extracto de trub	Etanol + NaCl					
	Ácido Cítrico + NaCl					
	Sulfato de Amonio					
	Ca(OH) ₂					
Últimas Aguas	Etanol + NaCl					
	Ácido Cítrico + NaCl					
	Sulfato de Amonio					
	Ca(OH) ₂					

Fuente: elaboración propia.

3.8. Análisis estadístico

A continuación se presentan los valores evaluados en el análisis dimensional:

3.8.1. Análisis factorial

En la presente investigación se desea analizar el efecto que tienen dos factores respecto a una variable respuesta; por ello, el experimento será factorial de dos factores. Se determinará si existe una interacción significativa entre la cantidad de nisina recuperada en función de 5 posibles medios de

cultivo y de 4 protocolos de recuperación de nisina. Se tomará 3 muestras diarias de cada medio de cultivo de 2 tipos de cerveza, durante 7 días. Todos los parámetros evaluados se realizaron en triplicado, con el fin de obtener datos confiables y relevantes estadísticamente.

Tabla IX. Experimento de dos factores

A	B			Total	Media
	1	2	3		
1	Y_{111}	Y_{121}	Y_{131}	$T_{1..}$	$X_{1..}$
2	Y_{211}	Y_{221}	Y_{231}	$T_{2..}$	$X_{2..}$
3	Y_{311}	Y_{321}	Y_{331}	$T_{3..}$	$X_{3..}$
4	Y_{411}	Y_{421}	Y_{431}	$T_{4..}$	$X_{4..}$
5	Y_{511}	Y_{521}	Y_{531}	$T_{5..}$	$X_{5..}$
6	Y_{611}	Y_{621}	Y_{631}	$T_{6..}$	$X_{6..}$
7	Y_{711}	Y_{721}	Y_{731}	$T_{7..}$	$X_{7..}$
8	Y_{811}	Y_{821}	Y_{831}	$T_{8..}$	$X_{8..}$
9	Y_{911}	Y_{921}	Y_{931}	$T_{9..}$	$X_{9..}$
10	Y_{1011}	Y_{1021}	Y_{1031}	$T_{10..}$	$X_{10..}$
Total	$T_{.1.}$	$T_{.2.}$	$T_{.3.}$	$T_{...}$	
Media	$X_{.1.}$	$X_{.2.}$	$X_{.3.}$		$X_{...}$

Fuente: Raymond, Walpole. Probabilidad y estadística.

Donde:

$T_{i..}$ = suma de las observaciones para el i-ésimo nivel del factor A

$T_{.j.}$ = suma de las observaciones para el j-ésimo nivel del factor B

$T_{...}$ = suma de todas las abn observaciones

$X_{i..}$ = media de las observaciones para el i-ésimo nivel del factor A

$X_{.j.}$ = media de las observaciones para el j-ésimo nivel del factor B

$X_{...}$ = media de todas las abn observaciones.

A = Tiempos de fermentación (días)

B = Formulaciones con distintas proporciones

3.8.2. Análisis de varianza (ANOVA)

- Cálculo de suma de cuadrados

$$\text{Suma de cuadrados} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n x^2_{ijk} - T^2$$

- Suma de cuadrados del factor A

$$SSA = \frac{\sum_{i=1}^a T^2_{i \dots}}{bn} - \frac{T^2 \dots}{abn}$$

- Suma de cuadrados del factor B

$$SSB = \frac{\sum_{j=1}^b T^2_{j \dots}}{bn} - \frac{T^2 \dots}{abn}$$

- Suma de cuadrados para dos factores AB

$$SS(AB) = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b T^2_{ij}}{n} - \frac{\sum_{i=1}^a T^2_{i \dots}}{bn} - \frac{\sum_{j=1}^b T^2_{j \dots}}{an} + \frac{T^2 \dots}{abn}$$

- Suma de cuadrados del experimento

$$SSE = SST - SSA - SSB - SS(AB)$$

Tabla X. **Varianza en un experimento de dos factores**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	f calculada
Efecto Principal				
A	SSA	$a - 1$	$S^2_1 = SSA / a - 1$	$f_1 = S^2_1 / S^2$
B	SSB	$b - 1$	$S^2_2 = SSB / b - 1$	$f_2 = S^2_2 / S^2$
Interacción de dos factores AB	SS(AB)	$(a-1)(b-1)$	$S^2_3 = \frac{SS(AB)}{(a-1)(b-1)}$	$f_3 = S^2_3 / S^2$
Error	SSE	$ab(n-1)$	$S^2 = SSE / ab(n-1)$	
Total	SST	$abn - 1$		

Fuente: Raymond, Walpole consulta. *Probabilidad y estadística*.120 p.

Decisión: Si $F \geq F_{tabla}$ se rechaza la hipótesis nula.

3.9. Plan de análisis de los resultados

A continuación, se presenta la estrategia y planificación para la generación, análisis e interpretación de los resultados.

3.9.1. Modelo de los datos según tipo de variables

En la presentación de los resultados obtenidos de la investigación, se graficará todos los parámetros de los 5 posibles medios de cultivo, con el fin de determinar el medio de cultivo óptimo para la inserción de la bacteria producto de nisina.

Se trazará una curva de calibración a partir de soluciones estandarizadas de nisina. Se obtendrá un modelo matemático del diámetro de las zonas de inhibición microbiana (mm) en función de la actividad específica de la nisina (IU/mL). A partir de esta ecuación se podrá obtener la actividad específica recuperada a partir de mediciones de las zonas de inhibición producto de la nisina en las muestras recuperadas.

A partir del dato de actividad específica recuperada, será posible calcular la cantidad de nisina recuperada y determinar la eficiencia de recuperación de cada protocolo evaluado.

Se presentará los resultados de las eficiencias de recuperación en función de los protocolos evaluados y de los posibles medios de cultivo. Esto con el fin de determinar el protocolo con la recuperación más alta, de manera simple, rápida, confiable y de grado alimenticio

A partir de estos resultados, se realizará un análisis de varianza para determinar si existe diferencia significativa en la cantidad de nisina recuperada en función del protocolo ejecutado y en función de los posibles medios de cultivo.

3.9.2. Programas por utilizar para el análisis de datos

A continuación, se presentan los software utilizados en el proyecto para la generación de tablas, gráficas y resultados.

3.9.2.1. Microsoft Excel 2016

Se utilizará el software Microsoft Excel 2013 para la tabulación de datos, el cálculo respectivo de los resultados, el análisis estadístico y de varianza.

3.9.2.2. QtiPlot 0.9.8.9

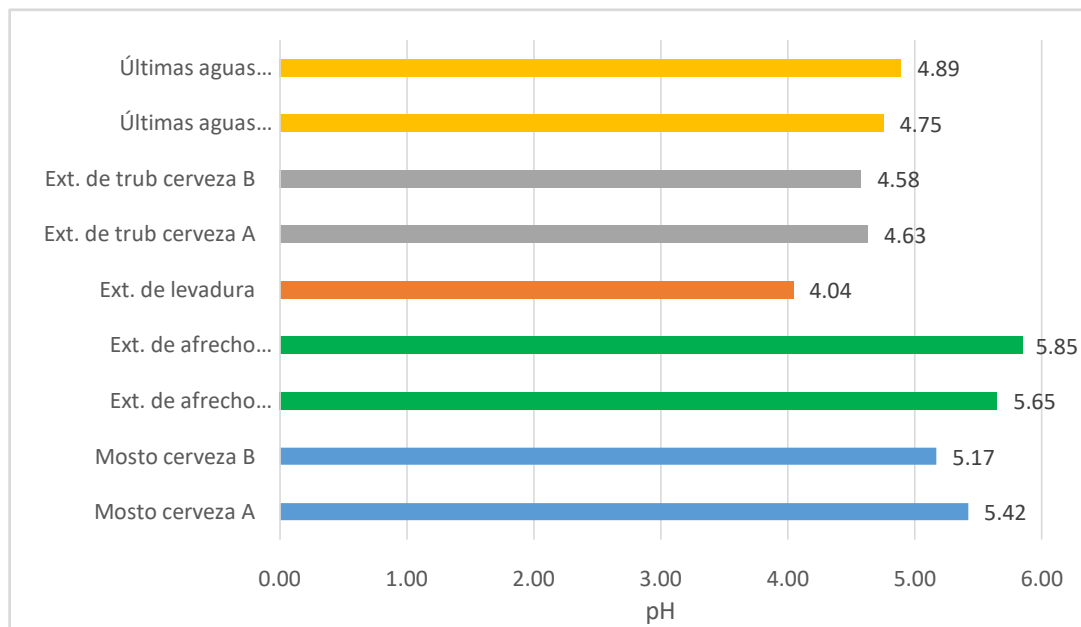
Se utilizará el software QtiPlot para graficar los comportamientos de los elementos fertilizantes en función del tiempo de fermentación, para cada formulación propuesta. También se utilizará para indicar y obtener rangos y modelos matemáticos de dichos comportamientos.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de posibles medios de cultivo

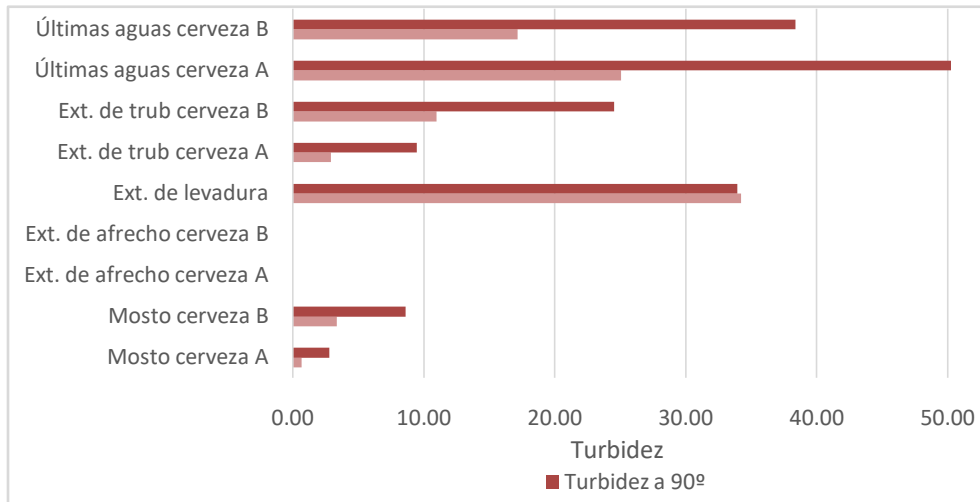
A continuación, se presentan las gráficas de los parámetros evaluados en la caracterización de los 5 posibles medios de cultivo.

Figura 6. Comportamiento del pH de los posibles medios de cultivo



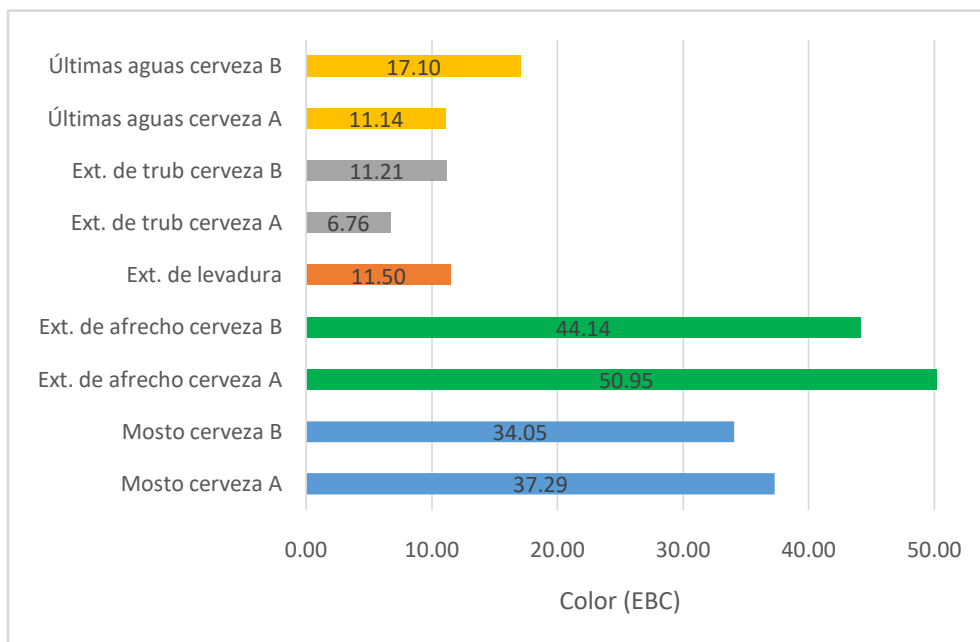
Fuente: elaboración propia.

Figura 7. Comportamiento de la turbidez a 25 ° y a 90 ° de los posibles medios de cultivo



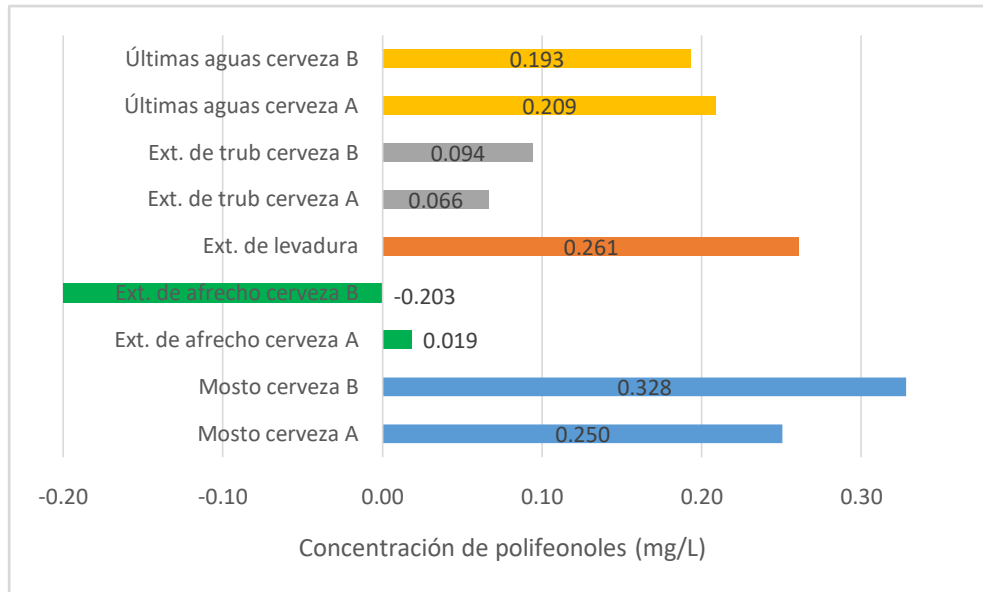
Fuente: elaboración propia.

Figura 8. Comportamiento del color de los posibles medios de cultivo



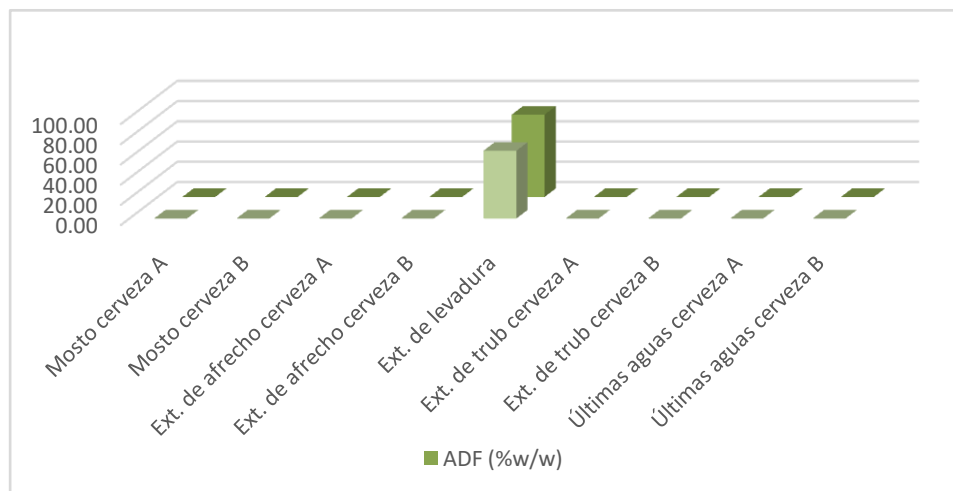
Fuente: elaboración propia.

Figura 9. **Comportamiento de la concentración de polifenoles en los posibles medios de cultivo**



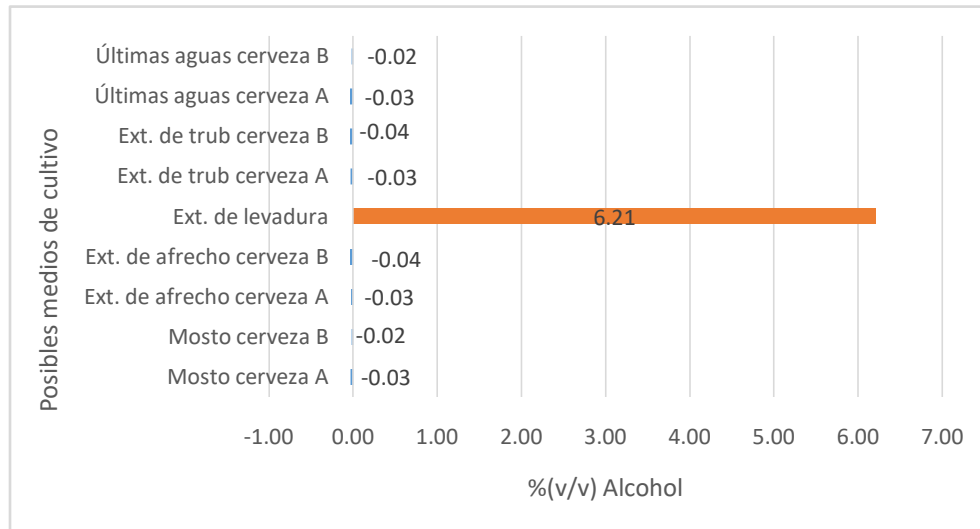
Fuente: elaboración propia.

Figura 10. **Comportamiento del grado de fermentación de los posibles medios de cultivo**



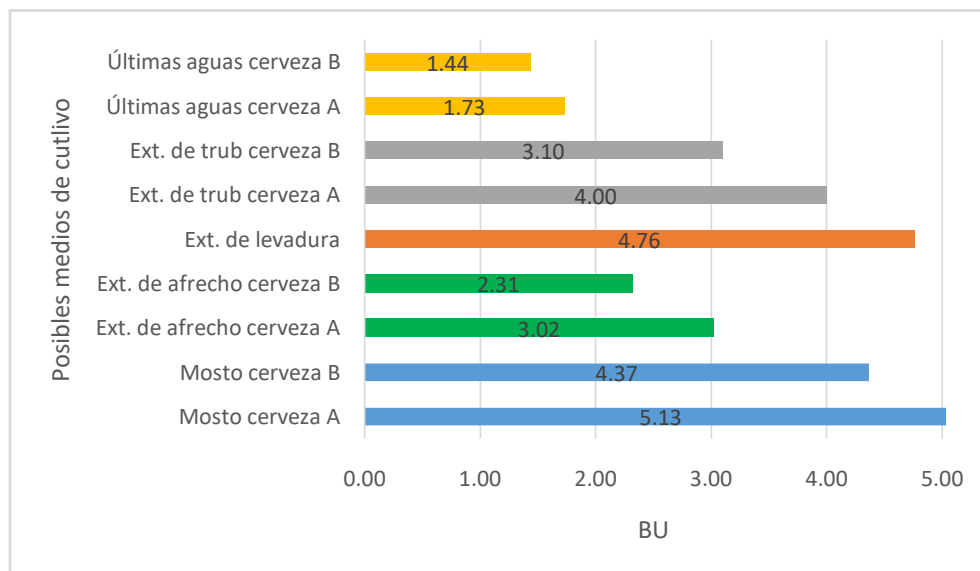
Fuente: elaboración propia.

Figura 11. **Comportamiento del grado de alcohol de los posibles medios de cultivo**



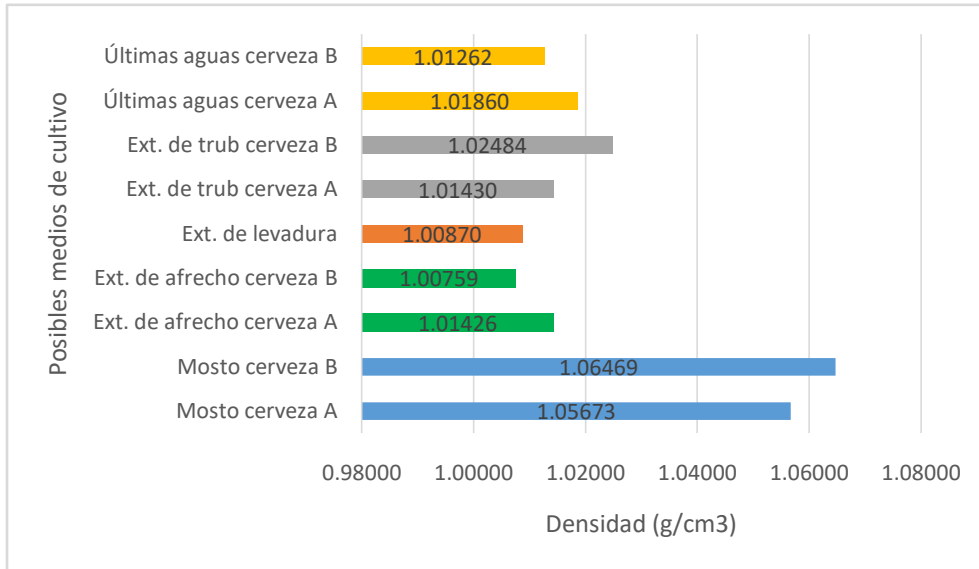
Fuente: elaboración propia.

Figura 12. **Comportamiento del nivel de amargura de los posibles medios de cultivo**



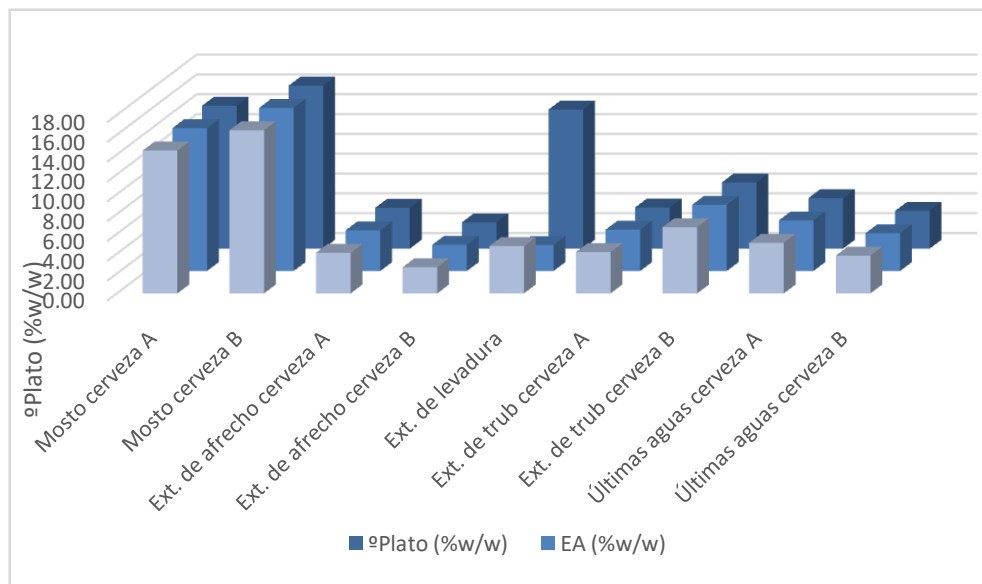
Fuente: elaboración propia.

Figura 13. Comportamiento de la densidad de los posibles medios de cultivo



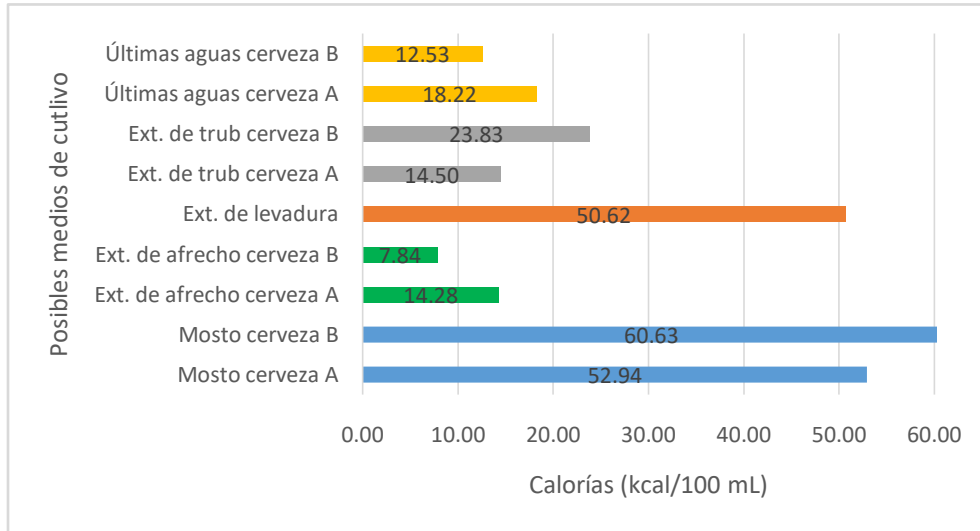
Fuente: elaboración propia.

Figura 14. Comportamiento de la gravedad de los posibles medios de cultivo



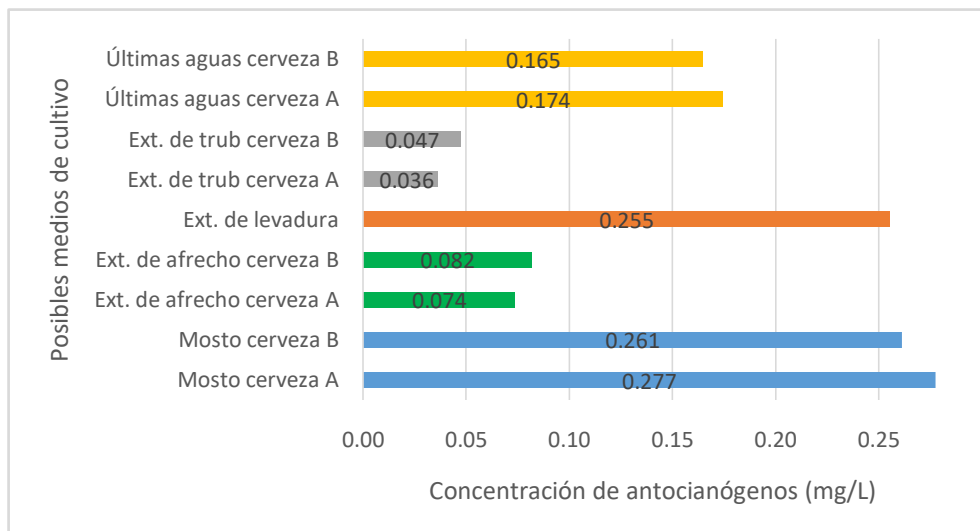
Fuente: elaboración propia.

Figura 15. **Comportamiento del valor calórico de los posibles medios de cultivo**



Fuente: elaboración propia.

Figura 16. **Comportamiento de la concentración de antocianógenos en los posibles medios de cultivo**

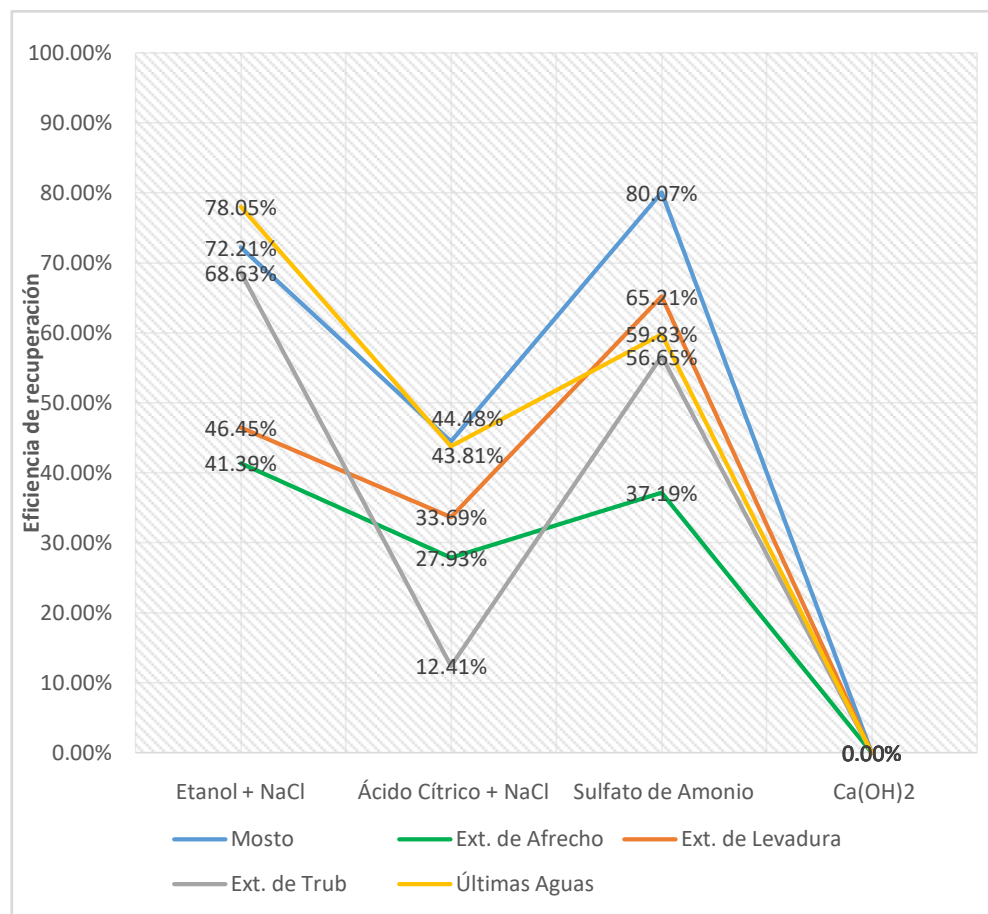


Fuente: elaboración propia.

4.2. Recuperación de nisina

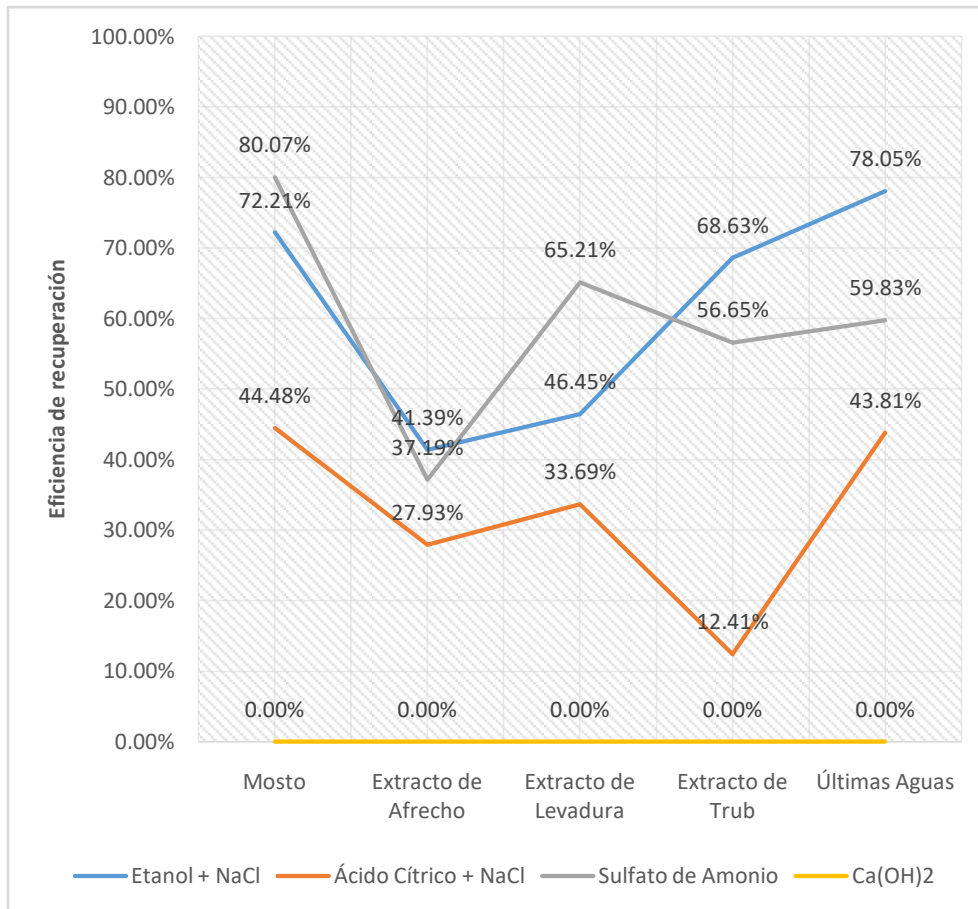
A continuación se presentan las gráficas de los resultados de los 4 métodos de recuperación evaluados.

Figura 17. Eficiencia de recuperación de nisina en función del método de recuperación utilizado



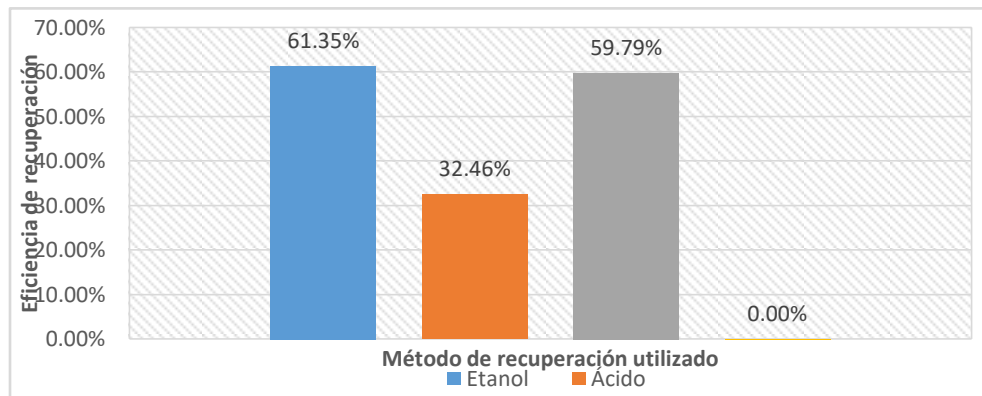
Fuente: elaboración propia.

Figura 18. **Eficiencia de recuperación de nisina en función del posible medio de cultivo**



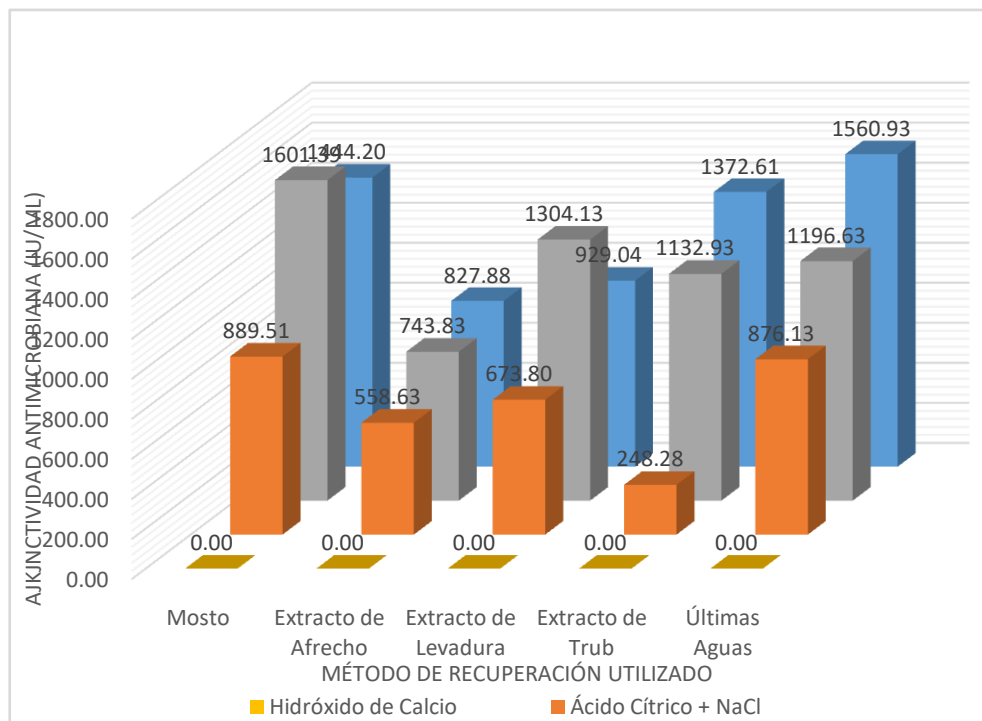
Fuente: elaboración propia.

Figura 19. Promedio de la eficiencia de recuperación de nisina en función del método de recuperación utilizado



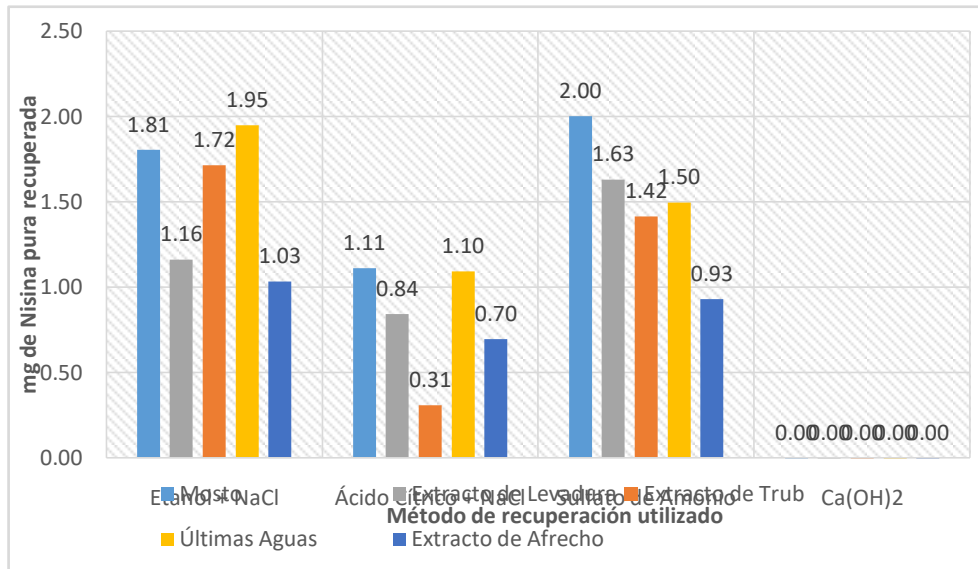
Fuente: elaboración propia.

Figura 20. Actividad biológica de la nisina recuperada en función del método de recuperación utilizado



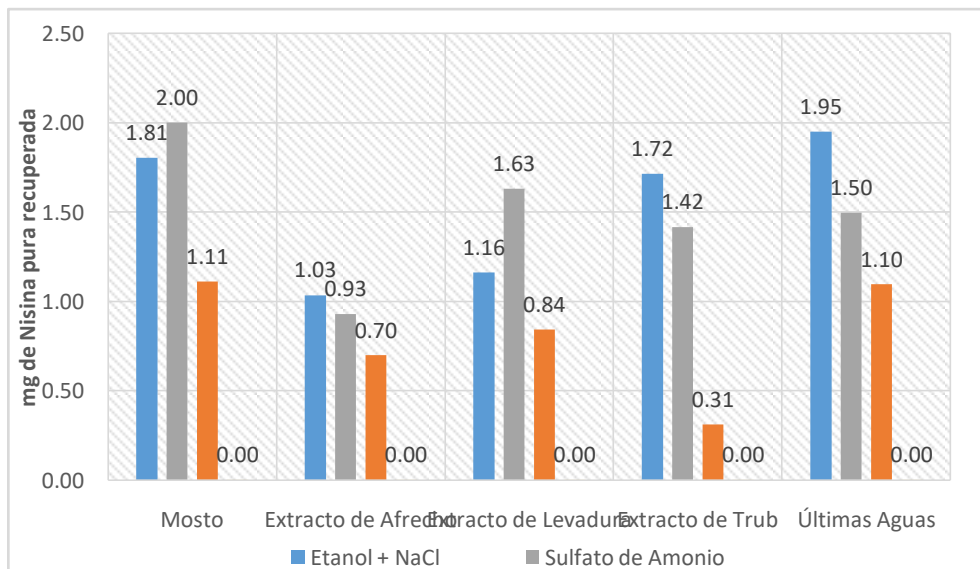
Fuente: elaboración propia.

Figura 21. Miligramos de nisina pura recuperada en función del método de recuperación utilizado



Fuente: elaboración propia.

Figura 22. Miligramos de nisina pura recuperada en función del posible medio de cultivo



Fuente: elaboración propia.

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El trabajo experimental de la recuperación de la nisina a partir de los subproductos de una cervecería que contienen azúcares fermentables se dividió en dos partes: la caracterización fisicoquímica de 5 posibles medios de cultivo para la inserción de la bacteria productora *Micrococcus luteus*; seguido de la evaluación de 4 protocolos de recuperación de la nisina y la determinación de la actividad antimicrobiana de la nisina recuperada, mediante el método KB/DAS.

5.1. Caracterización de los posibles medios de cultivo

En la caracterización de los 5 posibles medios de cultivo (mosto, extracto de afrecho, extracto de levadura, extracto de trub y últimas aguas), se evaluaron los parámetros de pH, turbidez (a 25 ° y 90 °), grado de alcohol, contenido de azúcares, densidad, grado de fermentación, calorías, BU, color, concentración de polifenoles y antocianógenos. Debido a que la mayoría de estos parámetros se ven influenciados directamente por la temperatura (por ejemplo, grado Plato, pH, densidad, entre otros), se decidió estandarizar la temperatura para todas las muestras a 25 ° C.

En la figura 6 se presentan los valores de pH, de los cinco posibles medios de cultivo, los cuales van desde un pH de 4,04 hasta 5,85. Se determinó que, independientemente del tipo de cerveza, los valores de pH de todos los medios se representan un medio viable para la inserción de la bacteria productora.

El mosto diluido, el extracto de afrecho y las últimas aguas reportaron pHs cercanos a 5,5, el cual se indica como el pH óptimo para la producción de nisina. Estos medios de naturaleza ácida disminuyen la adsorción celular del bactericida e incrementan la estabilidad bioquímica de la nisina

Los valores de pH de los posibles medios de cultivo evaluados están por debajo del rango de máxima adherencia celular (pH = 5,5-6,5) lo que permitió recuperar materia con actividad antimicrobiana y bajo contenido de impurezas.

Las muestras con el pH más bajo fueron los extractos de levadura, con un pH de 4,04, debido a que durante el proceso de fermentación las levaduras liberan alcohol, dióxido de carbono, ácidos orgánicos e inorgánicos, los cuales disminuyeron el pH de la solución.

En la figura 7 se presenta el comportamiento de la turbidez (25 ° y 90 °) de los posibles medios de cultivo. Se registraron los valores más altos de turbidez a 90 ° para las muestras de las últimas aguas de la cerveza A y B con 50 y 38 EBC, respectivamente; el extracto de levadura con 35 EBC y el extracto de trub de la cerveza B con 25 EBC.

Los medios de cultivo con los valores más altos de turbidez a 90 ° (figura 7), fueron los medios efluentes de procesos que desprenden una cantidad considerable de partículas sólidas inferiores a 1 µm, tales como proteínas pequeñas y polifenoles.

Los cinco medios evaluados se caracterizan por contener diferentes tipos de partículas en solución: proteínas y carbohidratos en solución provenientes de la malta de cebada en el mosto; proteína precipitada por el proceso *Whirlpool* y taninos (polifenoles) provenientes principalmente del lúpulo, en el extracto de trub; partículas sólidas del proceso de lixiviación en las últimas aguas y extracto de afrecho; células diluidas y sedimentos de levadura en el extracto fermentado de levadura.

Los extractos de afrecho de ambos tipos de cerveza fueron las soluciones más difíciles y lentas de filtrar, donde se recuperó extracto en pequeños volúmenes, son las muestras con la mayor apariencia turbia a simple vista. Las mediciones de turbidez de los extractos de afrecho resultaron en lecturas nulas en el turbidímetro. Se interpreta que en la muestra hay un alto contenido de sólidos suspendidos que imposibilitan la lectura de la turbidez, la cual posiblemente sobrepase el rango de lectura del turbidímetro utilizado (0-100 EBC), especificado por Pentair Haffmans B.V., en el 2012.

La relación entre la turbidez y el color de las muestras (ver figuras 7, 8 y 9) queda demostrada con las muestras de afrecho que son las únicas con valores de turbidez nula, valores negativos en la concentración de polifenoles y con los valores más altos de color, con un valor de 45 a 50 EBC, que duplica y triplica al resto, incluso en valores mayores que el color de las muestras de mosto.

El extracto de levadura presentó valores altos de concentración de polifenoles, turbidez a 90° y el mayor valor de turbidez a 25°, por encima de los 35 EBC, es el único medio de cultivo con valores de turbidez a 25 ° mayores que los de la turbidez a 90 °. Un medio de cultivo con estas características indica la presencia de partículas superiores a 1 µm, tales como células de levaduras, proteínas, carbohidratos originales del mosto y residuos de tierra de diatomea (utilizada en la filtración kieselguhr). Esto indica que utilizar este medio de cultivo generaría recuperar soluciones con alto contenido de impurezas.

En contraste, los valores más bajos de turbidez se reportaron para los mostos de ambos tipos de cerveza, sin sobrepasar los 10 EBC. Esto indica que existen residuos presentes en la solución, pero en cantidades pequeñas, lo que representa una ventaja para la obtención de precipitados con la menor cantidad posible de excipientes.

Se determinó que todos los posibles medios de cultivo, exceptuando al extracto de levadura, presentaron valores bajos de turbidez a 25 °. Los 5 medios presentaron pocas partículas contaminantes en las muestras de nisina recuperada.

De todo el proceso de elaboración de cerveza, solo las muestras del extracto de levadura fueron tomadas durante un proceso fermentativo, son las únicas muestras en reportar valores del grado de fermentación (ADF y RDF) y grado de alcohol, presentados en las figuras 10 y 11, respectivamente.

En la figura 11 se presenta la mayor desventaja que tiene el extracto de levadura para la implementación como medio de cultivo, debido a que el contenido de alcohol sobrepasa el 6 % (v/v). Todos los otros medios no presentan ningún riesgo a la bacteria productora al no contener ningún porcentaje de alcohol.

El extracto de levadura presentó un 67 % de grado real de fermentación (RDF) y un 81 % de grado aparente de atenuación de fermentación (ADF) (ver figura 10), junto con un promedio de 6,21 % (v/v) de contenido alcohólico, para mediciones realizadas durante 7 días después de iniciada la fermentación.

Los valores obtenidos de ADF y RDF indican que el extracto de levadura, a pesar de haber atravesado el proceso de fermentación, aún contiene una cantidad suficiente de solutos que representan una posible fuente de nutrientes para la bacteria productora de bactericidas; sin embargo, el contenido de alcohol influye negativamente en el crecimiento, la reproducción de la bacteria productora y disminuye la eficiencia de producción de bactericidas.

Siguiendo el flujo de elaboración de cerveza (ver figura 5) e identificando el punto de adición de lúpulo; se encuentra la relación de los valores del nivel de amargura (BU) con los medios de cultivo evaluados, presentados en la figura 12.

Se determinó que el mosto y el extracto de levadura son los medios menos favorables para el cultivo de nisina, los cuales sobrepasan el rango óptimo de producción de 4 BU. El extracto de trub, afrecho y las últimas aguas quedan por debajo de dicho valor. Los 5 posibles medios matrices se encuentran debajo de la mitad del valor crítico de 10 BU descrito por Müller-Auffermann.

Tanto el extracto de afrecho como las últimas aguas se obtienen como subproductos del filtro Lauter, proceso previo a la adición del lúpulo. Ambos medios de cultivo reportaron las menores cantidades de BU, con el promedio más bajo de 1,44.

Posteriormente al filtrado, se procede al cocimiento del mosto, punto en donde se agrega el lúpulo y de donde se toman las muestras de mosto; el cual se reporta como el medio evaluado con la mayor cantidad de BU, con un promedio de 5,13 y 4,37 para la cerveza A y B, respectivamente. Las muestras provenientes de la cerveza A presentan mayores valores de BU que los de la cerveza B, ya que comercialmente la cerveza A posee mayor cantidad de lúpulo que la cerveza B.

Luego de proceso de cocción, se trasiega el mosto a los tanques de centrifugación *Whirlpool* en donde se extrajo un sedimento proteico llamado trub. Se evidencian trazas de lúpulo en solución por la mediana cantidad de BU. Posteriormente, el mosto se trasiega a los tanques fermentadores donde se siembra la levadura. Las muestras del extracto de levadura resultaron con el segundo mayor valor de BU, cercano a las muestras de mosto de los dos tipos de cerveza evaluados.

En la figura 13 se presentan las densidades de los 5 posibles medios, los cuales están en un rango de 1,00759 a 1,06469 g/cm³. Las muestras con la mayor densidad fueron las del mosto, seguido por las muestras del extracto de trub, extracto de levadura, últimas aguas y, por último, el extracto de afrecho.

Un aumento en la densidad se debe no solo a la cantidad de carbohidratos, sino también a la cantidad de partículas sólidas presentes en la solución, tales como células de levadura, proteínas y compuestos remanentes de algún proceso anterior. La presencia de sólidos en solución que pudo influir en los procedimientos de recuperación de nisina.

Los medios con la mayor densidad del grupo fueron los mostos y los extractos de trub. El trub por tener una consistencia espesa y espumosa, se dificultó el proceso de filtración para la recuperación del extracto, logrando obtener de 5 kg un mínimo de 50 mL para los análisis de la caracterización.

El valor con la menor densidad fueron las muestras de extracto de levadura con $1,0087 \text{ g/cm}^3$; indican que un contenido de azúcares disueltos fue consumido por las levaduras en el proceso de fermentación, liberaron dióxido de carbono y producen alcohol. La densidad del alcohol, al ser menor que la del agua, redujo significativamente la densidad de la solución.

La densidad (gravedad específica) de los 5 medios evaluados es mayor que la densidad del agua (aprox. $1,00 \text{ g/cm}^3$ a 1atm y $4 \text{ }^\circ\text{C}$) debido a la presencia de azúcares y otros sólidos en la solución. Esto indica que los 5 medios podrían contener azúcares nutritivos para la bacteria productora; pero con la desventaja de contener proteínas o células de levaduras que floculen eventualmente e incrementen la cantidad de impurezas en las soluciones de nisina recuperada.

Análogo al comportamiento de las densidades de los medios evaluados corresponde la tendencia de las concentraciones de azúcares en solución (ver figura 14).

Se observa en la figura 14 que el comportamiento del extracto aparente, extracto real y grado Plato de los 5 medios evaluados. Se determinó que todos los medios, exceptuando al extracto de levadura y los mostos de ambos tipos de cerveza, reportaron valores entre de 4,12 a 6,68 °P, los cuales se encuentran dentro del rango óptimo para la producción de nisina (5 - 10 °P).

Las muestras de mosto presentaron los valores más altos de grado Plato, extracto aparente y extracto real, con un promedio de 14,42 °P para la cerveza tipo A y 16,46 °P para la cerveza tipo B.

Para la caracterización del mosto se tomaron muestras del mosto original utilizado para la elaboración de cada tipo de cerveza evaluada. Con el fin de simular las características de un flujo de descarte con baja gravedad, efluente del proceso convencional de cocción, se diluyó el mosto con agua desmineralizada hasta alcanzar un extracto de 5 °P. Esta dilución significa pasar de una concentración original de los mostos de 15 °P hasta 5 °P; representando una dilución 1:3 del valor original. De igual manera, para el mosto diluido, todas las características evaluadas mantendrían esta proporción.

Los valores de grado Plato, extracto aparente y extracto real, en casi todos los medios evaluados resultaron muy similares. La única excepción fueron las muestras del extracto de levadura, medio el cual fue tomado durante el proceso de fermentación.

Solo las muestras del extracto de levadura presentaron una variación en los 3 valores de extracto: el extracto original tuvo una concentración de 14,03 °P, correspondiente a la tendencia obtenida de las muestras de mosto original, lo que en el proceso indica tener un contenido óptimo de azúcares disponibles para la fermentación del mosto.

Para el extracto aparente y extracto real, se obtuvo un promedio de 2,62 °P y 4,78 °P, respectivamente. La reducción sustancial de los valores de extracto, en relación con el extracto original, se debe a la variación de densidades de las soluciones, producto de la producción de etanol y dióxido de carbono a través del proceso de fermentación.

Las muestras de trub de la cerveza B fueron las segundas más altas después de las muestras de mosto, reportan un extracto de 6,68 °P. Seguido de las últimas aguas de la cerveza tipo A con 5,11 °P. Los datos de afrecho, últimas aguas de cerveza tipo B y trub de cerveza tipo A resultaron con valores alrededor de 4 °P.

De manera análoga las tendencias obtenidas de los extractos y densidades, en la figura 15 se observa el comportamiento de las calorías. Se determinó que los medios con los valores más altos corresponden a los valores más altos en la concentración del grado Plato.

En la figura 14 se presenta al mosto y a la levadura como los dos medios con mayor nivel de extracto, correspondiente a la tendencia de la cantidad de azúcares en solución como aporte calórico, presentadas en la figura 15. Se indica que los niveles calóricos, de densidad y extracto son producto del contenido de azúcares en la solución.

Se determinó que las últimas aguas y el extracto de afrecho representan los medios más adecuados para su utilización como medios de cultivo, al tener bajos niveles de BU, polifenoles, turbidez, ningún contenido de alcohol, además de tener valores de pH y extracto dentro del rango óptimo. El extracto de trub se encuentra cerca de estos dos medios, solo con la desventaja de tener niveles altos de turbidez, BU y polifenoles.

Se descarta al mosto, debido a que los valores de extracto original, BU y polifenoles presentes en los mostos originales se encuentran por arriba del rango óptimo. Se recomienda trabajar con mosto diluido para disminuir así el contenido de BU y polifenoles. Trabajar con un “mosto verde” (muestreado previo a la adición del lúpulo) significaría tener un medio nutritivamente relevante y con valores óptimos de BU y Polifenoles.

Se descarta la utilización del extracto de levadura como posible medio de cultivo, debido a su alto contenido de alcohol, turbidez, BU, polifenoles y extracto, factores que impedirían drásticamente al desempeño de la bacteria productora.

5.2. Recuperación de la nisina

Se caracterizaron 5 posibles medios de cultivo con el objetivo de determinar el medio matriz óptimo para la inserción de la bacteria productora de nisina.

Los protocolos construidos resultan de una combinación estratégica de principios fisicoquímicos: ebullición, solubilidad, floculación, acidificación, separación de fases, precipitación, interacciones polares, punto isoeléctrico; junto con diversos procedimientos mecánicos: filtración, microfiltración, decantación y centrifugación.

Simulando un escenario posproducción de nisina, se adicionó una concentración estandarizada de nisina en polvo de presentación comercial (ver inciso 2.3.4.1), y se ejecutaron directamente los métodos de recuperación.

Los métodos de recuperación planteados siguen un línea básica: comenzando con una aislación y concentración de la solución de manera química o mecánica, seguido de una purificación y recuperación de la fase heterogénea, procediendo con un centrifugado y una microfiltración, terminando con una resuspensión en ácido clorhídrico 0,02 N para recrear una concentración apegada a las utilizadas para el trazo de la curva de calibración.

La cantidad inicial de *Micrococcus luteus* obtenida mediante la filtración por membrana para el método de Conteo Aeróbico Total (CAT), tuvo un recuento inicial de 1×10^5 células/mL. Esto se complementa con el concepto que indica que existe una relación inversamente proporcional entre el tamaño de las zonas de inhibición en función de la concentración de la bacteria identificadora, es decir que, a mayor concentración de *Micrococcus luteus* menores serán los diámetros de los halos de inhibición.

El *Micrococcus luteus*, utilizado como microorganismo indicador para el método KB/DAS (ver inciso 2.6.2), fue activado y propagado en NBB-A y NBB-A como medios líquidos. Se procedió a una incubación a temperatura ambiente durante 2 días en condiciones aerobias y con una agitación constante de 100 rpm. Posteriormente, se dejaron todas las muestras en incubación durante 5 días a 28 °C en condiciones aerobias.

Se determinó la actividad antimicrobiana de la nisina recuperada y la eficiencia de recuperación de cada protocolo a partir de la ecuación obtenida de la curva de calibración semilogarítmica (ver figura 23), de la actividad antimicrobiana de la nisina pura (IU/mg) en función del diámetro de las zonas de inhibición (mm).

A partir de la figura 23 se determinaron también las concentraciones mínimas de inhibición (MIC); la dilución con actividad 62,5 IU/mL fue la última en presentar un área de inhibición (ver figura 68 y 69 en los anexos) y la menor concentración de nisina que logra la inhibición de la bacteria identificadora, descartando las soluciones con concentraciones menores a la MIC: 31,25, 15,625 IU/mL.

La curva de calibración (figura 23) presenta una tendencia lineal directamente proporcional del diámetro de las zonas de inhibición en función de la actividad específica de la nisina; es decir que, a mayor actividad específica de la nisina, mayor será el diámetro de los halos de inhibición. Dicha curva tiene un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9769, lo cual indica que sí existe una correlación lineal entre las concentraciones de nisina pura evaluadas en función de los diámetros de las zonas de inhibición.

Se realizaron pruebas controles para determinar la actividad antimicrobiana de los reactivos puros (sin ninguna cantidad de nisina) utilizados en los métodos de recuperación y evaluar si estos influyen en los resultados de inhibición. Se inyectaron volúmenes de ácido cítrico, etanol al 70 %, cloruro de sodio, sulfato de amonio e hidróxido de calcio, todos sin ninguna concentración de nisina.

Las pruebas control no presentaron ningún halo de inhibición en ninguna muestra realizada (ver figura 92 en los anexos). Se puede considerar una evaporación de los reactivos al agregarse al agar sólido, ya sea a temperatura ambiente o al introducir los platos a la cámara de incubación, lo cual pudo haber disminuido significativamente la concentración de los reactivos.

Se realizó una prueba de control para la lisozima, enzima que puede degradar y ser activa contra el *Micrococcus luteus*. Se agregó un volumen de saliva humana, la cual se conoce por tener en su composición una parte de esta enzima. No se obtuvo ninguna zona de inhibición en las muestras incubadas, lo indica que la concentración de lisozima pudo haber no fue suficiente para lograr la inhibición, estando debajo de la MIC. (Ver figura 93 en los anexos).

La ausencia de zonas de inhibición en las muestras control indican que los halos en las muestras de nisina recuperada fueron producto meramente de la actividad antimicrobiana de la nisina.

Con el fin de remover la mayor cantidad posible de sólidos, partículas o células que pudieran contaminar y disminuir el grado de pureza de las fases recuperadas, las muestras de los 5 posibles medios de cultivo se filtraron 2 veces con tierras diatomeas,

No toda la materia precipitada será nisina con actividad antimicrobiana, sino que también existirá la presencia de otros sólidos y partículas suspendidas. La determinación de la actividad biológica revelará la cantidad activa de nisina recuperada.

Las soluciones se concentraron mediante la evaporación de los solventes ácidos y alcoholes empleados en los métodos de recuperación; se obtuvo soluciones con una mayor concentración de nisina y un menor volumen de trabajo. Posteriormente, se calentaron estas soluciones concentradas a 90 °C durante 5 min con el fin de eliminar posibles contaminaciones.

Posterior al proceso de concentración y esterilización, se disminuyó la temperatura de las soluciones hasta alcanzar 4 - 8 °C, con el propósito de sedimentar y flocular la mayor cantidad posible de sólidos y partículas suspendidas en la solución. La reducción de la temperatura de los medios representó una disminución en la solubilidad de la nisina (solute) en el medio de cultivo (solvente).

Se depuraron los tratamientos con solventes orgánicos ya que representan pérdidas parciales o totales de la actividad antimicrobiana, debido a la formación irreversible de complejos entre la nisina y las proteínas en solución. La mayoría de los métodos que implementan solventes orgánicos producen precipitados abundantes, pero desnaturalizan las proteínas en la solución.

Se utilizó la prueba de actividad antimicrobiana (método de KB/DAS) para determinar la cantidad de nisina activa recuperada. Se presenta en la figura 19 las actividades antimicrobianas de la nisina recuperada: el protocolo de sulfato de amonio recuperó la mayor cantidad de nisina, con un valor de actividad antimicrobiana de 1 601,39 IU/mg, seguido por las muestras de etanol + NaCl, con 1 560,93 IU/mg, 1 444,20 IU/mg y 1 372,61 IU/mg para las últimas aguas, mosto y extracto de trub, respectivamente.

La nisina es conocida por ser un péptido relativamente hidrofóbico, que presenta su mayor solubilidad a una hidrofobicidad intermedia; es decir que, a una mayor concentración de alcohol, se presenciara una menor solubilidad proteica.

Se seleccionó al etanol como reactivo principal del protocolo de recuperación, permitió aprovechar las propiedades polares y la inmiscibilidad acuosa de los solventes orgánicos. Las propiedades anfífilas de los bactericidas permiten la migración y concentración del bactericida hacia la interfase o en un punto extremo de la solución heterogénea (fase supernadante o fase inferior), que permite la recuperación del bactericida mediante el protocolo de recuperación.

Se trabajó con etanol al 70 %; fue la concentración óptima que permitió recuperar la mayor cantidad de nisina, que está reportada como la mayor para cualquier otro alcohol. La polaridad del etanol a esta concentración provocó la trans migración de las moléculas del bactericida a la fase acuosa, lo que produjo la precipitación.

El método de recuperación con alcohol presentó los halos de inhibición de mayor dimensión que el resto, debido a que el alcohol facilitó la difusión de la nisina a través del agar sólido.

Las sales agregadas disminuyeron significativamente la solubilidad de los compuestos de naturaleza proteica, debido a la interacción catiónica de las sales con las cadenas hidrofílicas de las moléculas peptídicas, lo que insolubilizó y precipitó a los compuestos proteicos.

Trabajar con soluciones con pH cercano a 2 y adicionar cloruro de sodio, permitió la separación y desadsorción de las moléculas del bactericida de las células de la bacteria productora, lo que permitió recuperar nisina con bajas contaminaciones de compuestos no deseados.

Tanto para el método de etanol como el de ácido cítrico, se obtuvieron copiosos precipitados, pero con baja actividad antimicrobiana, debido a que durante el salteado con NaCl o $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, se separaron las fases y se precipitaron la mayoría de los sólidos suspendidos, al punto de desnaturalizar las proteínas del medio. Esto provocó la formación de complejos entre las proteínas y nisina con baja actividad.

Para alcanzar el punto isoeléctrico, el punto máximo de insolubilidad de la nisina, (pH 1,8 – 2,0 para la molécula de la nisina A), se utilizó ácido cítrico de grado alimenticio, para acidificar la solución hasta alcanzar un pH cercano a 2,0. Este pH permitió ejecutar los métodos en el punto donde la nisina se precipitó en la mayor cantidad posible.

Trabajar con un medio ácido permitió desplegar la mejor característica de la nisina, su máxima estabilidad a altas temperaturas, lo que a su vez permitió ejecutar los procesos de concentración y erradicación de posibles contaminaciones de la solución mediante evaporación, sin afectar negativamente a la actividad de la nisina.

Esto representa un desempeño efectivo de la nisina a través de procesos claves de la producción cervecera, como el proceso de pasteurización, la filtración Kieselgurh, sin alterar la actividad biológica de la nisina.

Para el método de hidróxido de calcio (cal hidratada), se agregó una lechada de cal que incrementó el pH de 4,5 a 9,0, lo que produjo la floculación y precipitación de las partículas en solución. Esto produjo copiosos precipitados de apariencia blancuzca o amarillenta.

Los iones Ca^{+2} y Mg^{+2} actuaron adsorbiendo las moléculas de la nisina presentes en los medios de cultivo. No obstante, la purificación y remoción de cal de estos precipitados resultó imposible debido a que la cal se apelmazó junto con la materia recuperada sin poder separarlas.

El procedimiento con hidróxido de calcio no obtuvo actividad antimicrobiana en ningún medio de cultivo ni en ninguna corrida, a pesar de la cantidad considerable de precipitado recuperado, debido a que la naturaleza básica del hidróxido de calcio resultó en el incremento drástico del pH de la solución hasta alcanzar el punto de inactivación biológica de la nisina, y anuló significativamente la actividad antimicrobiana de la nisina. Esto se observa en que ninguna muestra del método de cal presentó halos de inhibición.

En la figura 17 se reporta las eficiencias de recuperación de nisina en función del método de recuperación utilizado, y en la figura 18 las eficiencias de recuperación en función de los posibles medios de cultivo.

El método con mayor eficiencia fue el sulfato de amonio para el mosto, con una eficiencia del 80,07 %, seguido del etanol + NaCl para 3 posibles medios, con eficiencias de 78,05 %, 72,21 % y 68,63 % para las últimas aguas, mosto y extracto de trub, respectivamente. Debajo se encuentran los datos de ácido cítrico + NaCl, reporta el mayor valor para el mosto con 44,48 % y, por último, el método de hidróxido de calcio tuvo una eficiencia de 0 % para todos los medios, debido a que no se logró recuperar ninguna cantidad de nisina con actividad biológica.

En figura 19 se presentan los promedios de las eficiencias de recuperación obtenidas en los 4 protocolos de recuperación, donde se determinó que el método de etanol + NaCl como el mejor método para la recuperación de nisina con un promedio de recuperación de 61,35 %; seguido por método de sulfato de amonio con 59,79 %; por la mitad de estos 2 métodos, se encuentra el método de ácido cítrico con 32,46 %, y por último está el método de hidróxido de calcio con 0 % de eficiencia de recuperación al no obtener ninguna zona de inhibición microbiana.

Mediante la ecuación que describe el comportamiento de la actividad antimicrobiana de la solución en función de la solución utilizada, se determinó la cantidad de miligramos de nisina pura recuperada, presentada en las figuras 21 y 22. La relación tiene un comportamiento análogo al de las eficiencias de recuperación.

En la figura 21, se determinó que los métodos de sulfato de amonio y de etanol + NaCl lograron las mayores cantidades de nisina pura recuperada, seguidos por el método de ácido cítrico + NaCl y por último, el de hidróxido de calcio.

Para calcular la cantidad de nisina pura en la solución con nisina de grado comercial al 2,5 %, se multiplicó por un factor de pureza de 2,5 %. Por ejemplo, 100 mg de nisina comercial corresponden a 2,5 mg de nisina pura.

La mayor cantidad de nisina recuperada fue para el método de sulfato de amonio mosto, recuperando 2,00 mg de nisina pura con una eficiencia del 80,07 % de recuperación. El método de etanol + NaCl recuperó los 3 siguientes datos más altos, para las últimas aguas, el mosto y el extracto de trub con 1,95, 1,81 y 1,72 mg, respectivamente.

Seguido de nuevo por el método del sulfato del amonio en mosto, extracto de levadura, últimas aguas y extracto de trub. Por debajo de los valores más altos obtenidos por estos dos métodos, se encuentran los resultados obtenidos con el método de ácido cítrico + NaCl, con 1,11 y 1,10 mg recuperados para el mosto y las últimas aguas. Por último, el método de hidróxido de calcio que no logró recuperar ningún miligramo activo de nisina.

En la figura 22 se presentan los miligramos de nisina pura recuperados por cada posible medio de cultivo utilizado; son los mostos, las últimas aguas, el extracto de trub, levadura y afrecho, en el orden decreciente de los miligramos efectivos recuperados.

CONCLUSIONES

1. Todos los medios, exceptuando al extracto de levadura y los mostos, representan ser medios viables para la implementación como medios de cultivo dentro del rango óptimo de extracto para la máxima liberación de nisina (5 a 10 °P), con valores de 4,12 a 6,68 °P.
2. Se encontró que todos los medios de cultivo son de naturaleza ácida y se encuentran dentro del rango óptimo para la producción de nisina y mínima de adherencia celular (pH = 5,5) con pHs de 4,58 a 5,85.
3. Se determinó que las partículas presentes en los medios de cultivo evaluados, exceptuando al extracto de levadura, no representan un riesgo como contaminantes en las muestras recuperadas, con valores menores a 25 EBC.
4. Se determinó que las últimas aguas y el extracto de afrecho representan los medios óptimos al tener bajos niveles de BU, polifenoles, turbidez y ningún contenido de alcohol, además de estar dentro del rango óptimo del nivel de extracto y pH.
5. Se determinó que los métodos de etanol + NaCl, ácido cítrico + NaCl y sulfato de amonio obtuvieron los mejores resultados de recuperación de nisina, de manera efectiva, simple y rápida, con sólo reactivos de grado alimenticio, de baja laboriosidad y alto porcentaje de recuperación y pureza.

6. El método de sulfato de amonio reportó la mayor eficiencia, con una recuperación del 80,07 % de nisina en mosto. Se precipitó 2,00 mg de nisina pura. El sulfato de amonio también logró recuperaciones altas en el extracto de levadura, últimas aguas y extracto de trub.
7. El método de etanol + NaCl recuperó los 3 siguientes datos más altos en tres diferentes medios de cultivo, con eficiencias de recuperación de nisina del 78,05 %, 72,21 % y 68,63 %, en las últimas aguas, mosto y extracto de trub, respectivamente y se recuperó 1,95, 181 y 1,72 mg de nisina pura para cada respectivo medio.
8. A partir del promedio de todas las eficiencias reportadas en 4 diferentes medios de cultivo, se determinó que el método de etanol + NaCl es el mejor método para la recuperación de nisina, con un promedio de recuperación de 61,35 %.
9. El protocolo de floculación con hidróxido de calcio fue el único método con que no se logró observar ninguna zona de inhibición (en el método KB/DAS), ni recuperar ningún miligramo de nisina activa y reportó datos de 0 % de recuperación en los 5 posibles medios evaluados.

RECOMENDACIONES

1. Realizar filtrados simultáneos y sucesivos, con el fin de realizar la extracción de manera rápida y con la mínima cantidad de contaminación posible para medios de naturaleza espesa, como el afrecho, levadura y trub.
2. Utilizar el método descrito por Taylor, FAO-JECFA/WHO y Müller-Auffermann: activación la bacteria identificadora por 3 días con agitación aerobia, para después inocular y propagarla dentro del agar líquido, verter en cajas de Petri y esperar su solidificación. Descartar el método descrito por Weber de solo esparcir una película de la bacteria identificadora sobre el agar sólido y no dentro de éste.
3. Verificar cualquier alternativa de bacteria identificadora mediante una tinción de Gram para identificar si pertenece al grupo grampositivo. Esto indica que es una bacteria que la nisina logra su inhibición.
4. Establecer un valor inicial alto de actividad antimicrobiana y realizar un mayor número de diluciones para cubrir una mayor porción de la tendencia de inhibición, proyectar un trazo más amplio de la curva de calibración y generar así una ecuación de desempeño de la nisina estadísticamente más representativa.
5. Ejecutar los métodos de recuperación a bajas temperaturas y así discutir la solubilidad de la solución y facilitar la precipitación de sólidos suspendidos.

6. Utilizar siempre el primer precipitado recuperado y evitar la repetición sucesiva de los procesos de recuperación, ya que esto sólo devolverá materia con una pobre cantidad de bactericida y una pérdida total de la actividad antibiótica del bactericida.
7. Aprovechar la hidrofobicidad de la nisina trabajando en medios polares; por ejemplo, el etanol. Se deberá considerar trabajar con concentraciones intermedias de etanol, desde 50 % a 70 %, para alcanzar la extracción óptima de la nisina.
8. Para lograr una recuperación con la mínima cantidad de contaminantes y en una presentación más estable, se puede aplicar realizar un secado directo por aspersión para eliminar la mayor humedad posible, lograr una presentación en polvo, y recuperar materia inerte a las propiedades organolépticas originales del producto final.
9. La rotoevaporación y recuperación del alcohol utilizado en los métodos de recuperación lograría recircular el condensado para su reutilización, optimizando y aumentando la rentabilidad del proceso. Esto reduce también el peligro de inflamabilidad de los alcoholes, y convierte al método en un procesamiento industrialmente más práctico.
10. Considerar la producción de bactericida *in situ* mediante la utilización de iniciadores (*starters*, por ejemplo, *Lactococcus lactis*), liberando al bactericida dentro del mismo alimento.

11. Evaluar las aplicaciones de la nisina dentro del proceso fermentativo y de pasteurización en la producción cervecera, lo que representaría una significativa ventaja para favorecer a las levaduras cerveceras y reducción de temperaturas y tiempo de exposición.

12. Se deberá caracterizar el mosto “verde”, el cual es el mosto previo a la adición del lúpulo en la casa de cocimientos, para tener un medio rentable y nutritivamente relevante, pero con niveles adecuados de BU y polifenoles.

BIBLIOGRAFÍA

1. ABTS, ANDRÉ. *Easy and rapid purification of highly active Nisin*. Instituto de Bioquímica, Centro de Investigación Médica y Biológica, Universidad Heinrich Heine de Düsseldorf. Düsseldorf, Alemania. 2011. 10 p.
2. BANERJEE, SHIBA PROSAD. *Detection, partial purification and characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus brevis FPTLB3 isolated from freshwater fish*. Departamento de Tecnología de Procesamiento del Pescado, Facultad de Ciencias de la Pesca, W.B.U.A.F.S. Kolkata, India. 2011. 9 p.
3. BURIANEK, LOUIS. *Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures*. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Estatal de Ohio. Columbus, Ohio, Estados Unidos de América. 2000. 6 p.
4. CHEESEMAN, GARY. *An improved method of preparing Nisin*. Instituto Nacional para la Investigación en la Industria Láctea, Universidad de Reading. Reading, Inglaterra. 1956. 6 p.
5. CHOI, HUBERT-JAY. *Production of a Nisin-like bacteriocin by Lactococcus lactis subsp. lactis. A164 isolated from Kimchi*. Departamento de Biotecnología y Centro de Investigación de Bioproductos, Universidad de Yonsei. Seúl, Corea del Sur. 1999. 27 p.

6. DE VUYST, LUC. *Nisin, a lantibiotic produced by Lactococcus lactis subsp. lactis: properties, biosynthesis, fermentation and applications*. Laboratorio de Microbiología Industrial y Biocatálisis, Facultad de Agricultura y Ciencias Biológicas Aplicadas, Universidad de Gante. Gante, Bélgica. 1994. 23 p.
7. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) / WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Compendium of food additive specifications, vol. 1: Nisin*. Monografía 14 de la FAO JECFA. Roma, Italia. 2014. 44p.
8. GROSS, ERICK. *Structure of Nisin*. Laboratorio de Ciencias Biomédicas, Instituto Nacional de Salud Infantil y Desarrollo Humano. Bethesda, Maryland, Estados Unidos de América. 1971. 38 p.
9. KLAENHAMMER, TONY. *Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. Departamento de Ciencias de los Alimentos, Centro de Investigación de Productos Lácteos del Sudeste, Universidad Estatal de Carolina del Norte. Raleigh, Carolina del Norte, Estados Unidos de América. 1993. 23 p.
10. MÜLLER-AUFFERMANN, KEITH. / GRIJALVA, FABIOLA. *Nisin and its usage in breweries: a review and discussion*. Research Centre Weihenstephan for Brewing and Food Quality, Technical University of Munich (TUM), Freising, Alemania. 2014a. 13 p.

11. MÜLLER-AUFFERMANN, KEITH. / GRIJALVA, FABIOLA. *Nisin-producing microorganisms and their implementation in brewers' wort*. Research Centre Weihenstephan for Brewing and Food Quality, Technical University of Munich (TUM). Freising, Alemania. 2014. 12 p.
12. PARADA, JOSÈ LUIS. *Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives*. División de Bioprocesos y Biotecnología, Universidad Federal de Paraná. Curitiba, Paraná, Brasil. 2007. 27 p.
13. PARENTE, EUGENIO. *Production, recovery and purification of bacteriocin from lactic acid bacteria*. Departamento de Biología, Defensa y Biotecnología Agroforestal, Universidad de la Basilicata. Potenza, Italia. 1999. 12 p.
14. PENTAIR HAFMANS B.V. *Folleto del producto: Haffmans Vos Rota, Medidor de Turbidez*. De Haffmans BV, de Holanda para Pentair Water Latinoamérica, S.A. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. 2012. 25 p.
15. PINGITORE, VERA. *Different strategies for purification of antimicrobial peptides from lactic acid bacteria (LAB)*. Centro de Referencia para Lactobacilos CERELA-CONICET. Tucumán, Argentina. 2007. 11 p.
16. RIBEIRO, SUSANA. *Isolation and characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. CITA-A de la Universidad de las Azores. Angra do Heroísmo, Portugal. 2008. 4 p.

17. SUGANTHI, VICTOR. *Antibiotic Nisin: Natural preservative from Lactococcus lactis*. División de Biotecnología Ambiental, Escuela de Tecnología y Ciencias Biológicas, VIT University. Vellore, India. 2012. 7 p.
18. TAYLOR, TRUCE MARTIN. *Extraction of Nisin from a 2,5 % commercial Nisin product using methanol and ethanol solutions*. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Tennessee. Knoxville, Tennessee, Estados Unidos de América. 2007. 13 p.
19. WEBER, PETER. *Nisin resistance of Bacillus cerus: Preparation of Nisin*. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Estatal de Minnesota. Mankato, Minnesota, Estados Unidos de América. 2004. 8p.
20. XIAO, DAN. *Nisin extraction capacity of aqueous ethanol and methanol from a 2,5 % preparation*. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos y el Departamento de Ciencias Animales, Universidad de Tennessee. Knoxville, Tennessee, Estados Unidos de América. 2010. 6p.
21. YANG, RON. *Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria*. Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Departamento de Ciencias Animales, Universidad de Wyoming. Laramie, Wyoming, Estados Unidos de América. 1992. 18 p.

APÉNDICES

Apéndice 1. **Curva de calibración**

La actividad antimicrobiana de la nisina fue determinada por el método de Kirby-Bauer de difusión en agar sólido (KB/DAS), descrito por Taylor utilizando *Micrococcus luteus* como microorganismo indicador. El método KB/DAS consiste en la medición de zonas de inhibición de crecimiento microbiano del organismo indicador dentro de cajas de Petri con agar sólido. Estas claras zonas de inhibición crecerán de manera proporcional ante la cantidad de nisina en la muestra evaluada.

Inicialmente se realizó la curva de calibración la cual consistía en tomar una solución estandarizada de nisina pura con actividad de 2000 IU/mL. Se preparó una solución patrón con una concentración de 2000 IU/mL disolviendo 0,1 g de la presentación de nisina al 2,5 % en 50 mL de 0,02 N de ácido clorhídrico (grado alimenticio).

Se diluyó la solución patrón con ácido clorhídrico 0,02N, en una serie de diluciones de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 y 15,625 IU/mL.

Se inoculó el agar MRS con la bacteria identificadora, se vertió en cajas Petri y se dejó solidificar, para luego abrir 4 orificios de 5mm de diámetro, donde se inyectaron las disoluciones patrón de nisina; se dejaron incubar aeróbicamente a 28 °C por 5 días.

Continuación apéndice 1.

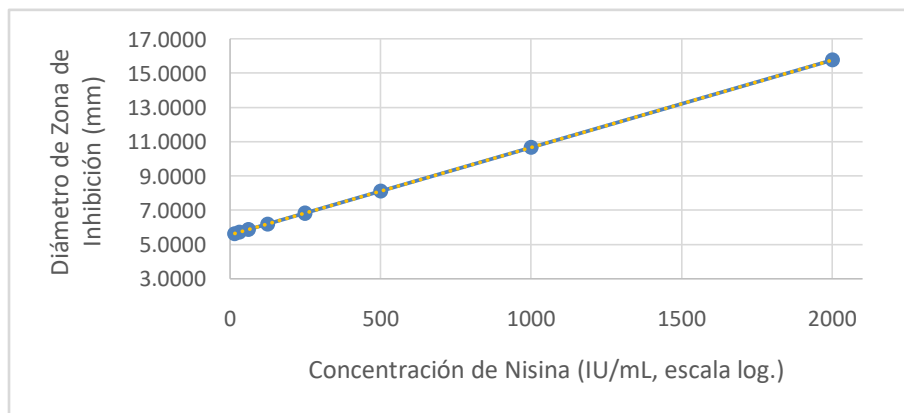
Después del tiempo de incubación, se forman halos de zonas de inhibición los cuales se midieron tres veces en tres diferentes direcciones para poder así establecer una curva de calibración logarítmica de las zonas de inhibición en función de las concentraciones de las soluciones estandarizadas de nisina pura.

Se realizó este mismo procedimiento para las soluciones recuperadas con posible concentración de nisina, donde se evidencia zonas de inhibición microbiana si efectivamente existe la presencia de nisina. Se midieron las zonas de inhibición y se utilizó el modelo matemático obtenido de la curva de calibración para determinar las concentraciones de la nisina recuperada.

Para la curva de calibración, todas las muestras evaluadas se realizaron en triplicado, con el fin de obtener datos confiables y relevantes estadísticamente. Se presenta en el apéndice 2.

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 2. **Curva de calibración para el método KB/DAS - Diámetro de inhibición en función de la concentración de la nisina**



Fuente: elaboración propia.

Continuación apéndice 2.

La curva de calibración presenta una tendencia directamente proporcional del diámetro de las zonas de inhibición en función de la actividad específica de la nisina. Se presenta la ecuación que describe la tendencia, obtenida de la curva de calibración de la figura 22.

$$[Dzi (mm)] = 0,0051 \left[Act. Nisina \left(\frac{IU}{mL} \right) \right] + 5,5727$$

En donde “Dzi” es el diámetro de la zona de inhibición microbiana en milímetros (mm) y “Act. nisina” es la actividad específica de la nisina en Unidades Internacionales por mL (IU/mL).

Esta curva presenta una ecuación lineal con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9769, lo cual indica que sí existe una correlación lineal entre las concentraciones de nisina evaluadas en función de los diámetros de las zonas de inhibición, mediante el método KB/DAS.

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 3. **Muestra de cálculo de la actividad específica de nisina para la solución patrón de la curva de calibración para el método KB/DAS.**

Se conoce que 1 gramo de nisina pura tiene una actividad específica de 40×10^6 unidades internacionales (IU) por gramo de masa.

Continuación apéndice 3.

En el inciso 4.3.4.1 del marco teórico encontramos las características de la nisina comercial, la cual contiene 2,5 % w/w de nisina pura (de acuerdo con MP Biomedicals, LLC, Francia).

Al conocer la concentración de esta presentación de nisina al 2,5 %, se obtiene que presenta una actividad específica aproximadamente de 1×10^6 IU/g.

$$1 \text{ g de N.C. tiene} = 1 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{g de N.C.}}$$

$$\left(40 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{g de N.P.}} \right) \left(0,025 \frac{\text{g de N.P.}}{\text{g de N.C.}} \right) = 1 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{g de N.C.}}$$

Para determinar la masa necesaria de nisina comercial para realizar una solución patrón de 50 mL con una actividad específica de 2 000 IU/mL, se realizó el siguiente procedimiento:

$$1 \text{ g N.C.} = 1 \times 10^6 \text{ IU} ; 1 \text{ mg N.C.} = 1 \times 10^3 \text{ IU}$$

$$2000 \frac{\text{IU}}{\text{mL}} * 50 \text{ mL de HCl } 0,02 \text{ N} * \frac{1 \text{ mg N.C.}}{1 \times 10^3 \text{ IU}} = 100 \text{ mg de N.C.}$$

$$100 \text{ mg de N.C.} = 2,5 \text{ mg de N.P.}$$

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 4. **Muestra de cálculo de los miligramos recuperados de nisina pura**

A partir de las mediciones de las zonas de inhibición para el análisis de las muestras obtenidas con los protocolos de recuperación se logra despejar la actividad antimicrobiana (IU/mL), en función de las zonas de inhibición (mm.).

$$\frac{[Dzi (mm)] - 5,5727}{0,0051} = \left[Act. Nisina recuperada \left(\frac{IU}{mL} \right) \right]$$

De esta ecuación se obtendrán los valores de la actividad específica de las muestras de nisina recuperada. Para el cálculo de los miligramos recuperados de nisina pura, se procedió de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} & \left[Act. N.R. \left(\frac{IU}{mL} \right) \right] * 50 mL HCl * \frac{1 mg de N.C.}{1x10^3 IU} * \frac{0,025 mg de N.P.}{1 mg de N.C.} \\ & = mg recuperados de Nisina Pura \end{aligned}$$

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 5. **Muestra de cálculo para determinar la eficiencia de recuperación**

Para determinar el rendimiento y eficiencia de los métodos de recuperación, se utilizará la siguiente ecuación:

$$Eficiencia de recuperación (\%) = \frac{Actividad de la Nisina recuperada}{Actividad de la Nisina pura} * 100$$

Continuación apéndice 5.

En donde el numerador es obtenido luego de haber utilizado el método de Kirby-Bauer (difusión en agar solido) para la determinación de la actividad microbiana de la nisina para las muestras recuperadas obtenidas de los métodos de recuperación; y el denominador fue calculado con base a la cantidad de nisina inicial (50 mg de N.C. = 1 000 1 000 IU/mL) agregada a cada muestra para la evaluación de la recuperación de cada protocolo.

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 6. **Datos originales, promedio de los diámetros de las zonas de inhibición obtenidos para el trazo de la curva de calibración**

<i>Actividad nisina (IU/mL)</i>	<i>Promedio del diámetro de las zonas de inhibición (mm)</i>
2000	15,77
1000	10,67
500	8,12
250	6,85
125	6,21
62,5	5,89
31,25	5,73
15,625	5,65

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 7. **Datos originales, características del mosto de cerveza tipo A y B**

Parámetro analizado	Mosto cerveza A	Mosto cerveza B
<i>pH</i>	5,420	5,170
<i>Turbidez a 25 °</i>	0,667	3,359
<i>Turbidez a 90 °</i>	2,764	8,597
<i>% (v/v) Alcohol</i>	-0,028	-0,019
<i>°Plato (%w/w)</i>	14,417	16,448
<i>ER (%w/w)</i>	14,414	16,455
<i>EA (%w/w)</i>	14,413	16,455
<i>Densidad (g/cm³)</i>	1,057	1,065
<i>RDF (%)</i>	0,000	0,000
<i>ADF (%w/w)</i>	-0,453	-0,324
<i>Calorías (kcal/100 mL)</i>	52,940	60,627
<i>BU (EBC)</i>	5,129	4,366
<i>Color (EBC)</i>	37,289	34,046
<i>Bisulfito (ppm)</i>	0,000	0,000
<i>Polifenoles</i>	0,250	0,328
<i>Antocianógenos</i>	0,277	0,261

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 8. **Datos originales, características del extracto de afrecho de cerveza tipo A y B**

Parámetro analizado	Ext. de afrecho cerveza A	Ext. de afrecho cerveza B
<i>pH</i>	5,650	5,845
<i>Turbidez a 25 °</i>	-	-
<i>Turbidez a 90 °</i>	-	-
<i>% (v/v) Alcohol</i>	-0,026	-0,036
<i>°Plato (%w/w)</i>	4,123	2,653
<i>ER (%w/w)</i>	4,110	2,649
<i>EA (%w/w)</i>	4,110	2,649
<i>Densidad (g/cm³)</i>	1,014	1,008
<i>RDF (%)</i>	0,000	0,000
<i>ADF (%w/w)</i>	-1,630	-3,670
<i>Calorías (kcal/100 mL)</i>	14,282	7,838
<i>BU (EBC)</i>	3,021	2,314
<i>Color (EBC)</i>	50,951	44,136
<i>Bisulfito (ppm)</i>	0,000	0,000
<i>Polifenoles</i>	0,019	-0,203
<i>Antocianógenos</i>	0,074	0,082

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 9.

Datos originales, características del extracto de levadura

Parámetro analizado	Ext. de levadura
<i>pH</i>	5,743
<i>Turbidez a 25 °</i>	34,223
<i>Turbidez a 90 °</i>	33,949
<i>% (v/v) Alcohol</i>	6,209
<i>°Plato (%w/w)</i>	14,035
<i>ER (%w/w)</i>	4,777
<i>EA (%w/w)</i>	2,619
<i>Densidad (g/cm³)</i>	1,009
<i>RDF (%)</i>	66,985
<i>ADF (%w/w)</i>	81,375
<i>Calorías (kcal/100 mL)</i>	50,621
<i>BU (EBC)</i>	4,757
<i>Color (EBC)</i>	11,504
<i>Bisulfito (ppm)</i>	21,000
<i>Polifenoles</i>	0,261
<i>Antocianógenos</i>	0,255

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 10. **Datos originales, características del extracto de trub de cerveza tipo A y B**

<i>Parámetro analizado</i>	Ext. de trub cerveza A	Ext. de trub cerveza B
<i>pH</i>	4,630	4,578
<i>Turbidez a 25 °</i>	2,899	10,949
<i>Turbidez a 90 °</i>	9,457	24,524
<i>% (v/v) Alcohol</i>	-0,031	-0,037
<i>°Plato (%w/w)</i>	4,159	6,679
<i>ER (%w/w)</i>	4,166	6,683
<i>EA (%w/w)</i>	4,166	6,683
<i>Densidad (g/cm³)</i>	1,014	1,025
<i>RDF (%)</i>	0,000	0,000
<i>ADF (%w/w)</i>	-1,293	-1,169
<i>Calorías (kcal/100 mL)</i>	14,500	23,829
<i>BU (EBC)</i>	4,000	3,097
<i>Color (EBC)</i>	6,757	11,211
<i>Bisulfito (ppm)</i>	0,000	0,000
<i>Polifenoles</i>	0,066	0,094
<i>Antocianógenos</i>	0,036	0,047

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 11. **Datos originales, características de las últimas aguas de cerveza tipo A y B**

Parámetro analizado	Últimas aguas cerveza A	Últimas aguas cerveza B
<i>pH</i>	4,754	4,894
<i>Turbidez a 25 °</i>	25,057	17,160
<i>Turbidez a 90 °</i>	51,057	38,371
<i>% (v/v) Alcohol</i>	-0,034	-0,020
<i>°Plato (%w/w)</i>	5,101	3,810
<i>ER (%w/w)</i>	5,106	3,814
<i>EA (%w/w)</i>	5,106	3,814
<i>Densidad (g/cm³)</i>	1,019	1,013
<i>RDF (%)</i>	0,000	0,000
<i>ADF (%w/w)</i>	-1,471	-2,319
<i>Calorías (kcal/100 mL)</i>	18,221	12,530
<i>BU (EBC)</i>	1,729	1,436
<i>Color (EBC)</i>	11,139	17,100
<i>Bisulfito (ppm)</i>	0,000	0,000
<i>Polifenoles</i>	0,209	0,193
<i>Antocianógenos</i>	0,174	0,165

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 12. **Datos originales, rendimiento de los métodos de recuperación en mosto diluido como posible medio de cultivo**

<i>Método</i>	<i>Promedio (in)</i>	<i>Promedio (mm)</i>	<i>IU/mL</i>	<i>mg de N. P. recuperada</i>	<i>Porcentaje de recuperación</i>
<i>Etanol + NaCl</i>	0,509	12,938	1444,201	1,805	72,21%
<i>Ácido cítrico + NaCl</i>	0,398	10,109	889,510	1,112	44,48%
<i>Sulfato de amonio</i>	0,541	13,740	1601,395	2,002	80,07%
<i>Ca(OH)₂</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00%

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 13. **Datos originales, rendimiento de los métodos de recuperación en extracto de afrecho como posible medio de cultivo**

<i>Método</i>	<i>Promedio (in)</i>	<i>Promedio (mm)</i>	<i>IU/mL (con modelo lineal)</i>	<i>mg de N. P. recuperada</i>	<i>Porcentaje de recuperación</i>
<i>Etanol + NaCl</i>	0,386	9,795	827,877	1,035	41,39 %
<i>Ácido cítrico + NaCl</i>	0,332	8,422	558,625	0,698	27,93 %
<i>Sulfato de amonio</i>	0,369	9,366	743,833	0,930	37,19 %
<i>Ca(OH)₂</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00%

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 14. **Datos originales, rendimiento de los métodos de recuperación en extracto de levadura como posible medio de cultivo**

<i>Método</i>	<i>Promedio (in)</i>	<i>Promedio (mm)</i>	<i>IU/mL (con modelo lineal)</i>	<i>mg de N. P. recuperada</i>	<i>Porcentaje de recuperación</i>
<i>Etanol + NaCl</i>	0,406	10,311	929,042	1,161	46,45 %
<i>Ácido cítrico + NaCl</i>	0,355	9,009	673,797	0,842	33,69 %
<i>Sulfato de amonio</i>	0,481	12,224	1304,127	1,630	65,21 %
<i>Ca(OH)₂</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00%

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 15. **Datos originales, rendimiento de los métodos de recuperación en extracto de trub como posible medio de cultivo**

<i>Método</i>	<i>Promedio (in)</i>	<i>Promedio (mm)</i>	<i>IU/mL (con modelo lineal)</i>	<i>mg de N. P. recuperada</i>	<i>Porcentaje de recuperación</i>
<i>Etanol + NaCl</i>	0,495	12,573	1372,608	1,716	68,63 %
<i>Ácido cítrico + NaCl</i>	0,269	6,839	248,284	0,310	12,41 %
<i>Sulfato de amonio</i>	0,447	11,351	1132,926	1,416	56,65 %
<i>Ca(OH)₂</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00%

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 16. **Datos originales, rendimiento de los métodos de recuperación en últimas aguas como posible medio de cultivo**

Método	Promedio (in)	Promedio (mm)	IU/mL (con modelo lineal)	mg de N. P. recuperada	Porcentaje de recuperación
<i>Etanol + NaCl</i>	0,533	13,533	1560,929	1,951	78,05 %
<i>Ácido cítrico + NaCl</i>	0,395	10,041	876,125	1,095	43,81 %
<i>Sulfato de amonio</i>	0,460	11,676	1196,634	1,496	59,83 %
<i>Ca(OH)₂</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00%

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 17. **Todas las muestras de los posibles medios de cultivo**



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 18. Muestras previo al análisis de antocianógenos



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza..

Apéndice 19. Los posibles medios de cultivo previo al análisis de antocianógenos



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza..

Apéndice 20. **Los medios de cultivo previo al análisis de bisulfito**



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 21. **Los medios de cultivo durante el análisis de bisulfito**



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 22. Filtración de las muestras de afrecho



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 23. Filtración de las muestras de mosto



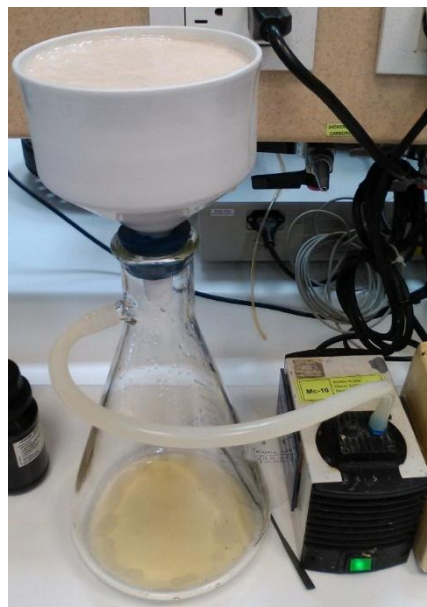
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 24. **Filtración de las muestras de trub**



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 25. **Filtración de las muestras de levadura**



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 26. Filtración de las muestras de las últimas aguas



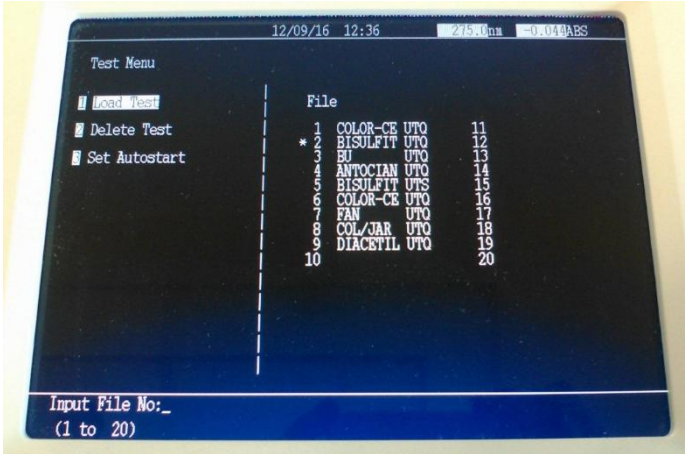
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 27. Filtración en conjunto de todos los medios de cultivo



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 28. **Menú del espectrodensitómetro utilizado**



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 29. **Muestras listas para análisis en Anton-Paar**



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 30. **Muestras listas para análisis en Anton-Paar**



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 31. **Muestras durante el análisis en Anton-Paar**



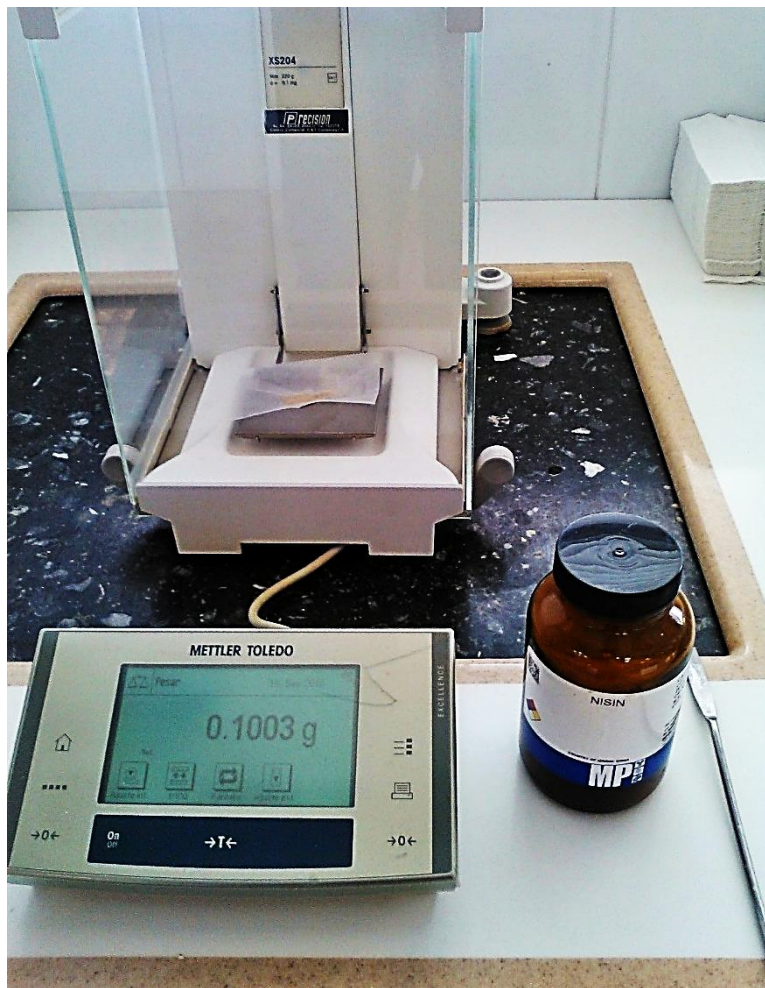
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 32. Reactivos utilizados para los protocolos de recuperación



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 33. **Peso inicial de nisina empleado en todas las muestras para la ejecución de los protocolos de recuperación**



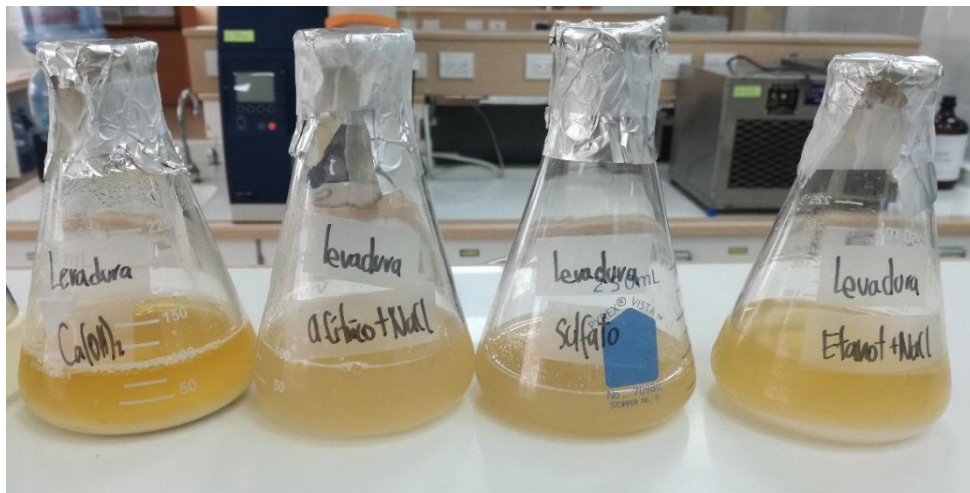
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 34. Muestras de trub, últimas aguas y afrecho con materia precipitada por los protocolos de recuperación



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 35. Muestras de levadura con materia precipitada por los protocolos de recuperación



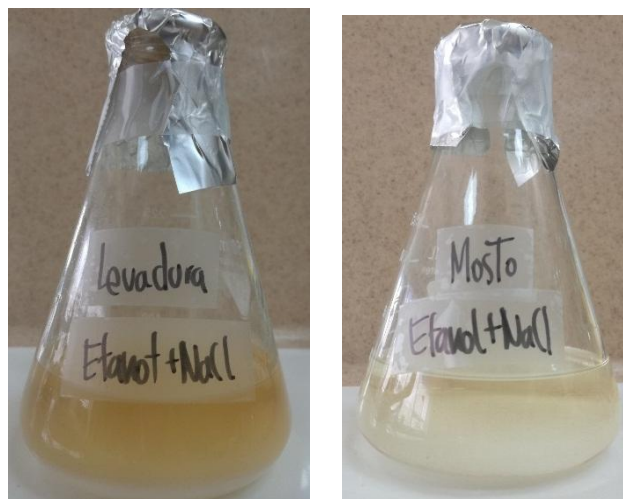
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 36. **Muestras con materia precipitada por el protocolo de sulfato de amonio**



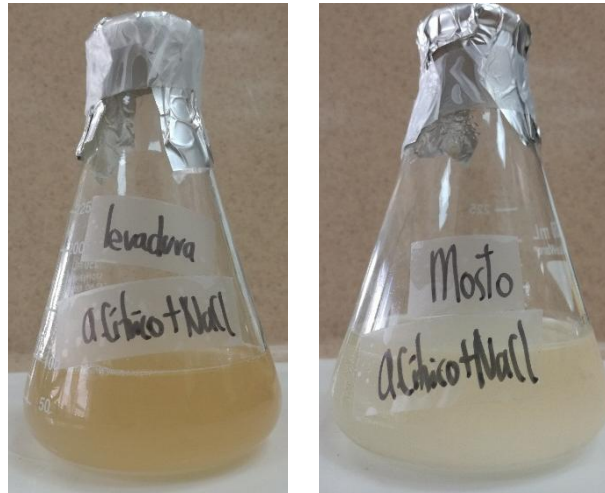
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 37. **Muestras con materia precipitada por el protocolo de etanol + NaCl**



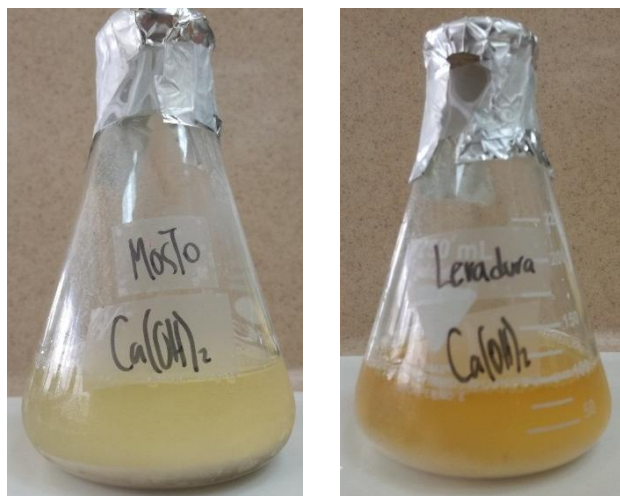
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 38. **Muestras con materia precipitada por el protocolo de ácido cítrico + NaCl**



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 39. **Muestras con materia precipitada por el protocolo de hidróxido de calcio**



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 40. **Muestras durante el proceso de concentración de las soluciones y eliminación de posibles contaminantes**



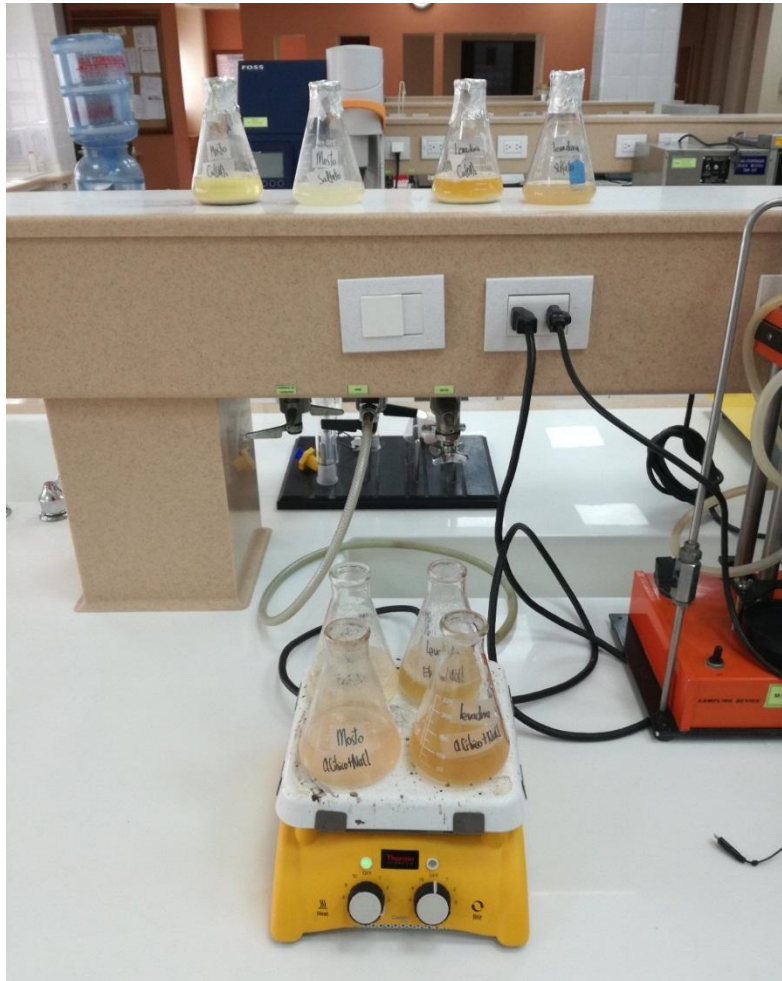
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 41. **Equipo utilizado para la centrifugación**



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 42. **Muestras de mosto diluido y extracto de levadura durante el proceso de concentración de la solución y eliminación de posibles contaminantes**



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 43. **Muestras de trub y extracto de levadura durante el proceso de disminución de solubilidad a bajas temperaturas**



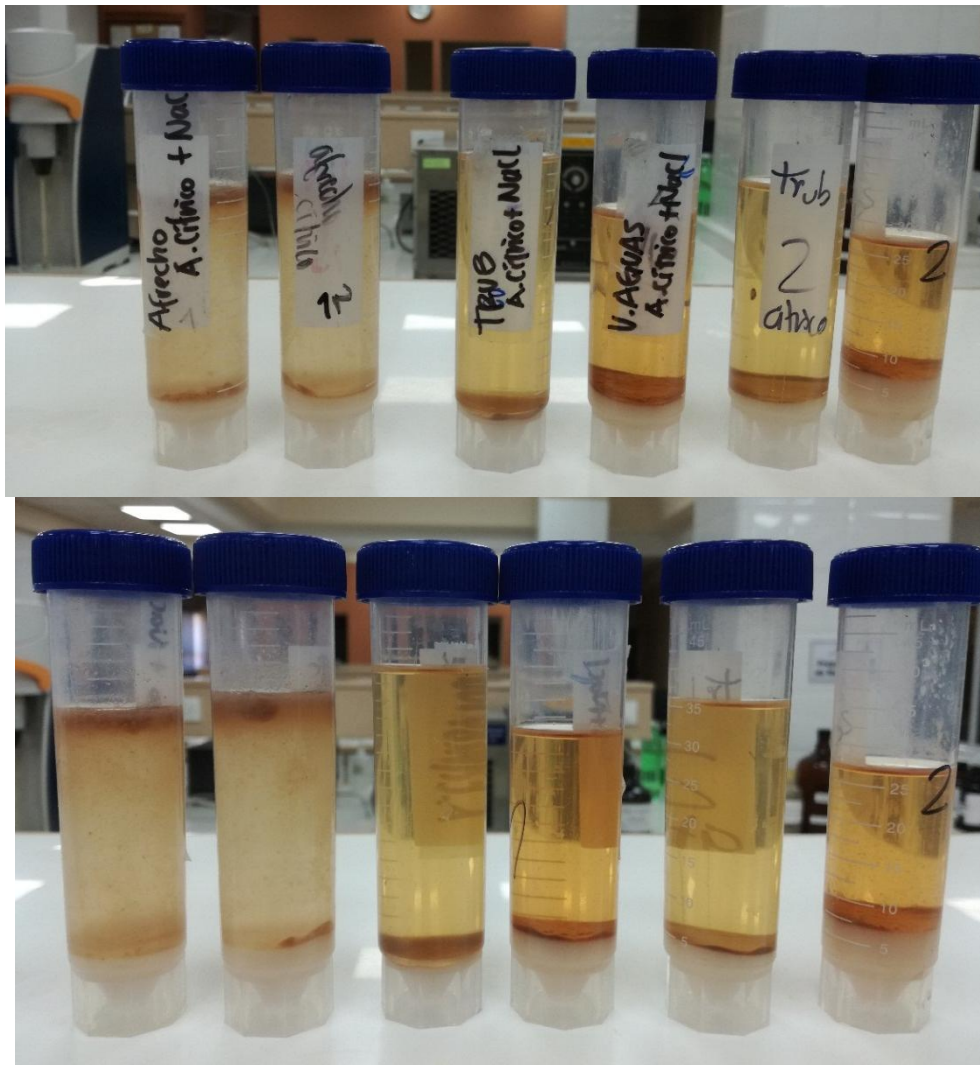
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 44. **Muestras de materia recuperada en mosto diluido y extracto de levadura luego de la centrifugación**



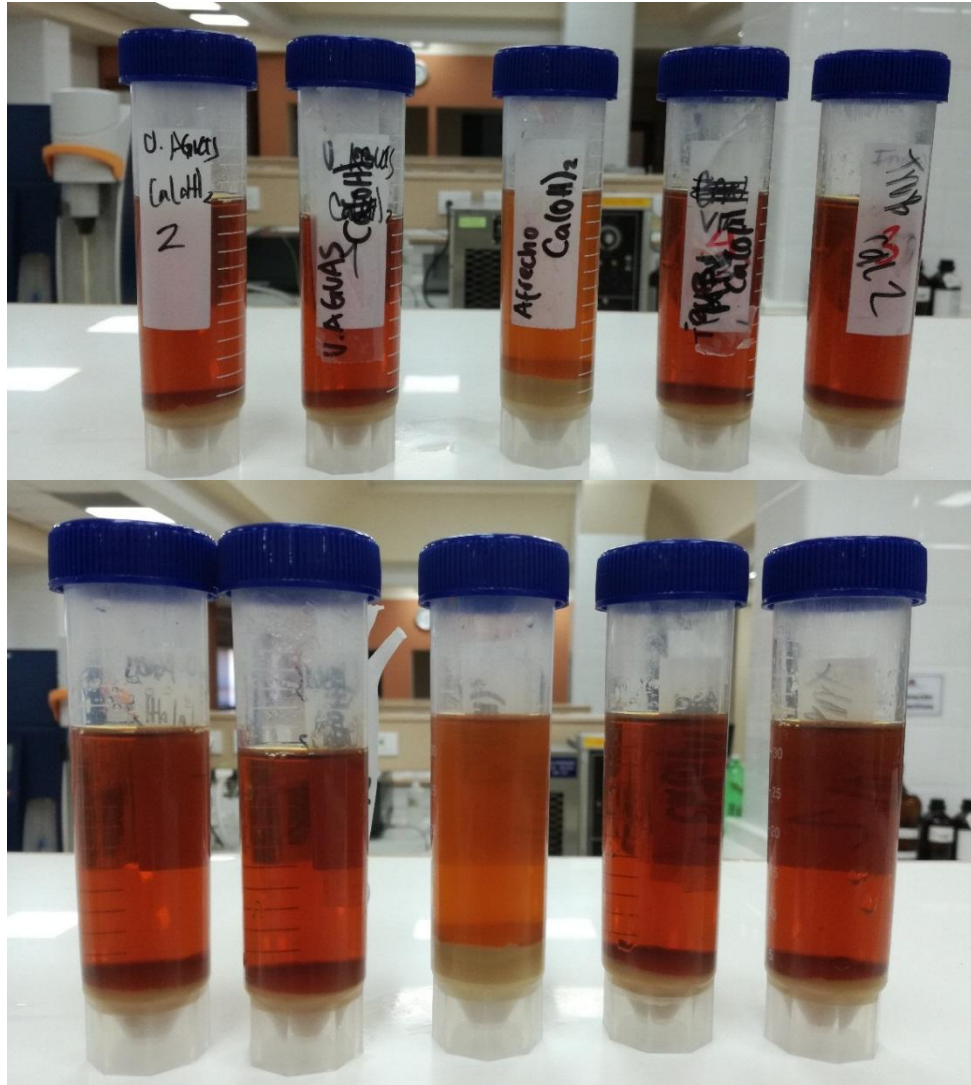
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 45. **Muestras de materia recuperada con el protocolo de ácido cítrico + NaCl luego de la centrifugación**



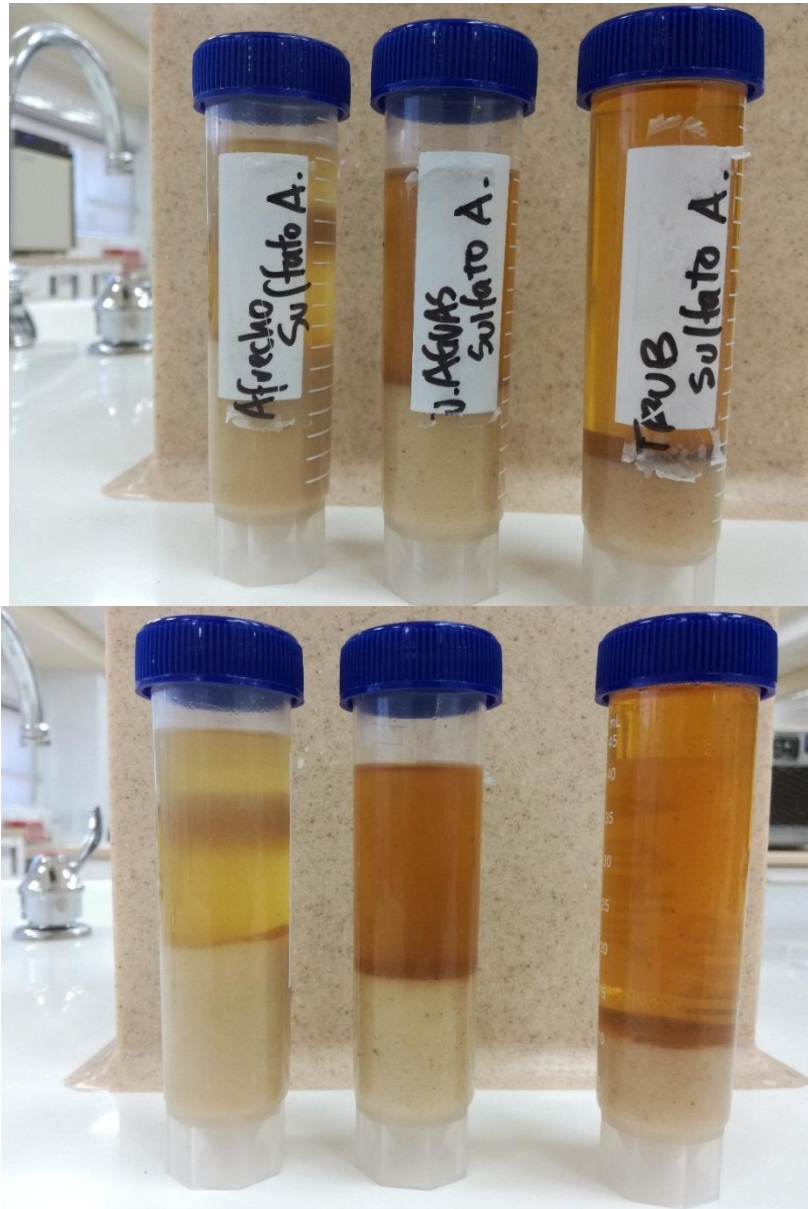
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 46. **Muestras de materia recuperada con el protocolo de hidróxido de calcio luego de la centrifugación**



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

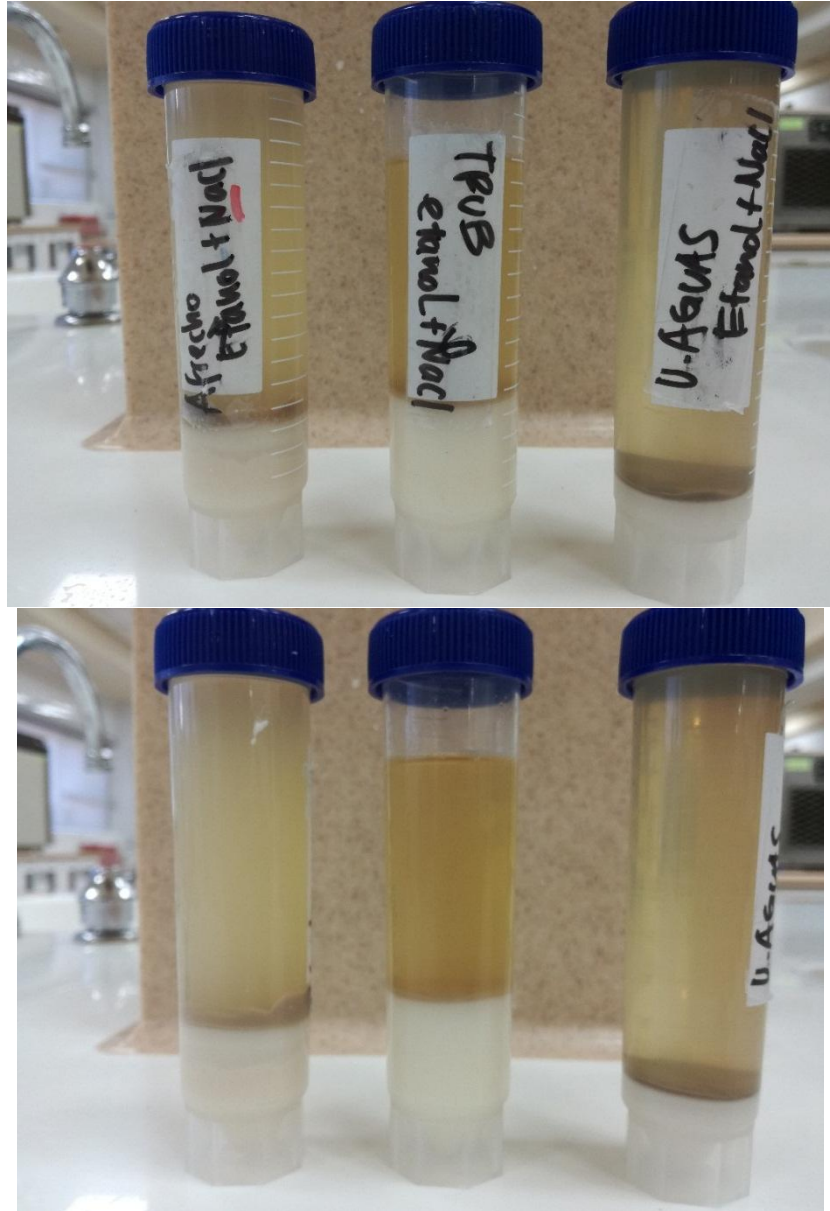
Apéndice 47. **Muestras de materia recuperada con el protocolo de sulfato de amonio luego de la centrifugación**



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 48.

Muestras de materia recuperada con el protocolo de etanol + NaCl luego de la centrifugación



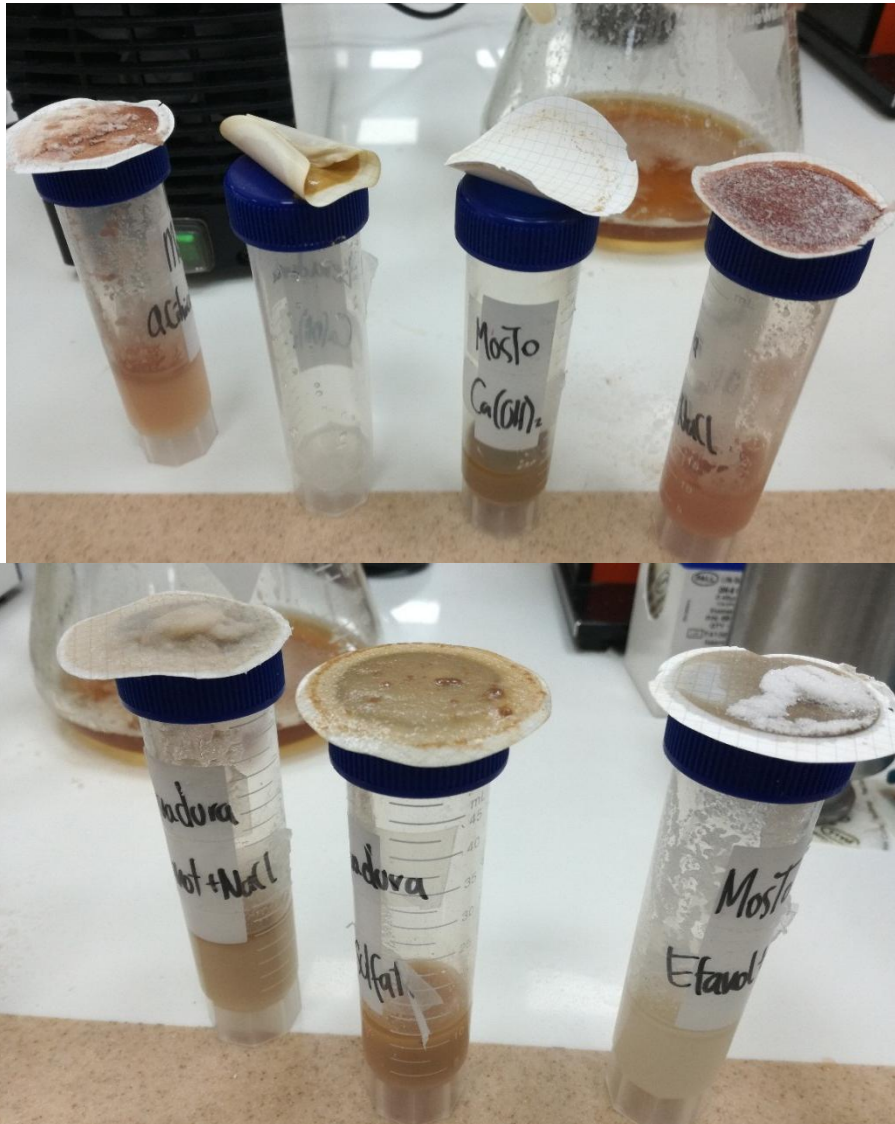
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 49. **Sistema armado para la microfiltración**



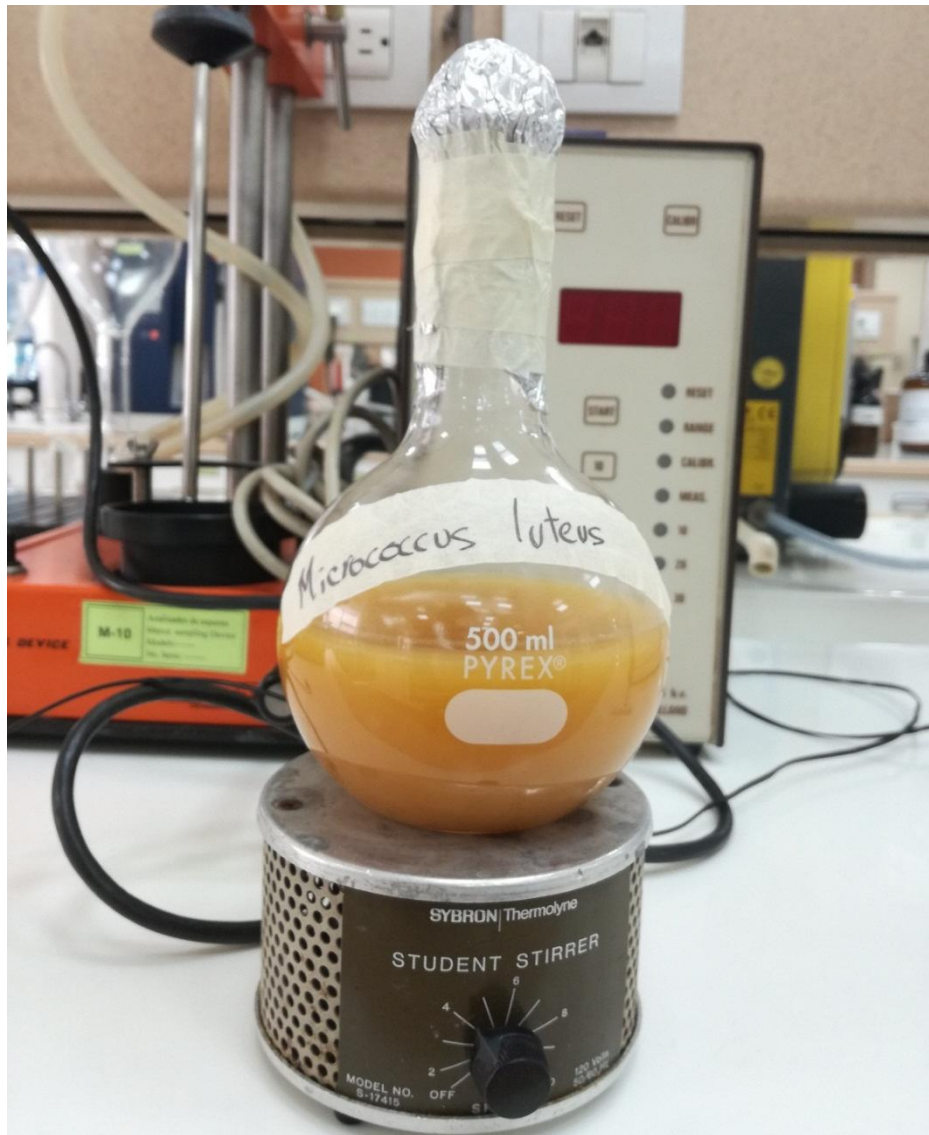
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 50. **Muestras de materia recuperada en extracto de levadura luego de ser micro filtradas**



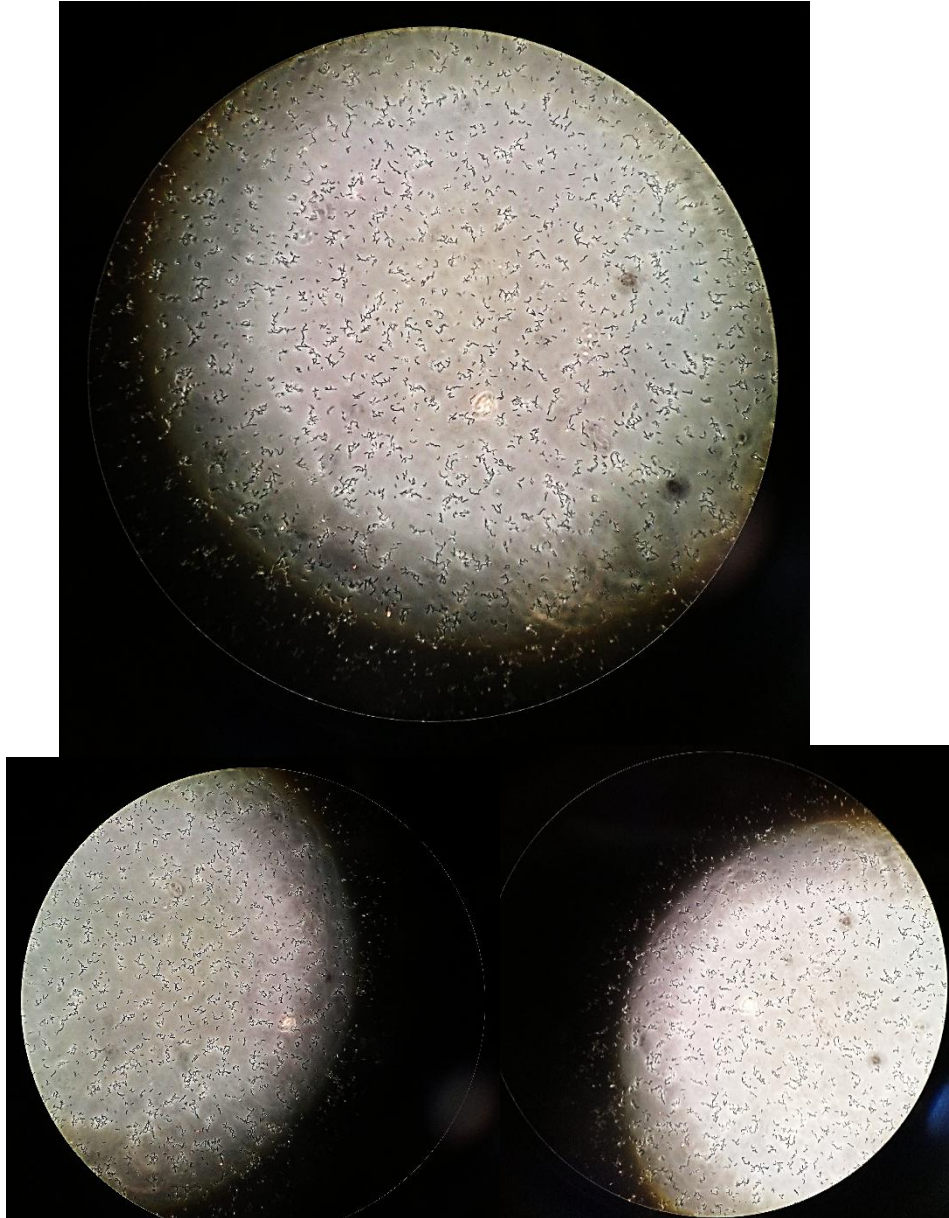
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 51. Activación de la bacteria identificadora: *Micrococcus luteus*



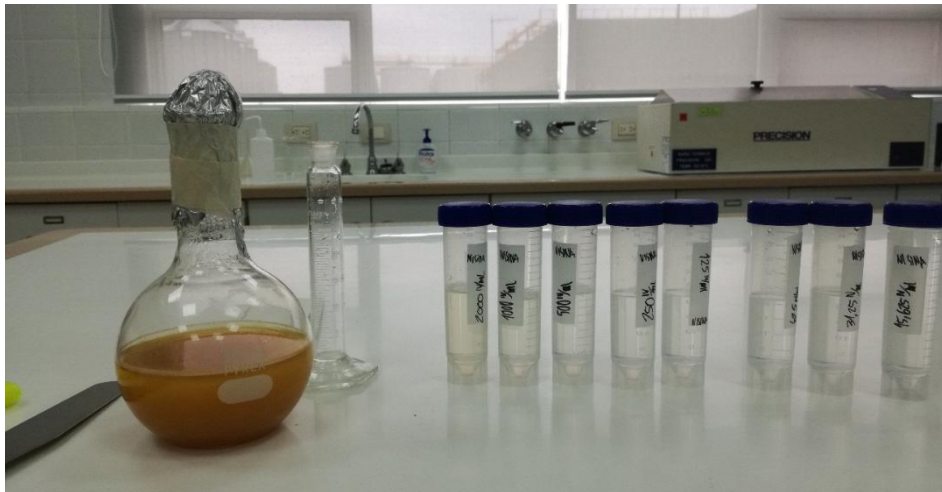
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 52. La bacteria *Micrococcus luteus* vista en microscopio



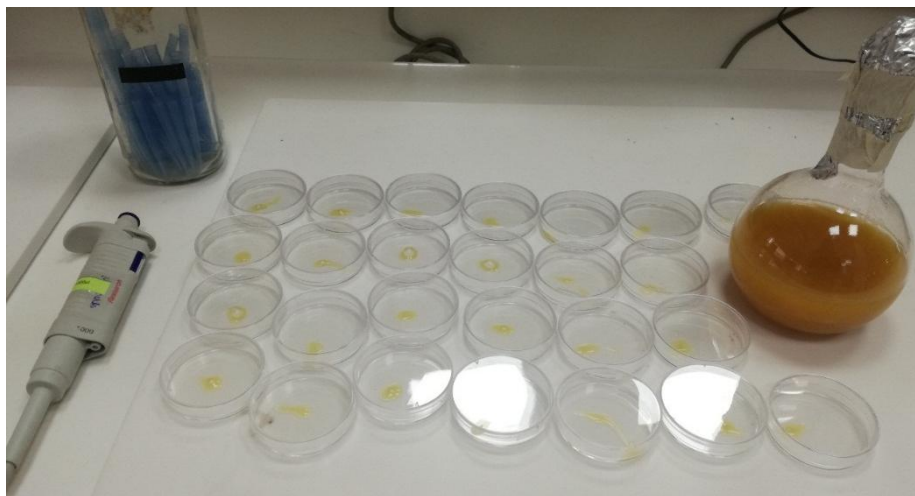
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 53. ***Micrococcus luteus* junto con las diluciones de nisina**



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 54. **Volumen de *Micrococcus luteus* para inocular el agar MRS**



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 55. **Preparación de agar MRS previo al proceso de autoclave**



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 56. Autoclave para la esterilización del agar MRS



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 59. **Muestras inoculadas previo a la incubación**



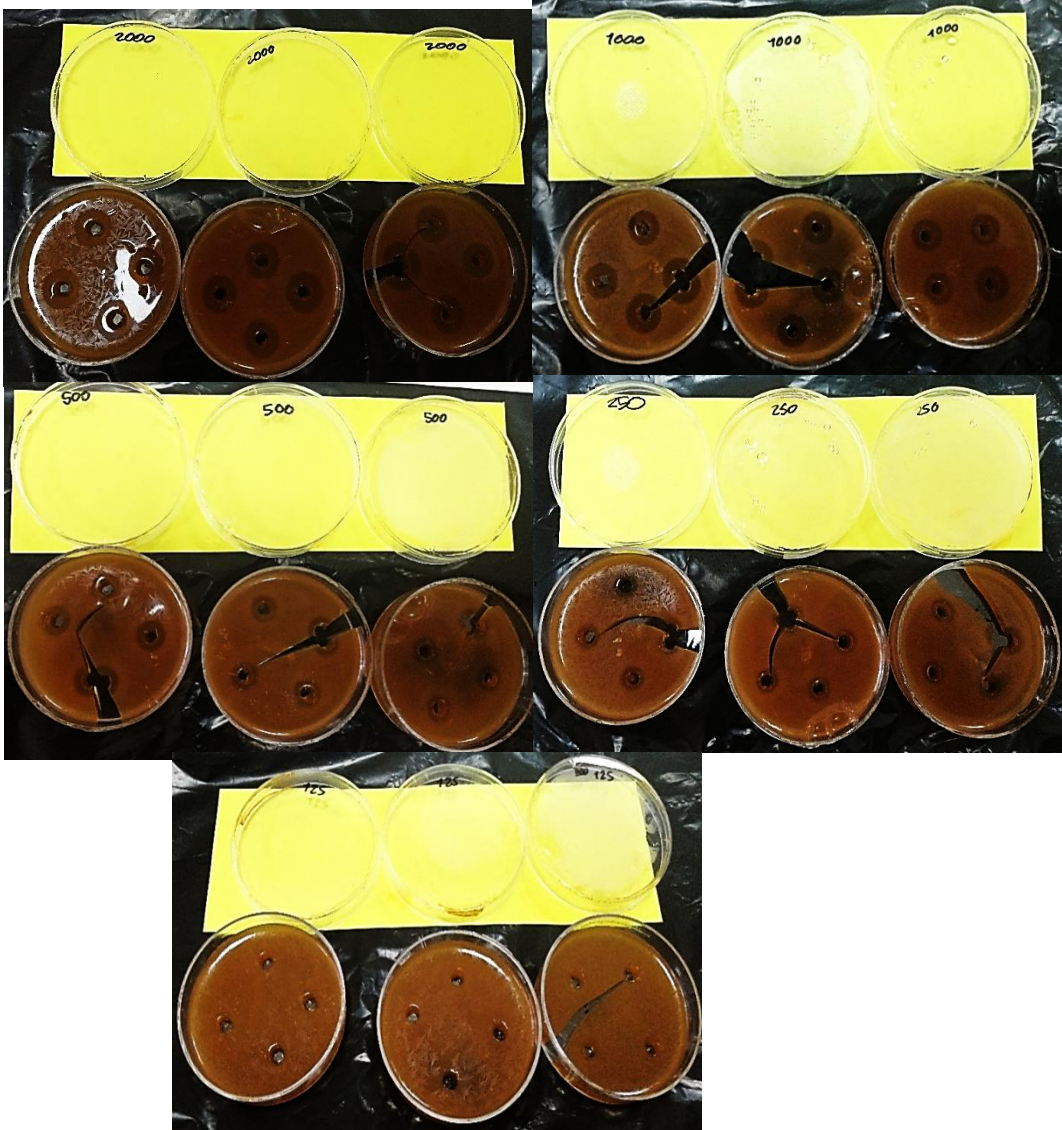
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 60. **Muestras en incubación aerobia a 25 °C**



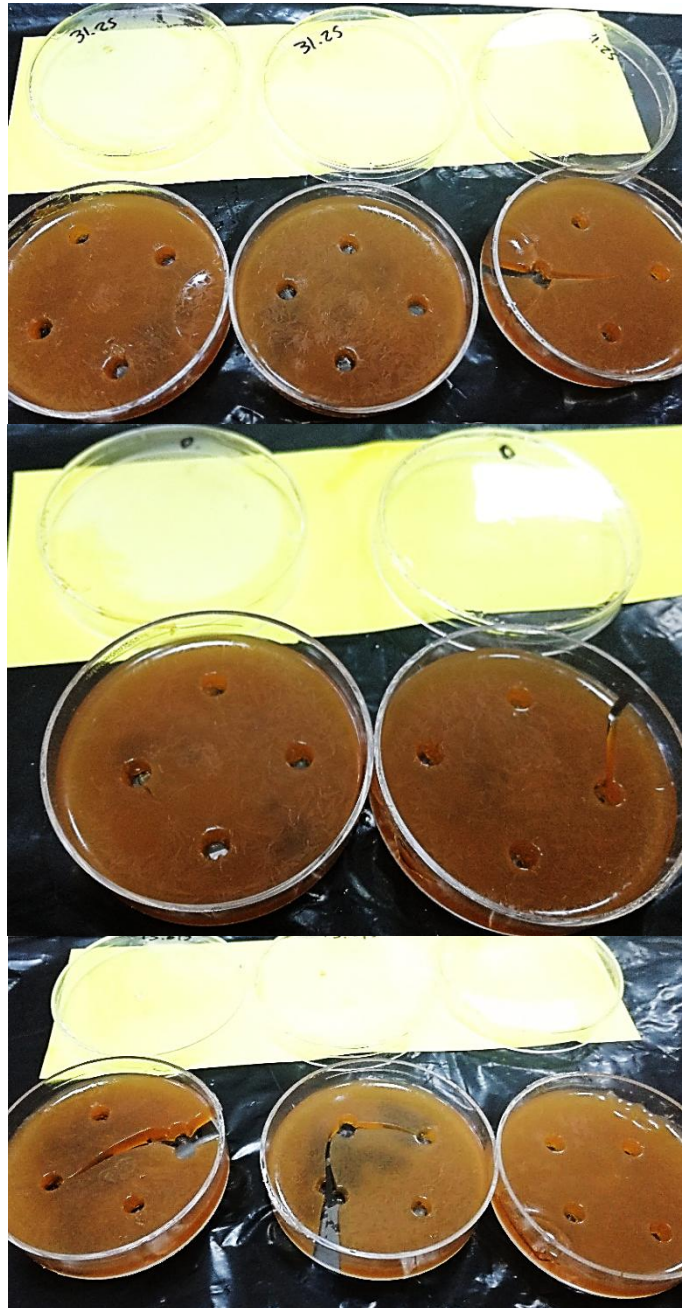
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 61. **Muestras con zonas claras de inhibición producto de la actividad antimicrobiana de nisina**



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 62. **Muestras sin zonas de inhibición**



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 63. Vernier utilizado para la medición de las zonas de inhibición



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 64. Medición de los diámetros de las zonas de inhibición para la curva de calibración



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

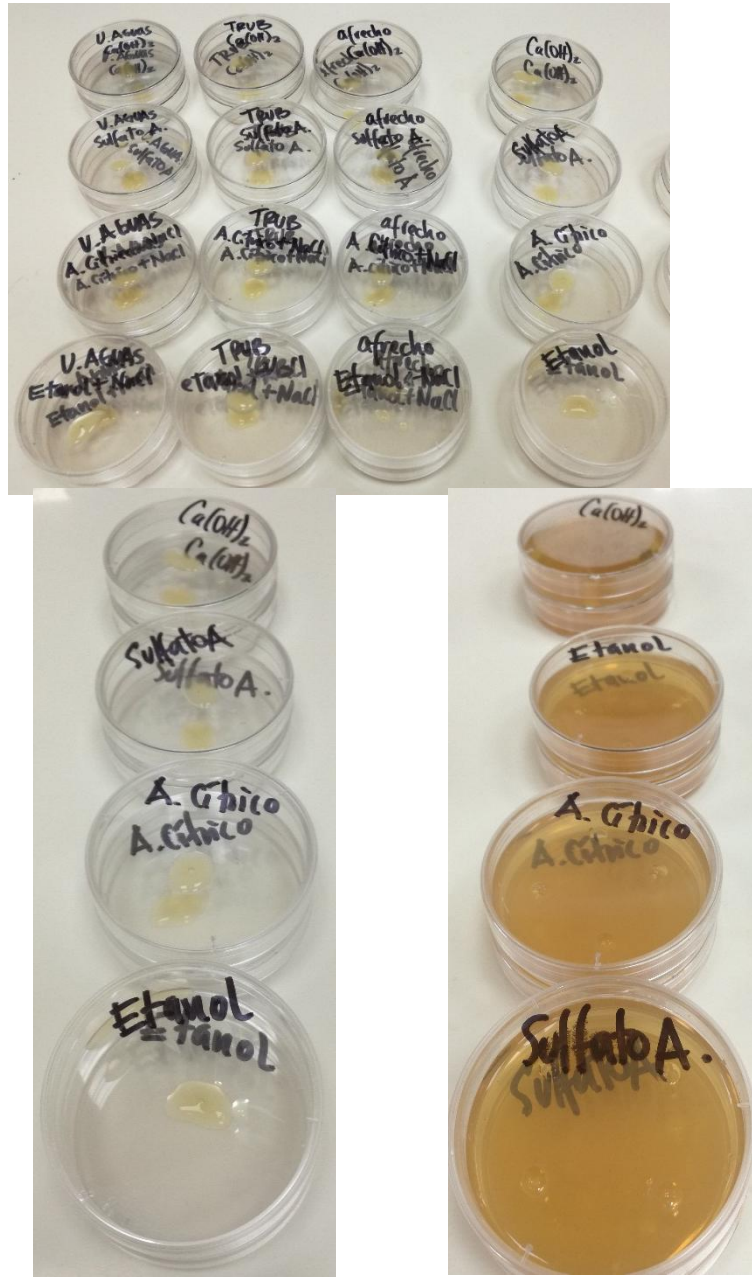
Apéndice 65. **Cajas de Petri para el mosto con el volumen de *Micrococcus luteus* para inocular el agar MRS**



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 66.

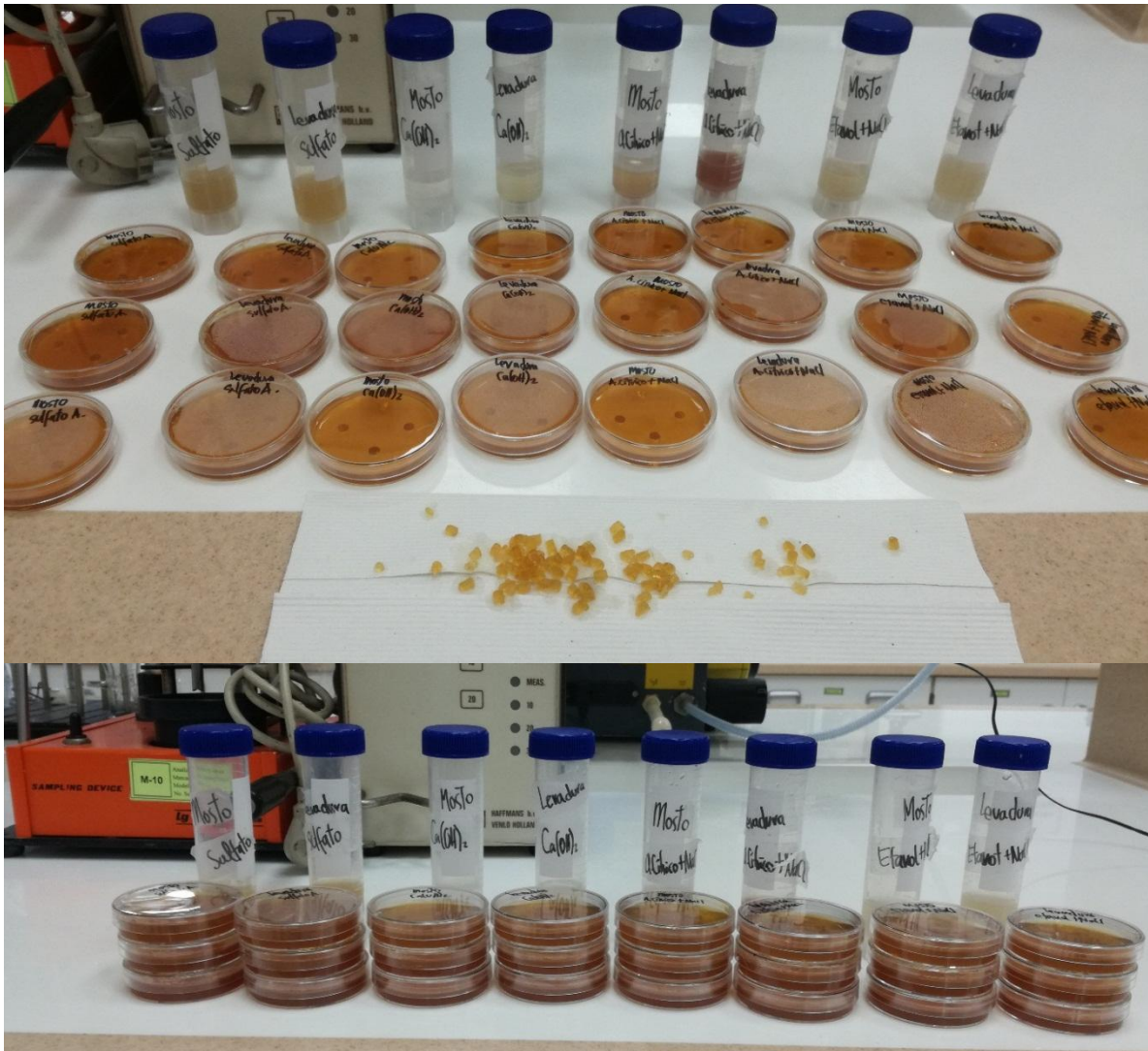
Cajas de Petri para varios medios de cultivo y para pruebas control para los reactivos principales de cada protocolo



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

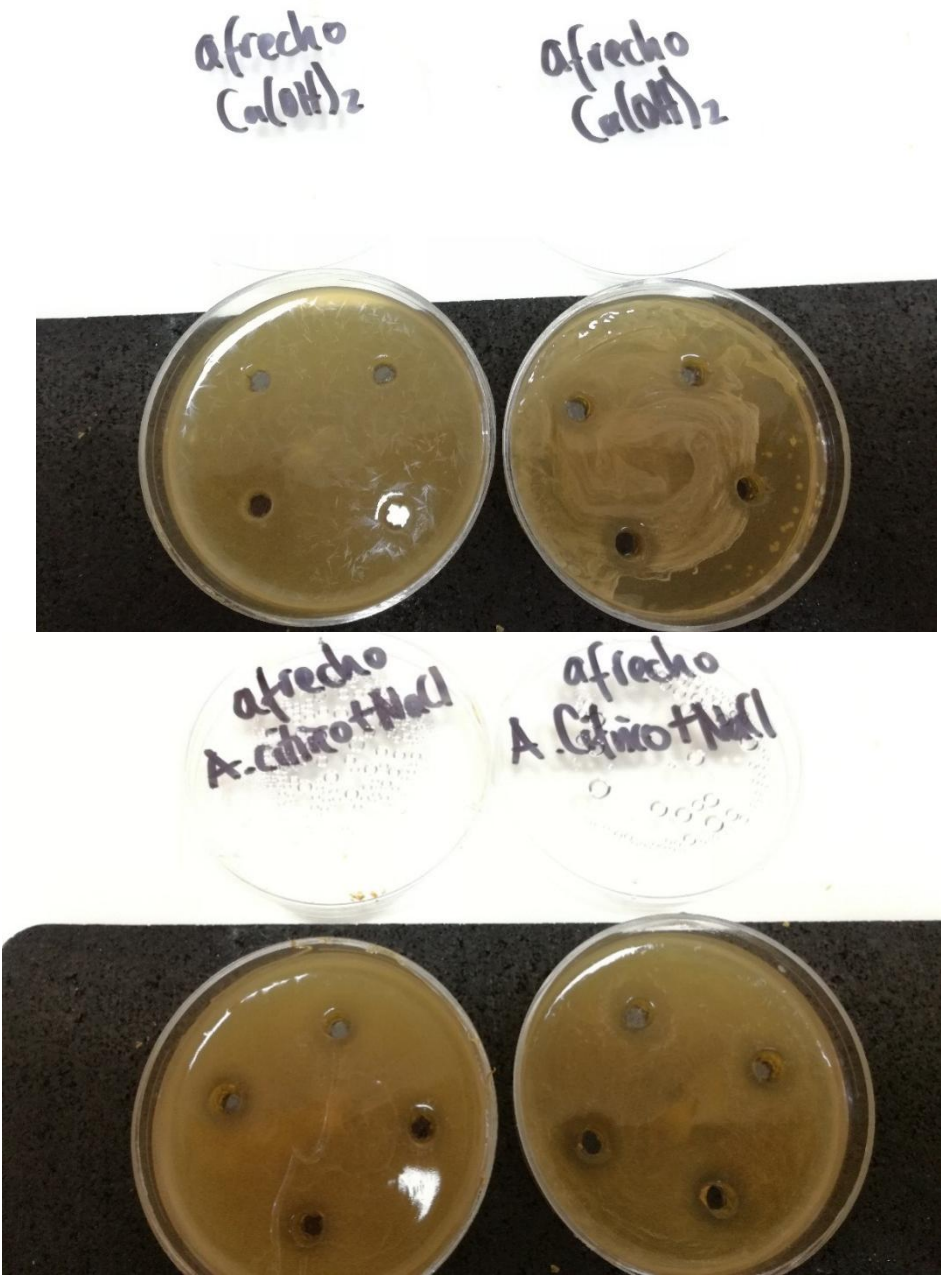
Apéndice 69.

Muestras inoculadas e inyectadas con las soluciones con presunto contenido de nisina previo a la incubación



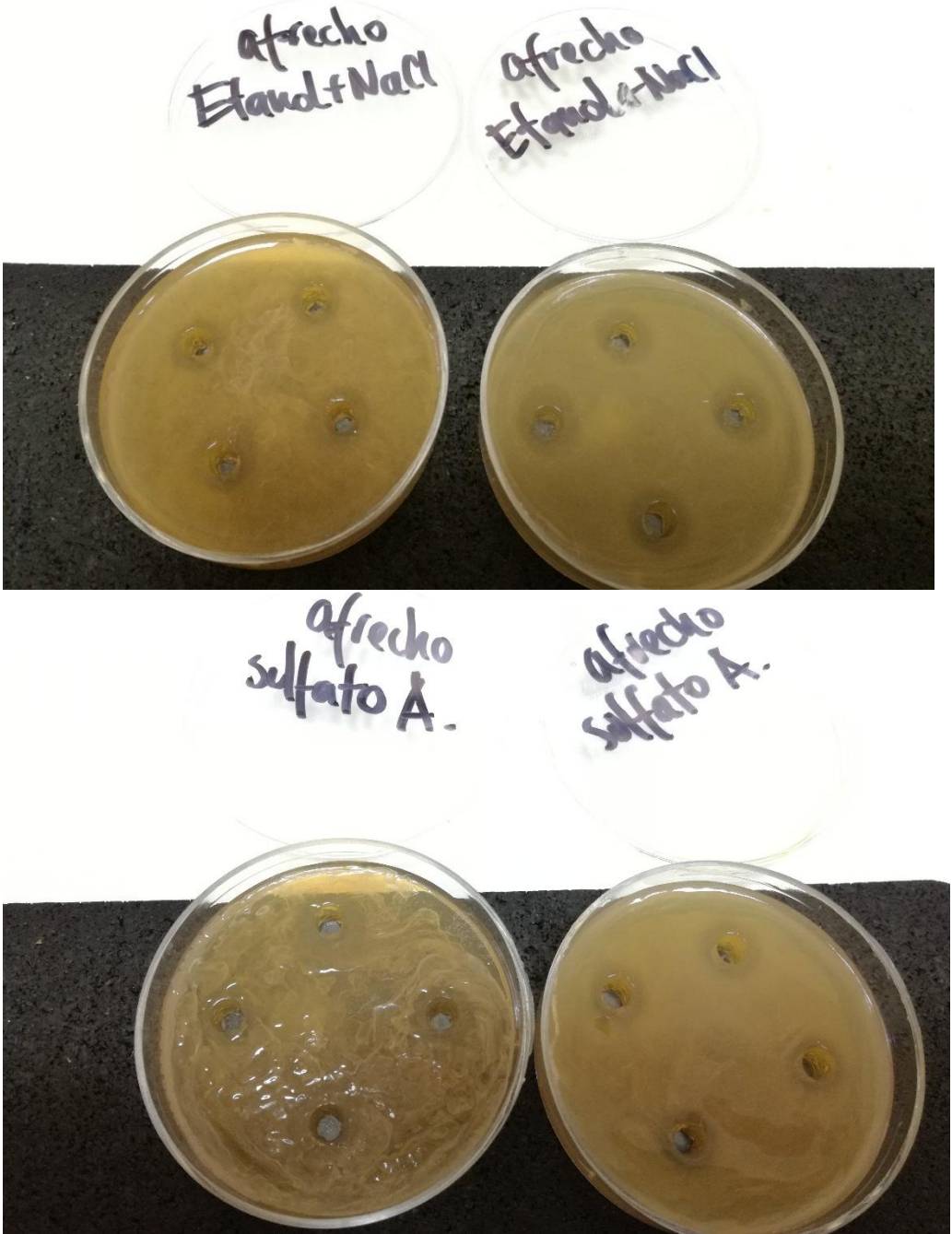
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 70. Muestras de ext. de afrecho luego de la incubación



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

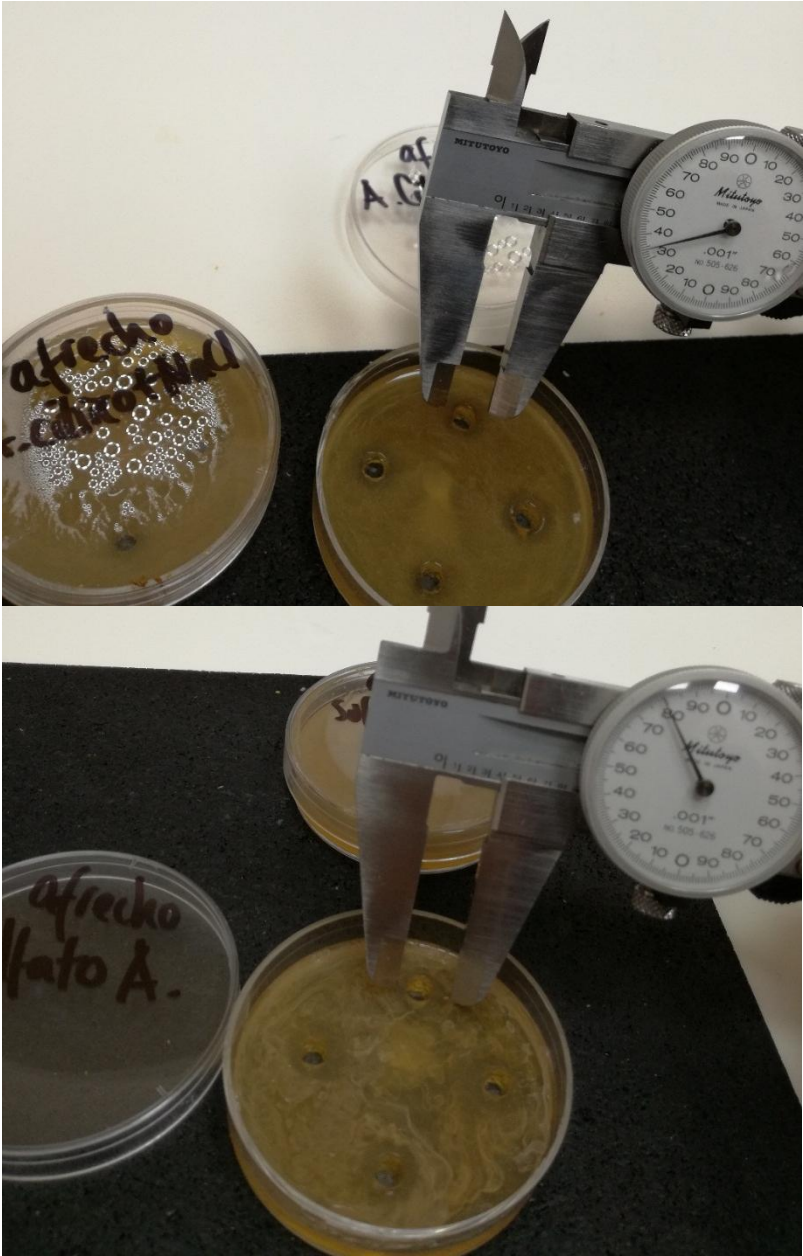
Apéndice 71. Muestras de ext. de afrecho luego de la incubación



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

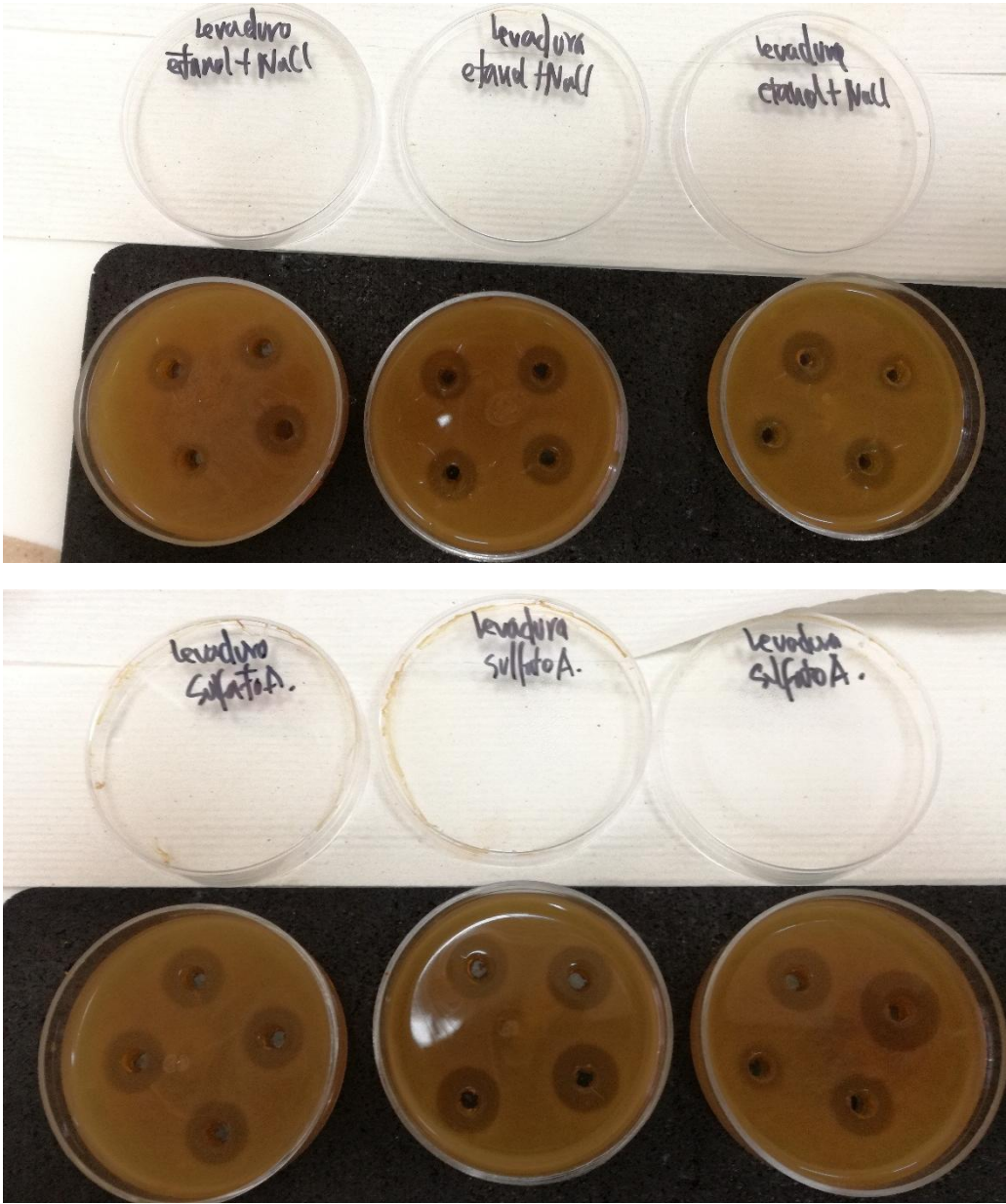
Apéndice 72.

Medición de las zonas de inhibición en las muestras del extracto de afrecho



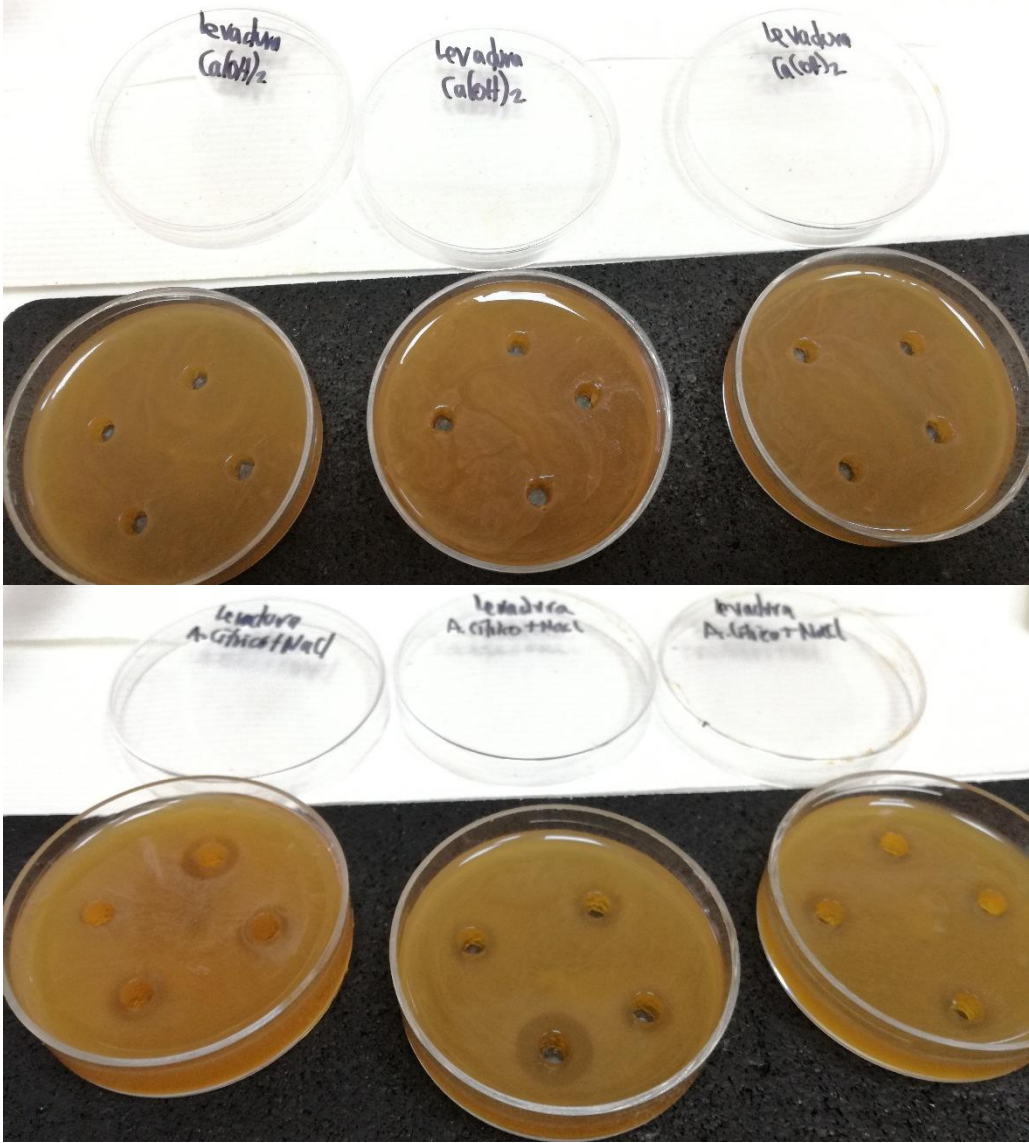
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 73. Muestras de ext. de levadura luego de la incubación



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

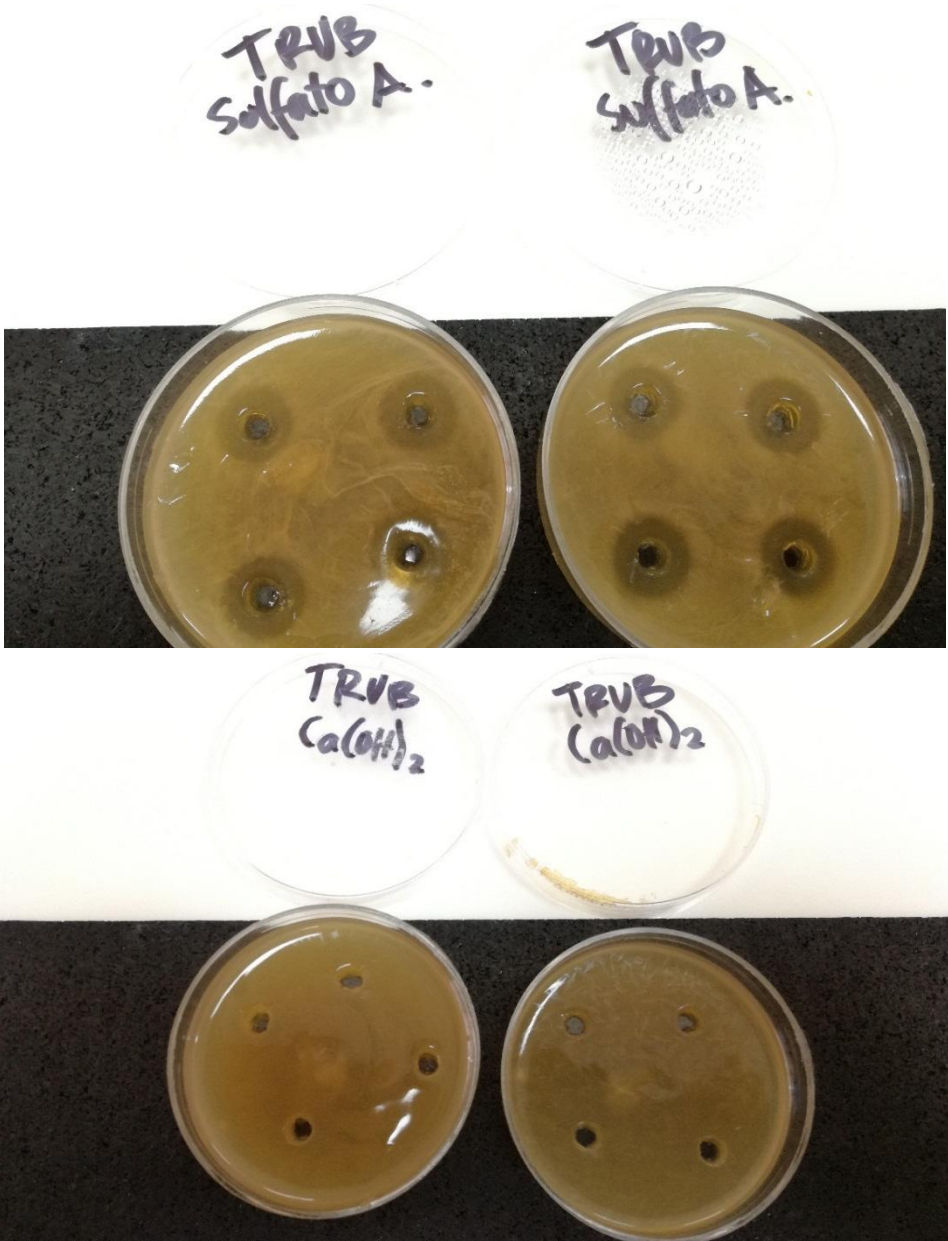
Apéndice 74. Muestras de ext. de levadura luego de la incubación



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

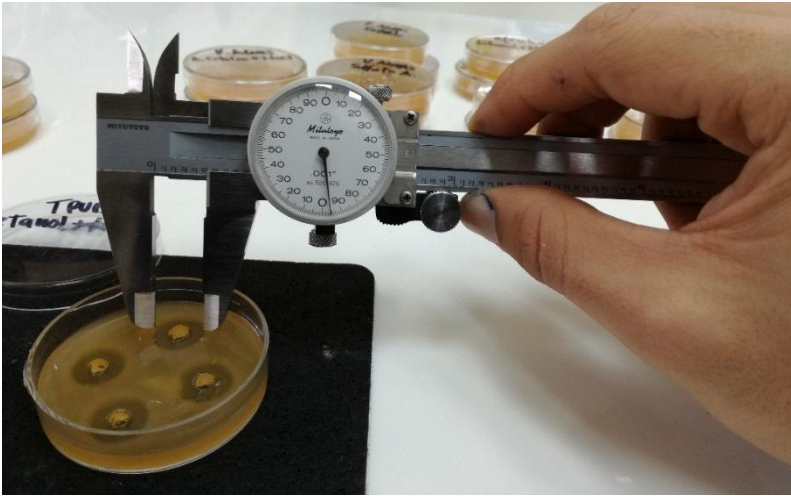
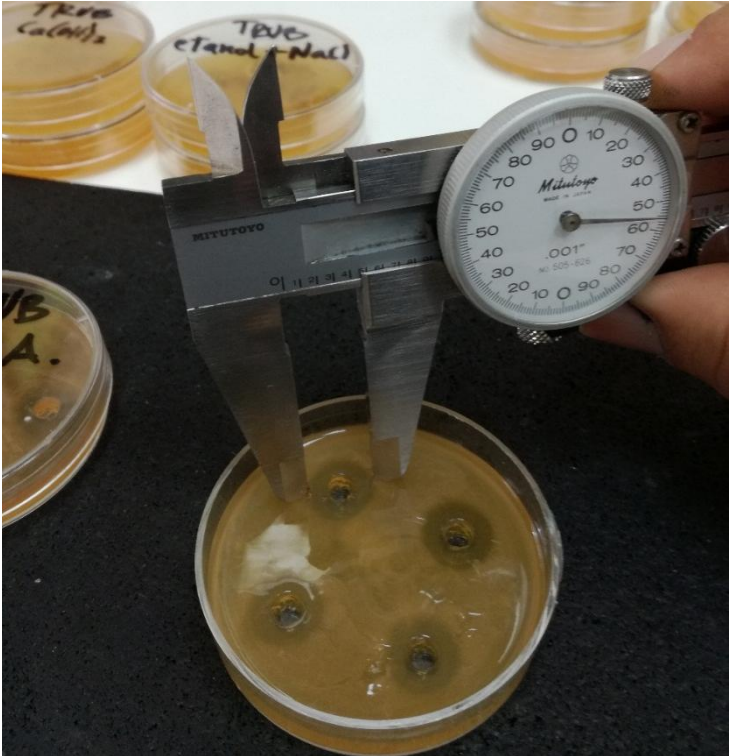
Apéndice 75.

Muestras de ext. de trub luego de la incubación



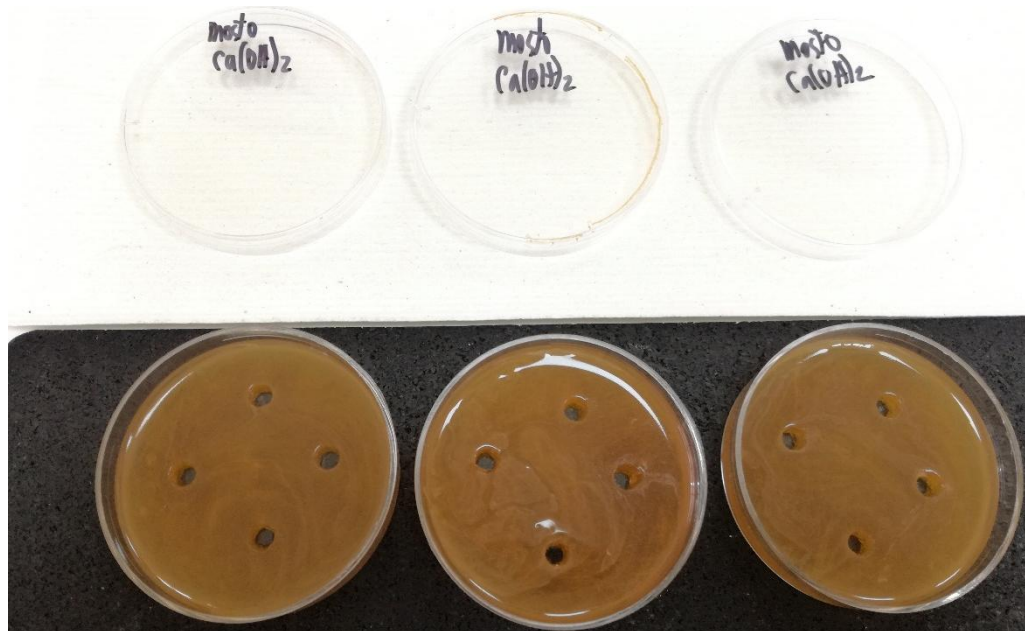
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 76. Mediciones en las muestras del extracto de trub



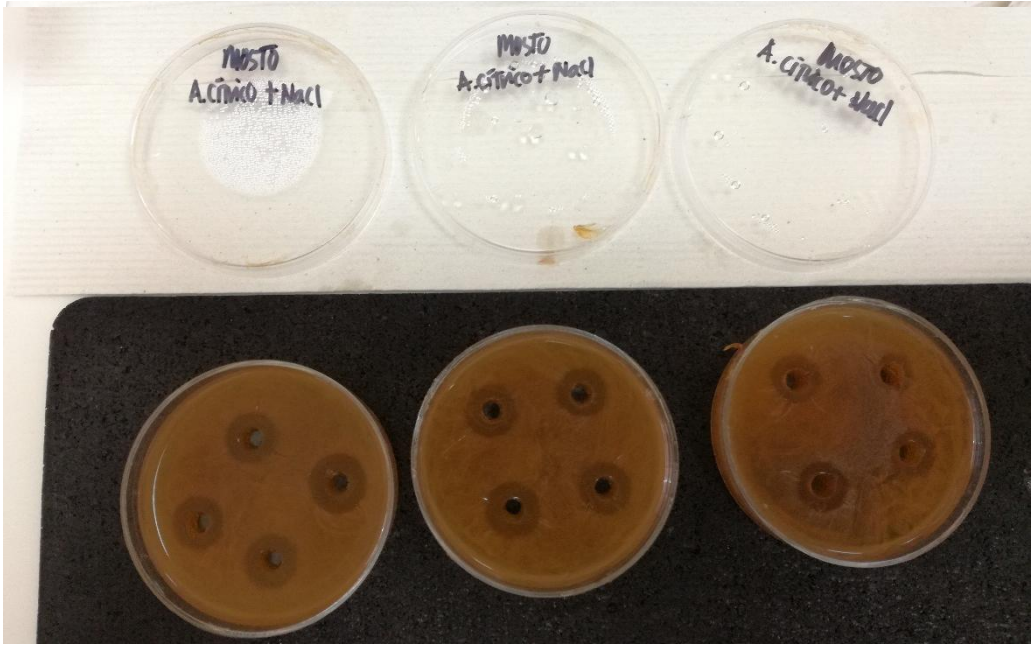
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 77. **Muestras de mosto diluido luego de la incubación**



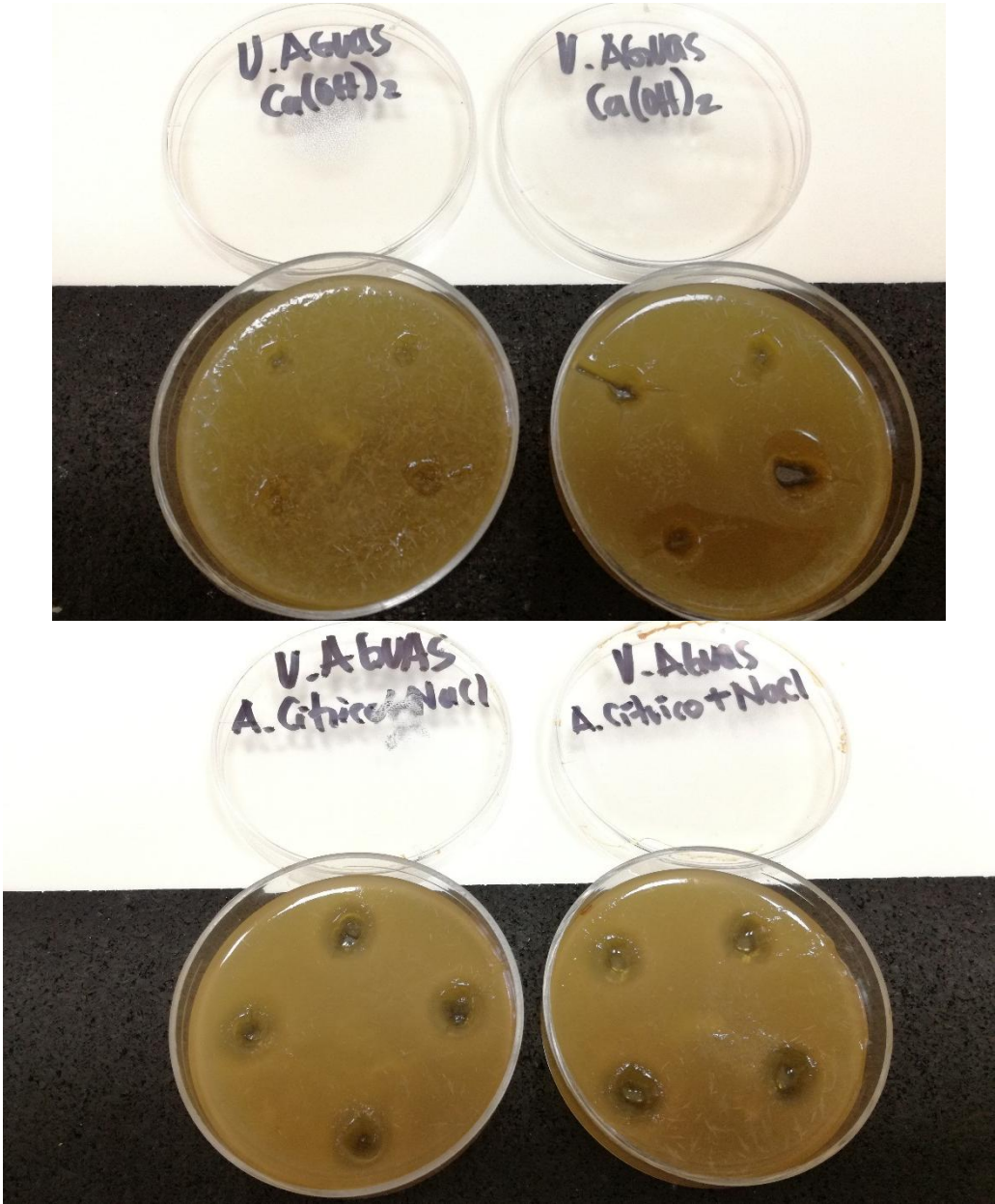
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 78. **Muestras de mosto diluido luego de la incubación**



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 79. Muestras de las últimas aguas luego de la incubación



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 81. Muestra del protocolo de hidróxido de calcio



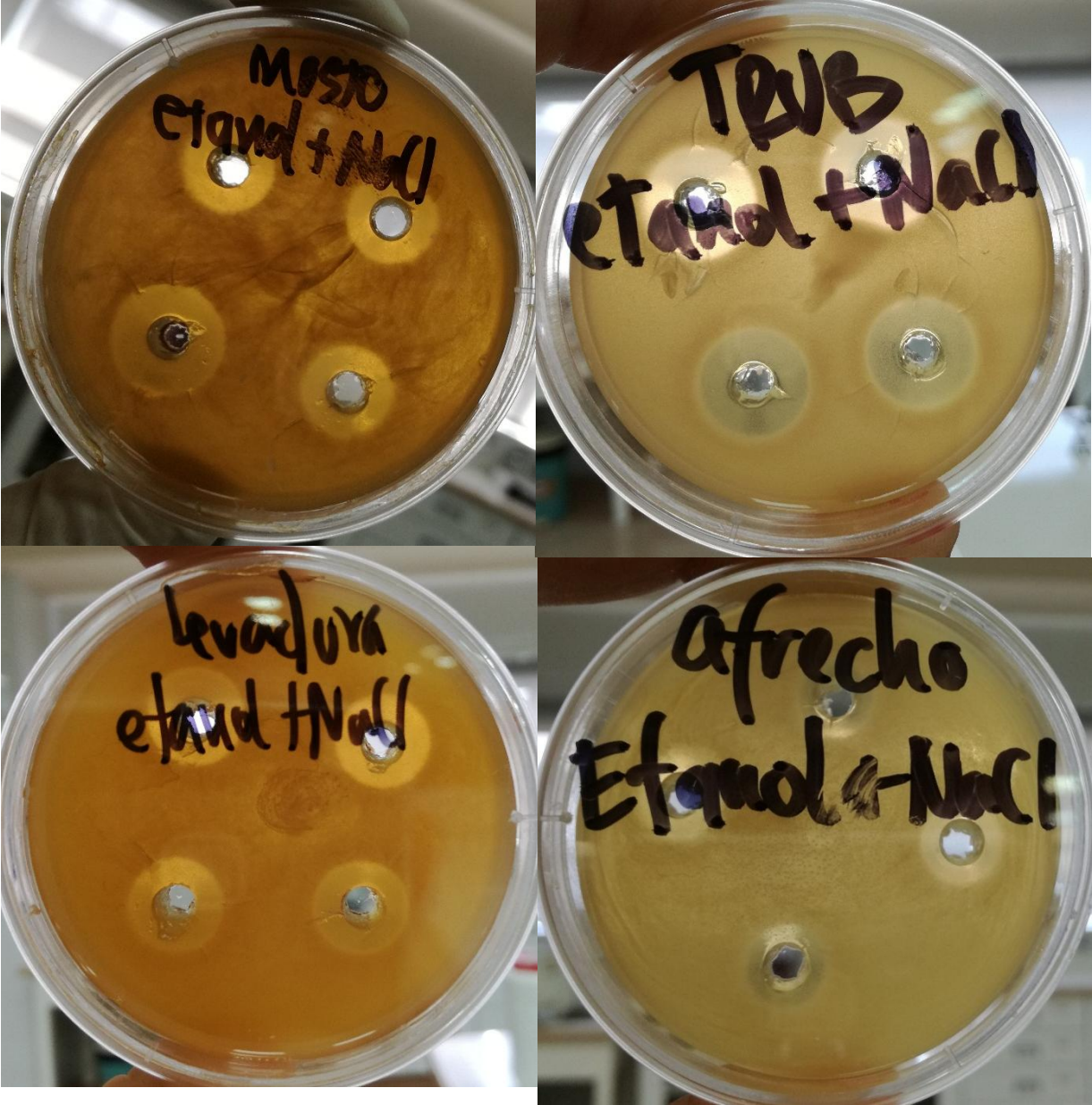
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 82. Muestras del protocolo de ácido cítrico + NaCl



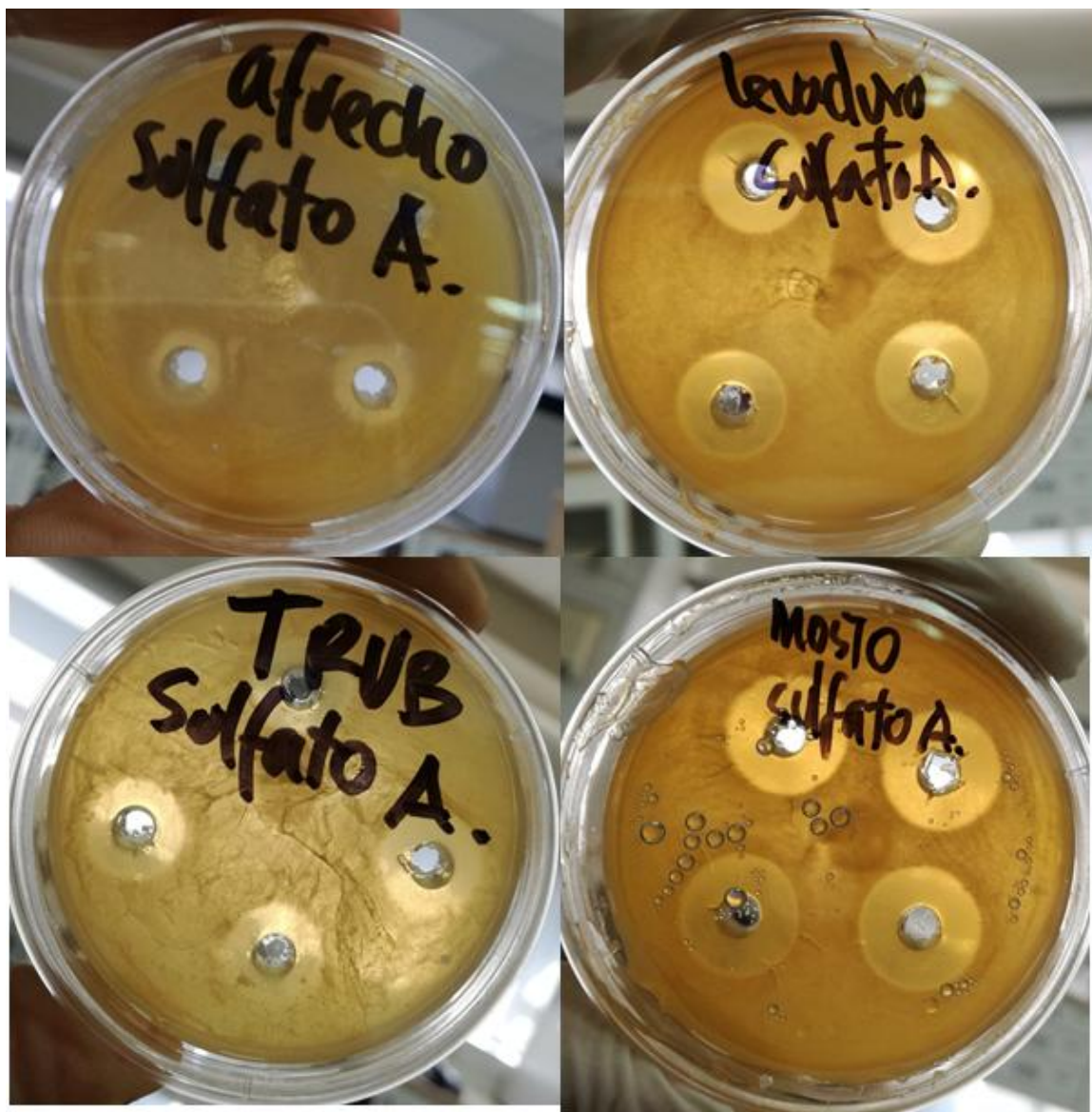
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 83. Muestras del protocolo de etanol + NaCl



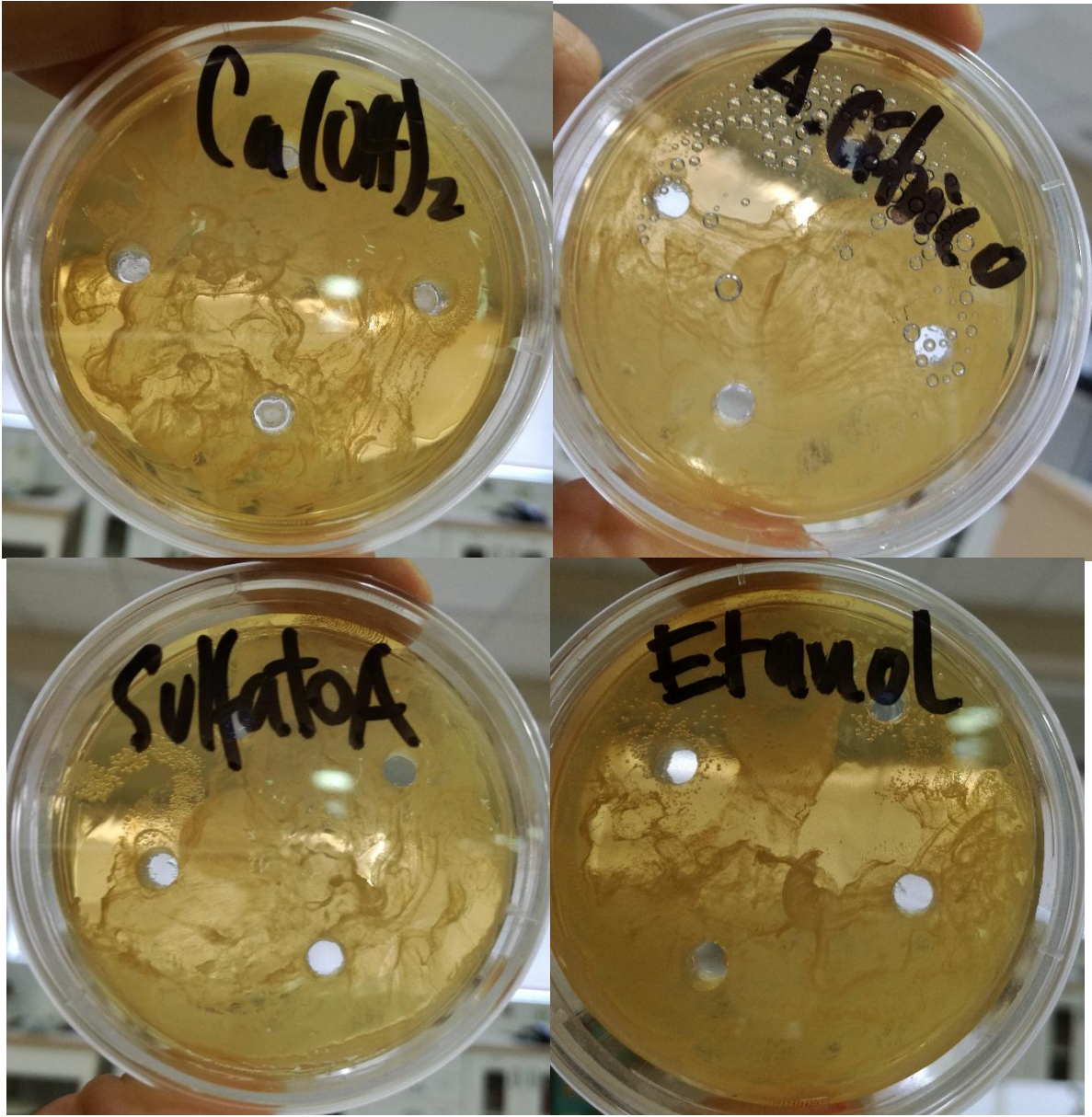
Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 84. Muestras del protocolo de sulfato de amonio



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 85. Pruebas control luego de la incubación



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.

Apéndice 86. **Prueba control con enzimas (lisozima)**



Fuente: elaboración propia, empleando el laboratorio de la planta de producción de cerveza.