

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES



EFECTO DE DIFERENTES IONES METALICOS  
SOBRE LA VIABILIDAD  
DE 2 VARIEDADES DE *Saccharomyces*  
*cerevisiae* PREVIAMENTE SOMETIDAS A  
"ESTRES QUIMICO"

POR  
MARIA GUADALUPE GONZALEZ JUAREZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS  
con Especialidad en  
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

Monterrey, N. L. México.

Diciembre, 2000

TM

Z5521

FCQ

2000

G6



1020135212

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS SUPERIORES**



**EFFECTO DE DIFERENTES IONES METÁLICOS  
SOBRE LA VIABILIDAD  
DE 2 VARIEDADES DE *Saccharomyces  
cerevisiae* PREVIAMENTE SOMETIDAS A  
“ESTRÉS QUÍMICO”**

**POR:**

**MARÍA GUADALUPE GONZÁLEZ JUÁREZ**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS  
con Especialidad en  
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL**

**Monterrey, N.L. México.**

**Diciembre, 2000**

0140-07860

TM  
75521  
F02  
2000  
G6



**FONDO  
TESIS**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS SUPERIORES**

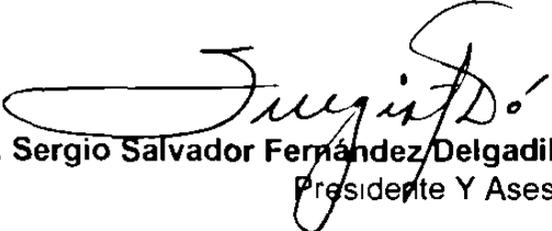
Diciembre de 2000

**Ing. José Manuel Martínez Delgado**  
*Director de la Facultad de Ciencias Químicas*

La tesis elaborada por la **Q.F.B. María Guadalupe González Juárez** titulada

**“ Efecto de diferentes iones metálicos sobre la viabilidad de 2 variedades de *Saccharomyces cerevisiae* previamente sometidas a “estrés químico”**

Ha sido aceptada como requisito parcial para optar al título de **“Maestría en Ciencias con especialidad en Microbiología Industrial”**

  
M.C. Sergio Salvador Fernández Delgadillo  
Presidente Y Asesor

  
M.C. Martha Alicia Suárez Herrera  
Co-Asesor Y Sinodal

  
Mc. Ma. Teresa Garza González  
Co-Asesor Y Sinodal

## DEDICATORIA

A mis padres José Armando Y María Guadalupe, que como signo de su amor me dieron vida, y mediante su apoyo me enseñaron a luchar cada día para alcanzar las metas propuestas.

A mi esposo Eugene Michael, con quien inicié un nuevo camino en esta vida y a quien agradezco muchísimo su apoyo y comprensión y sobretodo su amor para seguir y finalizar esta gran meta.

A mis hermanos, Jesús, Armando, José, Juan Antonio, María Soledad, Gabriel y Lucio, quienes a través de su interés y su aliento me apoyan constantemente.

A mis cuñadas y a mis sobrinos, por brindarme siempre su cariño.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios quien me guía y me permite seguir con vida para continuar aprendiendo nuevas cosas y teniendo nuevas experiencias.

A mi asesor M.C. Sergio Salvador Fernández Delgadillo, por la grandiosa ayuda que siempre me ha brindado siempre, además por su apoyo incondicional, así como junto con su familia me han mostrado su valiosa amistad .

A mis maestras M.C. Martha Alicia Suárez Herrera y M.C. María Teresa Garza González, por las facilidades brindadas para finalizar este estudio.

A todas las personas de Cervecería Cuauhtémoc, S.,A. que me apoyaron directa o indirectamente para la realización de este trabajo, con mención especial al Dr. Jesús Antolín Sierra Benavides y M.C. Luis Cástulo Damas Buenrostro.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
INTRODUCCION	1
OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECIFICOS	2
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Microorganismos	16
Medios de Cultivo	16
Condiciones de Estrés para la Levadura	17
Técnica de Microcultivo	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
Efecto del Uso de Diferentes Concentraciones de Dioxido de Cloro para las 2 Levaduras	21
Efecto del Uso de Calcio Magnesio y Zinc en la Viabilidad despues de la Exposicion al Estrés	22
Determinación del Residual de Cloro en la Suspensión de Levadura	25
Efecto del Uso de pH 2 a Diferentes Tiempos de Contacto sin Adición de Desinfectante para las 2 Levaduras	27
Efecto del Uso de Calcio Magnesio y Zinc en la Viabilidad despues de la Exposición a estrés con un pH 2 y Diferentes Tiempos de Contacto	28

Comparación del Efecto de las 2 Condiciones de Estrés para las 2 Levaduras	30
CONCLUSIONES	31
RECOMENDACIONES	32
BIBLIOGRAFIA	34
APENDICE DE TABLAS	39
APENDICE DE FIGURAS	41

## APENDICE DE TABLAS

Tabla		Página
I	Definiciones de los Diferentes Estados Fisiológicos en las que se describe el Grado de Dano Celular de las Levaduras	40

## APÉNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Microfotografía de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la que se puede Observar el Proceso de Gemación como un Círculo Indicador de su Viabilidad	42
2	Representación Esquemática de la Estructura de la Pared y Membrana Celulares de una Levadura	43
3	Representación Esquemática de las Diferentes Formas que pueden Observarse al Realizar una Tinción para Evaluar la Viabilidad en una Población de Levaduras	44
4	Representación Esquemática de la Reacción en que se basa la Evaluación de Viabilidad mediante el Uso del Azul de Metileno como Indicador de Viabilidad	45
5	Representación Esquemática de la Metodología para la Determinación de la Viabilidad por la Técnica de Microcultivo en Portaobjeto	46
6	Determinación de la Viabilidad por la Técnica de Microcultivo en Portaobjeto y Observación Microscópica	47
7	Efecto de la Concentración de Dioxido de Cloro sobre la Viabilidad de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> variedades 790 y 820 Expresado como Promedio de Células Muertas	48
8	Efecto de Algunos Iones Metales Divalentes sobre la Viabilidad de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> variedades 790 y	49

	820 Previamente Sometidas a un Tratamiento Químico con Dioxido de Cloro Expresada como % de Células Muertas	
9	Porcentaje de Viabilidad Observado para la Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> variedad 790 Sometida a Lavados con Dioxido de Cloro y Posteriormente Cultivada en Presencia de Algunos Iones Metálicos Divalentes	50
10	Porcentaje de Viabilidad Observado para la Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> variedad 820 Sometida a Lavados con Dioxido de Cloro y Posteriormente Cultivada en Presencia de Algunos Iones Metálicos Divalentes	51
11	Efecto de Tiempo de Estrés Químico a pH 2 Sobre la Viabilidad de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> variedades 790 y 820 Expresado como % Promedio de Células Muertas	52
12	Efecto de Algunos Iones Metálicos Divalentes Sobre la Viabilidad de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> variedades 790 y 820 Previamente Sometidas a un Estrés Químico a pH 2 Expresada como % de Células Muertas	53
13	Porcentaje de Viabilidad Observado para la Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> variedad 790 Sometida a Estrés Químico a pH 2 con Diferentes Tiempos de Contacto y Posteriormente Cultivada en Presencia de Algunos Iones Metálicos Divalentes	54
14	Porcentaje de Viabilidad Observado para la Levadura	55

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> variedad 820 Sometida a Estres Quimico con Diferentes Tiempos de Contacto y Posteriormente Cultivada en Presencia de Algunos Iones Metalicos Divalentes	
15	Resultados Graficos Comparativos del Efecto de los Tratamientos de Estres Ensayados Sobre la Viabilidad de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> variedades 790 y 820 Expresada como % de Celulas Muertas	56
16	Vía de Emben-Meyerhof-Parnas	57

# INTRODUCCIÓN

Los cationes metales como Magnesio y Calcio son de los más abundantes en los tejidos y fluidos biológicos de los mamíferos, por su abundancia se ubican entre los que han dado en llamarse constituyentes mayoritarios mientras que el Zinc es considerado dentro de los constituyentes minoritarios. Debido a la mayor abundancia de Magnesio y Calcio tanto en la corteza terrestre como en las aguas de mar están en cierta medida predestinados a desempeñar ante todo funciones no catalíticas.

Dado que la función catalítica pasa a un segundo plano, es importante mencionar las otras funciones que aparecen asociadas con ellos. En primer lugar estos metales aparecen vinculados a la constitución de estructuras de soporte y protección para las que se requieren cantidades importantes de material. Numerosos compuestos de Calcio aparecen involucrados tanto en la formación de tejidos duros como en la estabilización de estructuras de membranas. Asimismo todos estos metales participan también a través de interacciones electrostáticas y efectos osmóticos en la estabilización de

las conformaciones de muchos sistemas biológicos fundamentales (1)

El uso de las levaduras para la producción de bebidas alcohólicas es un proceso antiguo la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 1) es un derivado de las levaduras silvestres usadas en la antigüedad y por mejoramientos en fermentación se han seleccionado cepas de levaduras de acuerdo a las propiedades particulares que se desean (11) Se encuentran clasificadas dentro de los organismos eucarióticos en el grupo de los hongos imperfectos. La envoltura de las levaduras *Saccharomyces* consiste de la Pared Celular y la Membrana Plasmática separadas por un espacio periplásmico. El grosor de la pared celular puede ser de 150 a 300 nm dependiendo de la especie y de las condiciones del medio de crecimiento y la membrana celular tiene aproximadamente 10 nm de grueso (Figura 2) La pared celular es un componente esencial de la célula de levadura ya que es una estructura metabólicamente activa sus principales funciones incluyen rigidez, protección, porosidad y determinar la forma. También contiene ciertas enzimas que son esenciales en el transporte de moléculas complejas hacia el interior de la célula. Su material de construcción consiste de 2 clases de polisacáridos (a) Manoproteínas (

polimeros de Manosa un dos cova entemente a pépt dos) y (b Glucanos (pol meros de G ucosa Entre las propiedades fis cas de a superfic e de a gunas levaduras se encuentran h drofob cidad (incapac dad de la superficie a interactuar con agua) de la superfic e de la celula la carga (tienden a exhibir una superfic e cargada negativamente deb do a la presencia de grupos Fosfato en la capa mas externa de la capa de las manoproteinas) y topografia de la superfic ie o aspereza (31)

En el caso de las levaduras para obtener crecimientos óptimos se requiere un gran número de iones inorganicos en concentraciones que pueden ser micro y/o milimolares (12) Un desbalance en la nutrición iónica se reflejara en complejas o en ocasiones en sutiles alteraciones de los patrones metabolicos y características de crecimiento por e emp o en la morfo og a y tolerancia al medio ambiente (4)

Jones y Greenf e d (16) mencionan en la literatura que las especies on cas juegan un dob e papel este puede ser Enzimatic o y o Estructural Cada ion en part cular desarrolla d ferentes funciones en su Papel Enzimatico como centro cata tico de una enz ma como act vador o estab zador de a func on de a enz ma o para mantener e contro f s o og co por antagon smo entre los

activadores y los desactivadores. En el Papel Estructural las especies iónicas actúan para neutralizar fuerzas electrostáticas presentes en las diferentes unidades aniónicas celulares. Estos 2 papeles también determinan la respuesta de cualquier levadura al medio ambiente iónico.

En la revisión acerca de los factores que afectan las características de viabilidad y vitalidad de la levadura realizada por varios investigadores encabezada por Heggart (12) se menciona que la demanda de estas especies iónicas dependerá de la cepa de levadura, del medio de cultivo utilizado para el crecimiento y las interacciones de los constituyentes especialmente entre los cationes divalentes. Por lo que estas especies iónicas se pueden clasificar en varias categorías dependiendo de los requerimientos necesarios para el crecimiento de las levaduras, que son (a) Macroelementos (Mg, K, Zn, Fe, Ca, Mn, Cl) (b) Microelementos (Co, B, Cd, Mo, Cu, Va, N, Cr, I) (c) Inhibidores o Tóxicos (Ag, Bd, Hg, Se, Pd, Te, As, N, Os, L).

En la literatura cervecera Walker, Jones and Greenfield (16, 34) reportan un resumen realizado acerca de los efectos causados de los iones metálicos sobre la viabilidad y vitalidad de la levadura *Saccharomyces* en

donde aparece la concentración observada de inhibición del crecimiento para diferentes iones así como el impacto observado en la velocidad de producción de etanol. Sin embargo Heggart (12) menciona que la determinación de los niveles tóxicos de los iones metálicos es muy difícil de realizar ya que los efectos tóxicos pueden ser sinérgicos o antagonicos por lo que se deberá tener cuidado al interpretar los resultados obtenidos ya que las pruebas se realizaron en medios definidos por lo que los resultados de esas pruebas de toxicidad pudieran tener poca aplicabilidad si se pretende usar en mosto ya que este es un medio de fermentación industrial complejo debido a su alto contenido de agentes quelatantes o secuestrantes como son los aminoácidos, polipéptidos y proteínas los cuales realizan una función buffer con relación a la concentración disponible de los metales (13)

A pesar de la marcada similitud química por ejemplo entre Magnesio y Calcio su requerimiento y participación en sistemas biológicos es muy específico. En general son las membranas celulares las que efectúan el proceso de selección es decir es frecuente encontrar que solo ciertos cationes pueden pasar a través de una membrana en una dirección determinada. La selectividad de las membranas queda también demostrada por el hecho de

que la composición iónica en el interior de la célula es diferente a la de los fluidos externos. El Magnesio(II) juega un papel importante en todos los procesos que involucran transporte, utilización y transferencia de grupos fosfato. Por otro lado, cumple una cierta función reguladora y de competencia con la bioquímica del Calcio.

Los efectos y papeles desempeñados de ciertos iones metálicos hacia la levadura cervecera, particularmente Zinc y Calcio, han sido altamente reconocidos por los cerveceros por largo tiempo, más recientemente han involucrado al Magnesio, así como su interacción con otros iones. Rees and Stewart (23-25) reportaron para algunas cepas lager de levadura que la velocidad inicial de fermentación desciende cuando la proporción entre Calcio y Magnesio se incrementa, resultando también en un tiempo incrementado de consumo de carbohidratos, pero por otro lado se observó una producción más baja de etanol, además de un consumo alterado de maltosa y maltotriosa. Es importante recordar que el nivel de toxicidad de los diferentes iones varía de cepa a cepa de levadura. Duffus y Patterson (7) postularon que las cantidades intracelulares de iones Calcio y Magnesio eran esenciales para la división celular de la levadura, debido posiblemente a que se promueve el rompimiento de

microtubulos involucrados en la division nuclear y la formacion de la ce u a Ohsum y Anraku (21) observaron que las vesiculas de la membrana de las vacuolas de *Saccharomyces cerevisiae* catalizan el transporte activo de Calcio estas vacuolas actuan como el principal compartimento responsable de regular el Calcio en el citoplasma. Ademas Friis (10) reporto que el Calcio juega un papel importante en el control del inicio de la proliferación celular en la fase lag o de latencia lo cual adicionalmente indica que el Calcio puede ser critico para los eventos intracelulares aparte de la estabilización estructural que realiza en las membranas.

El papel del Zinc en sistemas biológicos se le ha relacionado como un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de todas las formas de vida es un componente esencial de muchas proteínas siendo indispensable para su estabilidad y o función catalitica. La alcohol deshidrogenasa es un ejemplo de oxidoreductasa que involucra la participación de Zn(II) como elemento esencial para el proceso catalítico. Esta enzima cataliza la oxidación de alcoholes primarios como por ejemplo el etanol y algunos alcoholes superiores como el n-propano o el n-butano los cuales son transformados rápidamente a aldehidos. Ademas se ha demostrado

también la presencia de Zn(II) en las enzimas DNA y RNA polimerasas que desempeñan un importante papel en la síntesis de los ácidos nucleicos. L. Van Engel (33) reportó un medio de cultivo con un alto contenido de Zinc (50 ppm) y observó una alta velocidad de crecimiento de las levaduras de cultivo. Este estudio fue basado en el conocimiento de que la adición de Zinc mejora el metabolismo del azufre de las células de levadura por lo que su impacto en la levadura cervecera sería observado en un producto final con bajo contenido de sulfhidrilo ya que se incrementa la actividad de la metaloenzima cisteína desulfhidrasa la cual cataliza la reducción de cisteína a sulfuro de hidrógeno amonio y ácido pirúvico.

Por otro lado, Sattukoglu (26) menciona que para el metabolismo de las levaduras la importancia del Magnesio es bastante obvia ya que niveles de 50 ppm son encontrados en los medios de cultivos usados para su crecimiento. El Magnesio es de fundamental importancia para el mantenimiento y regulación de una multitud de procesos metabólicos y de crecimiento en las células vivas. Las células de levadura tienen una alta demanda de Mg II para su crecimiento y no puede ser sustituido por otros iones metálicos. De hecho, el ion Ca II actúa antagonicamente hacia el Mg II en muchas funciones.

fisiológicas y bioquímicas de la levadura. La disponibilidad de  $Mg^{2+}$  influye en el crecimiento y metabolismo fermentativo de la levadura a través de estimular la división celular y la actividad de las enzimas glicolíticas. El  $Mg^{2+}$  podría también mostrar un efecto protector a las células de levadura de efectos dañinos causados por el etanol, la alta temperatura y la presión osmótica.

Por lo anterior se deduce que los iones metálicos mencionados deben ser considerados de manera especial en los procesos industriales que utilizan microorganismos como lo son productores de etanol ya que en éstos se busca mejorar los rendimientos, incrementar la capacidad fermentativa de las levaduras y mantener una consistencia en la calidad de los productos finales. Concentraciones apropiadas de tales iones permitirán por lo tanto crecimientos acelerados con un mayor rendimiento de biomasa y consecuentemente se tendrá una acumulación acelerada de los compuestos metabólicos que resultarán en un mayor rendimiento de productos finales.

La calidad de la levadura es uno de los parámetros más importantes para mantener comportamientos fermentativos consistentes los que resultarán en excelentes procesos productivos. Esta calidad puede estar

definida en términos de viabilidad y/o vitalidad. La viabilidad de la levadura es medida sobre la base del número de células vivas o muertas en una población dada y la vitalidad es una medida de vigor o estado fisiológico de las células vivas. Figura 3. En la Tabla I se enuncian las definiciones que propuso Basson (2) para los diferentes estados fisiológicos que pueden ser usados para describir el grado de daño de la levadura o la pérdida de la calidad de la levadura.

Existen diferentes métodos para medir la viabilidad de la levadura como son: replicación celular usando microcultivo o dilución y vacado en casa; medición de componentes celulares; uso de colorantes vitales (miden indirectamente una actividad de la célula de levadura), etc. Para obtener una medición verdadera del estado de viabilidad de las levaduras es difícil. Uno de los métodos más usados es el de la técnica del azul de metileno, basado en que en su forma oxidada es de color azul y por medio de la acción de las enzimas reductasas cambia a su forma reducida, la cual es incolora. Muy usado en la industria cervecera ya que utiliza sólo 5 minutos para obtener resultados. Figura 4. Pero no es un método confiable ya que sobreestima poblaciones de células vivas de levaduras cuando la viabilidad cae por debajo de 90

de viabilidad además de que requiere interpretación visual de las células teñidas (17-18) esto puede resolverse mediante el uso de tinción fluorescente acoplada con un análisis automatizado de los resultados a través del uso del analizador de imágenes o citometría de flujo (6-15) pero la correlación que se obtiene no es confiable si se compara con otros métodos de evaluación de viabilidad como el método de conteo en placa (8-32) Por lo tanto uno de los procedimientos más confiables para obtener una estimación más precisa de la viabilidad de las células de levaduras es la técnica de microcultivo la cual requiere un tiempo corto de incubación (18 horas)

Una proporción grande de microorganismos en sus medios ambientes naturales puede sobrevivir pero si las condiciones se varían se limita su crecimiento y la habilidad para sobrevivir por periodos largos La producción de alcohol es un fenómeno complejo cuyo rendimiento depende de diversos factores por ejemplo, características intrínsecas de la cepa condiciones de la reacción concentración de inoculo composición del medio, condiciones de fermentación etc Durante la fermentación la levadura puede pasar por diferentes tipos de estrés genera como choque osmótico tolerancia a etanol, tolerancia a altas temperaturas cambios de pH

etc Sin embargo en su manejo entre fermentaciones o en sus procesos de amacénaje estas pueden ser sometidas por accidente al contacto con los productos químicos que generalmente se usan como agentes impadores o desinfectantes en la industria de alimentos en general, como lo son los peróxidos y los detergentes alcalinos

En la literatura encontramos que a pesar de pH bajo externo, las células de levadura mantienen su pH intracelular (pHi) a rededor de la neutralidad (20) para la actividad óptima de los procesos metabólicos críticos (3) Cambios en el pHi parecen ser importantes para controlar el ciclo celular y las velocidades de síntesis de DNA y RNA parecen incrementarse con el pHi más alto pero dentro del rango fisiológico normal (19) Además las enzimas glicolíticas claves (Figura 16) se cree que regulan el pHi, particularmente la fosfofructoquinasa (9) Se cree que la función primaria de acción de los ácidos débiles usados para preservación es la de reducir el pHi abajo del rango fisiológico normal lo que conduce a detener el crecimiento

Las levaduras tienen un sistema bien desarrollado para mantener a homeostasis de pH dependiente de una H<sup>+</sup>-ATPasa que transoca los protones en la membrana plasmática En *Saccharomyces cerevisiae* la H<sup>+</sup> ATPasa

es la proteína más abundante de la membrana plasmática la cual constituye a rededor del 20% de total de proteína de la membrana esta enzima está acoplada con la hidrólisis del ATP y a expulsión de protones además de que es esencial para su crecimiento ya que limita la velocidad, también es crítica en el mecanismo de resistencia a los factores de estrés tales como el calor variaciones de pH etc (5, 22, 27, 28) El mantenimiento de la homeostasis de  $pH_i$  puede ser energéticamente caro, es decir se consume de un 40 a un 60% del ATP celular por lo que los niveles de ATP celular pueden bajar significativamente en la presencia de ácidos débiles usados como preservativos en alimentos (29)

Holyoak (14) observó en su experimentación que una cepa con una actividad reducida de  $H^+$  ATPasa de la membrana plasmática desplegó una fase lag o de latencia incrementada en presencia de un ácido débil como es el ácido sorbico lo que significa que esta enzima tiene una actividad que juega un papel crítico en la tolerancia de la levadura al etanol o a las temperaturas no óptimas de crecimiento

Por lo anterior es de gran importancia conocer a nivel laboratorio si mediante el uso de medios nutritivos adicionados con  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  o  $Zn^{+2}$  se

puede recuperar o mejorar la viabilidad de las células sometidas a este tipo de estrés

## OBJETIVO GENERAL

Observar el efecto de Calcio(II) Magnesio(II) y Zinc(II) sobre la viabilidad de 2 variedades de *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas en presencia de estos iones después de ser sometidas a estrés químico a temperatura constante y diferentes pH's y tiempos de contacto

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 - Someter a las levaduras a estrés químico con cuatro concentraciones de Dioxido de Cloro
- 2 - Someter a las levaduras a estrés químico usando pH de 2, y con cuatro tiempos de contacto
- 3 - Evaluar el efecto de Calcio(II) Magnesio(II) y Zinc(II) adicionados por separado en 100 ppm a un medio de cultivo sobre la viabilidad de las levaduras sometidas a "estrés químico"
- 4 - Experimentar discutir y concluir cual de los iones estudiados adicionado al medio de cultivo favorece la viabilidad de la levadura después de ser sometidas a "estrés químico"

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos

Los microorganismos a usar en este proyecto son 2 levaduras *Saccharomyces cerevisiae* obtenidas del cepario de la Universidad Autónoma de Nuevo León

Las identificaciones de las variedades fueron Levadura 790 y 820

Las cepas fueron obtenidas de los medios de cultivo inclinados donde fueron mantenidos. Se reactivaron en medio líquido (Cado MYPG) hasta obtener una biomasa de aproximadamente 30-40 de sólidos húmedos de levadura

### Medios de Cultivo

Se usó como base a formulación de medio de cultivo MYPG adicionado de concentraciones de

- a) Calcio = 100 ppm
- b) Magnesio = 100 ppm
- c) Zinc = 100 ppm

La compos c on de med o de cultivo MYPG Agar es a s guiente

Glucosa	10 0 g
Extracto de Malta	3 0 g
Extracto de Levadura	3 0 g
Peptona	5 0 g
Agar Bacteriologico	15 0 g
Agua Dest lada	1 0 L

### Condiciones de Estrés para la Levadura

#### *METODO No 1*

Usando agitacion constante se mantuvo la suspension de levadura a temperatura de 15 C y se adiciono acido fosforico hasta obtener un valor de pH de 3 0 seguido de la adicion de d ferentes concentrac ones de Dioxido de Cloro

- a) 15 ppm
- b) 30 ppm
- c) 60 ppm
- d) 120 ppm

Después de la incorporación de los reactivos se establecieron 4 horas como tiempo de contacto

#### *METODO No 2*

Usando agitación constante se mantuvo a suspensión de levadura a temperatura de 15 C y se adiciono ácido fosfórico hasta obtener un valor de pH de 2.0 seguido del establecimiento de diferentes tiempos de contacto

- a) 1 hora
- b) 2 horas
- c) 3 horas
- d) 4 horas

#### **Técnica de Microcultivo**

Se usó la metodología de la técnica de microcultivo la cual por medio de examinación microscópica de los portaobjetos que contenia el medio de cultivo y la levadura nos revelo el crecimiento de microcolonias correspondientes a células viables despues de un tiempo corto de incubación (18 horas) (Figura 5 y 6)

#### *METODOLOGIA*

- Flamear los portaobjetos

- De cada caja de petri donde se colocaron los medios de cultivo correspondientes a cada ion usando una navaja esteril se cortaron pequeños cuadros con dimensiones aproximadas de  $2 \times 2 \text{ cm}^2$  y se colocaron en el portaobjetos
- De la suspension de levadura se tomo 1 ml y se realizaron diluciones con soluc on salina esteril hasta obtener un conteo aproximado de 1 millon de células /ml Antes de colocar en el medio de cultivo colocar una gota de la suspension en un portaobjetos limpio y verificar que las células de levadura se observen bien dispersas al microscopio usando un aumento de 400 x
- Una vez obtenida la dilucion correcta procedo a colocar una gota de la suspension sobre cada medio de cultivo colocado en los portaobjetos Cubrir con un cubreobjetos y llevar a incubacion
- La incubacion se realizo a 30 C durante 18 horas
- Pasado el tiempo de incubacion contar en el microscopio aproximadamente un total de 500 entre microcolonias y células
- Se puede expresar los resultados como porcentaje de células viables de acuerdo a la siguiente formula

$$\frac{\text{No. Microcolonias}}{\text{Total No. Células y Microcolonias}} \times 100 = \text{Células vivas}$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la realización de los experimentos se observó que a partir de la adición del ácido fosfórico para bajar el pH y ajustarlo al valor de 3.0 y de 2.0 la levadura disminuyó su viscosidad lo cual facilitó la agitación mecánica de la suspensión de levadura. En el caso del primer método propuesto para causar estrés en la levadura ese cambio causó que el contacto del volumen de la solución de Dioxido de Cloro agregada en toda la suspensión de levadura, fuera inmediato.

### **Efecto del Uso de Diferentes Concentraciones de Dioxido de Cloro para las 2 Levaduras.**

Se procedió a realizar el primer método de la exposición a condiciones de estrés a través del uso de diferentes concentraciones de Dioxido de Cloro para observar su efecto sobre la viabilidad de las 2 levaduras en suspensión usando el conteo en el microscopio de las células aisladas y las microcolonias formadas.

Los primeros resultados de la experimentación realizada por triplicado pueden ser observados en la Figura 7 en la que se muestra en forma gráfica el promedio del porcentaje de células muertas para cada una de las diferentes concentraciones de Dióxido de Cloro.

De manera general se observaron cambios poco significativos en la viabilidad de las 2 levaduras como resultado de un aumento de la concentración de Dioxido de Cloro. En el caso de la Levadura 790 el rango del de células muertas se mantuvo en el rango de 11.6 hasta 14.5 %, nivel que resultó más alto que el obtenido para la Levadura 820 en la que se obtuvieron valores en un rango entre 6.9 y 8.7. Estas diferencias entre el aumento o descenso de viabilidad hicieron necesario realizar observaciones por separado para observar el impacto de cada uno de los iones usados con respecto a las diferentes concentraciones de Dioxido de Cloro.

#### **Efecto del Uso de Calcio, Magnesio y Zinc en la viabilidad después de la exposición al estrés.**

Para observar el impacto de uso de los diferentes iones en el crecimiento de ambas levaduras en el medio de cultivo se compararon los resultados obtenidos para el testigo y para cada uno de los iones usados en a

experimentación y posteriormente se grafico el promedio del porcentaje de células muertas. Los datos resultantes se muestran en la Figura 8.

Primero, para la Levadura 790 se puede mencionar la posibilidad de que la adición de Calcio y Magnesio al medio de cultivo testigo resulte en una mejora en la viabilidad después de la exposición a estrés químico causado por el descenso del pH y la adición de las diferentes concentraciones de Dioxido de Cloro mientras que con la adición de Zinc se observó que ocurre todo lo contrario, es decir obtenemos un decremento del porcentaje de células vivas.

Bajo el mismo análisis mencionado en el párrafo anterior, en el caso de la Levadura 820 se observa solamente ligera mejoría con la adición del ion Calcio no ocurriendo lo mismo ni cuando se adiciona Magnesio ni con la adición de Zinc.

Para continuar haciendo más evidente la mejoría de la viabilidad para cada una en particular se necesita observar por separado los resultados obtenidos de las diferentes concentraciones de Dioxido de Cloro tanto para la Levadura 790 como para la Levadura 820.

### **LEVADURA 790.**

En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos para esta levadura en los cuales se observó que en todas las concentraciones usadas del Dióxido de Cloro e ion Calcio mejora la viabilidad de la levadura con respecto al testigo; en el caso del ion Magnesio se observa mejoría en las concentraciones de 15 y 30 ppm de Dióxido de Cloro mientras que en las 2 restantes (60 y 120 ppm) no se observaron cambios en los % de viabilidad finalmente para la adición del ion Zinc se observó mejoría de la viabilidad solamente cuando se usaron 30 ppm ya que en 15, 60 y 120 ppm se vio incrementado el porcentaje de células muertas

### **LEVADURA 820.**

Los resultados obtenidos para la Levadura 820 se muestran en la Figura 10. Se observó mejoría de la viabilidad cuando se adiciona el ion Calcio al medio de cultivo en todas las concentraciones usadas de Dióxido de Cloro con respecto al testigo con la adición del ion Magnesio se mejora la viabilidad para 30, 60 y 120 ppm de Dióxido de Cloro a excepción sucede con 15 ppm en donde se mantiene casi igual el % de células muertas que el % obtenido para el testigo en el caso del ion Zinc mejora la viabilidad a 15 y 60 ppm de Dióxido de Cloro

para la concentración de 30 ppm se observaron los mismos resultados de viabilidad que la obtenida en el testigo siendo la excepción la concentración de 120 ppm en donde se observó que el porcentaje de células muertas se vio incrementado

Continuando con la experimentación se decidió verificar que la condición de estrés para las 2 levaduras por la metodología realizada estuviera ocurriendo ya que generalmente el aumento de la concentración usada de algún desinfectante como es el Dióxido de Cloro resulta más perjudicial para cualquier microorganismo del medio ambiente

Se planteó medir el residual de Dioxido de Cloro en la suspensión de levadura a 2 diferentes temperaturas 5 y 15 Grados Celsius usando tanto la concentración de trabajo mínima (15 ppm) como la máxima establecida (120 ppm) en la metodología de trabajo y usando 2 diferentes tiempos de contacto como son tiempo cero y 30 minutos

#### **Determinación del Residual de Cloro en la Suspensión de Levadura.**

Los resultados obtenidos mediante el uso de la técnica de tiosulfato de sodio se pueden observar en el siguiente esquema de resultados

### 15 Grados Celsius

D oxido C oro (ppm)	Tiempo 0 m n	T empo 30 m n
15	0 ppm	0 ppm
120	40 ppm	3 ppm

### 5 Grados Celsius

Dióxido Cloro (ppm)	Tiempo 0 min	T empo 30 m n
15	0 ppm	0 ppm
120	46 ppm	6 ppm

Estos resultados marcan la pauta para mencionar que esta metodología no causa danos significativos con respecto a la viabilidad de ambas levaduras debido a que el ion cloro liberado bajo esas condiciones se elimina muy fácilmente y el valor de pH 3 no impacta significativamente en la viabilidad.

Entonces se hace necesario realizar el otro método para causar condiciones de estrés para las levaduras en el cual se usará un descenso de pH de 3 a 2 y eliminando el

uso del D óxido de Cloro además de que se probaran 4 diferentes tiempos de contacto 1 2 3 y 4 horas

**Efecto del Uso de pH 2 a Diferentes Tiempos de Contacto sin adición de Desinfectante para las 2 Levaduras.**

Se realizó el segundo método en donde se variaron condiciones de estrés para las 2 levaduras siendo esta metodología aplicada en muestras de levadura por triplicado y al igual que en el método anterior se observó hasta que grado se afecta la viabilidad de ambas levaduras causada por estas condiciones de estrés aplicadas. Se graficó el promedio del porcentaje de células muertas para cada una de los diferentes tiempos de contacto los resultados obtenidos los podemos ver en la Figura 11

Se observó que con el paso del tiempo se incrementa ligeramente el porcentaje de células muertas para las 2 levaduras se vuelve a observar al igual que en el método anterior de las condiciones de estrés que se obtuvo mayor porcentaje de células muertas para la Levadura 790 (rango de 15.4 a 16.9%) que para la Levadura 820 (rango de 10.2 a 14.4). En el caso de la Levadura 820 se observó un decremento en el porcentaje de células muertas a las 2

horas por lo que es necesario observar los resultados que se obtuvieron para cada uno de los diferentes iones usados y examinar cuál de los iones es el que influyó para obtener este descenso en el número de células muertas.

### **Efecto del Uso de Calcio, Magnesio y Zinc en la viabilidad después de la exposición al estrés con un pH de 2 y Diferentes Tiempos de Contacto.**

En la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos del promedio del porcentaje de células muertas para cada levadura y se puede analizar la viabilidad obtenida del testigo con respecto a cada uno de los iones analizados.

Para la Levadura 790 se observó que existe la posibilidad de que la adición de Calcio y Magnesio al medio de cultivo testigo mejore la viabilidad en todos los tiempos de contacto usados, ocurriendo lo contrario para la adición de Zinc.

En el caso de la Levadura 820 se observó una ligera mejoría cuando se usó Magnesio en todos los tiempos de contacto usados, para el Calcio no se observaron cambios y con el uso de Zinc se observó un decremento en el porcentaje de viabilidad.

Para continuar viendo la mejora de la viabilidad será necesario observar a detalle los resultados obtenidos de

los diferentes tiempos de tratamiento estresante para cada una de las levaduras y con cada uno de los iones adicionados

#### **Levadura 790.**

Los resultados obtenidos para la Levadura 790 se muestran en la Figura 13 en donde se puede observar que en todos los tiempos de contacto usados el ion Calcio mejora la viabilidad de la levadura con respecto al testigo, en el caso del ion Magnesio no se observa mejora cuando se usa 1 hora de tiempo de contacto pero en los otros tiempos usados 2 3 y 4 horas se observo un incremento en la viabilidad En el caso de la adicion de Zinc se observó un incremento bastante notable en el porcentaje de celulas muertas en todos los tiempos de contacto usados

#### **Levadura 820.**

Los resultados obtenidos para la Levadura 820 se muestran en la Figura 14 se observo mejora de la viabilidad en 3 de los 4 tiempos de contacto usados cuando se adiciono el ion Calcio con respecto al testigo la excepcion fue cuando se uso 1 hora de tiempo de

contacto cuyos resultados fueron que se incremento el porcentaje de ce u as muertas resultados muy parec dos se presentaron con el uso del ion Magnes o en donde se mejora la viabil dad para 2 3 y 4 horas de tiempo de contacto y la excepci3n fue con 1 hora de tiempo de contacto en donde se incremento el de c3lulas muertas en el caso del ion Zinc se observo de manera notable un incremento en el porcentaje de ce ulas muertas en los 4 tiempos de contacto usados

### **Comparaci3n del efecto de las 2 Condiciones de Estr3s para las 2 Levaduras.**

En la Figura 15 podemos observar los resultados obtenidos de viabil dad para ambas levaduras aplicando los 2 m3todos de estres Con el uso de las diferentes concentraciones de D3xido de Cloro se observ3 que el aumento de la concentraci3n de Dioxido de Cloro no refleja un decremento paulatino de la viabil dad de las levaduras Sin embargo con el uso del pH 2 se puede observar para ambas levaduras que se aumenta la viabil dad conforme se aumentan las horas del tiempo de contacto ambos casos referen a viabil dades observadas en cultivos en presenc ia de os ones estudi ados

## CONCLUSIONES

1 - La metodología de desinfección de levaduras usando diferentes concentraciones de Dióxido de Cloro no causa daños significativos a la viabilidad de las levaduras ensayadas debido a que el ion cloro liberado bajo esas condiciones se elimina muy fácilmente por volatilización y el valor de pH 3 involucrado en el medio acuoso no impacta significativamente la viabilidad

2 - Las condiciones de estrés generadas con el uso de pH 2 y tiempos de contacto arriba de 2 horas afectan en forma negativa la viabilidad para ambas levaduras

3 - El Calcio adicionado al medio de cultivo es el único ion que tiene una influencia positiva sobre la viabilidad de las Levaduras 790 y 820 después de ser expuestas a valores de pH de 3 y concentraciones de Dióxido de Cloro hasta de 120 ppm

4 - El efecto estresante provocado por un tratamiento ácido a pH 2 puede ser disminuido mediante la adición de

iones Calcio o Magnesio en un nivel de 100 ppm al medio de propagación

5 - La presencia de ion Zinc a 100 ppm en el medio de propagación no refleja mejoras en la viabilidad de las levaduras sometidas al estrés ácido a pH 2

## RECOMENDACIONES

Observando los resultados y de acuerdo a la literatura sería útil investigar en el laboratorio la conveniencia de neutralizar el pH de cada una de las 2 levaduras cuando alguna de estas condiciones de bajos niveles de pH se han presentado antes de iniciar una fermentación esto con el fin de ayudar a que las levaduras mantengan las cargas negativas de la pared celular lo cual se podría enfocar a revisar su impacto sobre la capacidad de floculación que tienen algunas levaduras cerveceras esto porque las proteínas localizadas en la pared celular son requeridas para la formación de novo de las paredes celulares durante la regeneración de esferoplasto y se podría modificar el template o plantilla de las proteínas

de la siguiente generación de levaduras con un resultado de afectación de la herencia del fenotipo de la levadura denominada Celula madre o iniciadora

Se recomienda evaluar la efectividad de los 2 metodos de lavado de levadura para destruir microorganismos contaminantes y tambien evaluar los resultados de vitalidad para ambas levaduras

## BIBLIOGRAFÍA

- 1 Baran J E Química Bioinorgánica McGraw Hill 1995 p 123-133  
183-191
- 2 Basson L Lowenadler J H K Harrison S T L Godfrey T A  
Axcell B C and O Connor Cox E S C 1996 The effect of yeast  
handling on yeast quality Proc 6th Int Brew Conf Harrogate p  
370-379
- 3 Busa W B and R Nuccitelli 1984 Replacement of the promoter of  
the yeast plasma membrane ATPase gene by a Galactose-  
dependent promoter and its physiological consequences Curr  
Genet 12 p 105-110
- 4 Chandrasena G Use of response surfaces to investigate metal ion  
interactions in yeast fermentations J Am Soc Brew Chem 1997  
55(1) p 24-29
- 5 Coote P J , Cole M B Seymour I J Rowe D L Ferdinando D P  
and Jones M V 1991 Activity of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase  
is a key physiological determinant of thermotolerance in  
*Saccharomyces cerevisiae* Microbiology 140 p 1881-1890
- 6 Donhauser C Eger C Hubl T Schmidt U and Wnnewisser W  
Brauwelt 132 1301 1992

- 7 Duffus J H and Patterson L J Control of cell division in yeast using the ionophore A23187 with Calcium and Magnesium Nature 1974 251 p 626-627
- 8 EBC yeast group J Inst Brew 68 14 1962
- 9 Francois J E Van Schafftingen and H G Hers 1986 Effect of Benzoate on the metabolism of Fructose 2,6-bisphosphate in yeast Eur J Biochem 154 p 141-145
- 10 Friis, J Szabewski L Christensen S T Schousboe P and Rasmussen, L. Physiological studies on the effect of  $Ca^{2+}$  on the duration of the lag phase of *Saccharomyces cerevisiae* FEMS Microbiol Lett 1994 123 p 33-36
11. Garcia Garibay M Biotechnology Alimentaria LIMUSA 1993 p 263-288
- 12 Heggart H M Factors affecting yeast viability and vitality characteristics A Review Technical Quarterly 1999 Vol 36 No 4 p 383-406
- 13 Helin T R M and Slaughter J C 1977 Minimum Requirements for Zinc and Manganese in brewer's wort J Inst Brew 83(1) p 17-19

- 14 Holyoak C D M Stratford Z McMullin M B Coe K Crmmns  
A J P Brown and P J Coote 1996 Activity of the plasma  
membrane H<sup>+</sup>-ATPase and optimal glycolytic flux are required for  
rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the  
presence of the weak acid preservative sorbic acid Appl Environ  
Microbiol 62 p 3158 3164
- 15 Hutter K J Brauwelt 132 252 1992
- 16 Jones, R P and Greenfield P F 1984 A review of yeast ionic  
nutrition – Part I Growth and fermentation requirements Process  
Biochemistry 19(2) p 48 60
- 17 King L M Schisler D O and Ruocco J J 1981 Epifluorescent  
method for the detection of non viable yeast J Am Soc Brew  
Chem 39 p 52 55
- 18 McCaig R 1990 Evaluation of the fluorescent Dye 1 Anilino-8-  
Naphthalene Sulfonic Acid for yeast viability determination J Am  
Soc Brew Chem 48 p 22 25
- 19 Madhus, I H 1988 Regulation of intracellular pH in eukarotic cells  
Biochem J 250 p 1 8
- 20 Ma partida F and Serrano 1981 Proton translocation catalysed by  
the purified yeast plasma membrane ATPase reconstituted in  
liposomes FEBS Lett 131 p 351 354

- 21 Ohsumi Y and Anraku Y Calcium transport driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae* J Biol Chem 1988 258 p 5614-5617
- 22 Portillo, F and Serrano R, 1989 Growth control strength and active site of yeast plasma membrane ATPase studied by site-directed mutagenesis Eur J Biochem 186 p 501-507
- 23 Rees E M R and Stewart G G 1997 The effects of increased Magnesium and Calcium concentrations on yeast fermentation performance in high gravity worts J Inst Brew 103 p 287-291
- 24 Rees E M 1998 Strain specific response of brewer's yeast strains to zinc concentrations in conventional and high gravity worts Journal of the Institute of Brewing July-August Vol 104 p 221-228
- 25 Rees, E M R and Stewart G G 1999 Effects of magnesium, calcium, and wort oxygenation on the fermentative performance of ale and lager strains fermenting normal and high gravity worts Journal of the Institute of Brewing Vol 105 No 4 p 211-217
- 26 Saltukoglu A, and Slaughter, J C 1983 The effect of magnesium and calcium on yeast growth Journal of the Institute of Brewing March-April Vol 89 p 81-83
- 27 Serrano R 1984 Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump Curr Top Cell Reg 23 p 87-126

- 28 Serrano R M C Ke land-Brandt and G R F nk 1986 Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup> & K<sup>+</sup>) and Ca<sup>++</sup>ATP ases Nature London) 319 p 689-693
- 29 Serrano, R 1991 Transport across yeast vacuolar and plasma membranes *In* J N Strathern E W Jones and J R Broach ed ) The molecu ar biology of the yeast *Saccharomyces* Genome dynamics protein synythesis and energetics Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor N Y
- 30 Simpson W J and Hammond J R M 1989 The response of brewing yeasts to acid wash ng Journal of the Institute of Brewing September-October Vol 95 p 347 354
- 31 Smart K A The mportance of the brewing yeast cell wall Brewer s Guardian April 1995 p 44-50
- 32 Trevors J T Biotechnol Lett 5 363 1983
- 33 Van Engel E L 1969 Zinc metaloenzyme activity and the growth of brewers Yeast P 35 43
- 34 Walker G M , Birch R M Chandrasena, G , and Maynard, A I 1996 Magnesium calcium, and fermentative metabolism in industrial yeasts American Society of Brew ng Chem sts 42 1) p 13-18

## APÉNDICE DE TABLAS

**TABLA I. DEFINICIONES DE LOS DIFERENTES ESTADOS FISIOLÓGICOS EN LAS QUE SE DESCRIBE EL GRADO DE DAÑO CELULAR DE LAS LEVADURAS**

• Células "Con Buena Salud"	Celulas intactas capaces de crecer y reproducirse metabolismo suficientemente activo para lograr buenas fermentaciones y no producir desviaciones en el producto final
• Células con Estrés Fisiológico	Celulas intactas, capaces de crecer y reproducirse metabolismo alterado lo cual puede resultar en una velocidad metabolca reducida fermentaciones lentas bajos niveles de materia de reserva y pueden producir desviaciones en el producto final
• Células Desactivadas en su Replicación	Celulas intactas no son capaces de reproducirse debido a un dano en su membrana celular pero es un proceso reversible seguido un periodo de adaptacion
• Células con Daño Menor en su Envoltura	Celulas danadas en su pared celular debido a parcial remocion de las glicoproteinas las cuales podran formar turbiedad en el producto final
• Células Muertas	Celulas suficientemente intactas para retener colorantes vitales pero no muestran crecimiento u otra actividad metabolica proceso irreversible
• Autólisis	Celulas rotas que perden su forma, no conservan su morfologia original y no pueden identificar como celulas microscopicas competas

## APÉNDICE DE FIGURAS

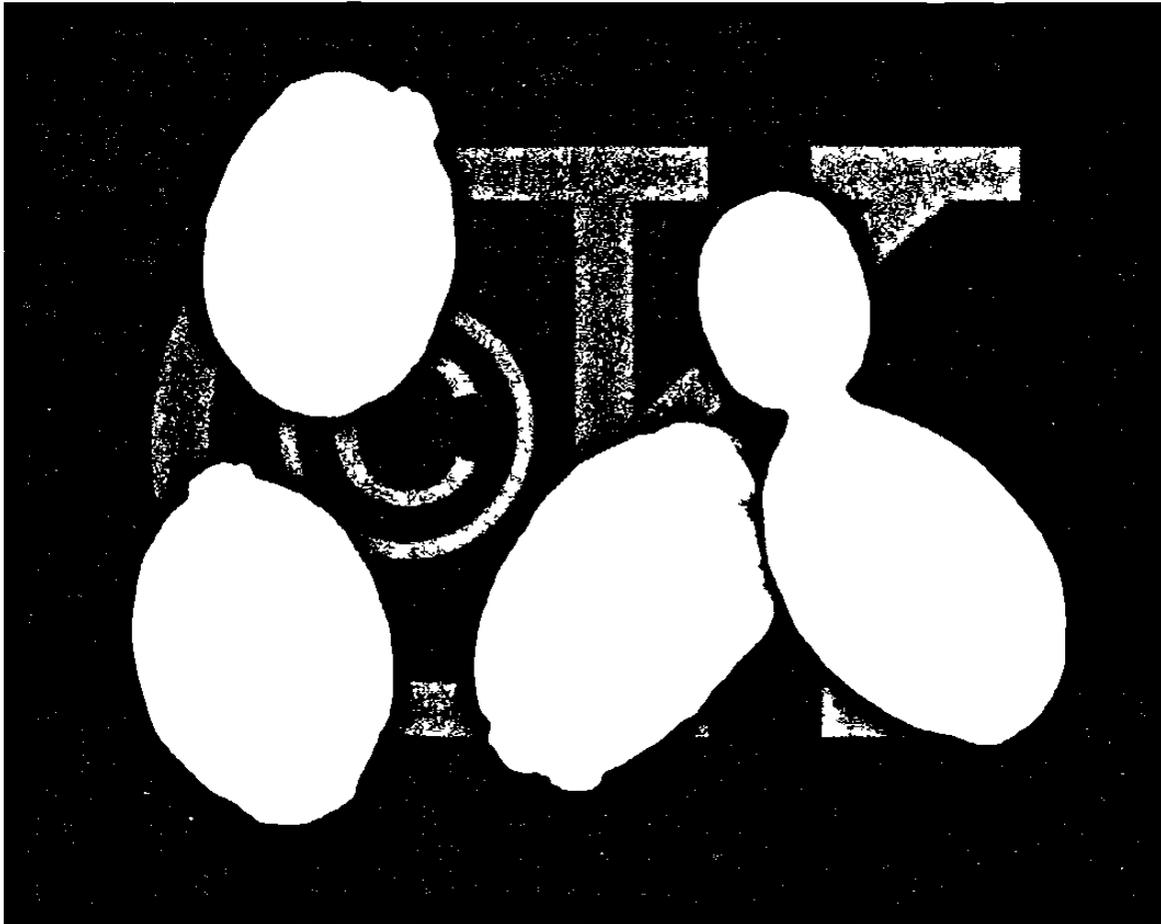


Figura 1.- Microfotografía de *Saccharomyces cerevisiae* en la que se puede observar el proceso de gemación como un claro indicador de su viabilidad.

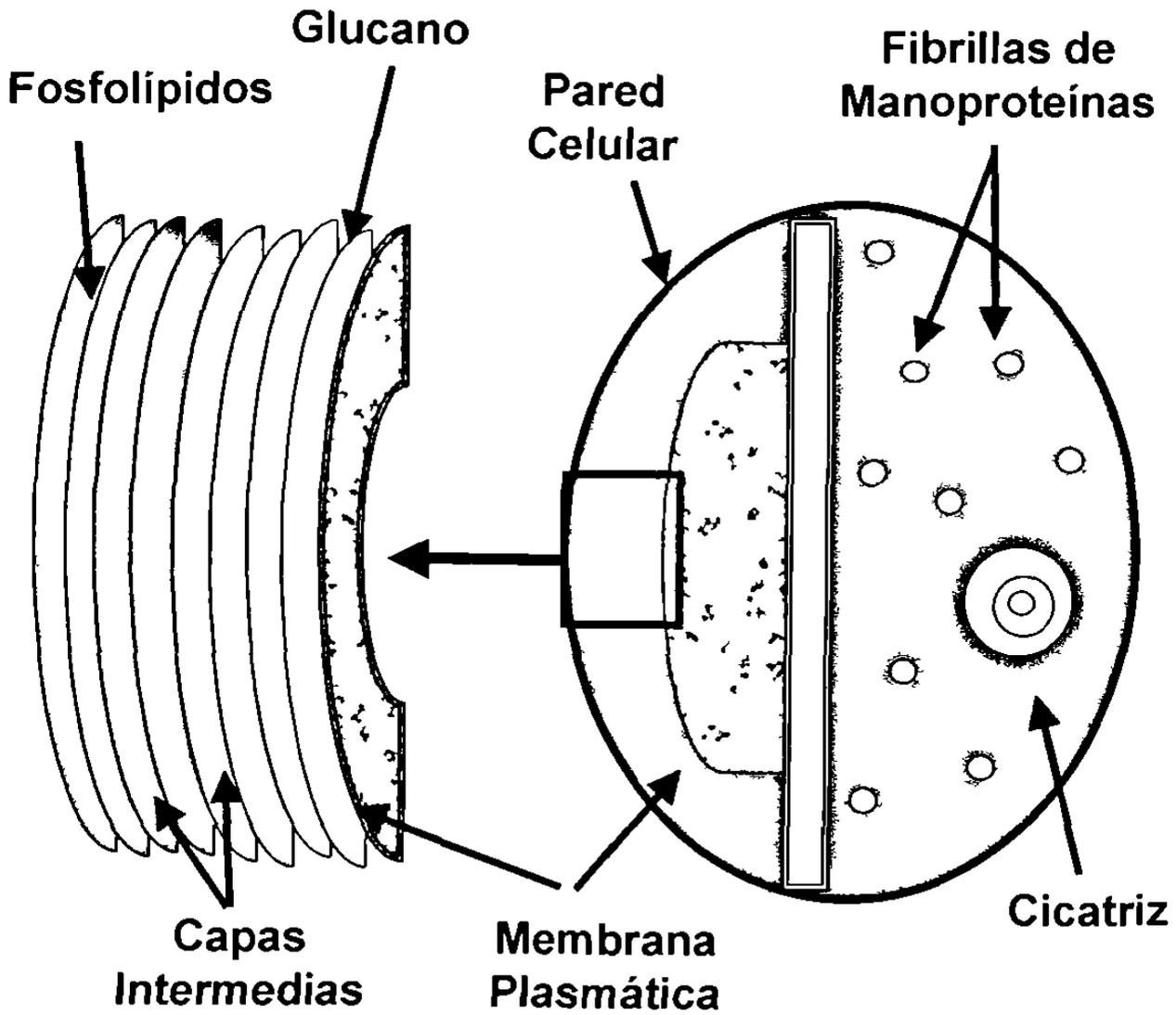


Figura 2.- Representación esquemática de la estructura de la pared y membrana celulares de una levadura.

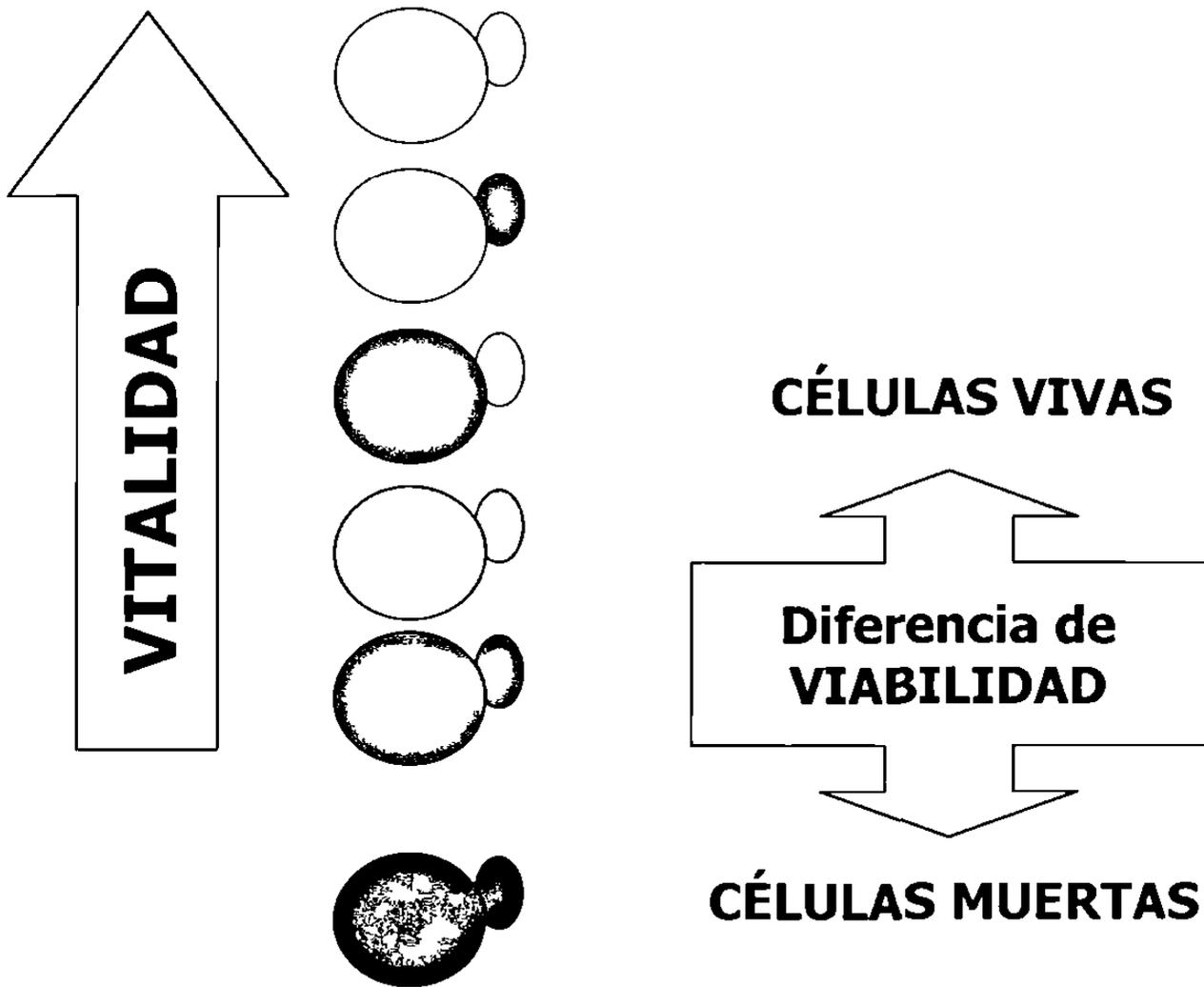
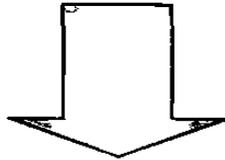
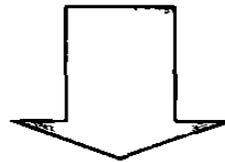


Figura 3.- Representación esquemática de las diferentes formas que pueden observarse al realizar una tinción para evaluar la viabilidad en una población de levaduras.

**Células de Color Azul**



**Enzimas  
Reductasas**



**AZUL DE METILENO  
(Forma Reducida)**

Figura 4.- Representación esquemática de la reacción en que se basa la evaluación de viabilidad mediante el uso del azul de metileno como indicador de viabilidad.

# MICROCULTIVO EN PORTAOBJETO

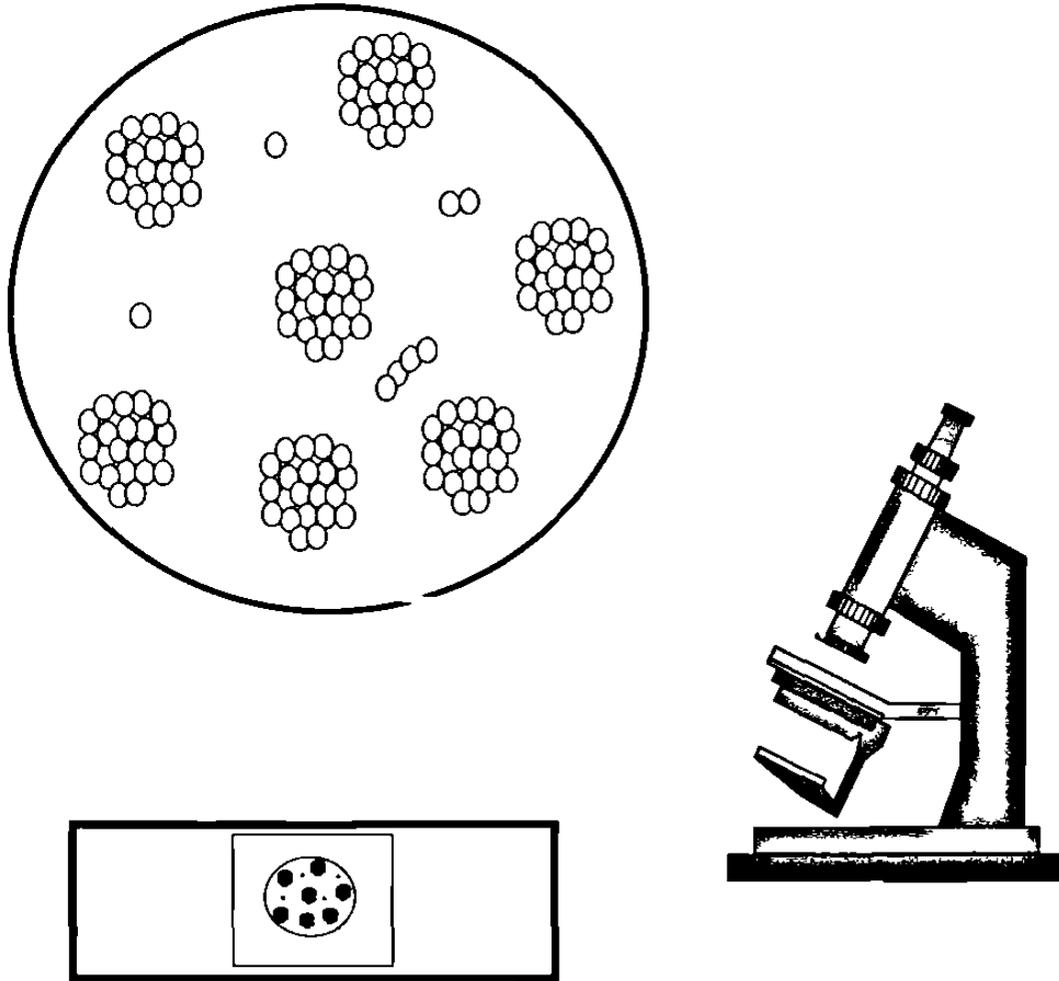
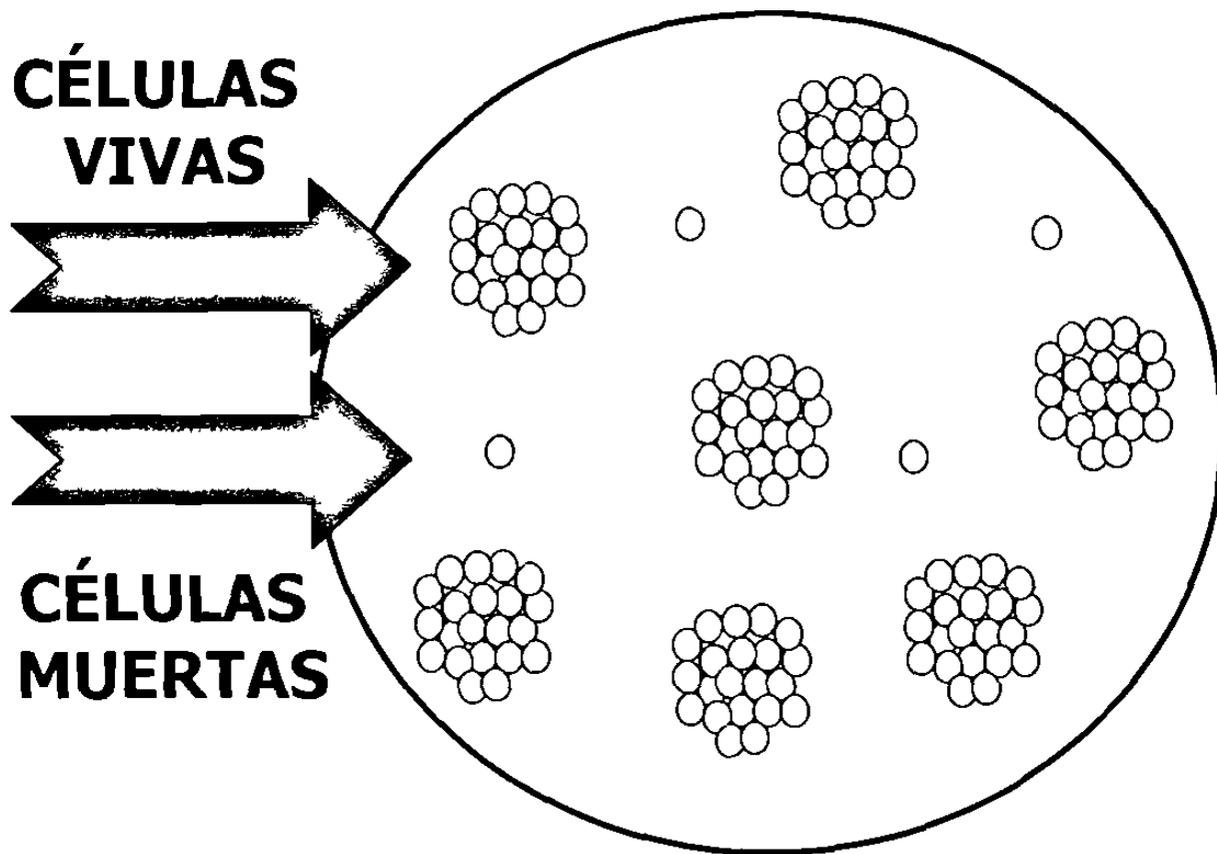
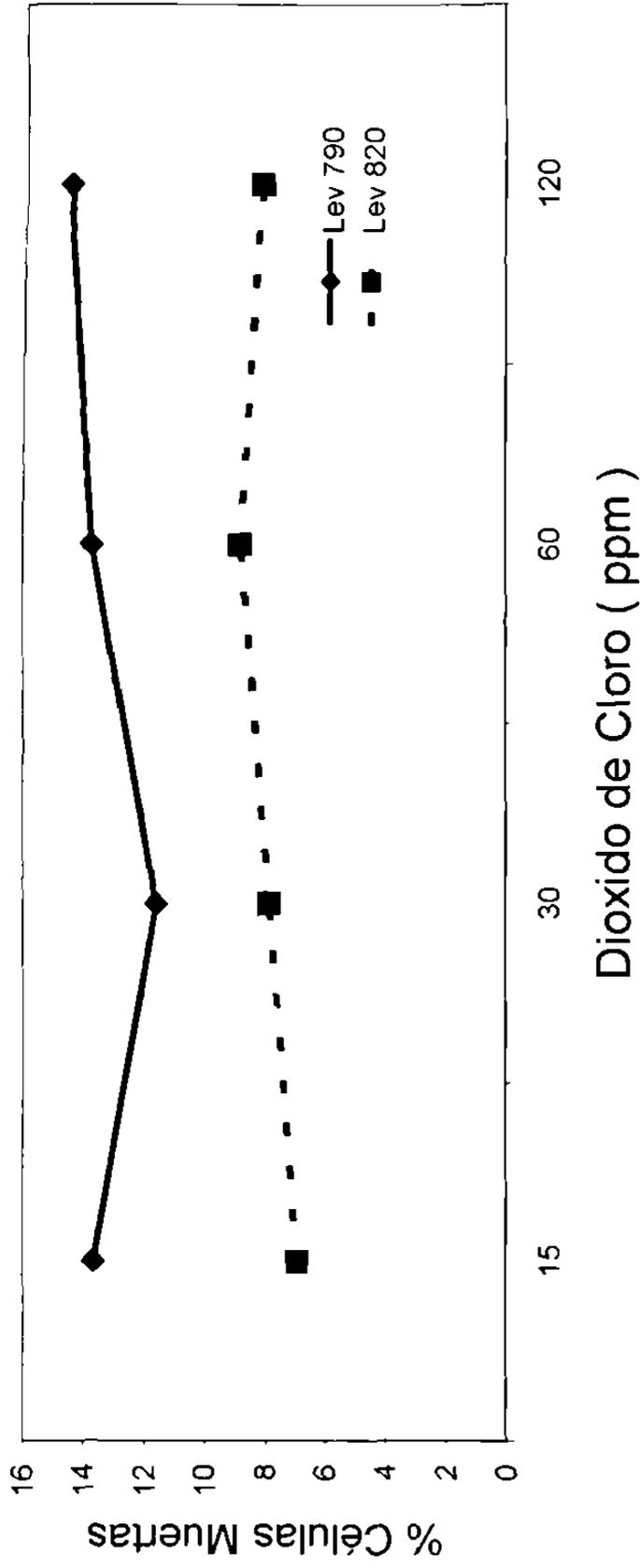


Figura 5.- Representación esquemática de la metodología para la determinación de la viabilidad por la técnica de microcultivo en portaobjeto.

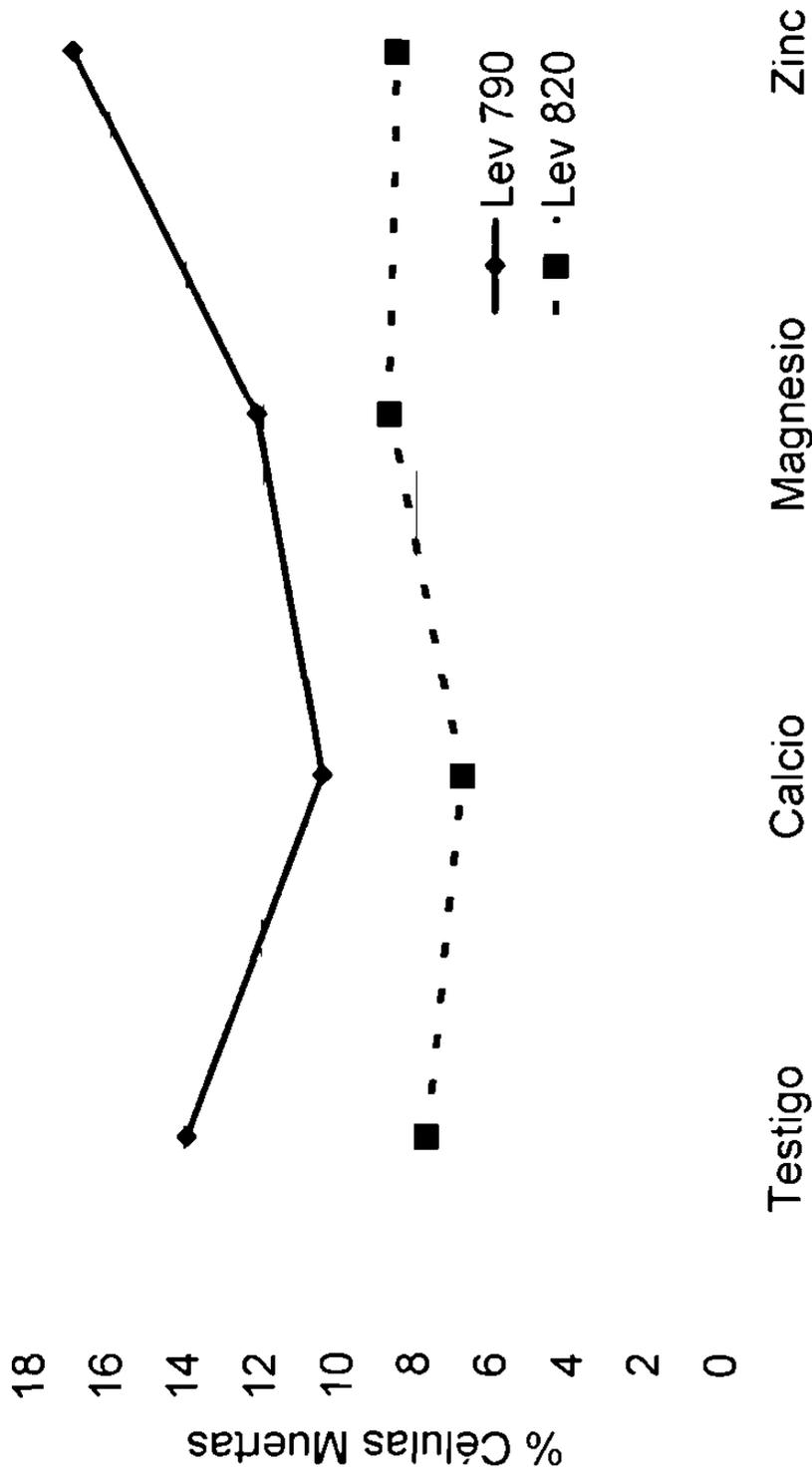


## **MICROCULTIVO**

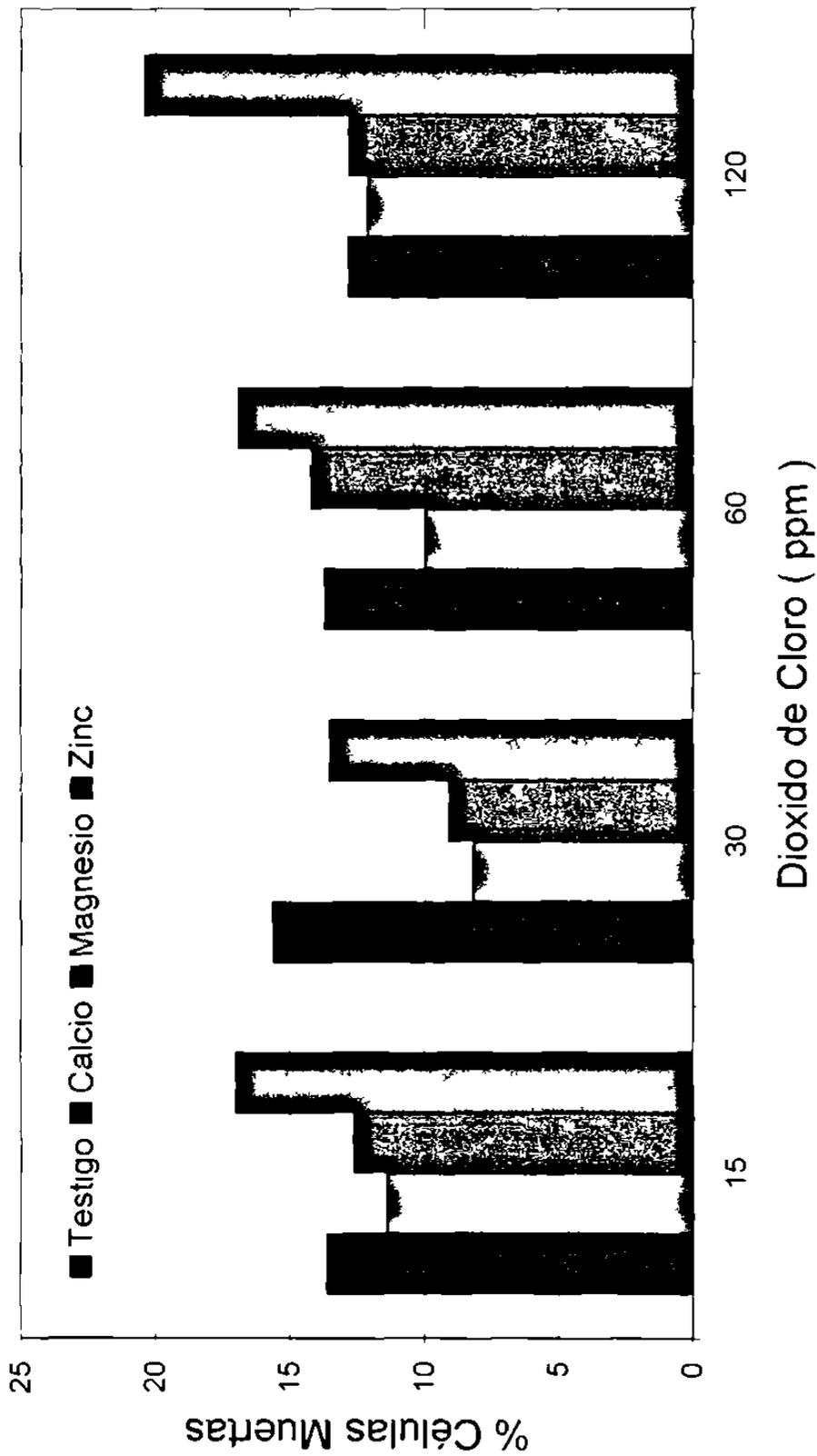
Figura 6.- Determinación de la viabilidad por la técnica de microcultivo en portaobjeto y observación microscópica.



**Figura 7.- Efecto de la concentración de Dióxido de Cloro sobre la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* variedades 790 y 820, expresado como % promedio de células muertas.**



**Figura 8.- Efecto de algunos iones metálicos divalentes, sobre la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* variedades 790 y 820, previamente sometidas a un tratamiento químico con Dióxido de Cloro, expresada como % de células muertas.**



**Figura 9.- Porcentaje de viabilidad observado para la levadura *Saccharomyces cerevisiae* variedad 790 sometida a lavados con Dióxido de Cloro y posteriormente cultivada en presencia de algunos iones metálicos divalentes.**

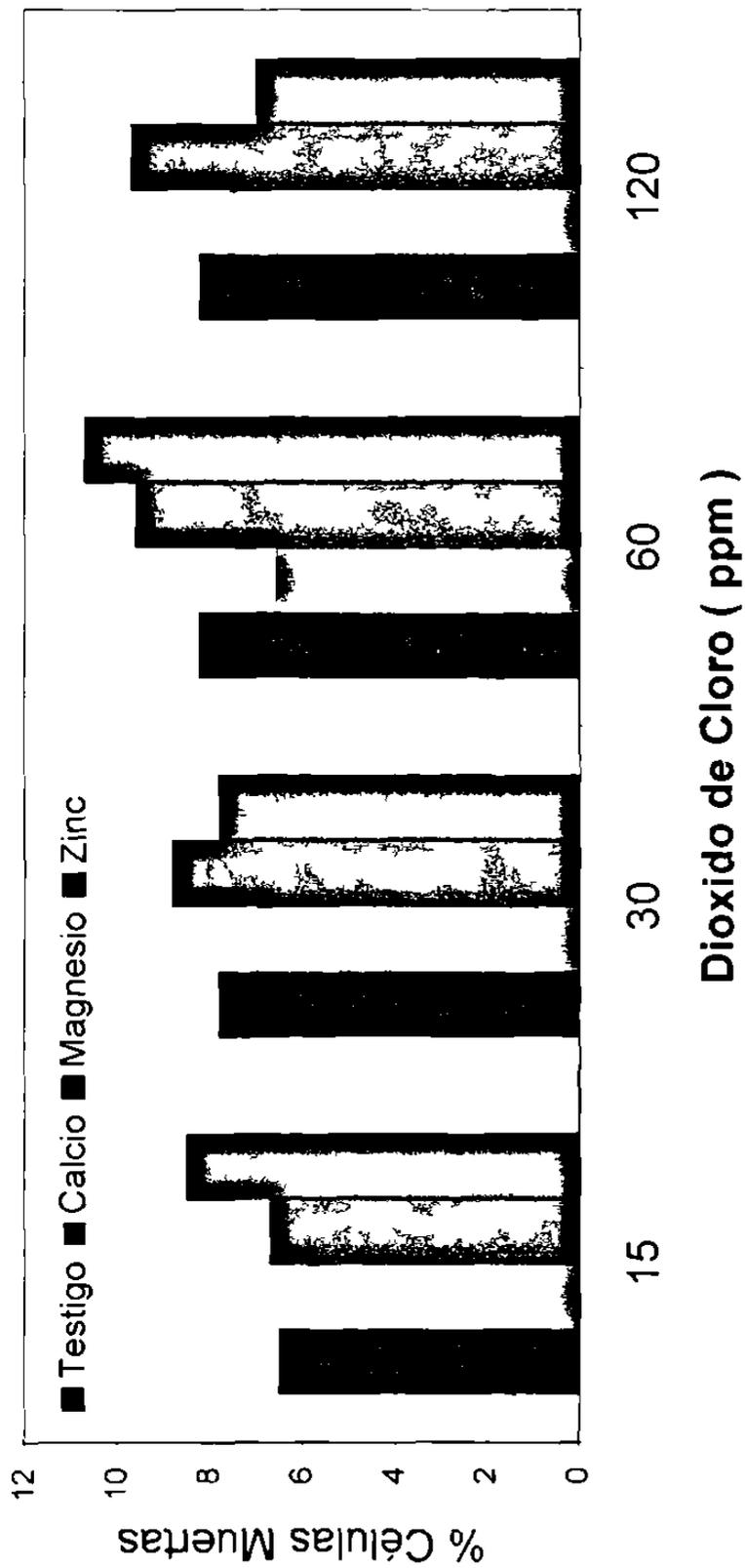
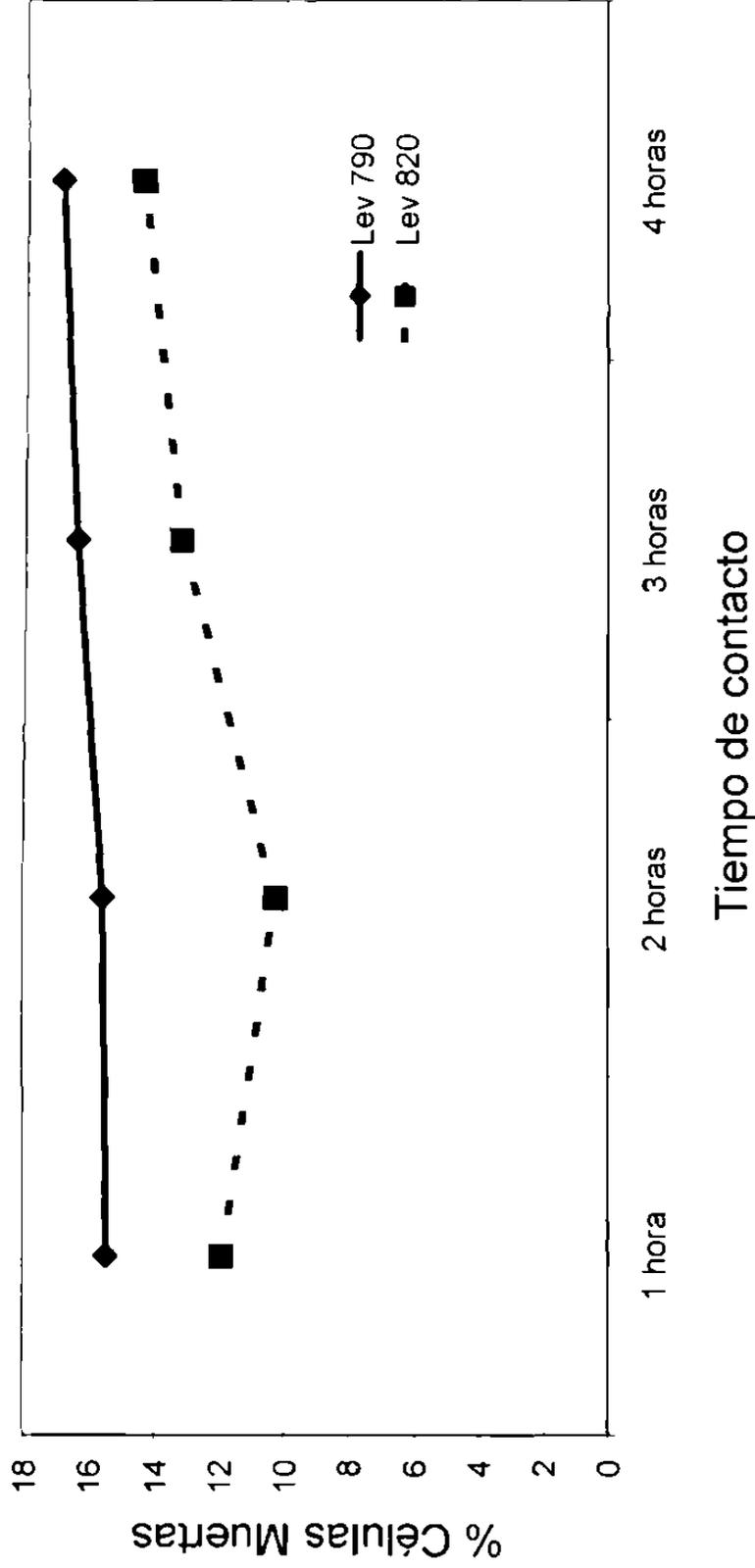
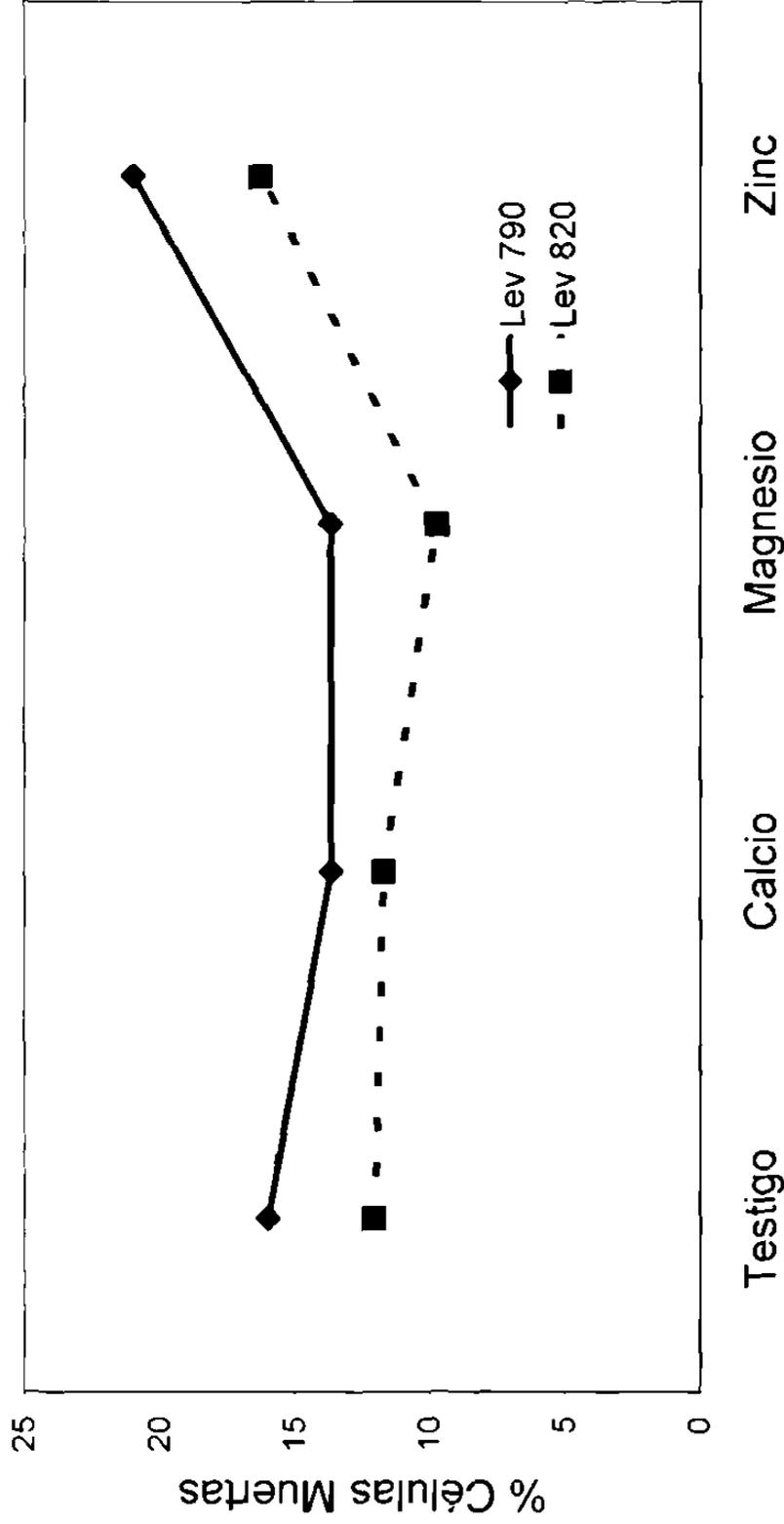


Figura 10.- Porcentaje de viabilidad observado para la levadura *Saccharomyces cerevisiae* variedad 820 sometida a lavados con Dióxido de Cloro y posteriormente cultivada en presencia de algunos iones metálicos divalentes.

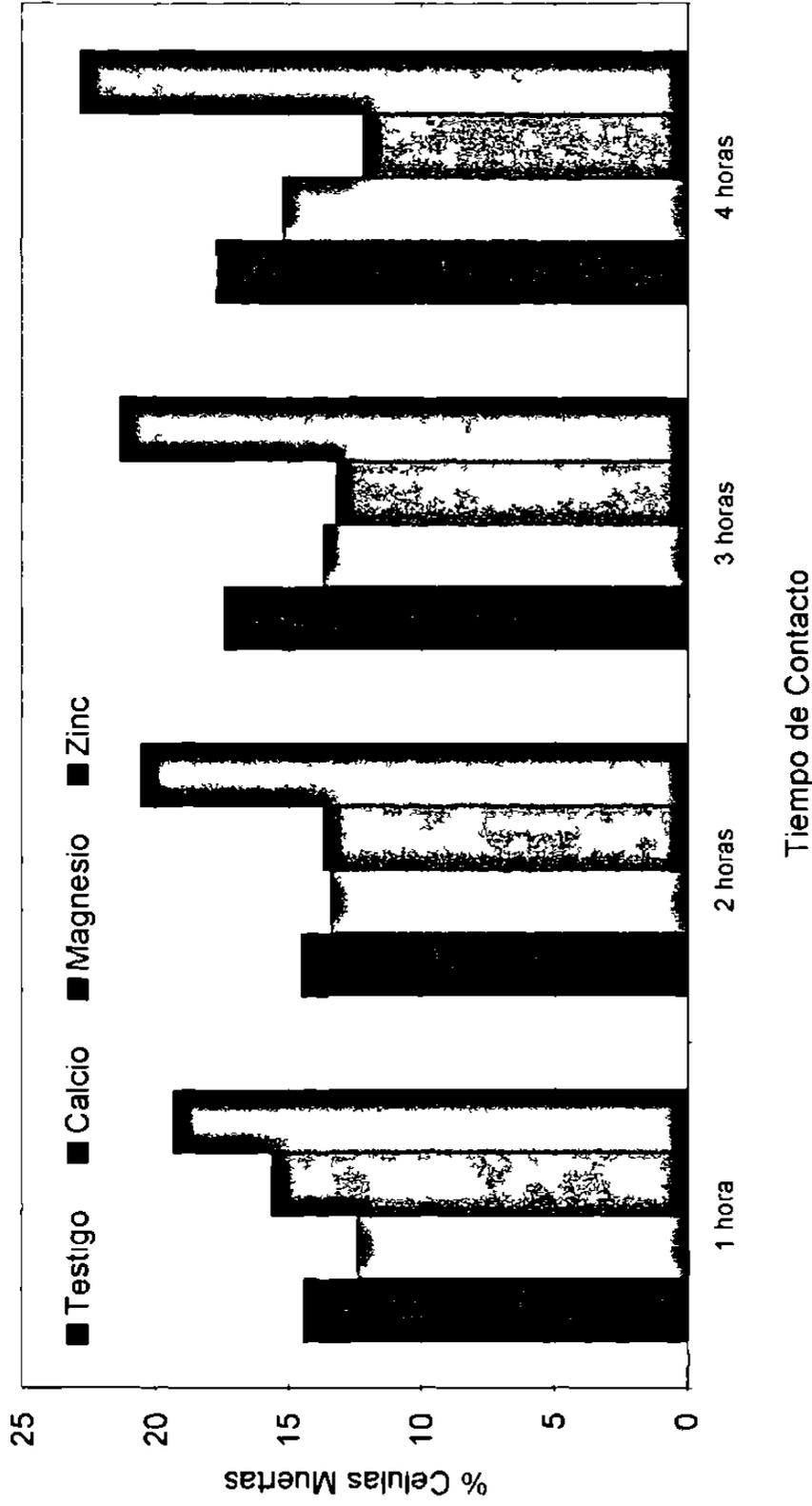
1312



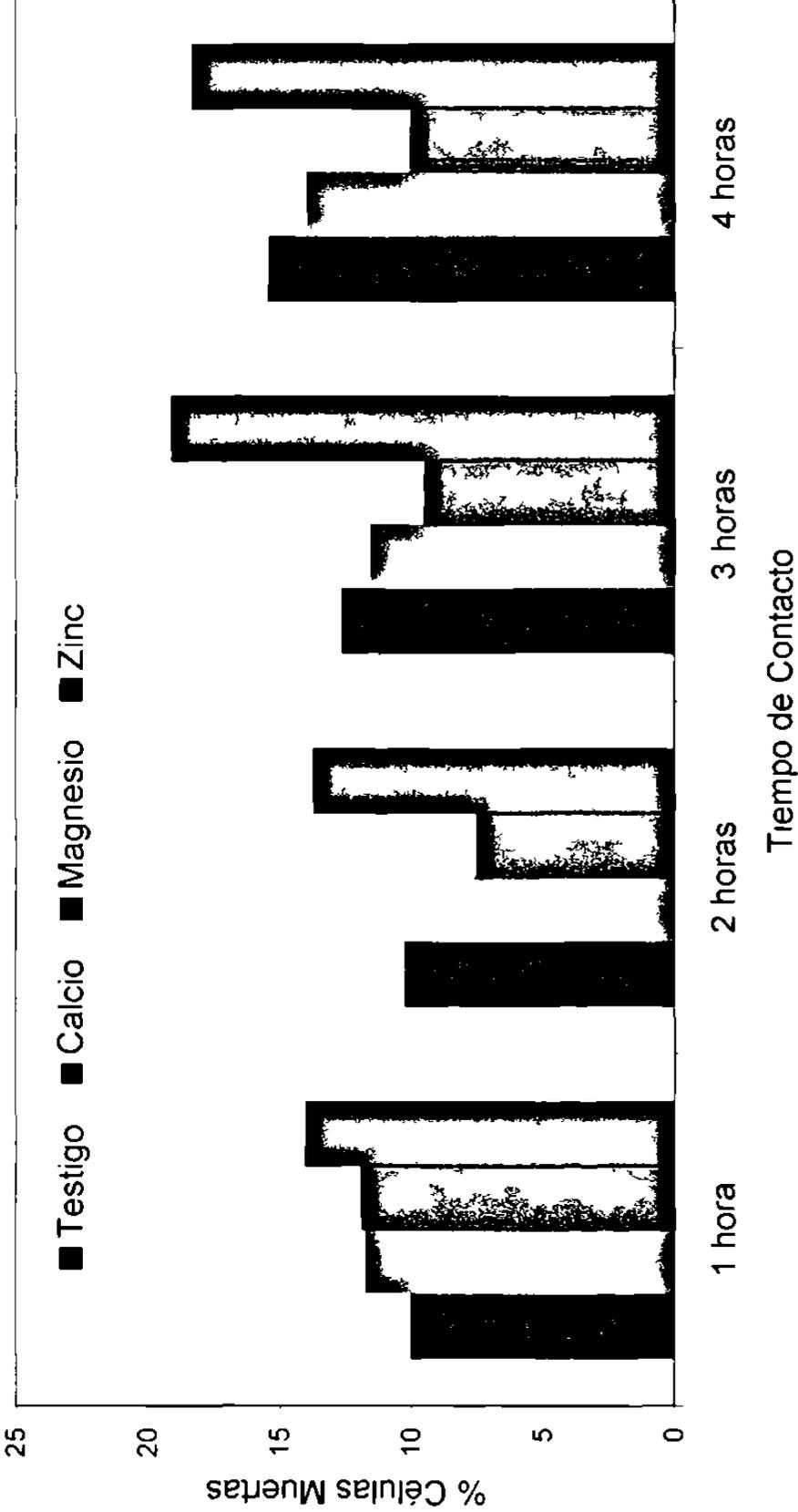
**Figura 11.- Efecto del tiempo de estrés químico a pH 2 sobre la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* variedades 790 y 820 expresado como % promedio de células muertas.**



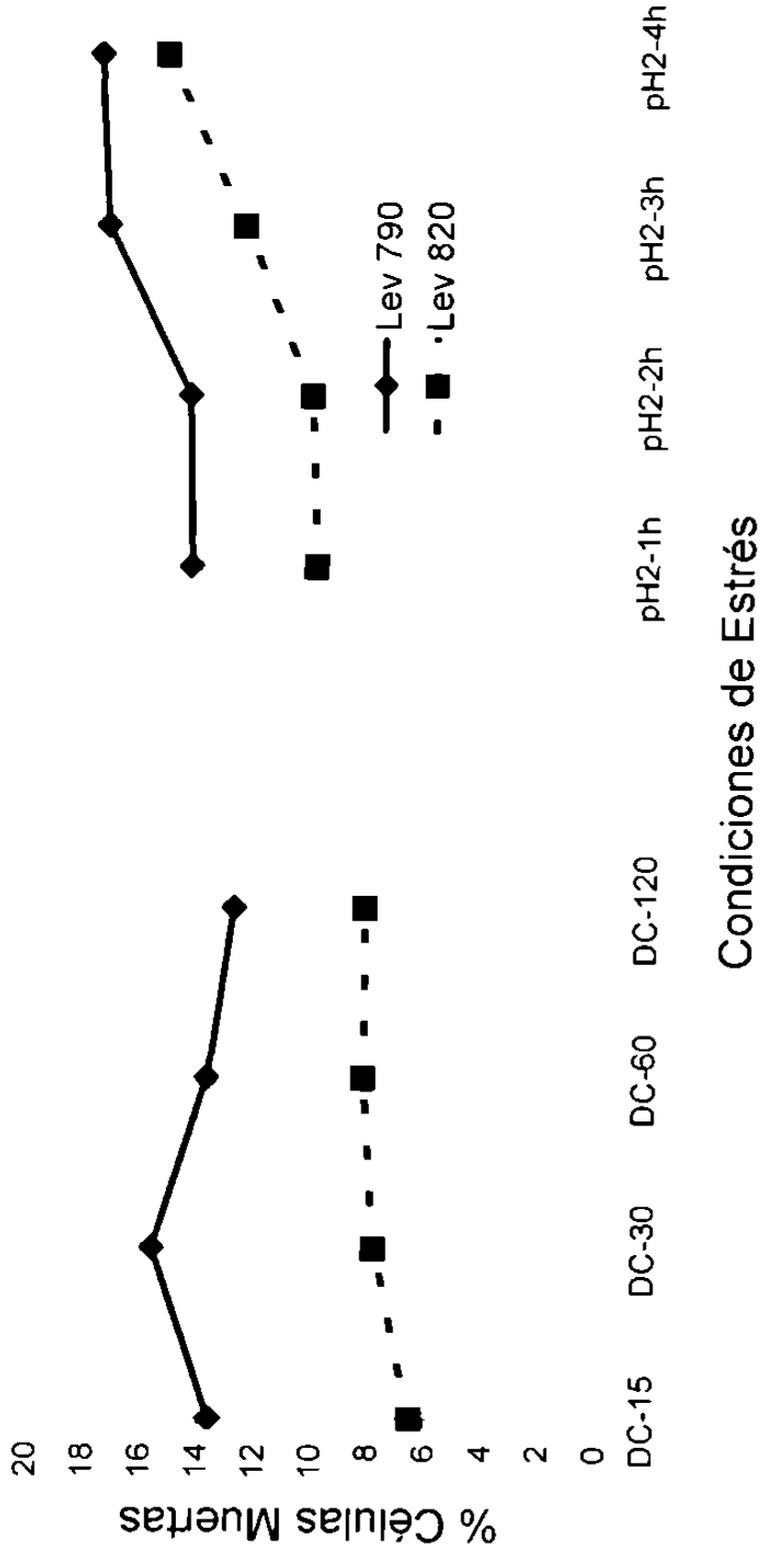
**Figura 12.- Efecto de algunos iones metálicos divalentes, sobre la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* variedades 790 y 820, previamente sometidas a un estrés químico a pH 2, expresada como % de células muertas.**



**Figura 13.- Porcentaje de viabilidad observado para la levadura *Saccharomyces cerevisiae* variedad 790 sometida a estrés químico a pH 2 con diferentes tiempos de contacto y posteriormente cultivada en presencia de algunos iones metálicos divalentes.**



**Figura 14.- Porcentaje de viabilidad observado para la levadura *Saccharomyces cerevisiae* variedad 820 sometida a estrés químico con diferentes tiempos de contacto y posteriormente cultivada en presencia de algunos iones metálicos divalentes**



**Figura 15.- Resultados gráficos comparativos del efecto de los tratamientos de estrés ensayados, sobre la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* variedades 790 y 820, expresada como % de células muertas ( DC = Dióxido de Cloro, pH2 = Estrés a pH ácido ).**

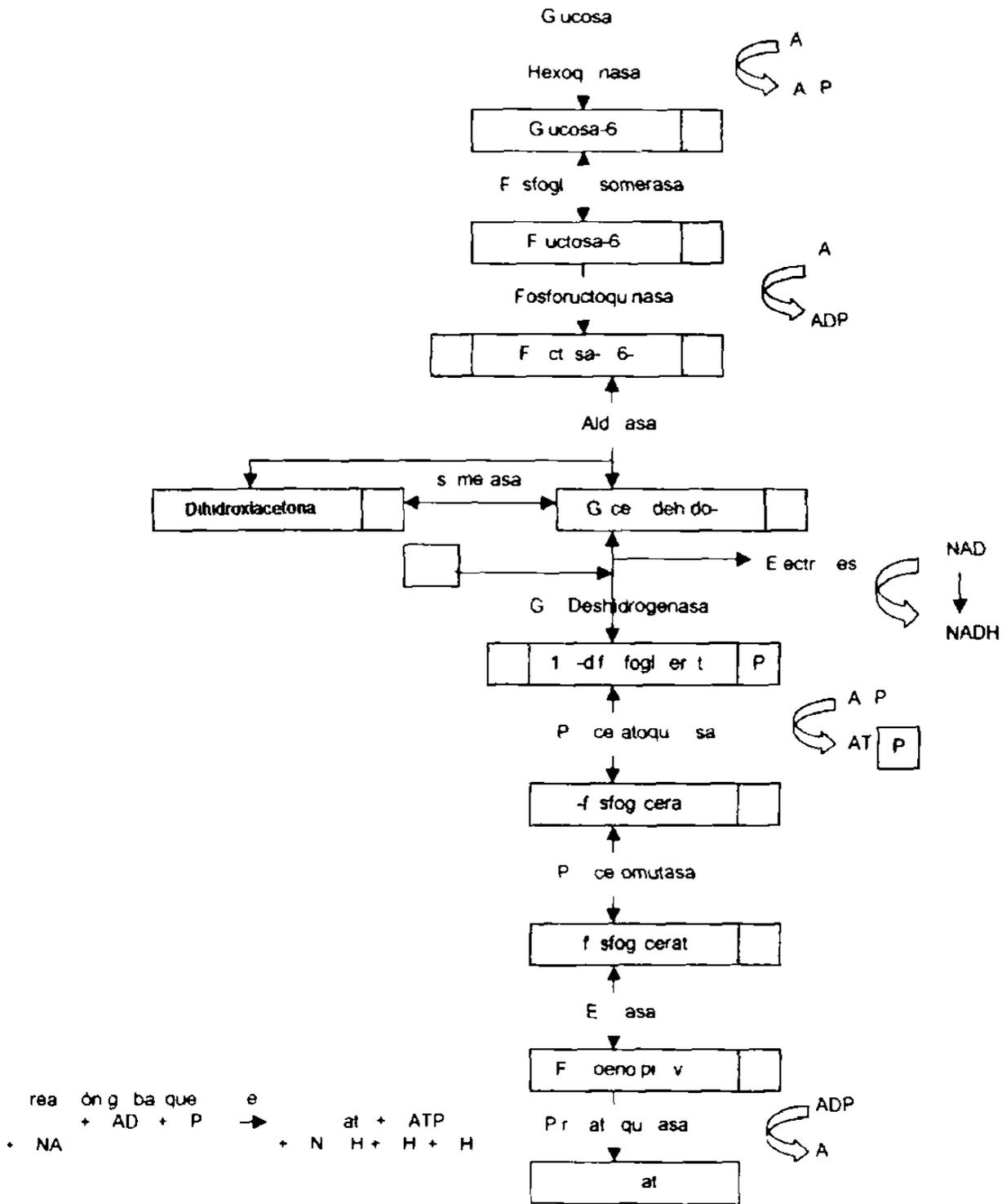


Figura 16.- Via de Embden-Meyerhof-Parnás.

