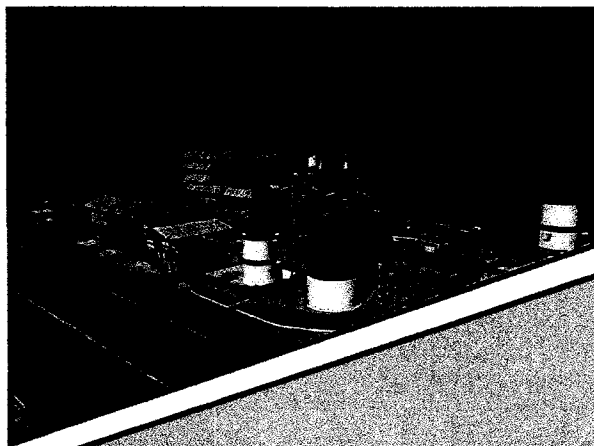
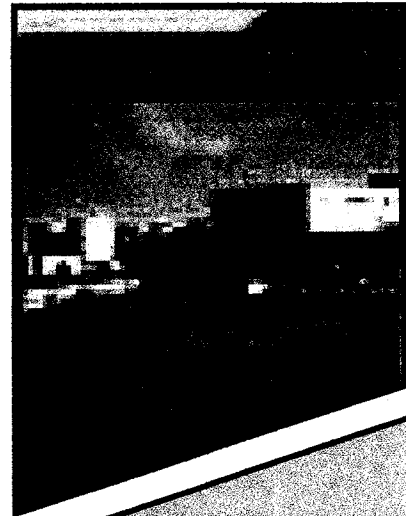
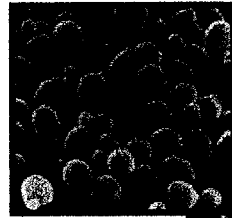


# Development of new technologies for the whole utilization of marginal and primary yeast as sources of food (YAF)

PGTF  
Project INTD4/KD4



Final Report



**PROJECT INT04/K04**

**DEVELOPMENT OF NEW TECHNOLOGIES AND PRODUCTS FOR THE WHOLE  
UTILIZATION OF MARGINAL AND PRIMARY YEASTS AS SOURCES OF FOOD  
(YAF)**

**FOREWORDS**

Project INT04/K04 started in June 14th 2004, just 366 days before the elaboration of present Final Report. During the whole year several activities have been carried out and different results obtained.

In a previous partial report documents dealing with Analytical techniques for yeast quality control, Industry diagnosis and a Questionnaire for yeast-producing industries were delivered and disclosed at UNDP-Havana web site.

Present document includes:

-Wrap-up Meeting Acta with a brief description of activities carried out in Mexico

-A lecture presented by Dr. Wagner one of the project partners at X CYTAL Congress (Argentinean Congress of Food Science and Technology) First International Symposium of New Technologies, Mar del Plata.

-A paper to be published in Food Science and Technology/LWT entitled "Cell wall proteins of *Kluyveromyces fragilis*. Surface and emulsifying properties" a collaboration work between UNLP and ICIDCA

-A poster send to biotechnology Congress in Merida, Yucatan entitled Emulsifying capacity of proteins extracted from yeast a result of a collaboration among researchers of ICIDCA (Cuba), University of Quilmes (Argentina) and UAM-I (Mexico) included in this document.

-A Monographic document in nine chapters entitled "Las levaduras. Realidad y potencialidades" (The Yeasts. Reality and Potentials)

Finally a brief report about future perspectives on this subject are included and a brief summary of a potential continuity project.

## UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAM



PEREZ-GUERRERO TRUST FUND FOR ECONOMIC AND  
TECHNICAL COOPERATION AMONG DEVELOPING  
COUNTRIES, MEMBERS OF THE GROUP OF 77

### PEREZ-GUERRERO TRUST FUND FOR ECONOMIC AND TECHNICAL COOPERATION AMONG DEVELOPING COUNTRIES, MEMBERS OF THE GROUP OF 77

#### DEVELOPMENT OF NEW TECHNOLOGIES AND PRODUCTS FOR THE WHOLE UTILIZATION OF MARGINAL AND PRIMARY YEASTS AS SOURCES OF FOOD. CONTINUATION (YAF) INTO4/K04.

#### WRAP-UP MEETING, MEXICO DF MARCH 9TH-10TH, 2005

The meeting began at 10:00 am at Division of Health Sciences of Autonomous University of Mexico, Iztapalapa Unit with the following attendance:

Dr. Oscar Monroy, Head of the Division

Eng. Gustavo Saura Laria, Project Director, ICIDCA

Dr. Isabel Guerrero Legarreta, Autonomous University of México

Dr. Jorge R. Wagner, National University of La Plata (UNLP), Argentina

Lic. Miguel A. Otero Rambla, ICIDCA

Eng. Julio A. Martínez-Valdivielso, ICIDCA

The first speaker was Eng. Gustavo Saura Laria, Project Director who presented Industry Diagnosis, a document with two study cases: Cuban fodder yeast system and distilleries.

Dr. Jorge Wagner representative of UNLP but nowadays working at University of Quilmes, Argentina one of the associated partners presented their experiences in the elaboration of protein enriched foods at pilot plant scale.

BSc Miguel A. Otero Rambla from ICIDCA presented Progress Reports dealing with Analytical Techniques for yeast quality studies. Another ICIDCA attendant to Wrap-up Meeting, Eng Julio Martínez gave his experiences regarding with the optimization of yeast growth at industrial scale with distillery slops-Microbial

Growth Enhancer mixtures and their impact in process economics. This later is included in present document. The former were delivered at partial reports previously.

Dr Isabel Guerrero Legarreta from UAM-I, Mexico presented their results about emulsifiers from yeast to be presented at Biotechnology Congress in Mexico entitled Emulsifying activity of protein extracted from yeast.

Eng. Gustavo Saura Laria  
Director INT04/K04 PGTF Project  
Havana, June 28th 2004

X CONGRESO CYTAL  
Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos  
1er Simposio Internacional de Nuevas tecnologías  
18 de mayo 2005 Mar del Plata



ASOCIACION ARGENTINA  
TECNOLOGOS ALIMENTARIOS

*Mesa Redonda: Características Estructurales y Funcionales de  
Proteínas Alimenticias*

# Propiedades térmicas y funcionales de proteínas de levadura

*Jorge R. Wagner  
Departamento de Ciencia y Tecnología  
Universidad Nacional de Quilmes*

## ❖ *Levaduras residuales*

*Saccharomyces cerevisiae*, residual de bebidas alcohólicas

## ❖ *Levaduras primarias*

### ***Candida utilis* (conocida como Torula)**

Asimilan azúcares de licores sulfíticos residuales (industria de papel, mieles de hidrólisis de la madera).

### ***Kluyveromyces fragilis* y *Kluyveromyces lactis***

Capacidad de asimilar lactosa. Tratamiento de lactosuero.

Más de 50% de proteínas ricas en L-lisina.

### ***Saccharomyces cerevisiae***

Levadura panadera. Elaboración de bebidas alcohólicas. Puede cultivarse para alcanzar altos % proteínas y vitaminas complejo B.

## *Proteína de levadura para consumo humano*

### **Proteínas unicelulares (Single Cell Proteins o SCP)**

#### **YEAST SCP**

##### *Ventajas*

- ✓ Alto contenido proteico
- ✓ Buen balance aminoacídico

##### *Inconvenientes*

- ▶ Contenido de ácidos nucleicos
- ▶ Baja digestibilidad de pared celular
- ▶ Limitadas propiedades funcionales



## *Ácidos nucleicos en levadura*

**5 a 13 % de ácidos nucleicos**

**Básicamente RNA ribosomal (80% de AN total)**

**Contenido de RNA aumenta con la tasa de crecimiento**

**Alto consumo de ácidos nucleicos en la dieta (>2g/día)**

**→ ácido úrico → gota, artritis**

*Máximo: 15 g yeast SCP / día*

## Composición química de biomasa de levadura

Componente	<i>S. cerevisiae</i>	<i>K. fragilis</i>
Humedad, %	72.28 ± 1.5	79.80 ± 1.2
Proteína, % bs	41.3 ± 1.5	50.76 ± 1.8
N no proteico, % bs	1.4 ± 0.11	1.59 ± 0.07
RNA, % bs	6.03 ± 0.77	7.54 ± 0.61
Carbohidratos Totales, % bs	40.28 ± 1.02	31.21 ± 1.65
Cenizas % bs	6.22 ± 0.69	5.98 ± 0.43

## Composición aminoacídica de proteínas de levaduras

Aminoácido	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Patrón FAO 1985
Arginina	4,9	5,0	-
Histidina	2,5	4,0	-
Isoleucina	5,5	5,5	4,2
Leucina	4,9	7,9	4,8
Lisina	8,8	8,2	4,2
Metionina	1,5	2,5	2,2
Fenilalanina	3,9	4,5	2,8
Treonina	5,5	4,8	2,8
Triptofano	1,5	1,2	1,4
Valina	6,6	5,5	4,2

*Kluyveromyces fragilis*

AA limitante Metionina IQ = 68%

*Saccharomyces cerevisiae*

AA limitante Triptofano IQ = 86%

# *Estructura celular de levadura*

**Pared celular**

**Periplasma**

**Membrana plasmática**

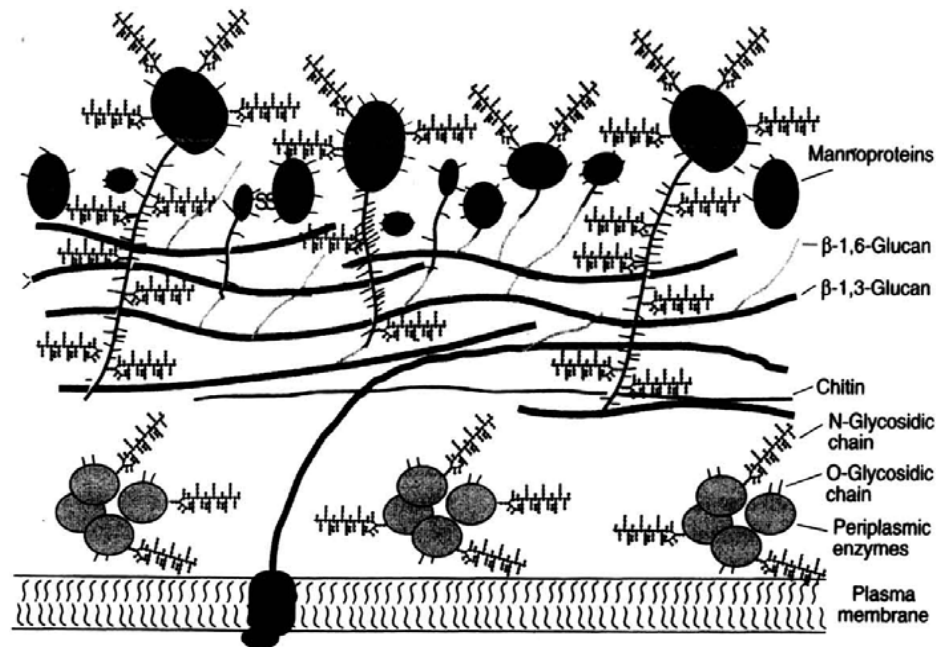
**Citoplasma**

**Enzimas**

**Organelas**

**RNA-ribosomas**

**DNA-Núcleo**



# Adecuación de las proteínas de levadura para consumo humano masivo

---

- *Incremento de la digestibilidad proteica  
(ruptura de pared celular)*
- *Disminución del contenido de ácidos nucleicos*
- *Concentración de proteínas*
- *Mejoramiento de la funcionalidad*

## *Métodos de reducción de RNA*

- ✓ **Reducción de la tasa de crecimiento de la levadura**
- ✓ **Tratamiento alcalino  $\text{pH} > 9$**   
**Hidrólisis de enlaces fosfodiéster de AN dando compuestos de menor PM.**
- ✓ **Métodos enzimáticos AUTOLISIS**  
**Activación de nucleasas intracelulares,  $45 - 55^\circ\text{C}$**

# Aislamiento de proteínas de biomasa de levadura

## *Primer paso: Desintegración celular*

### 1) Métodos Mecánicos

*Stress en líquido:* Ultrasonido  
Homogeneización a alta Presión  
Agitación

*Stress en sólido:* Molinado a bolas  
Alta presión

### 2) Métodos No Mecánicos

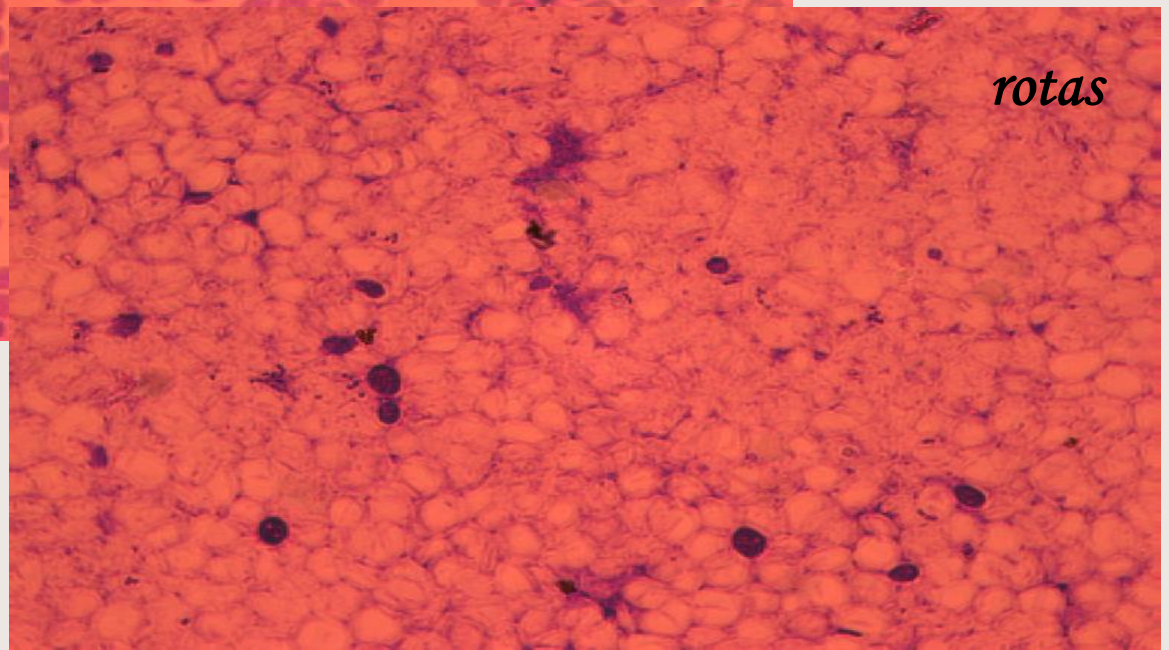
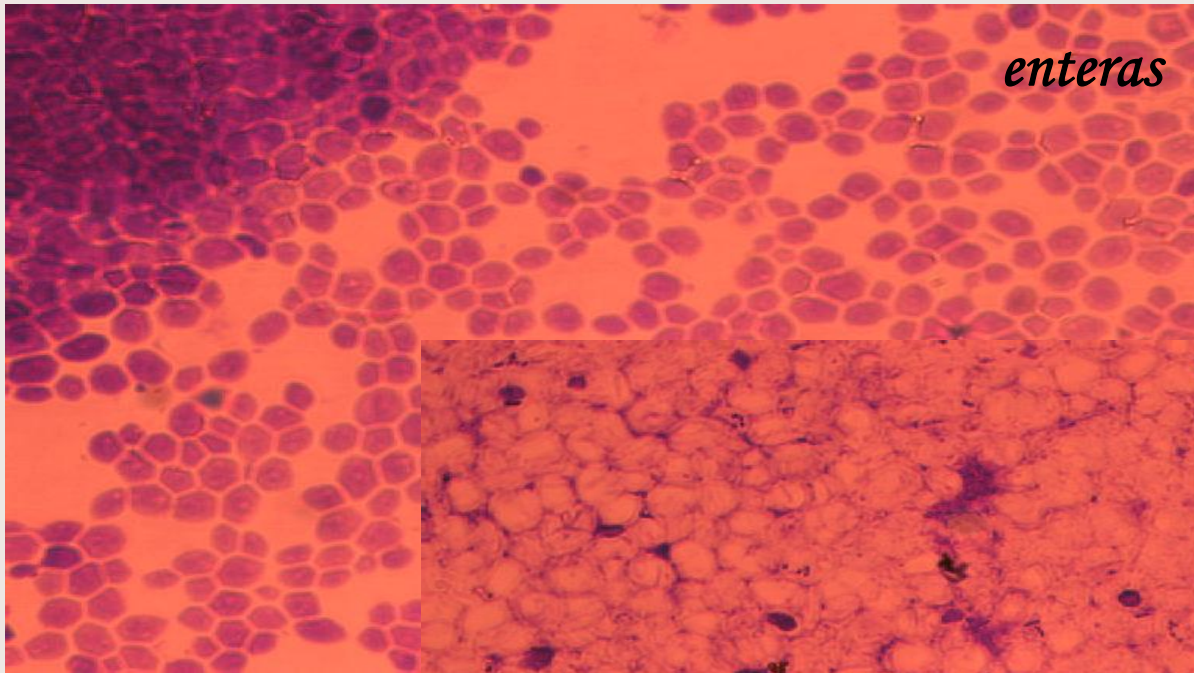
*Lisis física:* desecación, congelación-descongelación, choque osmótico, descompresión, esterilización

*Lisis química:* tolueno, tensioactivos, alcalis

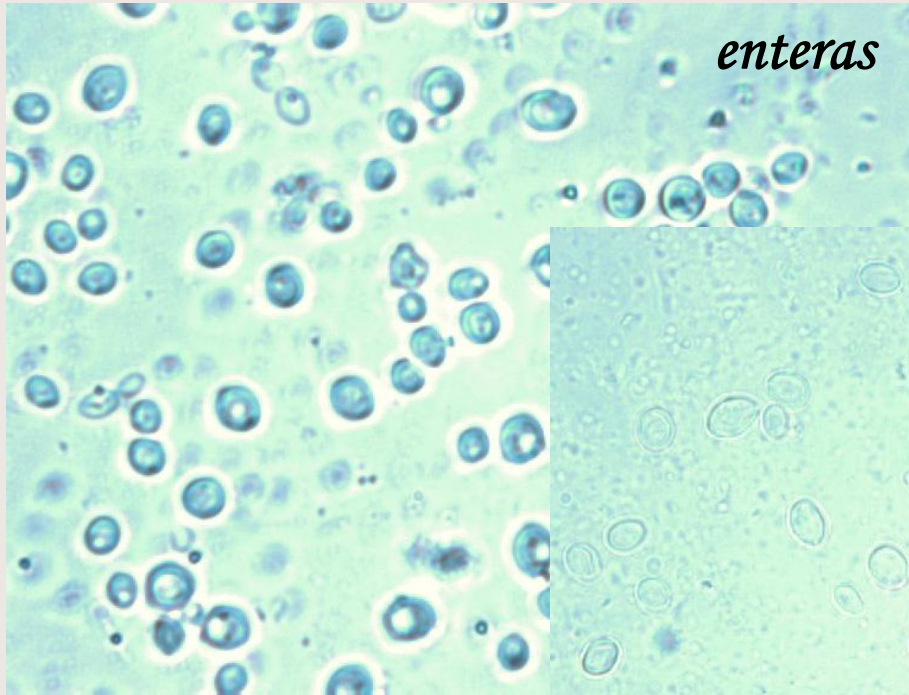
*Lisis enzimática:* lisozima, autólisis controlada



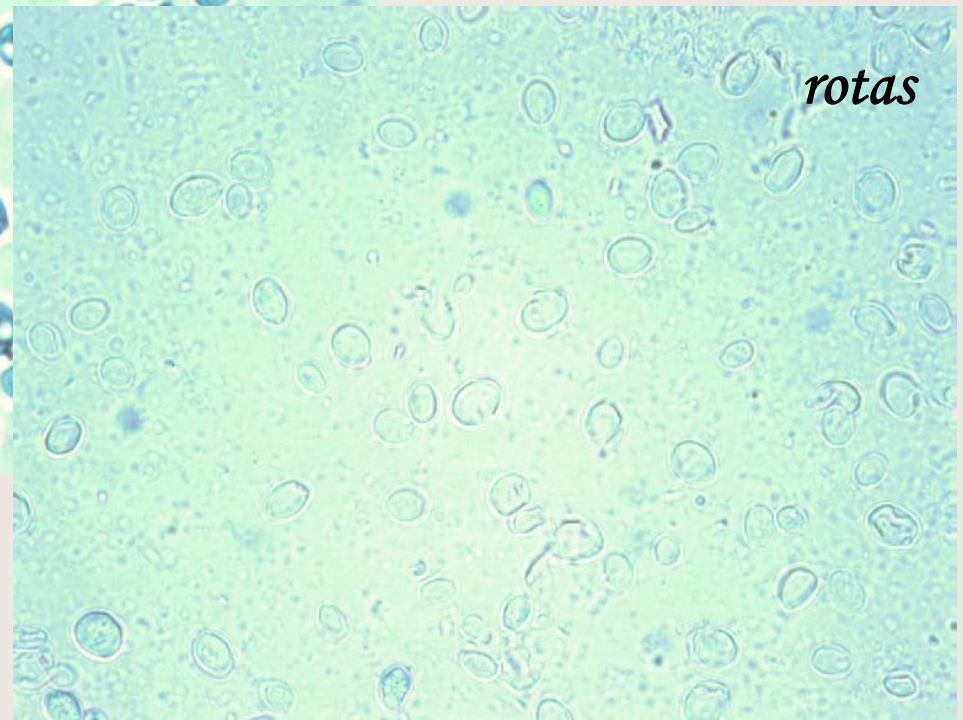
## *Micrografía de Saccharomyces cerevisiae*







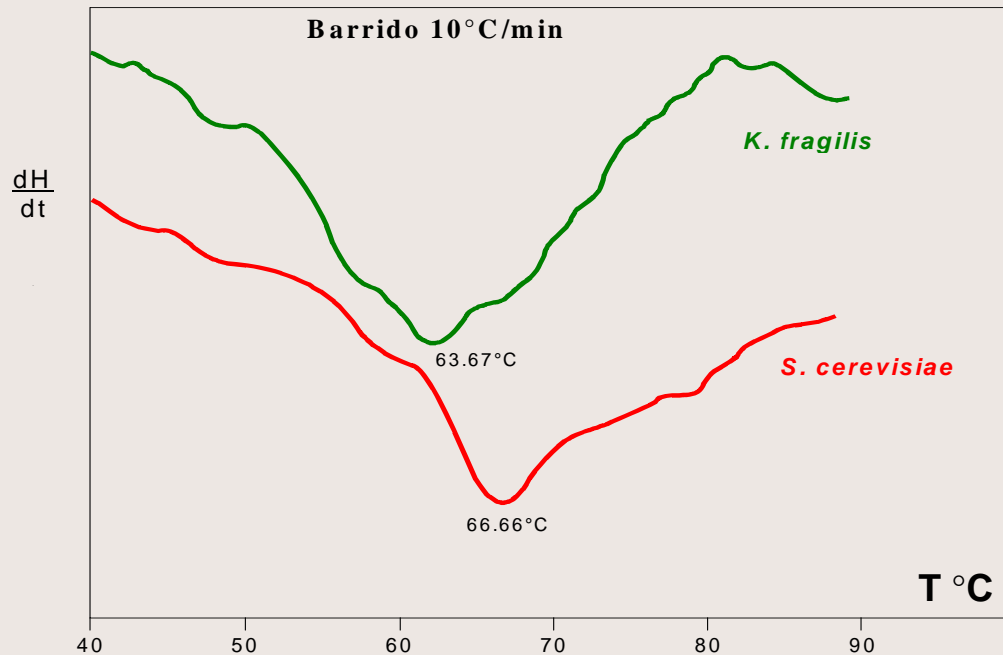
*enteras*



*rotas*

# Propiedades térmicas de proteínas de levadura

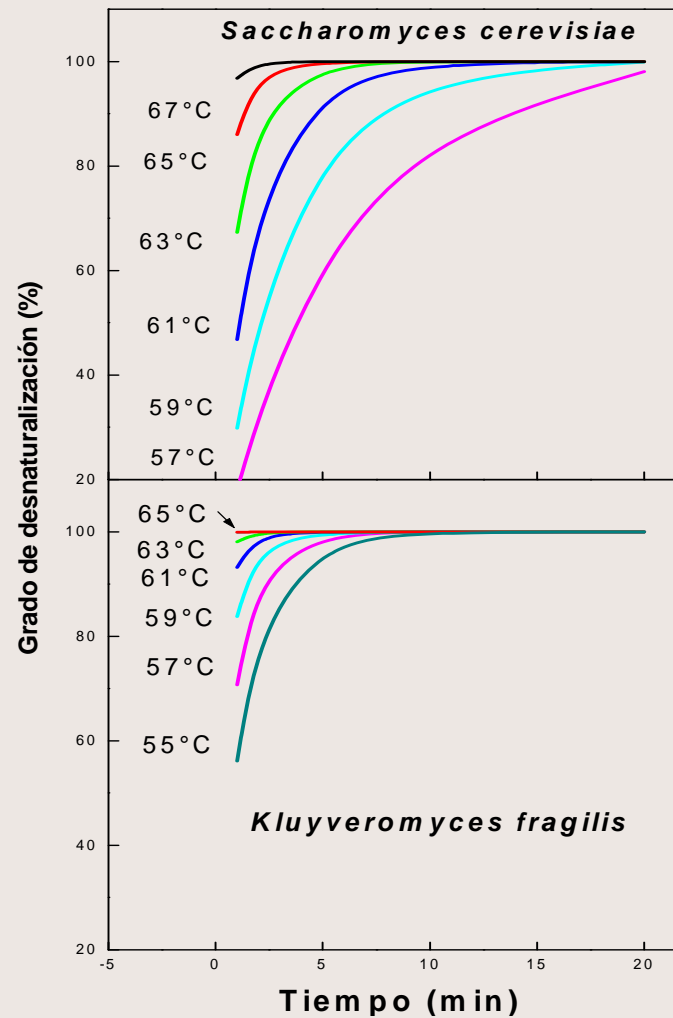
## Calorimetría diferencial de barrido (DSC)



Termogramas  
Levaduras enteras  
30 % en agua

Levadura	$T_p$ , °C (a $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ )	$E_a$ Kcal/mol	$Z$ , $\text{min}^{-1}$
<i>S. cerevisiae</i>	66.65 ± 0.98	63.80 ± 1.25	3.23 x 10 <sup>41</sup>
<i>K. fragilis</i>	63.21 ± 0.86	42.92 ± 1.17	3.07 x 10 <sup>28</sup>

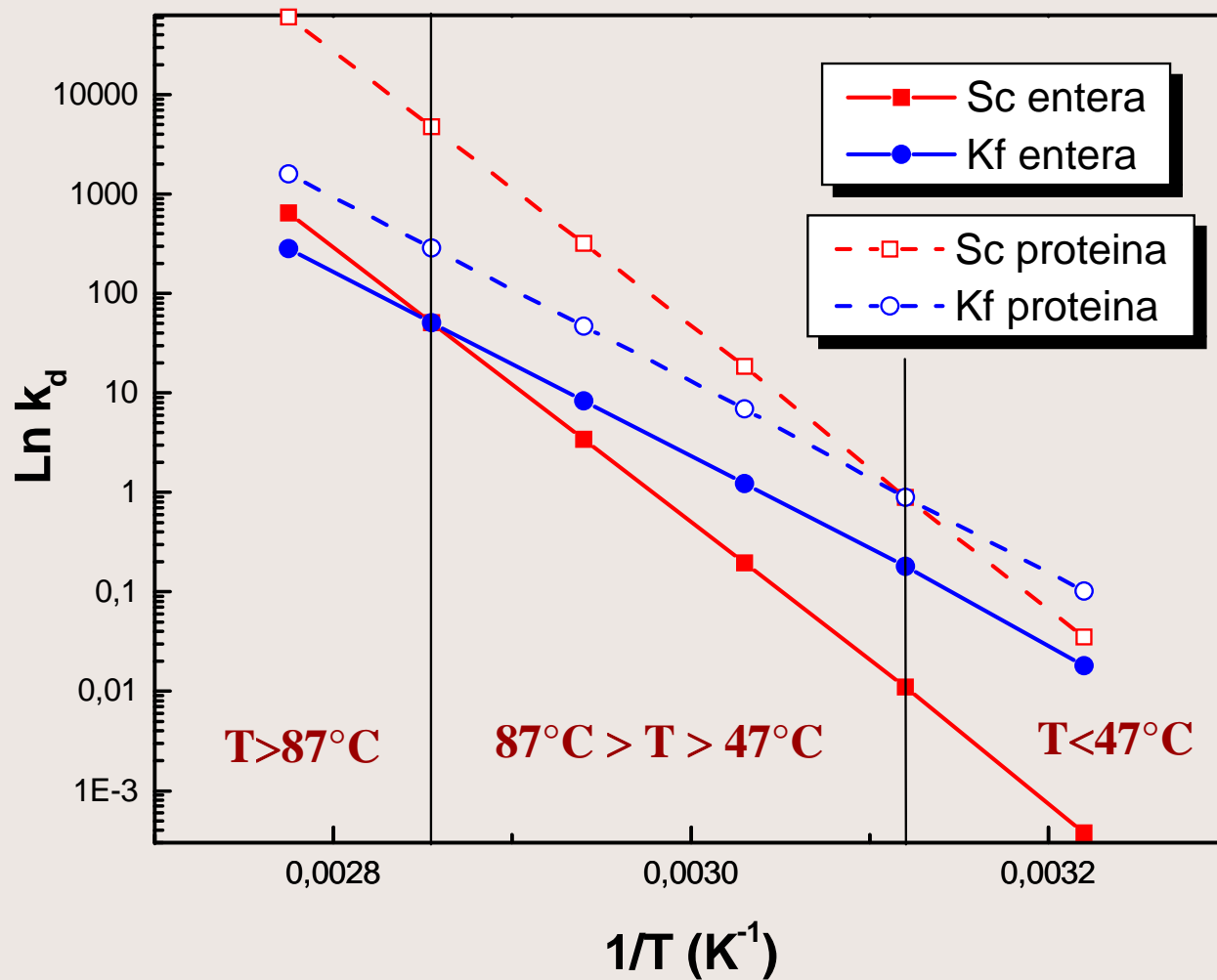
# Grado de desnaturalización vs temperatura



# *Estabilidad térmica*

## *Efecto de integridad celular*

### *Efecto del tipo de levadura*



## *Esquema básico de aislamiento de proteínas de levadura*

**Suspensión acuosa Levaduras**

↓  
**Ajuste a pH**

↓  
**Homogeneización**

↓  
**Centrifugación**

→ **Insoluble (pared celular)**

↓  
**Extracto de levadura**

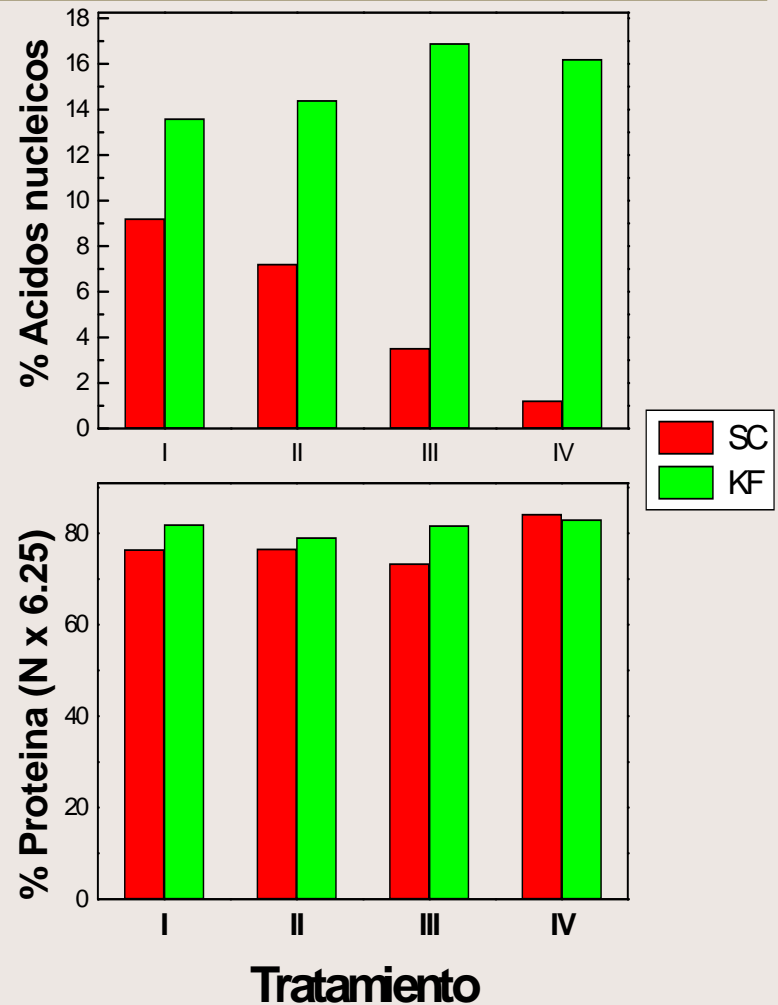


# Saccharomyces cerevisiae (SC) y Kluyveromyces fragilis (KF) Extracto de levadura

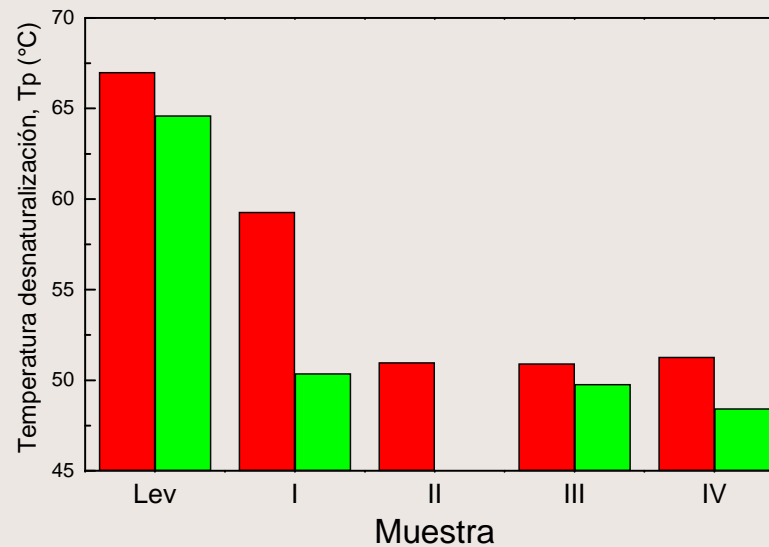
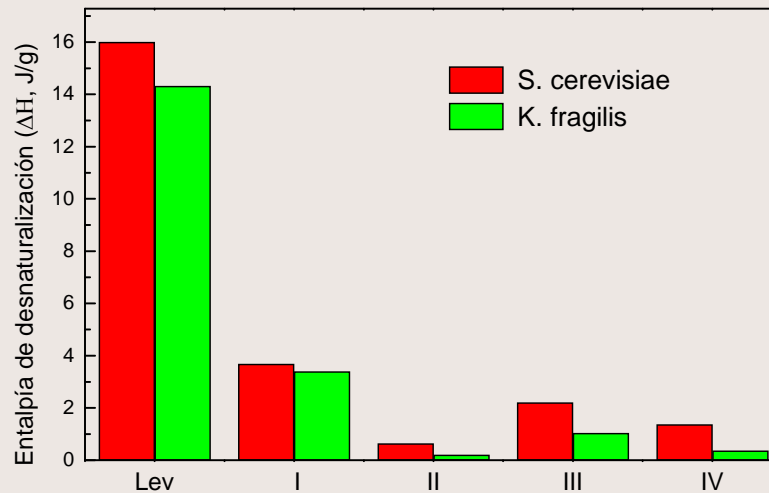
## Tratamientos

muestra	Incubación	Precipitación
I	NO	pH 4,5 T amb
II	50°C, 1 h, EDTA	pH 4,5 T amb
III	50°C, 1h	pH 4,5 T amb
IV	50°C, 1h	pH 4,5 90°C 15 min

## Composición



## Tratamientos vs propiedades térmicas



**Solubilidad 20-37%**  
**WHC: 3.6-6.9 mL/g**  
**WIC: 1.6-3.9 mL/g**



## *Esquema básico de aislamiento de proteínas de levadura*

**Suspensión acuosa Levaduras**

↓  
**Ajuste a pH**

↓  
**Homogeneización**

↓  
**Centrifugación**

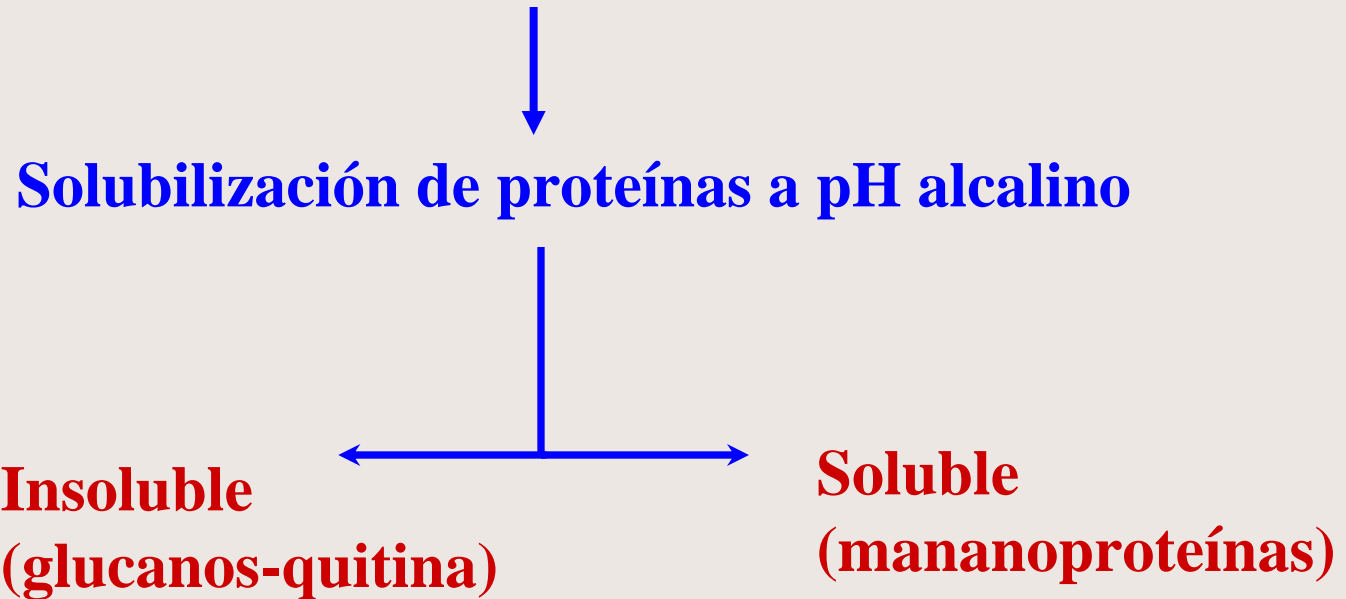
→ **Insoluble (pared celular)**

↓  
**Extracto de levadura**





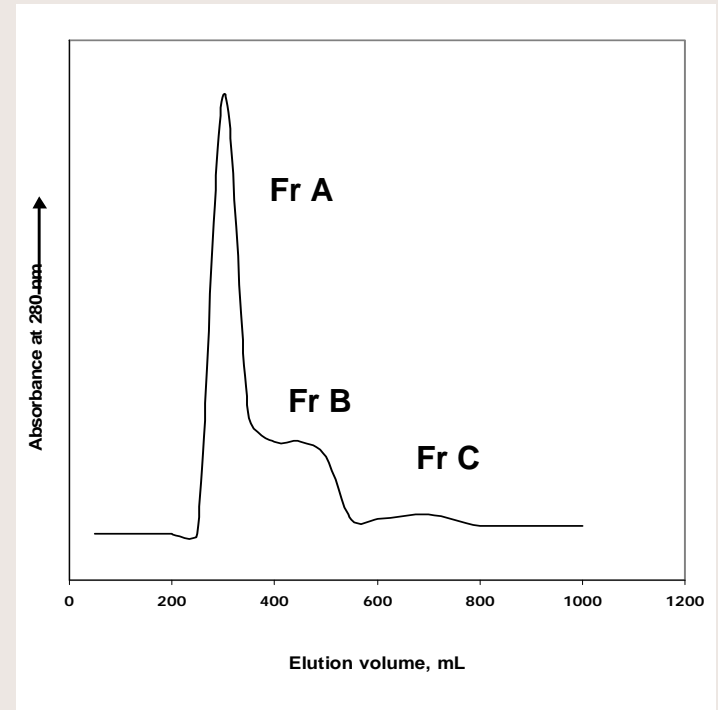
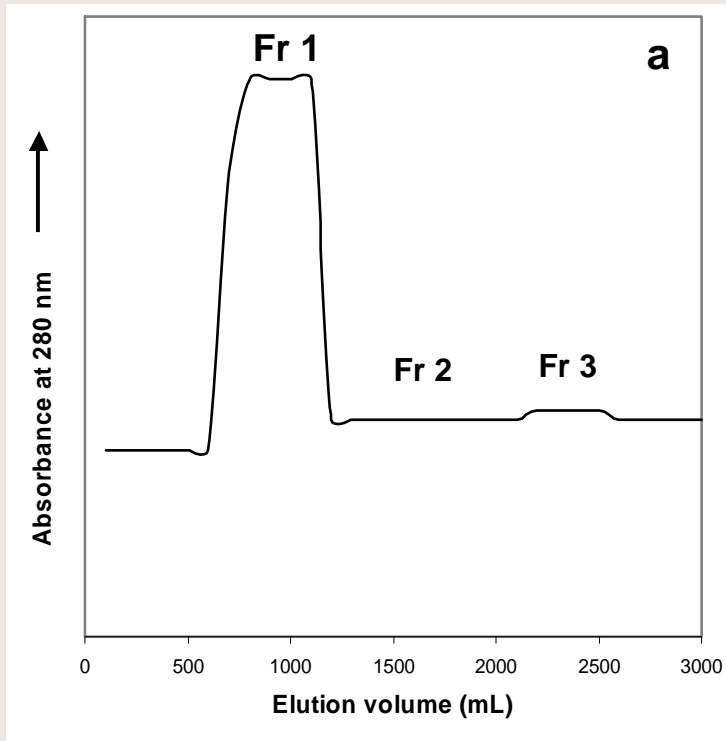
*Pared celular de levadura*



# Fraccionamiento mananoproteínas de pared

**Soluble**  
**Sephadex G-50**

**Fr 1**  
**Sephacryl S-300-HR**



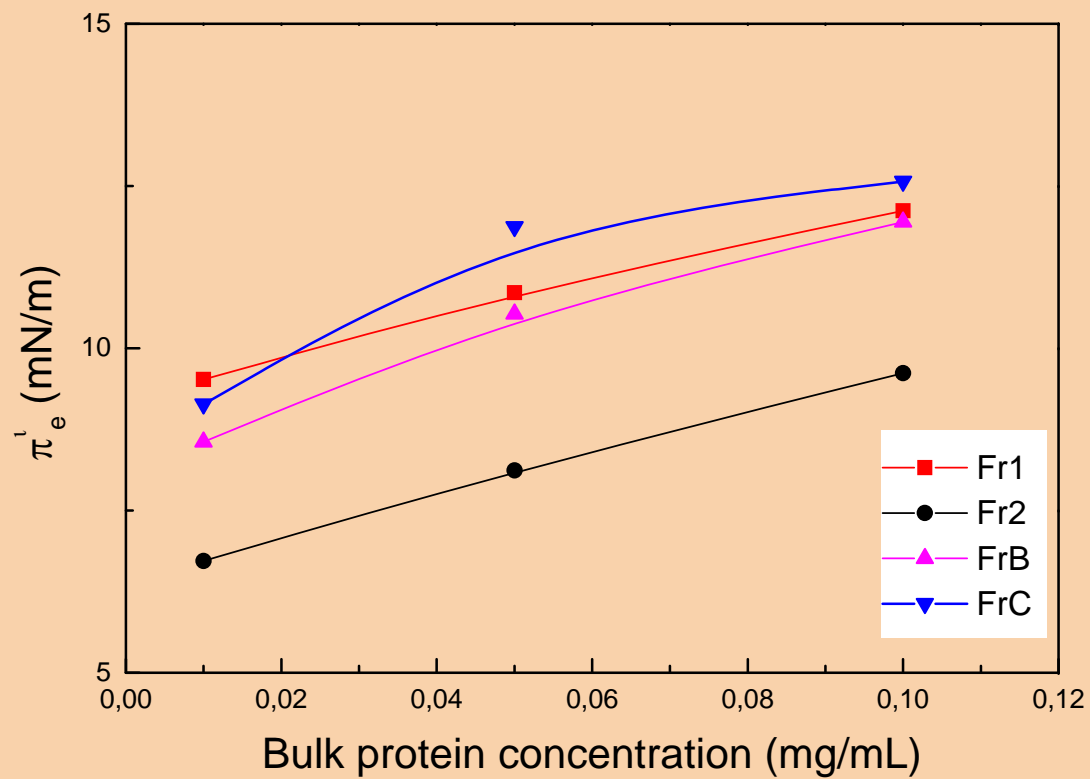
## *Composición de fracciones proteicas de pared celular*

<b>Fraction</b>	<b>Total Protein, TP (%, Nx 6.25)</b>	<b><sup>a</sup> Soluble Protein (%)</b>	<b>Carbohydrates, CH (%)</b>	<b>TP/C H ratio</b>	<b>Moisture (%)</b>
<b>Fr 1</b>	<b>62.5 ± 2.4</b>	<b>33.4 ± 2.0</b>	<b>19.8 ± 2.6</b>	<b>3.2</b>	<b>4.8 ± 0.8</b>
<b>Fr 2</b>	<b>23.2 ± 1.0</b>	<b>50.0 ± 14.0</b>	<b>33.8 ± 1.2</b>	<b>0.7</b>	<b>6.7 ± 1.1</b>
<b>Fr 3</b>	<b>31.0 ± 1.3</b>	<b>5.3 ± 1.5</b>	<b>29.5 ± 2.1</b>	<b>1.1</b>	<b>12.9 ± 1.3</b>
<b>Fr A</b>	<b>57.3 ± 6.4</b>	<b>3.8 ± 1.2</b>	<b>16.6 ± 3.2</b>	<b>3.4</b>	<b>7.1 ± 0.1</b>
<b>Fr B</b>	<b>54.3 ± 1.2</b>	<b>68.5 ± 5.0</b>	<b>15.4 ± 0.6</b>	<b>3.5</b>	<b>11.6 ± 0.4</b>
<b>Fr C</b>	<b>54.8 ± 2.3</b>	<b>44.8 ± 3.8</b>	<b>16.1 ± 2.4</b>	<b>3.4</b>	<b>3.1 ± 1.8</b>

**Fr 1 mayoritaria 65%**

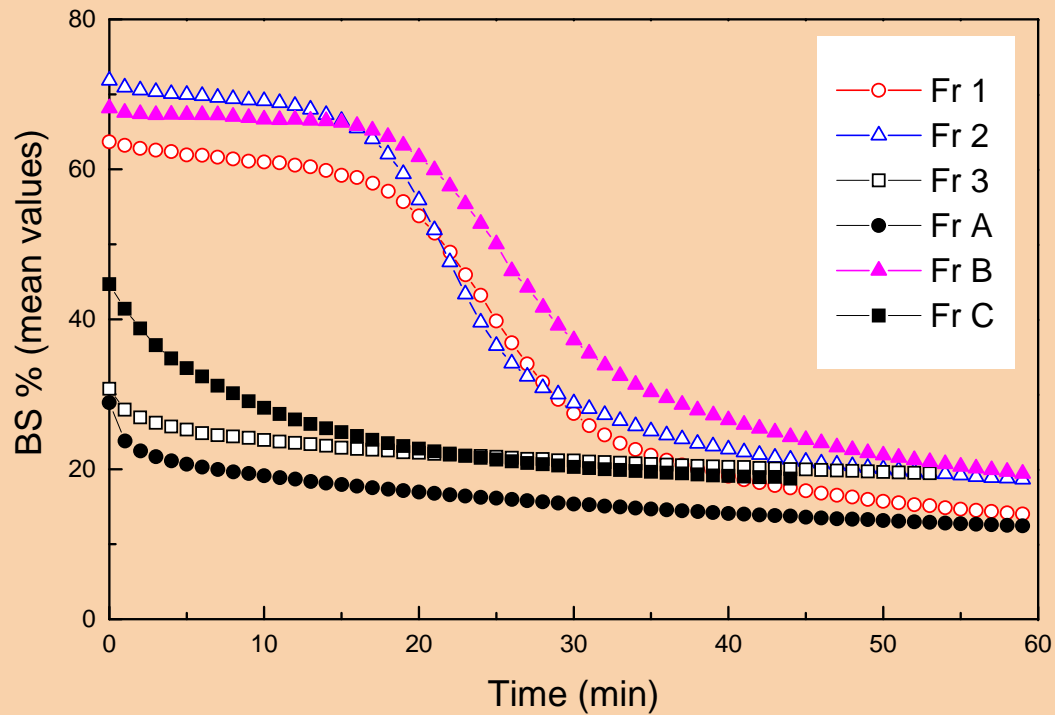
**Fr 2 10%**

# *Actividad interfacial*



# *Propiedad emulsionante y estabilidad al cremado*

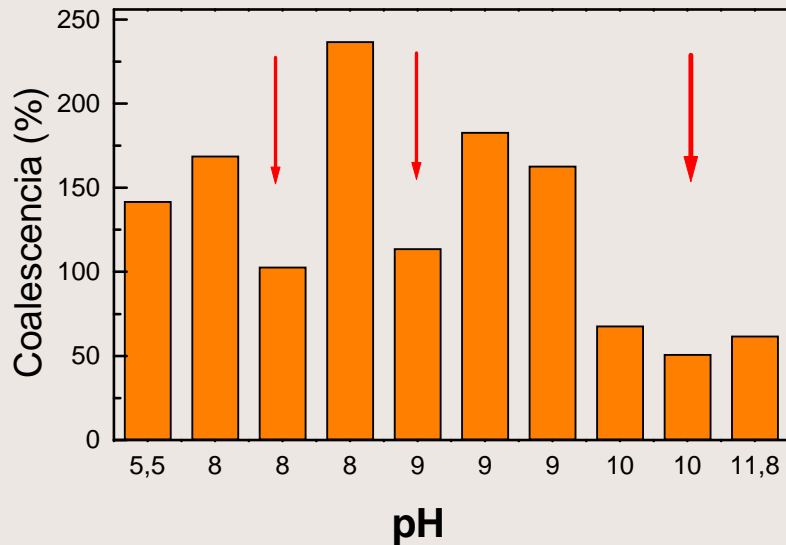
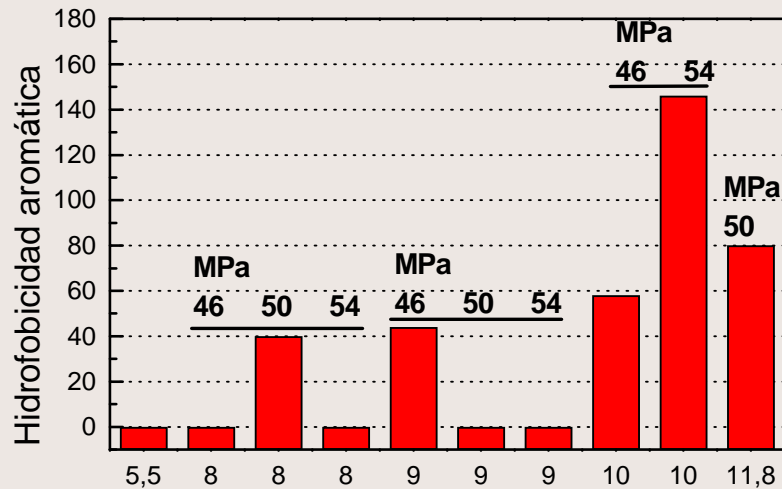
## Ensayos en Quick Scan



# EFFECTO DE CONDICIONES DE DESINTEGRACIÓN CELULAR CONCENTRADOS PROTEICOS DE LEVADURA *Kluyveromyces fragilis*

Tratamiento	pH	Presión, Mpa	Tp °C	ΔH, J/g
Control	5.5	50	54.4	10.0
I	8	46	49.5	6.2
II	8	50	53.5	2.9
III	8	54	49.3	0.7
IV	9	44	49.8	2.9
V	9	50	57.6	2.8
VI	9	56	58.2	4.2
VII	10	46	50.0	4.7
VIII	10	54	54.2	5.4
IX	11.8	50	53.7	4.5

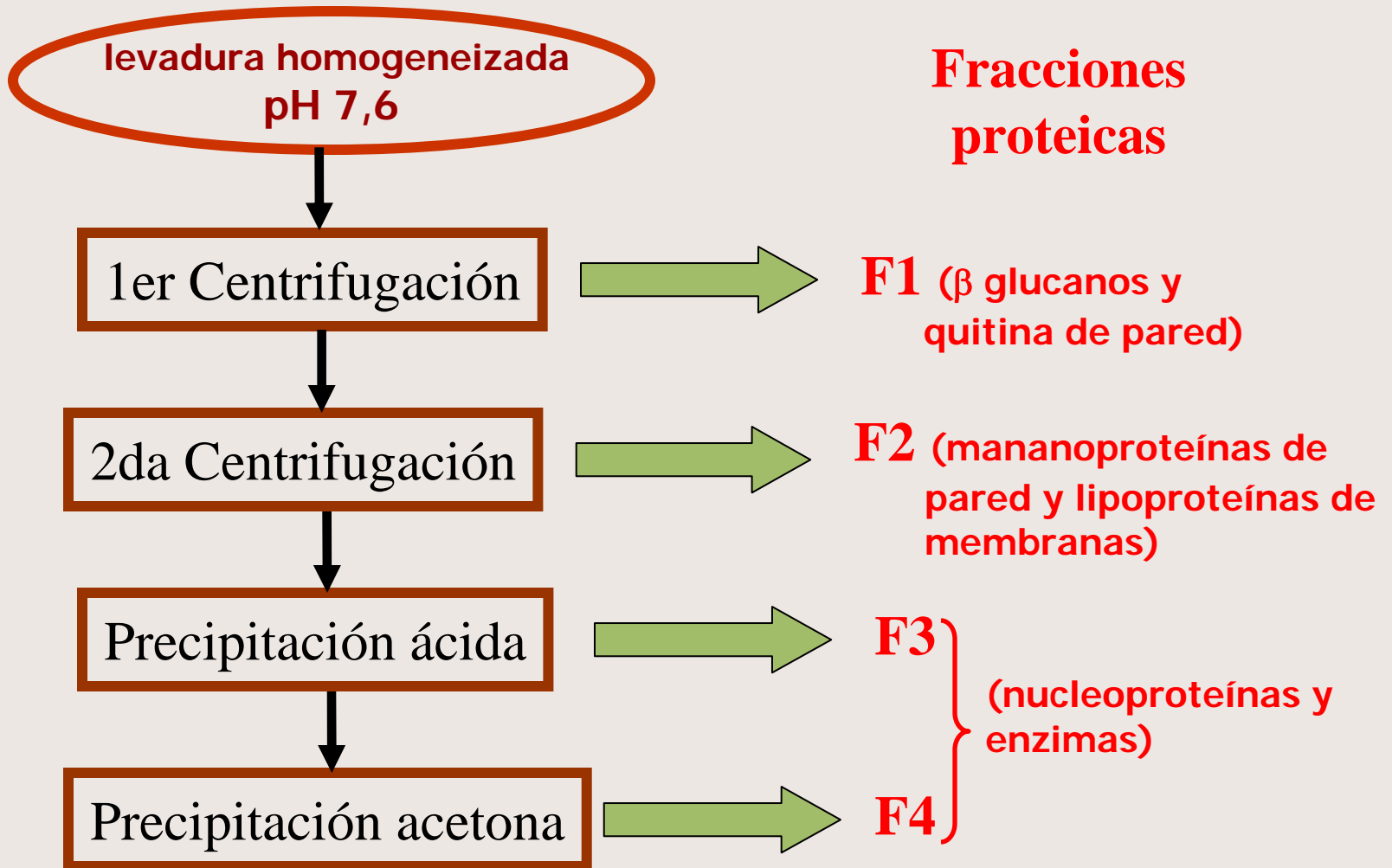
# Hidrofobicidad y Estabilidad de emulsiones



*Capacidad de absorción y retención de agua*  
2.56 – 5.54 (ml agua/g)

*Capacidad emulsionante*  
1.31 – 1.54 (ml aceite/g)

# Fraccionamiento completo de proteínas de levadura *Sc*



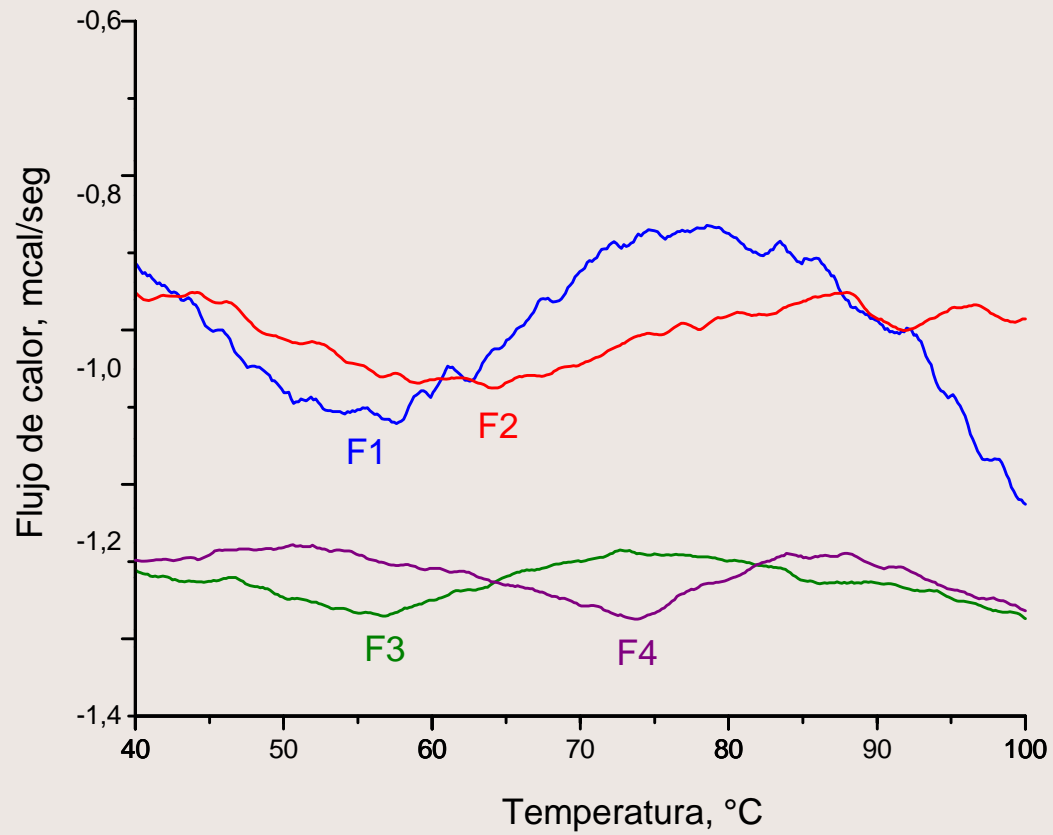


## *Composición de fracciones de levadura*

Fracción	PMSF	Proteínas (%)	Carbohidratos (%)	Humedad (%)
F1	Sin	17.93 ± 0.26	70.22 ± 3.30	9.23 ± 0.05
	Con	20.51 ± 1.45	65.59 ± 2.82	9.15 ± 1.84
F2	Sin	39.64 ± 3.33	10.36 ± 0.97	12.16 ± 0.56
	Con	42.40 ± 2.11	8.40 ± 0.46	13.07 ± 0.50
F3	Sin	63.76 ± 3.33	3.85 ± 0.67	6.66 ± 0.16
	Con	60.10 ± 2.13	6.51 ± 0.54	6.55 ± 0.37
F4	Sin	49.48 ± 1.08	13.87 ± 1.80	10.81 ± 0.88
	Con	57.78 ± 2.16	13.92 ± 3.08	11.13 ± 0.06

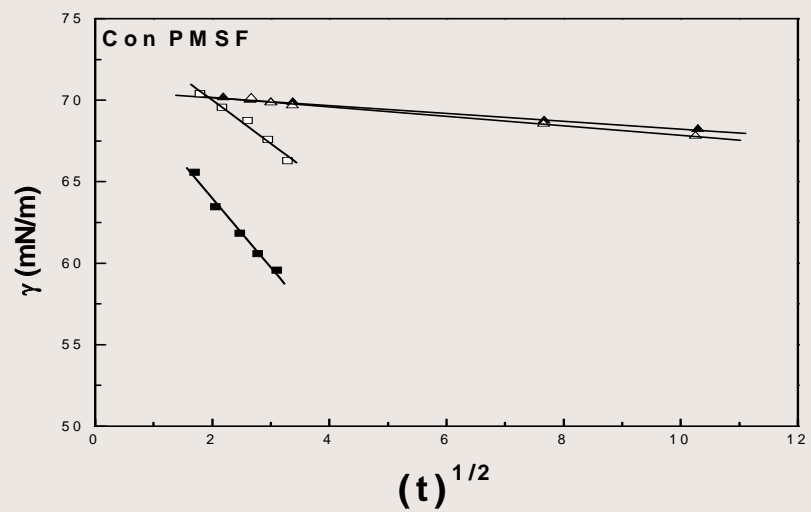
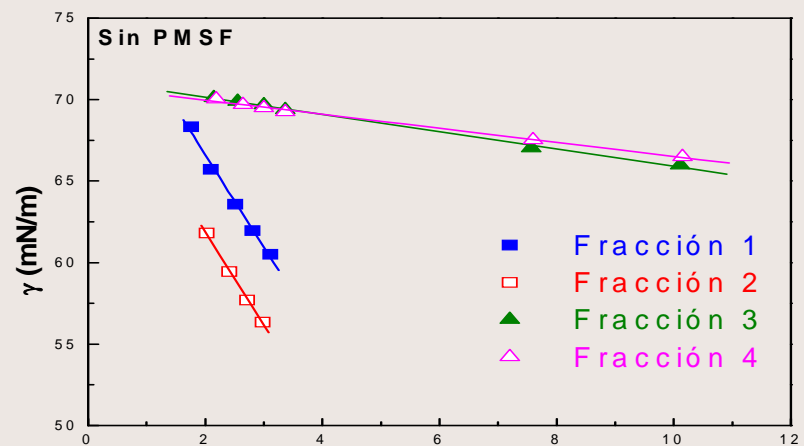
PMSF: fenilmetilsulfonilfluoruro como inhibidor de proteasas

# Comportamiento térmico, DSC



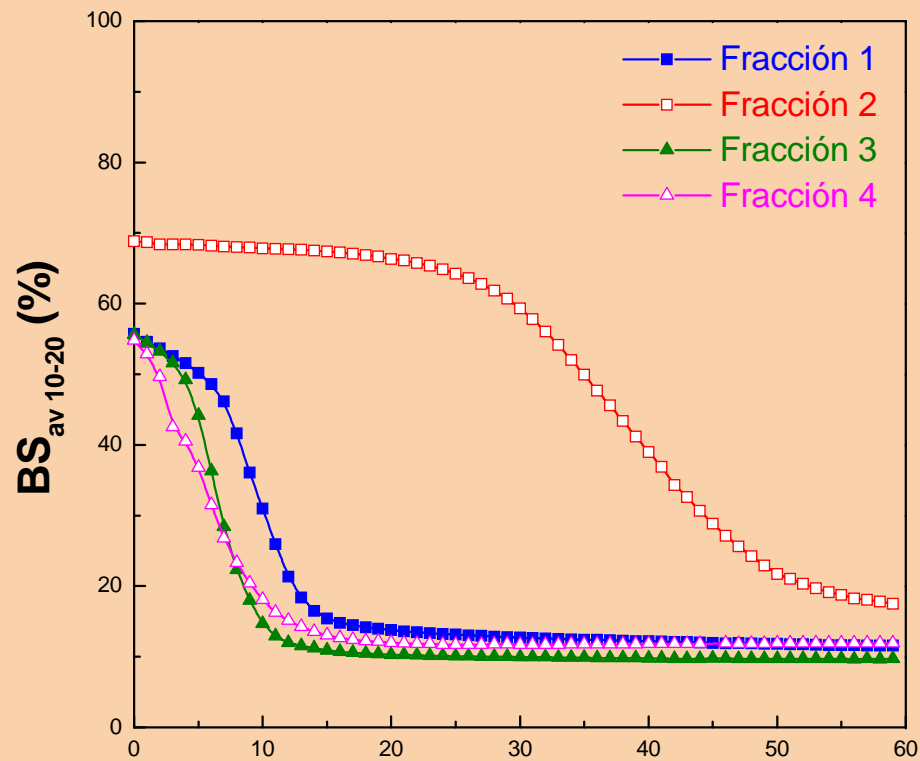
# TENSIOMETRIA DE GOTA

[proteína]=0,5 mg/mL)



# Estabilidad al cremado de Emulsiones O/W

## Medida de Backscattering - Equipo QuickScan.



## Conclusiones:

- ✓ *Las levaduras son fuente de proteínas de alto valor biológico y funcional*
- ✓ *Las propiedades térmicas, composición y funcionalidad de proteínas de levadura dependen del tipo de levadura y método de obtención*
- ✓ *Las proteínas aisladas son más sensibles a la temperatura que las mismas proteínas en células enteras lo cual explica se rápida desnaturalización luego de la ruptura*
- ✓ *La activación de nucleasas intracelulares permite la obtención de proteínas de levadura con bajo nivel de RNA*
- ✓ *Las proteínas aisladas de levadura tienen limitadas propiedades de hidratación pero buenas propiedades superficiales*
- ✓ *Las proteínas de pared celular de levadura son muy buenos emulsificantes debido a su composición en mananoproteínas (proteínas unidas a  $\beta$ -glucanos)*

## *Agradecimientos*

- ✓ *Al Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos*
  - ✓ *Al Instituto Cubano de Investigación en Derivados de la Caña de Azúcar*
  - ✓ *Institut für Toxikologie, Klinikum der Christian Albrechts Universität zu Kiel, Alemania*
  - ✓ *A SETCIP Argentina and CITMA, Cuba*
  - ✓ *A la Universidad Nacional de Quilmes*
- 
- ✓ *A Miguel A. Otero, M. Carmen Vasallo, M. Cristina Añón, Laszlo Beress, Gonzalo Palazolo, Lourdes García*

# Food Science and Technology/LWT: PDF for review

<b>Journal</b>	Food Science and Technology/LWT
<b>Article ID</b>	YFSTL_133
<b>Title</b>	CELL WALL PROTEINS OF <i>Kluyveromyces fragilis</i> . SURFACE AND EMULSIFYING PROPERTIES
<b>Version</b>	2
<b>Article type</b>	Full-length article
<b>Submitted</b>	03 Feb 05

## Files submitted

<b>Name</b>	<b>Fig No</b>	<b>Format</b>	<b>Use</b>	<b>Description</b>
K024-02-05 revised may24-05.doc		Manuscript (Microsoft Word)		CELL WALL PROTEINS OF <i>Kluyveromyces fragilis</i> . SURFACE AND EMULSIFYING PROPERTIES
Figure 1 modified.doc	1	Figures (Microsoft Word)	Yes	Figure 1: Extraction scheme of cell wall proteins from <i>Kluyvemomyces fragilis</i> cells.
Figure 2 modified.doc	2	Figures (Microsoft Word)	Yes	Figure 2: a) Gel filtration chromatography of F II on Sephadex G-50. Column: 112 x 6.5 cm. Eluant: 0.36 mol/L ammonium hydroxide. Sample: 2000 mg. b) Subfractionation of Fr 1 from Sephadex G-50 in Sep
Figure 3 modified.doc	3	Figures (Microsoft Word)	Yes	Figure 3: Values of surface pressure (a) and interfacial pressure (b) at equilibrium, as a function of bulk concentration of yeast fractions: Fr 1 (i), Fr 2 (j), Fr B (£), Fr C (¥). Each value i
Figure 4 modified.doc	4	Figures (Microsoft Word)	Yes	Figure 4: Back scattering profiles of emulsions prepared with different yeast fractions: a) Fr 1,

				b) Fr 2, c) Fr 3, d) Fr A, e) Fr B, f) Fr C, corresponding to 1 min (----), 10 min (....), 30 min (~)
Figure 5 modified.doc	5	Figures (Microsoft Word)	Yes	Figure 5: Creaming process of emulsions prepared with yeast fractions Fr 1 (&#9675;), Fr 2 (D), Fr 3 (&#9633;), Fr A (&#9679;), Fr B (&#9650;), Fr C (&#9632;). To follow the destabilization, variation
Figure 6 modified.doc	6	Figures (Microsoft Word)	Yes	Figure 6: Microstructure of emulsions prepared with Fr 1 (a), Fr A (b), Fr B (c). Arrows indicate insoluble aggregates and film deformation. Magnification: 100 X.
Figure 7 modified.doc	7	Figures (Microsoft Word)	Yes	Figure 7: Viscoelastic modulus (G, &#9632;; G, &#9679;) of creamed layers of emulsions from Fr 1 (a), Fr 2 (b), Fr C (c) as a function on oscillation frequency; (d) Variation of tan d (G <sub>LL</sub> /G <sub>L</sub> )



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

**CELL WALL PROTEINS OF *Kluyveromyces fragilis*. SURFACE AND EMULSIFYING PROPERTIES**

María del Carmen Vasallo<sup>1</sup>, María C. Puppo<sup>3</sup>, Gonzalo G. Palazolo<sup>3</sup>, Miguel A. Otero<sup>1</sup>, Laszlo Beress<sup>2</sup> and Jorge R. Wagner<sup>4#</sup>.

<sup>1</sup> *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Via Blanca 804, 11000, La Habana, Cuba. Fax (537) 338236.*

<sup>2</sup> *Institut für Toxokologie, Klinikum der Christian Albrechts Universität zu Kiel, Brunswiker Str. 10, 24105 Kiel, Germany.*

<sup>3</sup> *Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, Universidad Nacional de La Plata, 47 y 116 (1900), La Plata, Argentina, Fax 54 (221) 4254853,*

<sup>4</sup>*Departamento de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes. Roque Saenz Peña 180 (B1876BXD) Bernal, Buenos Aires, Argentina. Fax 54 (11) 4365 7100. E-mail: jwagner@unq.edu.ar*

Running head: Surface and emulsifying properties of yeast cell wall proteins

Correspondence should be sent to # Dr. Jorge R. Wagner

1 **ABSTRACT**

2

3 Yeast cell wall proteins were extracted from homogenized suspensions with 0.75  
4 mol/L NaOH, yielding after precipitation at isoelectric pH a pale-brown sediment.  
5 Lyophilized sample was fractionated on Sephadex G-50 to yield three fractions (Fr 1,  
6 Fr 2 and Fr 3). Fr 1, which had the highest yields and protein content, showed the  
7 highest molecular weight and best surface properties. Fr 2 and Fr 3 were mainly  
8 composed by polysaccharide-protein complexes. Fr 1 was further subfractionated on  
9 Sephacryl S-300 to produce three fractions (Fr A, Fr B and Fr C). All subfractions,  
10 turned out to be highly foamy during evaporation. The highest yields were obtained  
11 for Fr A, which also showed the highest molecular weight. Fractions Fr 1 and their  
12 subfractions Fr B and Fr C exhibited good surface activity and high emulsifying  
13 activity. Emulsions prepared with these fractions were the most stable against  
14 creaming and coalescence. **Fr 2** cream phase presented a gel-like behavior as a  
15 consequence of polysaccharides acting as thickening agents.

16

17

18 Keywords: Yeast proteins, cell wall proteins, fractionation, emulsifying properties,  
19 surface properties.

20

## 1 INTRODUCTION

2

3 Proteins rank among the most used components for they may have the  
4 majority of the desirable attributes related to food preparation (Fligner & Mangino,  
5 1991). Functional properties related to proteins include solubility, water retention,  
6 viscosity, gel formation and emulsification. These properties, being among the most  
7 important in food preparation and stability, are related to a protein ability to reduce  
8 interface tension between hydrophilic and hydrophobic components and strengthened  
9 film rigidity (Kay and Mac, 1979).

10 Most oil-in-water emulsions stabilize through the adsorption of a protein  
11 layer at oil/water interface, which produces a barrier surrounding the dispersed drops.  
12 An additional macromolecular stabilization could be related to non absorbed  
13 polysaccharides acting as thickening or structural agents in water phase (Dickinson,  
14 E. 1991, Chen et al., 1993).

15 Yeast and yeast derivatives have been widely used in the formulation of food  
16 systems. Interest in yeast proteins has increased as a result of a continuously growing  
17 fermentation industry which produce yeast biomass as a byproduct. The isolation of  
18 yeast proteins is an attractive alternative for the utilization of yeast biomass through  
19 its use as emulsifying, gelling, foam stabilizing agent, etc. in food systems (Dziezak,  
20 1987).

21 A considerable amount of work on yeast protein functionality has been reported,  
22 mainly on *Saccharomyces cerevisiae*, nevertheless more knowledge is needed to  
23 asses their potentialities as food ingredients (Kinsella, 1986; Guzmán-Juárez, 1982,  
24 Pacheco and Sgarbieri, 1998).

25 In the last years the interest on other yeast species has increased. It is the case  
26 for *Kluyveromyces* (*K. fragilis*, *K. lactis*), which can propagate in cheese whey due to

1 their lactose assimilation ability. Few works on protein obtention from  
2 *Kluyveromyces* sp. were been conducted (Otero et al., 2000).

3 In most of the studies on yeast proteins, protein concentrates or isolates were  
4 obtained from so-called yeast extracts, which are produced after cellular rupture and  
5 mainly composed of nucleoproteins ubiquitous inside the cell (Kinsella, 1986). The  
6 outer parts of the yeast cells, the cell walls, remain as an insoluble waste for which so  
7 far no commercial use has yet been established except as a supplement for animal  
8 feed (Guzmán-Juárez, 1982). According to Freimund et al. (2003), the composition  
9 of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell wall is 39-56% polysaccharides (mainly  
10 glucans and mannan), 20-29% proteins (free and as mannoproteins) and 11-13%  
11 lipids. Important bioactive, medicinal and physical properties related to glucans have  
12 been studied exhaustively studied (Bohn and BeMiller, 1995; Hromádková et al.,  
13 2003), however there is scarce information on functional properties of cell wall  
14 proteins. It was reported that cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* have  
15 possible applications as a bioemulsifier in foods (Cameron et al., 1988; Torabizadeh  
16 et al., 1996; Barriga et al., 1999).

17 The aim of this paper is the extraction, purification and fractionation of total  
18 cell wall proteins from *Kluyveromyces fragilis* and their evaluation as functional  
19 ingredients in food industry, specially those related to surface activity.

20  
21  
22

## 1 MATERIALS AND METHODS

2

### 3 **Materials**

4

5 *Kluyveromyces fragilis* cells were grown on sugar cane molasses as a source  
6 of carbon and energy, at a concentration of 40 mg/mL of total reducing substances  
7 supplemented with 5.62 mg/mL (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 1.60 mg/mL (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> as  
8 nitrogen and phosphorus sources respectively in a bioreactor. Propagation was  
9 carried out in continuous mode for 24 h at 32°C, pH 4.0 and at a dilution rate (D=μ)  
10 of 0.25h<sup>-1</sup>.

11 Cells were harvested by centrifugation in a Sharpless Open type continuous  
12 centrifuge at 5000 g (Alfa-Laval, Tumba, Sweden), washed twice with distilled water  
13 and stored at 10°C until use.

14

### 15 **Homogenization and protein extraction**

16

17 As shown in Figure 1, yeast cells were re-suspended in distilled water (150 mg/mL),  
18 adjusted to pH 9.5 with 1 mol/L NaOH and homogenized twice at 50 MPa (Manton  
19 Gaulin 8MBA, APV, UK) according to the method described by Otero et al. (1996).  
20 Yeast homogenate was diluted to 100 mg/mL of total solids with distilled water and  
21 centrifuged at 5000 g. Precipitate was washed twice with distilled water, resuspended  
22 to 200mg/mL and boiled for one hour to remove water soluble compounds. The  
23 sediment after centrifugation at 500 g was suspended in 0.75 mol/L NaOH at  
24 ambient temperature for 3 h and centrifuged under same conditions as above,  
25 yielding an insoluble fraction named Fraction I (F I). Supernatant was adjusted to pH  
26 5.0 with acetic acid, centrifuged as mentioned and brownish precipitate freeze-dried

1 (Fraction II, F II). Yield of this fraction was 11% with respect to initial yeast  
2 biomass.

3

#### 4 **Fractionation of ammonium soluble compounds**

5

6 Two g of lyophilized sample **F II** were suspended in 90mL of 0.7 mol/L  
7 ammonium hydroxide, filtered under vacuum through a T-1000 filter (Leitz Filter  
8 Werke GmbH, Bad Kreuznach, Germany), centrifuged at 49200 g in a Beckman J2  
9 HS centrifuge (Beckman Instruments GmbH, München, Germany) for 10 min at  
10 10°C and supernatant collected..

11

#### 12 **Gel Filtration Chromatography**

13

14 The above supernatant was applied to a Sephadex G-50 (fine) 112 x 6.5cm  
15 column (Pharmacia Biotechnology International, Uppsala, Sweden), and eluted with  
16 0.36 mol/L ammonium hydroxide. Using an Ultrac 7000 fraction collector (LKB  
17 Instruments AB, Bromma, Sweden) monitoring at 280 nm three main fractions were  
18 collected (Fr 1, Fr 2 and Fr 3 in Figure 2a). Fractions were evaporated under vacuum  
19 and freeze dried.

20 Fr 1 from Sephadex fractionation was applied (200 mg to 10mL of 0.7 mol/L  
21 ammonium hydroxide) onto a Sephacryl S-300 HR 100 x 2.5cmm column and eluted  
22 with the same eluant as above. Resulted fractions (Fr A, Fr B and Fr C in Figure 2b)  
23 were also evaporated under vaccum and freeze dried.

24

#### 25 **Chemical Analysis**

26

1 Carbohydrate content was analyzed by phenol-sulfuric method (Dubois et al.,  
 2 1956) while the total protein content was determined by microkjeldahl ( $N \times 6.25$ )  
 3 (Nkonge and Murray Ballance, 1982). Protein solubility was determined in 0.01  
 4 mol/L sodium phosphate buffer, pH 7.0. Dispersions (5 mg sample/mL buffer) were  
 5 gently stirred for 1 h at room temperature, centrifuged at 10000 g for 10 min, and  
 6 protein content measured by the Bradford method (Bradford, 1976). Solubility was  
 7 expressed as grams of soluble protein/100 g of sample. All solubility determinations  
 8 were conducted in duplicate.

9 Moisture content was determined by heating samples at 105°C to constant  
 10 weight. The lipid content of **F I** and **F II** was determined by Soxhlet method using  
 11 diethyl ether. RNA content of these fractions was determined by following the  
 12 experimental procedure of Rut (1973).

### 14 **Surface Activity**

15  
 16 Surface (air-water, A/W) and interfacial (corn oil-water, O/W) tensions of solution of  
 17 each fraction were determined at 25° C using a CSC DuNouy 70535 tensiometer  
 18 using the ring method (Couper, 1993). Supernatants from protein solubility  
 19 determination were used to obtain solutions of 0.01-0.1 mg protein/mL in 0.01 M  
 20 sodium phosphate buffer, pH 7.0. As a result of adsorption of the surface active  
 21 protein, the surface (or interfacial) tension decreased from the value for the clean  
 22 interface  $\gamma_0$  to a value  $\gamma$ . Therefore, the interfacial and surface pressure at equilibrium  
 23 ( $\pi_e^i$  and  $\pi_e^s$ , respectively, where i stands for interfacial and s represents surface) were  
 24 calculated as

$$25 \quad \pi_e^i = \gamma_0^i - \gamma_e^i \text{ (mN/m)}$$

1 and

$$2 \quad \pi_e^s = \gamma_0^s - \gamma_e^s \text{ (mN/m).}$$

3 where the symbols 0 and e represent the initial and equilibrium stages, respectively.

4 Determinations were performed at least in triplicate.

5

### 6 **Preparation of o/w emulsions**

7

8 The emulsions were prepared by homogenization of 10 mL of a sample  
9 dispersion (10 mg/mL, 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.0) and 10 mL of corn  
10 oil using an Ultraturrax (T-25, S25N10G device, IKA Labortechnik, Karlsruhe,  
11 Germany) at 20.000 rpm for 30 s. at 25° C.

12

### 13 **Emulsifying Activity Index (EAI)**

14

15 The EAI was estimated according to the methods of Pearce and Kinsella  
16 (1978) which relates the absorbance at 500 nm of diluted emulsions to the interfacial  
17 surface area of protein films surrounding the emulsified oil droplets. Aliquots (50  $\mu$ l)  
18 of each emulsion were immediately diluted 50-fold in 0.01 mol/L sodium phosphate  
19 buffer pH 7.0 containing 0.1 g SDS/100 mL solution, then  $A_{500}$  was measured. EAI  
20 (in  $\text{m}^2/\text{g}$ ) was defined as

$$21 \quad \text{EAI} = 4.606 A_{500} \text{ Dilution} / L \phi C$$

22 where L was the light path (1 cm);  $\phi$  the volumetric oil fraction and C is the protein  
23 concentration. Results represent the mean of at least three experiments.

24



## 1 **Droplet Size Distribution**

2

3 The droplet size distribution was determined on the initial emulsions from  
4 0.03 to 300  $\mu\text{m}$  by laser scattering using a Mastersizer Micro Particle Analyzer  
5 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, United Kingdom). Sauter Mean diameter ( $D_{32}$ )  
6 was calculated from droplet size distribution expressed in differential surface.  
7 Determinations were conducted at least in duplicate.

8

## 9 **Emulsion Stability**

10

11 Emulsion stability was analyzed using two different methods: creaming  
12 stability and oiling-off coalescence stability.

13 Creaming stability was determined in quiescent conditions at 25° C using a  
14 Vertical Scan Analyzer (QuickScan, Beckman-Coulter, USA). Samples were put in a  
15 cylindrical glass measurement cell and the Backscattering (BS%) profiles were  
16 studied each minute during one hour as a function of the sample height (total height  
17 60 mm) . Initial Backscattering ( $BS_1$ ) values were determined from initial profile of  
18 emulsions ( $t=1$  min) as the mean value through the tube length. Creaming kinetic  
19 was followed by measuring the mean values of BS% as a function of time in the  
20 bottom zone of the measurement cell (zone 5-7 mm). Relative volume of cream  
21 phase at 60 min ( $V_r$ ), with respect to total emulsion volume, was estimated from the  
22 BS % profiles. Oiling-off stability was studied by centrifugation of 10 mL of  
23 emulsion for 30 min at 1000 g. The oil separated was removed with a Pasteur pipette  
24 and coalescence determined by weight difference. Coalescence was expressed as the  
25 fraction of separated oil with respect to total oil in the emulsion.

26

## 1 **Rheological Properties of Emulsion Cream Layers**

2

3 Rheological behavior of the emulsion cream layer obtained after  
4 centrifugation (30min, 10000 g, 20°C) was studied by measuring the viscoelastic  
5 parameters  $G'$  (storage modulus),  $G''$  (loss modulus) and  $\tan \delta$  ( $G''/G'$ ) as a function  
6 of frequency within the linear viscoelastic range. Measurements were carried out at a  
7 strain of 5% and 20° C in an oscillatory Haake CV20 rheometer (Haake  
8 MessTechnik, GmbH Co, Karlsruhe, Germany) with parallel plates setup.

9

## 10 **Emulsion microstructure**

11

12 A 20  $\mu\text{L}$  aliquot of cream phase of emulsion (dilute six-fold in the same  
13 buffer in which the proteins were dispersed) was placed on a glass slide and covered  
14 with a 22 X 22 cover-slip. Samples were observed with a light microscope (Leica DC  
15 100, Germany) fitted with an adapted digital camera at 100 X magnification.

16

## 17 **Statistical analysis**

18

19 Statistical analysis of data was performed by analysis of variance (ANOVA).  
20 Differences between means were analyzed by the Fisher's test (Systat version 5.0).  
21 Significance was considered at  $\alpha = 0.05$

22

## 23 **RESULTS AND DISCUSSION**

24

25 Following the homogenization and extraction of yeast cells according to the  
26 procedure schematized in Figure 1, two fractions were obtained: a polysaccharide-

1 rich debris (**F I**) and an extract of cell wall proteins (**F II**). Table 1 shows the  
2 composition of these primary products. Proteins and carbohydrates were the main  
3 components of F II. Due to the fact that this fraction was obtained by extraction of  
4 cell wall in basic condition and precipitated in acidic medium, its carbohydrates  
5 would be composed mainly of alkali-soluble, acid-insoluble polysaccharides  
6 (mannans, glucans) free or linked with wall proteins. According to studies on  
7 *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition, the alkali-soluble, acid-insoluble  
8 polysaccharide fraction are composed of (1-3)-  $\beta$ -D-glucan, mannan, and some (1-6)-  
9  $\beta$ -glucan (Manner & Meyer, 1977).

10 From gel filtration on Sephadex G-50 of **F II**, two UV-absorbing fractions  
11 (**Fr 1 and 3**) were produced (Figure 2a). The volume eluted between the two  
12 absorbing peaks was also collected (**Fr 2**), yielding a white powder after drying.  
13 Table 2 offers the yields of the three fractions obtained after gel filtration on  
14 Sephadex G-50. It can be seen that the total yield of the fractions was 61.5%, which  
15 indicates the non-protein fraction removed from fraction II was probably composed  
16 of free polysaccharides  $\approx$  38.5%. The most interesting peak is that corresponding to  
17 **Fr 1**, which represented both the highest amount of all fractions and turned out to be  
18 very foamy during evaporation. Foaming properties seem to be quite important in the  
19 food industry for a number of applications (Halling, 1981).

20 **Fr 1** exhibited a high molecular weight ( $> 3 \times 10^4$  Da) and a new fractionation  
21 was attempted on Sephacryl S-300 HR. The further fractionation of **Fr 1** yielded  
22 three new fractions labeled as **Fr A**, **Fr B** and **Fr C**. Figure 2b shows a typical  
23 chromatogram for this sample (in a range of  $1 \times 10^4$  Da to  $1.5 \times 10^6$  Da) and Table 3  
24 shows the yields of each subfraction with respect to the original **Fr 1**. The fraction  
25 with the highest yield was **Fr A**. All fractions showed the same foamability as **Fr 1**  
26 when they were vacuum evaporated. This behavior could be due to the fact that these

1 fractions (**Fr 1**, **Fr A**, **Fr B**, **Fr C**) contained a considerable level of protein content  
2 (total protein, TP=54-62%) and similar total protein-carbohydrate ratio (TP/CH) > 3  
3 (Table 4,  $p < 0.05$ ). Nevertheless these fractions showed different values of protein  
4 solubility ( $p < 0.05$ ). We can observe that **Fr A**, the main protein fraction obtained  
5 from **Fr 1**, exhibited the lowest solubility at pH 7 probably due to its high content of  
6 insoluble high molecular weight carbohydrates. On the other hand, the presence of  
7 protein-polysaccharides complexes with a high content of carbohydrates in **Fr 2** and  
8 **Fr 3** was observed (TP/CH of 0.7 and 1.1, respectively). The protein solubility was  
9 high for **Fr 2** but very low for **Fr 3** indicating structural differences between these  
10 two complexes.

11 **Fr 1**, **Fr 2**, **Fr B** and **Fr C** exhibited surface and interfacial activity at  
12 different bulk protein concentrations (Figure 3 a, b). **Fr 3** and **Fr A** exhibited very  
13 poor surface activity (data not shown) probably due to their low content of soluble  
14 proteins (Table 4). **Fr 1** showed the highest surface pressure,  $\pi_s$  (Figure 3 a), which  
15 explains the frothing observed during evaporation and freeze-drying. Also,  $\pi_e^i$  values  
16 were higher for **Fr 1** and its subfractions **Fr B** and **Fr C** (Figure 3b), indicating  
17 similar interfacial behavior. These results suggest the presence of proteins with high  
18 ability to adsorb at the oil/water and air/water interfaces. Concerning **Fr 2**, being  
19 composed mainly of carbohydrates with a protein/carbohydrates ratio of 0.7, it is not  
20 surprising that its interfacial activity at equilibrium was lowest ( $\pi_e^i$  in Figure 3b).

21 Emulsions prepared with the different fractions showed initial characteristics  
22 determined mainly by their droplet size distributions. All emulsions exhibited a  
23 bimodal distribution except for emulsions prepared with **Fr 3** and **Fr A**, which  
24 presented a Sauter mean diameter,  $D_{32} > 25 \mu\text{m}$ ; all the rest had initial values of  $D_{32}$  in  
25 the range 14.7-15.2  $\mu\text{m}$  (Table 5).

1 To determine the stability of emulsions prepared with different samples, the  
2 back scattering (BS %) profiles were analyzed according Palazolo et al. (2004). Only  
3 the profiles corresponding to 1, 10, 30 and 60 min were showed (Figure 4 a-f).  
4 Except for emulsions from **Fr 3** and **Fr A**, the others showed an initial back  
5 scattering (BS<sub>1</sub>) higher than 60%, results that are in agreement with the high  
6 emulsifying activity (EAI > 24 m<sup>2</sup>/g in Table 5) and interfacial activity (Figure 3b).  
7 High values of BS<sub>1</sub> and EAI for **Fr 1**, **Fr 2**, **Fr B** and **Fr C** correspond to the  
8 presence of a high number of small drops (D<sub>32</sub> ≤ 15.2 μm, Table 5, p<0.05). In  
9 Figure 4 these are represented by the drops drifting to the upper part of the measuring  
10 cell as the profiles shift to higher lengths, which indicates cream phase formation.  
11 Creaming kinetic was analyzed in the lower part of tube by means of BS% decrease  
12 as a function of time (Figure 5). Emulsions from **Fr 1**, **Fr 2** and **Fr B** showed high  
13 creaming stability during the first 20-30 minutes of monitoring, Fr C to a lesser  
14 extent. On the contrary, Fr 3 and Fr A showed highly unstable creaming stability. In  
15 this regard, drop size seemed to be the most important factor concerning stability.  
16 Therefore, for those more unstable emulsions (Fr 3 and Fr A in Figures 4c-d), higher  
17 D<sub>32</sub> values were measured (≥26.9 μm, Table 5).

18 On the other hand, even with low protein content and interfacial pressure **Fr 2**  
19 fraction exhibited a good emulsifying activity. This may be attributed to the presence  
20 of highly soluble protein-polysaccharide complexes (Samat el al., 1993). Fractions  
21 showing lower capacity to stabilize against creaming (**Fr 3** and **Fr A**) exhibited  
22 similar behavior with respect to coalescence in quiescent condition. This fact became  
23 evident as a sharp drop in back scattering along the cream phase in the upper part of  
24 the measuring tube due to drop size increase (Figures 4c-d).

25 During homogenization, emulsions from **Fr 1** tended to foam as a function of  
26 its high surface activity (see  $\pi_e^s$  in Figure 3a). Foam could be observed in the upper

1 part of initial back scattering profile (Figure 4a,  $t=1$  min., near top) as a peak that  
2 slowly fades away during the studied interval (Palazolo et al., 2004). The formed  
3 foam was relatively stable and had not any effect on **Fr 1**'s emulsion stability against  
4 coalescence. Coalescence resistance was also studied by speeding up the process  
5 through centrifugation and a similar behavior was observed. Only emulsions from **Fr**  
6 **3** and **Fr A** exhibited oiling-off (27.9% and 5.6 %, respectively, Table 5). In such a  
7 sense, stability against coalescence (with or without centrifugation) of emulsions  
8 prepared from **Fr 1**, **Fr 2**, **Fr B** and **Fr C** is mainly driven by the resistance of the  
9 protein layer surrounding oil drops (Wagner & Guéguen, 1999), but controlled as  
10 well, by the initial drop size distribution. According to McClements (1999), larger  
11 drops have a higher efficiency of collision and tend to coalesce faster.

12 On the other hand, despite protein content in **Fr A** being quite similar to those  
13 observed in **Fr B** and **Fr C** (Table 4), its emulsions were unstable against  
14 coalescence and creaming. This behavior could be a consequence of its low protein  
15 solubility (Table 4). In previous works (Kato & Nakai, 1980; Voutsinas et al., 1983)  
16 it has been reported that high solubility and surface hydrophobicity are important  
17 factors on emulsion capacity. During **Fr 1** subfractioning (Figure 3), **Fr A** resulted  
18 with a high molecular weight, which suggests the presence of aggregates, probably  
19 induced by acid precipitation.

20 Figure 6 shows microstructure of cream phase of **Fr 1**, **Fr A** and **Fr B**  
21 emulsions. The lower drop size in **Fr B** was evident and likely due to lower  
22 molecular weight and higher interfacial activity of its proteins. The insoluble protein  
23 aggregates present in **Fr A**, lead to interfacial film deformation and rupture (Figure  
24 6b). Thus, their existence due to strong protein-protein and/or protein-polysaccharide  
25 interactions prevented the formation of stable emulsions.

1 Additional information on drop-drop interactions and film strength was  
2 obtained through rheological studies upon creams resulting from emulsion  
3 centrifugation. Viscoelastic behavior was only detected in emulsions from **Fr 1**, **Fr 2**  
4 and **Fr C** (Figure 7), while the rest became liquid (data not shown). **Fr 1** and **Fr C**  
5 cream layers exhibited viscoelastic properties typical of weak gels (Figure 7 a, c, d)  
6 with  $G'' \geq G'$  below a frequency of about 0.2 Hz and  $G' > G''$  above a frequency of 0.2  
7 Hz. On the contrary, **Fr 2** cream phase presented a gel-like structure with  $G' > G''$   
8 and  $\tan \delta < 1$  throughout the entire frequency range (Figure 7 b, d). This behavior  
9 could be a consequence of polysaccharides acting as thickening or structural agents  
10 more than floc formation agents as is probably the case in **Fr 1** and **Fr C** mainly  
11 constituted of proteins. On the other hand, the high coalescence in emulsions from **Fr**  
12 **3** and **Fr A** explains the liquid behavior in their creams. The liquid cream phase of  
13 **Fr B** emulsion could be due to the high hydration of proteins absorbed onto interface  
14 (McClements, 1999). Cream layers derived from **Fr 3** and **Fr A** presented a small  
15 volume of cream phase with respect to the emulsion volume ( $V_r$  in Table 5) since  
16 coalescence lead to water molecule exclusion due to high drop collision efficiency  
17 and hydrophobic interactions.

18 Highly hydrated cream layers ( $V_r > 0.8$ , Table 5) presented different  
19 rheological behavior. This result can be explained through cream phase properties in  
20 each case. Gel-like structure in **Fr 2** would be due to strong interactions between  
21 water molecule and hydrophilic groups in polysaccharides, the main components of  
22 this fraction. Concerning the emulsions from **Fr 1**, **Fr B** and **Fr C**, proteins are  
23 adsorbed at the interface and form rigid films, as is suggested by EAI values and  
24 coalescence resistance. Floc formation through protein-protein interactions would  
25 explain the viscoelastic performance of creams derived from **Fr 1** being different

1 from those obtained from **Fr B** where no flocs were observed (Figure 6), and  
2 therefore with liquid rheological behavior.

3 It is very interesting to compare jointly all the measured properties of **Fr A**,  
4 **Fr B** and **Fr C** with respect to **Fr 1**. **Fr 1** was the main proteinaceous fractions  
5 obtained from *Kluyveromyces fragilis* cell wall by alkali extraction, acid precipitation  
6 and the first chromatographic separation. When **Fr 1** was fractionated on a second  
7 chromatographic assay, **Fr A** was the main fraction (65%, Table 3). Thus,  
8 comparable properties for these samples would be expected. Also, even though  
9 composition of **Fr 1** and **Fr A** were similar, the surface and emulsifying properties  
10 were different (Table 5, Figures 4-5,  $p < 0.05$ ). On the contrary, **Fr B** and **Fr C**, which  
11 represented only 7.5 and 5% of **Fr 1** subfractions, exhibited values of  $D_{32}$ ,  $BS_1$  and  
12 emulsion stability similar to **Fr 1**. Protein species of **Fr B** behaved as surface agent  
13 (high EAI and low  $D_{32}$  values) while those of **Fr C** behaved as structural agent  
14 (viscoelastic behavior of cream layer). Therefore surface and emulsifying properties  
15 of each fraction were mainly influenced by the nature of protein molecules more than  
16 by the total protein content.

17 Results on composition and emulsifying properties of bioemulsifier from  
18 *Saccharomyces cerevisiae* have been reported by Barriga et al. (1999). This emulsifier  
19 was resolved into two major component, which were labeled  $\alpha$  and  $\beta$ . The  $\alpha$   
20 component, with the high emulsifying activity, was identified as a cell wall  
21 mannoprotein and had a high protein-carbohydrate ratio when compared with the  $\beta$   
22 component. The  $\beta$  component, consistent with its high content of carbohydrate and  
23 low content of protein, was very water-soluble and exhibited a low interfacial  
24 activity. Nevertheless, this component can contribute to the emulsion stability.  
25 According to their composition and interfacial behavior,  $\alpha$  and  $\beta$  components from *S.*



1 *cerevisiae* would be comparable with those of Fr 1 and Fr 2 from *K. Fragilis* even  
2 though the methods of isolation and properties evaluation were very different.

3 In conclusion, different proteinaceous fractions were obtained from  
4 *Kluyveromyces fragilis* cell wall by alkali extraction, acid precipitation and  
5 chromatographic separation. Their surface and emulsifying properties can be  
6 explained on the bases of protein/carbohydrate ratio and water solubility. These  
7 results provide useful information for further applications at the food industry.

8

### 9 **ACKNOWLEDGMENT**

10

11 This work was partially supported by cooperation projects CU/A00-BIX/011  
12 (SETCIP, Argentina and CITMA, Cuba) and INT04/K04 (PGTF). J. R. Wagner and  
13 M. C. Puppo are members of Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y  
14 Técnicas (CONICET) and G. G. Palazolo is fellow of Comisión de Investigaciones  
15 Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC).

16

1

2 **LITERATURE CITED**

3

4 Barriga, J.A.T., Cooper, D.G., Idziak, E.S. & Cameron, D.R. (1999). Components of  
5 the bioemulsifier from *S. Cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 96-102.

6

7 Bohn, J.A. & BeMiller, J.N. (1995). (1-3)- $\beta$ -D-glucan as biological response  
8 modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate*  
9 *Polymers*, 28, 3-14.

10

11 Bradford, M.B. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of  
12 micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
13 *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.

14

15 Cameron, D.R., Cooper, D.G. & Nufeld, R.J. (1988). The mannoprotein of  
16 *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Applied and Environmental*  
17 *Microbiology*, 54 (6), 420-425.

18

19 Chen, J.; Dickinson, E. & Iveson, G. (1993). Interfacial Interactions, Competitive  
20 Adsorption and Emulsion Stability. *Food Structure*. 12, 135-146.

21

22 Couper, A. (1993). Surface tension and its measurement. In *Physical Methods of*  
23 *Chemistry Vol IXA*; Rossiter, B.W., Baetzold, R.C., Eds.; John Wiley & Sons: New  
24 York, Chapter 1.

25

1 Dickinson, E. (1991). Competitive adsorption and protein-surfactant interactions in  
2 oil-in-water emulsions: In *Microemulsions and Emulsions in Foods.*; Nokaly, C-L,  
3 Cornell, D., Eds.; American Chemical Society, Symposium Series 448: Washington,  
4 pp 114-129.

5

6 Dubois, M.; Gilles, K.H.; Hamilton, J.; Rebers, F. & Smith, F. (1956). Colorimetric  
7 method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*,  
8 28, 349-356.

9

10 Dziezak, J. (1987). Yeast and yeast derivatives: applications. *Food Technology*, 32,  
11 122-124.

12

13 Fligner, K.L. & Mangino, M.E. (1991). Relationship of composition to protein  
14 functionality. In *Interactions of Food Proteins*: Parris, N., Barford, R., Eds.; ACS  
15 Symp. Series 54 1.

16

17 Freimund, S., Sauter, M., Kappeli, O. & Dutler, H. (2003). A new non-degrading  
18 isolation process for 1,3- $\beta$ -D-glucan of high purity from baker's yeast  
19 *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Polymers*, 54, 159-171.

20

21 Guzmán-Juárez, M. (1982). Yeast proteins. In: *Development in Food Proteins-2*, pp.  
22 263-291, B.F.J. Hudson ed, Applied Science Publishers, London and New York.

23

24 Halling, P.J. (1981). Protein-stabilized foams and emulsions. *Critical Reviews in*  
25 *Food Science and Nutrition*, 15, 155-163.

26

- 1 Hromádková, Z., Ebringerová, A., Sasinková, V., Šandula, J., Hříbalová, V. &  
2 Omelková, J. (2003). Influence of the drying method on the physical properties and  
3 immunomodulatory activity of the particulate (1→3)-β-D-glucan from  
4 *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate polymers*, 52, 9-15.
- 5
- 6 Kato, A. & Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by fluorescence probe  
7 method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica and*  
8 *Biophysica Acta*, 624(1), 13-20.
- 9
- 10 Kay, H. & Mac, R. (1979). Influence of pH and salt concentration on nitrogen  
11 solubility and emulsification properties of soy flour. *Journal of Food Science*, 44,  
12 770-774.
- 13
- 14 Kinsella, J.E. (1986). Functional properties from yeast nucleoprotein for uses.  
15 Methods for isolation. In *Food Biochemistry*. D. Knorr (Ed.) pp. 363-391. Marcel  
16 Dekker, New York.
- 17
- 18 Manner, D.J. & Meyer, M.T. (1977). The molecular structures of some glucans from  
19 the cell walls of *Schizosaccharomyces pombe*. *Carbohydrate Research*, 57, 189-203.
- 20
- 21 McClements, D.J. (1999). *Food emulsions: principles, practice and techniques*. CRC  
22 Press: New York, pp 213-220 .
- 23
- 24 Nkonge, C. & Murray Ballance, G. (1982). A sensitive colorimetric procedure for  
25 nitrogen determination in micro Kjeldahl digest. *Journal of Agricultural and Food*  
26 *Chemistry*, 30, 416-420.

1

2 Otero, M.A.; Vasallo, M.C.; Verdecia, O.; Fernandez, V.M. & Betancourt, D. (1996).  
3 A process for the complete fractionation of beaker's yeast. *Journal of Chemical*  
4 *Technology and Biotechnology*, 67, 67.

5

6 Otero, M.A., Wagner, J.R., Vasallo, M.C. García, L. & Añón, M.C (2000). Thermal  
7 behavior and hydration properties of yeast protein from *Saccharomyces cerevisiae*  
8 and *Kluyveromyces fragilis*. *Food Chemistry*, 69, 161-165.

9

10 Otero, M.A.; Wagner, J.R.; Vasallo, M.C.; Garcia, L.; Añón, M.C.; Jimenez, J.C. &  
11 Lopez, J.C. (2002). Thermal denaturation kinetics of yeast proteins in whole cells.  
12 *Food Science and Technology International*, 8 (3): 163-167

13

14 Pacheco, M.T.B. & Sgarbieri V.C. (1998). Hydrophilic and Rheological properties of  
15 Brewer's yeast protein concentrates. *Journal of Food Science*, 63 (2) 238-243

16

17 Palazolo, G.P. Sorgentini, D.A & Wagner, J.R. (2004). Emulsifying properties and  
18 surface behavior of native and denatured whey soy proteins in comparison with other  
19 proteins. Creaming stability of o/w emulsions. *Journal of American Oil of Chemists'*  
20 *Society*, 81, 625-632.

21

22 Pearce, N.K & Kinsella, J.E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation  
23 of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 716-  
24 723.

25

1 Rut, M. (1973). Determination of nucleic acids on yeast and yeast related products.  
2 *Kvasny Prumysl*, 19, 131-133.

3

4 Samat, S.K., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R. & Rege, D.V. (1993). Protein-  
5 polysaccharide interactions: a new approach in food formulation. *International*  
6 *Journal of Food Science and Technology*, 28, 547-562.

7

8 Torabizadeh, H., Shojaosadati, S.A. & Tehrani, H.A. (1996). Preparation and  
9 characterization of bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* and its application  
10 in food products. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 29, 734-737.

11

12 Voutsinas, L. P; Cheung, E. & Nakai, S. J. (1983). Relationships of hydrophobicity  
13 to emulsions Properties of heat denatured proteins *Journal of Food Science*, 48, 26-  
14 32.

15

16 Wagner, J.R. & Guéguen, J. (1999). Surface functional properties of native, acid  
17 treated and reduced soy glycinin.2. Emulsifying properties. *Journal of Agricultural*  
18 *and Food Chemistry*, 47, 2181-2187.

19

## 20 FIGURES CAPTIONS

21

22 **Figure 1:** Extraction scheme of cell wall proteins from *Kluyvomyces fragilis* cells.

23

24 **Figure 2: a)** Gel filtration chromatography of **F II** on Sephadex G-50. Column: 112  
25 x 6.5 cm. Eluant: 0.36 mol/L ammonium hydroxide. Sample: 2000 mg. **b)**

1 Subfractionation of **Fr 1** from Sephadex G-50 in Sephacryl S-300-HR. Column 100  
2 x 1.6 cm. Eluant: 0.36 mol/L ammonium hydroxide. Sample: 200 mg.

3

4 **Figure 3:** Values of surface pressure (**a**) and interfacial pressure (**b**) at equilibrium,  
5 as a function of bulk concentration of yeast fractions: Fr 1 (■), Fr 2 (●), Fr B (▲),  
6 Fr C (▼). Each value is the mean of at least three determinations. Vertical bars are  
7 standard deviation values.

8

9 **Figure 4:** Back scattering profiles of emulsions prepared with different yeast  
10 fractions: **a)** Fr 1, **b)** Fr 2, **c)** Fr 3, **d)** Fr A, **e)** Fr B, **f)** Fr C, corresponding to 1 min  
11 (—), 10 min (.....), 30 min (- · - ·) and 60 min (- - -). Tube length: 60 mm.

12

13 **Figure 5:** Creaming process of emulsions prepared with yeast fractions Fr 1 (○), Fr 2  
14 (Δ), Fr 3 (□), Fr A (●), Fr B (▲), Fr C (■). To follow the destabilization, variation of  
15 mean values of BS (%) as a function of time was analyzed from back scattering  
16 profiles. Measurement zone corresponding to 5-7 mm was indicated in Figure 4a as  
17 an horizontal bar. Maximum standard deviation was 5%.

18

19 **Figure 6:** Microstructure of emulsions prepared with Fr 1 (**a**), Fr A (**b**), Fr B (**c**).  
20 Arrows indicate insoluble aggregates and film deformation. Magnification: 100 X.

21

22 **Figure 7:** Viscoelastic modulus ( $G'$ , ■;  $G''$ , ●) of creamed layers of emulsions from  
23 Fr 1 (**a**), Fr 2 (**b**), Fr C (**c**) as a function on oscillation frequency; (**d**) Variation of  $\tan$   
24  $\delta$  ( $G''/G'$ ) of creamed layers from emulsions: Fr 1 (□), Fr 2 (○), Fr C (Δ). Standard  
25 deviation of each value is indicated as vertical bar.

26

1

2

Review Copy



1  
2  
3  
4  
5  
6**Table 1:** Composition of products obtained from *Kluyveromyces fragilis*

Composition (g/100g) <sup>a</sup>	Polysaccharide-rich debris (F I)	Cell wall proteins (F II)
<b>Kjeldahl protein</b> (N x 6.25)	3.7 ± 0.4	36.0 ± 0.8
<b>Carbohydrates</b>	88.3 ± 1.2	48.7 ± 1.5
<b>RNA</b>	2.0 ± 0.3	4.9 ± 0.7
<b>Lipids</b>	1.5 ± 0.3	6.4 ± 0.5

7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32<sup>a</sup> On dry matter basis

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10

**Table 2:** Yields of different fractions from Fraction II obtained on Sephadex G-50 chromatography. Original weight of FII was 2000 mg.

<b>Fraction</b>	<b>Recovered weight (mg)</b>	<b>Yield (g/100 g)</b>
<b>Fr 1</b>	1120	56.0
<b>Fr 2</b>	70	3.5
<b>Fr 3</b>	40	2.0
<b>Overall</b>	1230	61.5

11  
12  
13  
14  
15

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10**Table 3:** Yields of different subfractions from Fraction 1 obtained on Sephacryl S-300 HR. Original weight of Fr 1 was 200 mg.

<b>Fraction</b>	<b>Recovered weight (mg)</b>	<b>Yield (g/100 g)</b>
<b>Fr A</b>	130.0	65.0
<b>Fr B</b>	15.0	7.5
<b>Fr C</b>	10.0	5.0
<b>Overall</b>	155.0	77.5

11  
12

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9

**Table 4:** Composition (g/100g) in protein, carbohydrates, moisture of wall protein fractions obtained from *Kluyveromyces fragilis* cells.

Fraction	Total Protein, TP	<sup>a</sup> Soluble Protein	Carbohydrates, CH	TP/CH ratio	Moisture
Fr 1	62.5 ± 2.4	33.4 ± 2.0	19.8 ± 2.6	3.2	4.8 ± 0.8
Fr 2	23.2 ± 1.0	50.0 ± 14.0	33.8 ± 1.2	0.7	6.7 ± 1.1
Fr 3	31.0 ± 1.3	5.3 ± 1.5	29.5 ± 2.1	1.1	12.9 ± 1.3
Fr A	57.3 ± 6.4	3.8 ± 1.2	16.6 ± 3.2	3.4	7.1 ± 0.1
Fr B	54.3 ± 1.2	68.5 ± 5.0	15.4 ± 0.6	3.5	11.6 ± 0.4
Fr C	54.8 ± 2.3	44.8 ± 3.8	16.1 ± 2.4	3.4	3.1 ± 1.8

<sup>a</sup> Expressed on basis of total protein

10  
11  
12  
13  
14

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14

**Table 5:** Emulsifying properties of wall protein fractions obtained from *Kluyveromyces fragilis* cells. Maximum standard deviation for initial back scattering ( $BS_1$ ), oiling-off and relative cream volume ( $V_r$ ) values was 5%.

Fraction	Initial emulsion characteristics			Oiling-off (%)	Cream phase at 24 hs in quiescent condition	
	$D_{32}$ ( $\mu\text{m}$ )	$BS_1$	EAI ( $\text{m}^2/\text{g}$ )		$V_r$	Rheology behavior
Fr 1	15.2±0.2	67.5	29.8±1.2	0	0.87	weak gel
Fr 2	14.7±0.2	75.1	24.1±1.0	0	0.80	gel
Fr 3	32.3±0.3	43.6	8.7±0.5	27.9	0.56	liquid
Fr A	26.9±0.3	48.3	14.0±0.7	5.6	0.66	liquid
Fr B	14.7±0.2	68.9	37.8±1.4	0	0.88	liquid
Fr C	15.1±0.2	65.8	27.4±1.1	0	0.82	weak gel

15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

Friday , May 27, 2005

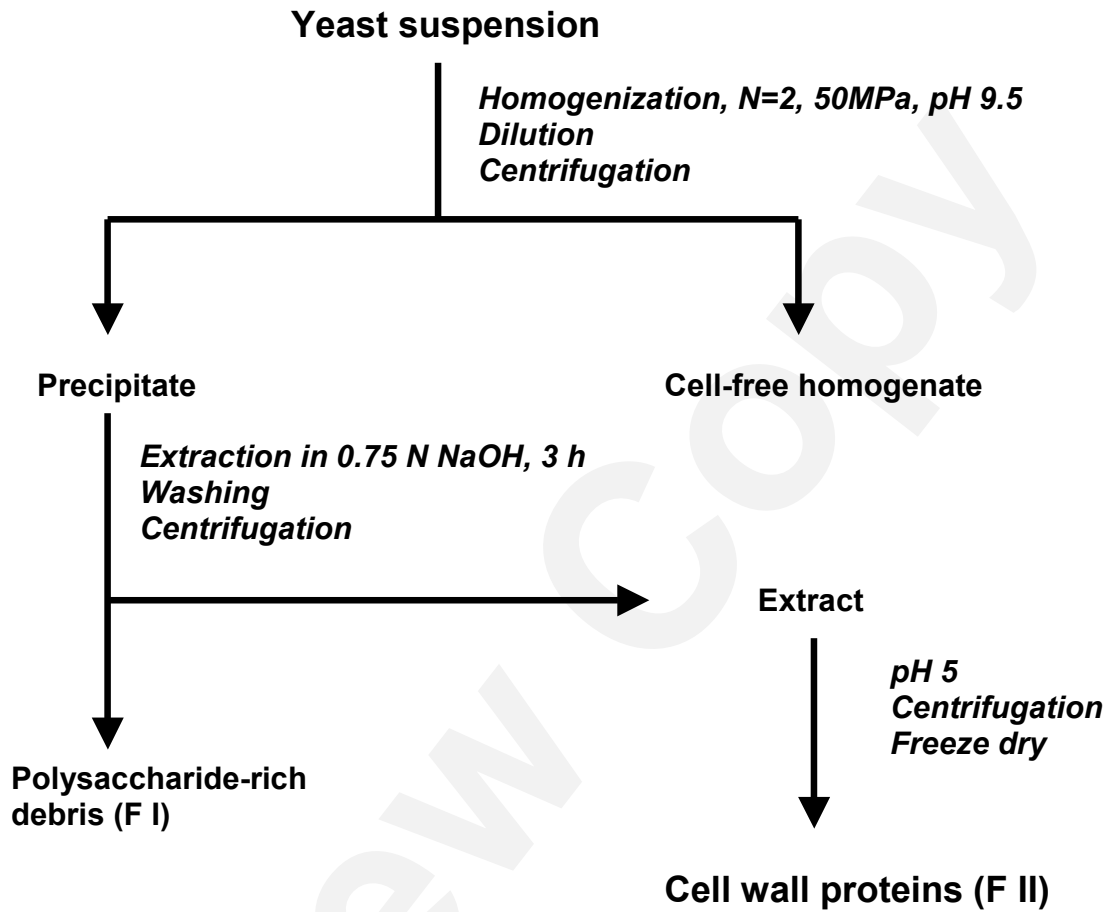


Figure 1

Figure No: 2

Legend: Figure 2: a) Gel filtration chromatography of F II on Sephadex G-50. Column: 112 x 6.5 cm. Luant: 0.36 mol/L ammonium hydroxide. Sample: 2000 mg. b) Subfractionation of Fr 1 from Sephadex G-

Friday, May 27, 2005

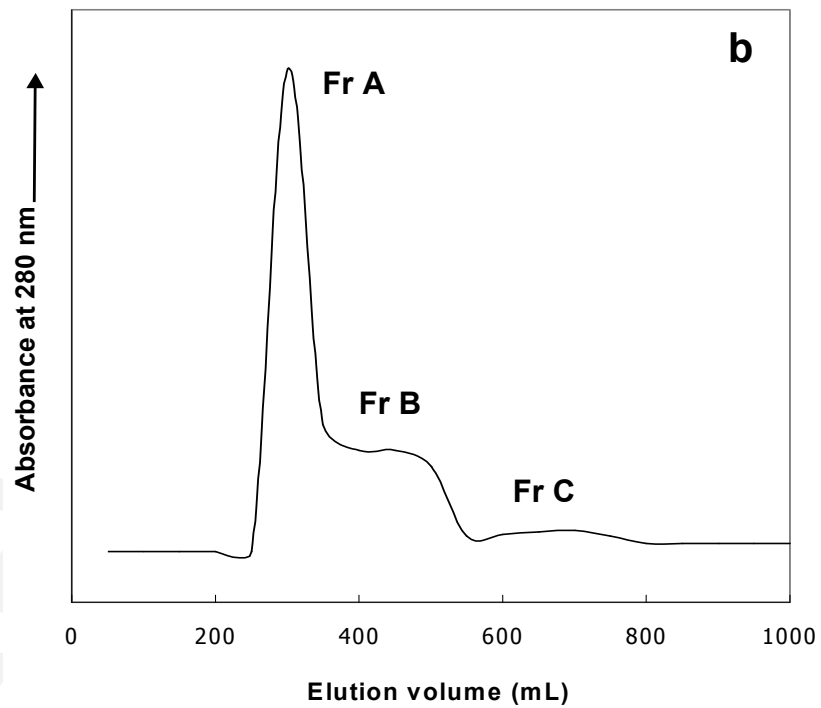
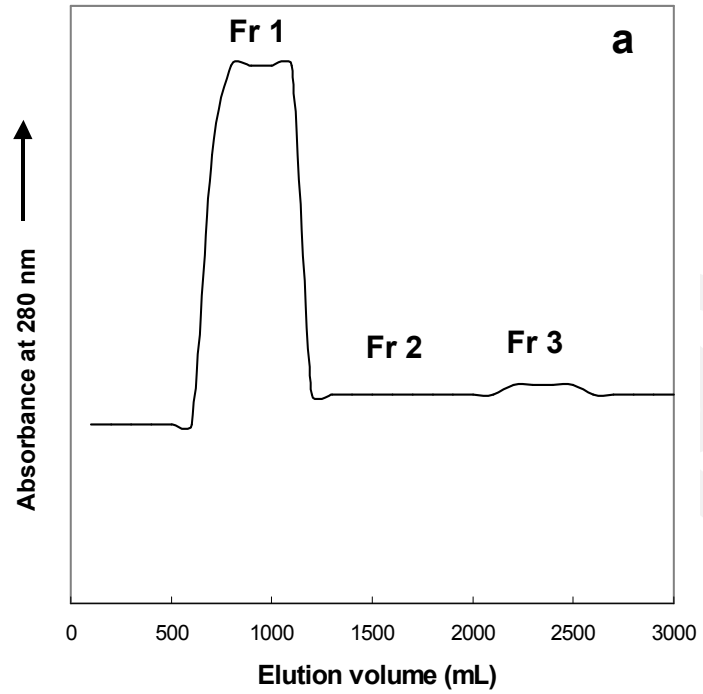


Figure 2

Legend: Figure 3: Values of surface pressure (a) and interfacial pressure (b) at equilibrium, as a function of bulk concentration of yeast fractions: Fr 1 (◻), Fr 2 (◻), Fr B (◻), Fr C (◻). Eac

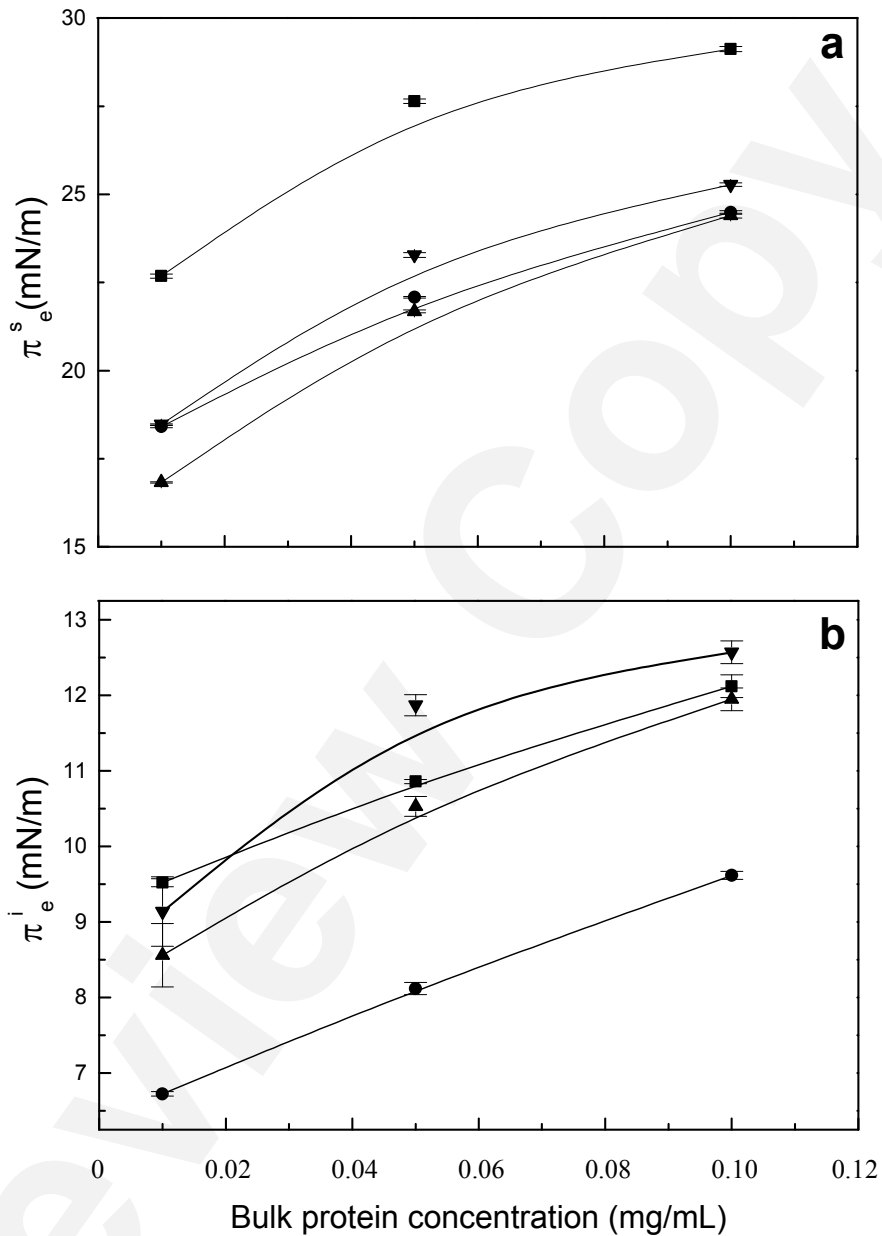


Figure 3



Figure No: 4

Legend: Figure 4: Back scattering profiles of emulsions prepared with different yeast fractions: a) Fr 1, b) Fr 2, c) Fr 3, d) Fr A, e) Fr B, f) Fr C, corresponding to 1 min (----), 10 min (....), 30 min (—)

Friday, May 27, 2005

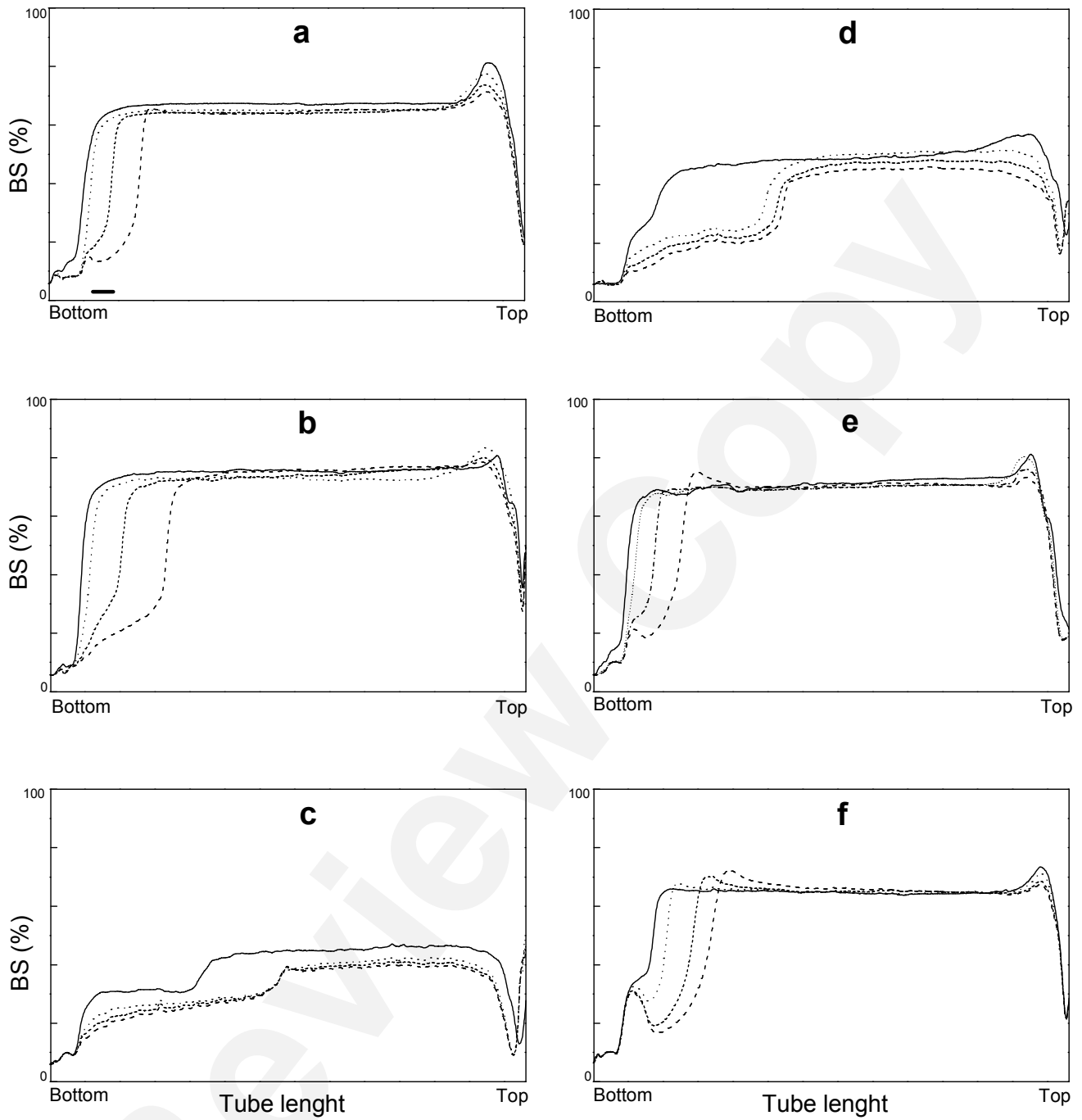


Figure 4

Legend: Figure 5: Creaming process of emulsions prepared with yeast fractions Fr 1 (&#9675;), Fr 2 D), Fr 3 (&#9633;), Fr A (&#9679;), Fr B (&#9650;), Fr C (&#9632;). To follow the destabilization,

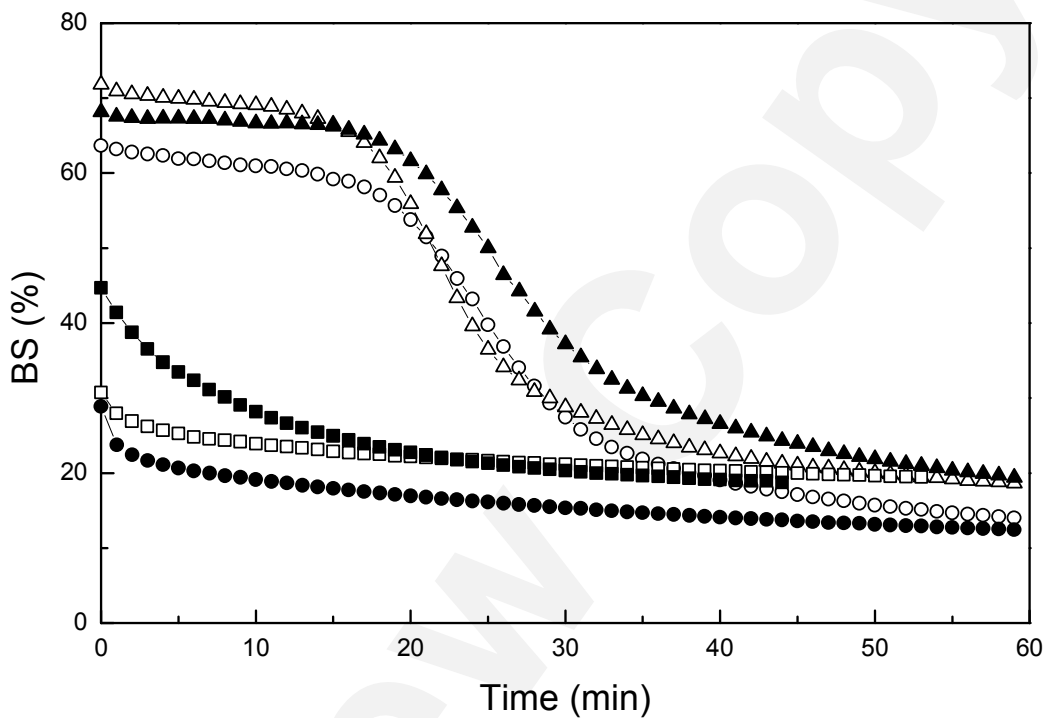


Figure 5

Figure No: 6

Legend: Figure 6: Microstructure of emulsions prepared with Fr 1 (a), Fr A (b), Fr B (c). Arrows indicate insoluble aggregates and film deformation. Magnification: 100 X.

Friday , May 27, 2005

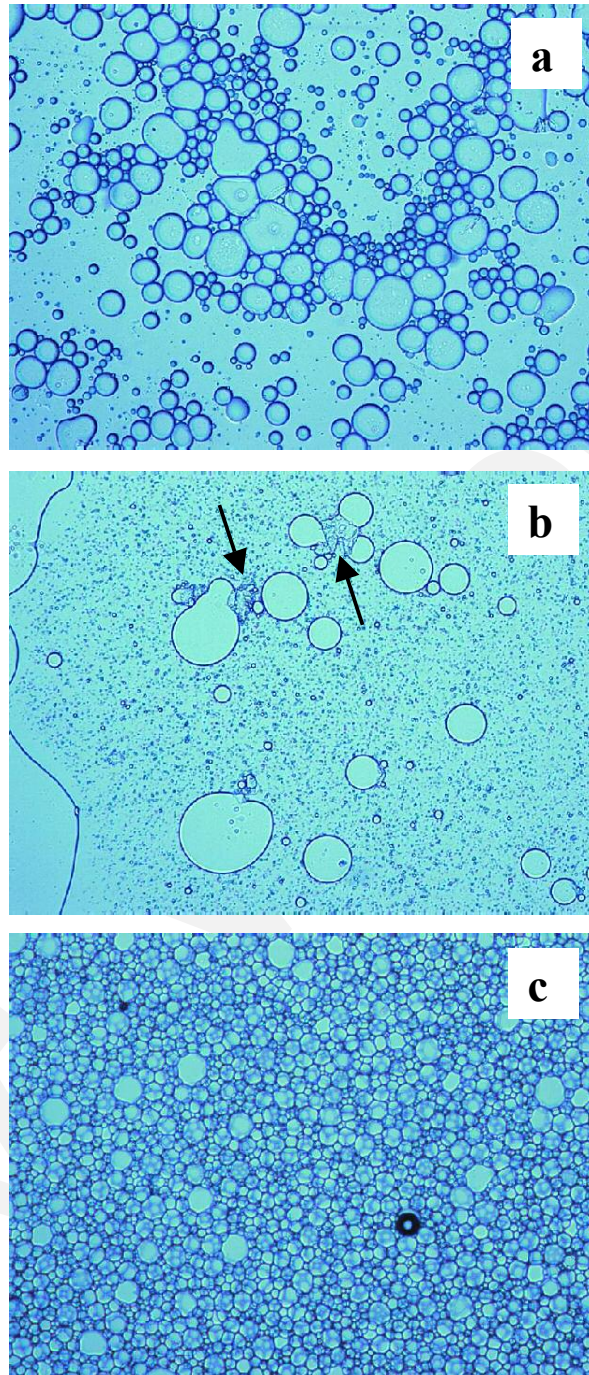


Figure 6

Figure No: 7

Legend: Figure 7: Viscoelastic modulus ( $G'$ ,  $G''$ ) of creamed layers of emulsions from Fr 1 (a), Fr 2 (b), Fr C (c) as a function on oscillation frequency; (d) Variation of  $\tan \delta$  ( $G''/G'$ )

Friday, May 27, 2005

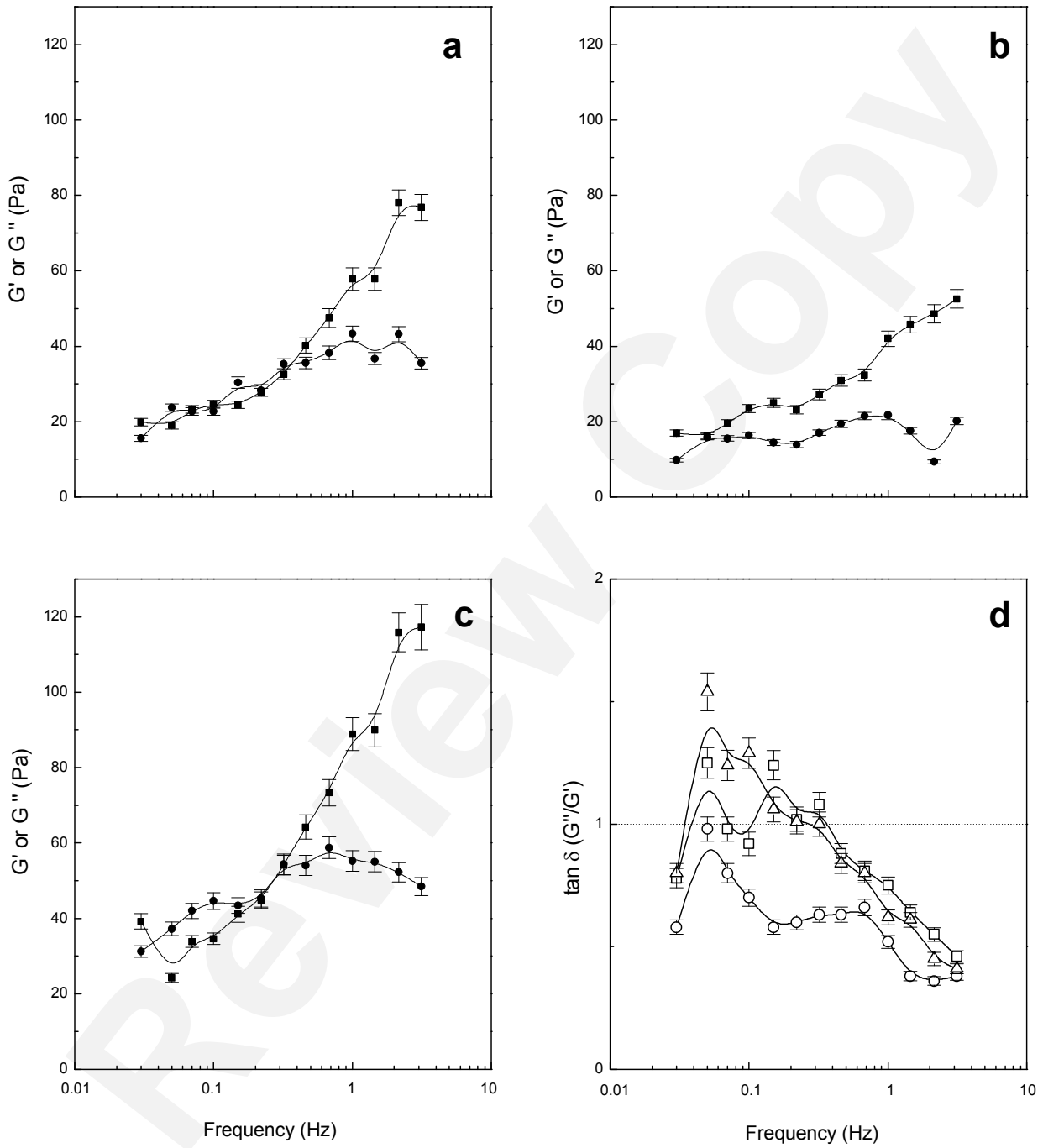


Figure 7

## CAPACIDAD EMULSIFICANTE DE PROTEÍNAS EXTRAIDAS DE LEVADURA

Karla Guadarrama Cruz<sup>1</sup>, Ma. Angeles Martínez Uribe<sup>1</sup>, Raquel García Barrientos<sup>1</sup>, Gustavo Saura<sup>2</sup>, Miguel Otero<sup>2</sup>, Jorge R. Wagner<sup>3</sup>, Araceli Tomasini Campocoso<sup>1</sup>, Isabel Guerrero Legarreta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apartado Postal 55-535, C.P. 09340 México D.F. Fax: 5804 47 12, correo electrónico: atc@xanum.uam.mx, meat@xanum.uam.mx; <sup>2</sup>Instituto Cubano de Investigaciones en Derivados de la Caña de Azúcar, La Habana, Cuba <sup>3</sup>Universidad de Quilmes, Buenos Aires, Argentina

*Palabras clave: levaduras, capacidad emulsificante, proteínas*

**Introducción.** Los procesos industriales en los que se emplean levaduras suelen dejar como subproductos levaduras residuales de posible utilización. Tal es el caso de las levaduras empleadas en la industria de producción de alcohol. Por otra parte, los emulsificantes son aditivos alimentarios de alto valor agregado. En el presente trabajo se estudiaron las proteínas extraídas de una levadura, y la capacidad y estabilidad de emulsificación del extracto proteico.

**Metodología.** Como sistema modelo se utilizó una cepa comercial de *Sacharomyces cerevisiae*, levadura instantánea producida por Tanggal Pembuata; una vez confirmada su pureza se creció en cultivo sumergido empleando el medio reportado por Campelo y Belo (2004) modificado con 30 g glucosa L<sup>-1</sup> y una solución de sulfato de zinc, cobre, magnesio y hierro, pH 5.5, en un biorreactor Applikon de 2 L incubado a 30° C, 250 rpm y una tasa de aireación de 0.006L de aire h<sup>-1</sup>. Se tomaron muestras de 10 mL, a diferentes tiempos y se determinó el peso seco. La biomasa total producida en el reactor se recuperó al final de la fermentación para extraer proteínas. Para esto, se resuspendió en un búfer de fosfatos 0.1 M, pH 7.0 y se sometió a sonicación por 30 minutos. El contenido de proteína se analizó por el método de biuret; se realizó SDS-PAGE del extracto (Laemmli, 1970), así como la capacidad y estabilidad de emulsión (Xiong y Kenny, 1999).

**Resultados y Discusión.** La mayor producción de biomasa, 4.1 g L<sup>-1</sup>, se obtuvo a las 48 h de cultivo, por lo que en ese tiempo se detuvo el cultivo y se recuperó la biomasa producida en el biorreactor. La  $\mu_{max}$  (máxima tasa de crecimiento) fue de 0.038 h<sup>-1</sup>. Se encontraron 18 fracciones proteicas en SDS-PAGE, de 12.9 a 116.9 kDa (Figuras 1 y 2), representando un intervalo muy amplio. Por tanto es posible que la capacidad de emulsificación varíe ampliamente entre fracciones. El extracto proteico mostró una alta capacidad de emulsificación, 47.2 mL/mg, superior a la de las proteínas miofibrilares (40 a 45 mL/mg), consideradas entre las de más alta capacidad de emulsificación. Sin embargo, la estabilidad de la emulsión producida fue muy corta, de 6 min, en comparación con la de las proteínas miofibrilares de cerdo, de alrededor de 75 minutos.

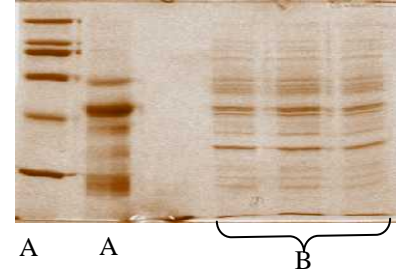


Fig. 1. SDS-PAGE de extracto proteico de levaduras: A) .marcadores; B) extracto proteico

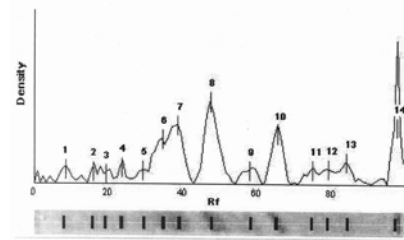


Fig. 2. Densitograma de los geles SDS-PAGE

**Conclusiones.** Los resultados obtenidos bajo las condiciones de cultivo probadas permitieron obtener 4 g biomasa L<sup>-1</sup> en 48 h, aunque al momento se están cambiando algunas condiciones de cultivo con el fin de mejorar tanto la  $\mu_{max}$  como la cantidad de biomasa producida en el biorreactor. Con esta biomasa se logró obtener una proteína de excelente capacidad de emulsificación, aunque formando emulsiones muy inestables. Debido al amplio intervalo de pesos moleculares de las proteínas presentes en el extracto, es necesario estudiar la capacidad de emulsificación en intervalos de pesos moleculares más cortos, así como el tipo de proteínas presentes, su estructura e hidrofobicidad.

**Agradecimientos.** Los autores agradecen a PNUD (Fundación Pérez Guerrero-Grupo de los 77) las facilidades proporcionadas.

### Bibliografía.

Campelo AF. y I. Belo (2004) Fermentative capacity of baker's yeast exposed to hyperbaric stress. *Biotech. Letters*. 26:1237-1240.  
Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage t4. *Nature*. 227:680-685.  
Xiong, Y.L. y Kenney., P.B. (1999). Functionality of proteins in meat products. *Proc. 52nd Reciprocal Meat Conf.* 52: 67-69.

## DE LA HISTORIA DE LAS LEVADURAS, LOS HITOS Y EL ESTADO DEL ARTE

Oscar A. Almazán del Olmo, PhD

Agustín J. Cabello Balbín, BSc

Tal vez sería posible y acertado decir a más de la Historia, “de la Prehistoria”, porque muy probablemente las levaduras existen e influyen desde temprano en la evolución de nuestro planeta, precediendo aún la consolidación existencial del propio *Homo erectus* (y después del *habilis* y el *sapiens*).

Afirmamos esto porque, si bien no se conocen fósiles de levaduras, sin embargo se han encontrado esporas **fúngicas** en materiales **fosilizados** y las levaduras muy probablemente estuvieron asociadas con ellas, **aunque** no se **hayan** reconocido.

Probablemente sea una larga espera para este descubrimiento, se han observado antiquísimas diatomeas, algas y otros microorganismos; eventualmente puede hallarse un *ascos* de levadura, quizás descansando pacíficamente en su tumba de ámbar.

El propio carácter omnipresente y omniactivo de las levaduras refuerza esta tesis que proponemos; es posible encontrarlas en los más disímiles habitats (**ref**), desde los desiertos (levaduras cactófilas) hasta la Antártida (criptococos), también asociadas a insectos, flores, frutos, suelos, plancton; junto con su ilimitada capacidad de metabolizar desde hexosas, pentosas, ácidos orgánicos, hasta hidrocarburos y hábiles en producir desde alcoholes, grasas, hasta proteínas heterólogas (**ref**), lo que las hace evidentemente capaces para haber sobrevivido no solo a las condiciones extremas de clima que experimentó este planeta como las glaciaciones, sino haber tomado parte activa en el salto acuo-terrenal de la vida y en la propia evolución hacia formas superiores de existencia.

Una de las mejores definiciones de las levaduras en general es:

“Aquellos hongos, *Basidiomicetos* o *Ascomycetos*, cuyo estado vegetativo es unicelular, que se multiplican por gemación o fisión, que pueden o no formar

esporas durante un estado sexual y que no han sido denominadas como otro tipo de hongos" (ref); a lo que añadimos "presentes en cualesquiera de los componentes animales, vegetales y minerales de este mundo nuestro".

Es inobjetable y evidente que su relación con nosotros se pierde en la memoria histórica de nuestra especie; lo que permite especular que ellas "nos esperaron", mucho para servirnos, pero también para enfermarnos.

Aquí, sin pretensiones enciclopédicas ni de alcance absolutamente abarcador, ambas de sensata imposibilidad por la propia riqueza y diversidad de la relación del hombre con las levaduras, hablaremos de los hitos de mayor trascendencia de ese vínculo en que estas fueron, desde el mismo inicio, servidores fieles del placer y el subsistir humano (el vino y el pan) y en ocasiones de su salud, mantenidos nosotros por muchos siglos desapercibidos del enorme e incansable potencial que explotábamos, originalmente consecuencia del conocer empírico derivado de afortunadas coincidencias fortuitas.

Todos coincidimos en que la posibilidad de transformar granos húmedos, jugos, etc., en embriagadores néctares ricos en alcohol, aconteció aleatoriamente. Los primeros que reportan y sistematizan elaborar y disfrutar de bebidas como el vino y comer pan fermentado fueron los egipcios ó algunas de las otras civilizaciones del fértil y creativo Creciente. Conocieron las levaduras pero no su identidad.

Lo confirma que los primeros datos históricos sobre las fermentaciones recogen que los egipcios elaboraban pan, vino y cerveza y que este conocimiento era compartido por los otros pueblos (ref) de la región con los que se relacionaban y por aquellos que habitaban naciones lejanas con que comerciaban, por ejemplo la India.

La presencia de panes se confirma por el hallazgo en Egipto de pequeños bloques planos que datan de al menos 6000 años a.e.; si una masa de trigo húmeda se deja reposar, por alguna razón, fermenta espontáneamente y el resultado será un pan fermentado "crecido" espontáneamente. El olor del pan "crecido" es similar al de la cerveza fermentada y de aquí que el empleo de la levadura residual de las cubas de las cervecerías para hacer pan fue probablemente un paso corto y obvio.



Los modelos de panaderías y cervecerías encontrados en las tumbas egipcias muestran que ambos procedimientos estaban bien establecidos al menos 4000 años antes de nuestra era.

Esta asociación de las levaduras de la fermentación del vino y la cerveza con la fabricación del pan, pudo inducir en algunas religiones la demanda litúrgica de abstenerse, en ocasiones específicas, de ingerir pan elaborado con levaduras.

Tal es el caso de la "Festividad del Pan **Ácimo**" de los judíos, para conmemorar el mes de Abib en que escaparon de Egipto, en la que se establece "No coman ningún pan hecho con levadura durante los siete días que dura este festival" (Éxodo 34.18); resultado posiblemente de considerar esa levadura recuperada de la fermentación alcohólica algo "impuro" por su origen y por tanto indigno de celebración u ofrenda divina.

No hay dudas de que la tecnología de la fabricación de bebidas alcohólicas, desconociendo el agente de fermentación, fue bien desarrollado por las civilizaciones tempranas. La elaboración de vinos se confinó naturalmente a aquellos países donde el clima favorecía el cultivo de uvas, como Francia, Italia, España, entre otros; sin embargo los sombríos bosques alemanes y sus descampados campos brindó una ventaja a los cultivadores de cebada sobre los viticultores y las tribus germánicas que combatieron a los romanos bebían cerveza. La producción de cerveza se desarrolló con rapidez en las condiciones climáticas de Inglaterra, los Países Bajos y Escandinavia, al igual que en Alemania. En Escocia, con **un** aún más inclemente y desapaciblemente frío que en Inglaterra, sus naturales prefirieron una bebida más ardiente y produjeron el whisky de fuerte sabor.

Por su parte la caña de azúcar, que realiza un largo viaje de casi 30 siglos desde sus orígenes en Nueva Guinea, a la India, desde donde las tropas de Alejandro Magno la llevan a Persia, más tarde a Siria y de allí los árabes en sus conquistas la trasladan a Egipto, África del Norte y toda la cuenca del Mediterráneo y España; en Sicilia se cultiva y se produce azúcar de caña en el Medioevo los barcos portugueses la llevaron a Madeira y los españoles siguen el ejemplo levándola a



Canarias, desde donde Cristóbal Colón en 1493 la trae, en su segundo viaje descubridor, a América, a Santo Domingo (La Española) en el Caribe. A mediados del siglo XVI los portugueses la introducen en Sudamérica, en Brasil.

En este recorrido desde su origen la caña fue acompañada por la práctica de fermentar su jugo y sus coproductos para obtener bebidas de muy diferentes características y contenido alcohólico.

Pero fue en América donde se materializa la institucionalización del producto paradigmático de la fermentación alcohólica de los productos de la caña de azúcar: el ron.

Aunque parezca sorprendente no fue en las Antillas donde se realizan las grandes producciones de ron a partir de las mieles de la caña de azúcar en el siglo XVIII, sino en las Trece Colonias inglesas de América del Norte, principalmente en Pennsylvania, a partir de las mieles finales importadas, primero de las West Indies ó Antillas Inglesas y después de Cuba.

Esta bebida adquiere en pocos años una curiosa, especial y "distinguida" connotación, cuando su Majestad Británica hace mandatorio en el siglo XVII, que cada marino de su armada tenga derecho a recibir una ración diaria de ron, (curioso, no era de whisky sino de ron de caña).

En ninguna de estas producciones de bebidas fermentadas se había apreciado que todo dependía de un organismo vivo -las levaduras.

La primera persona que realmente vio una célula de levadura, a través de su inusual microscopio, construido de una sola y pequeña esfera de cristal pulido fue el holandés Antonie van Leewenhoek a mediados del siglo XVII. Observó cuerpos globulares, redondos u ovals, en una gota de cerveza fermentada- los que designó como "pequeños animalucos".

Fue Erxleben en 1818 quien expresó por primera vez su punto de vista, de que la levadura era un organismo vivo, responsable de la fermentación. Cagniard-Latour en Francia en 1835 y Schwann y Kutzing en Alemania en 1837 observaron la presencia de organismos unicelulares en el sedimento de las cubas de

fermentación y aunque los organismos no fueron identificados, expresaron que la fermentación era el resultado de su actividad durante el crecimiento.

Finalmente Louis Pasteur en 1857 en sus trabajos "Etudes sur la Biere " y "Etudes sur le vin" (Estudios sobre la cerveza y Estudios sobre el vino) mostró que la presencia de estos organismos era esencial para el proceso de fermentación. Sin ellos, señalaba, la fermentación no ocurre y si otros microorganismos, morfológicamente diferentes, están presentes, no tiene lugar la fermentación deseada y los vinos se deterioraban. Pasteur dio el golpe final a la idea de la generación espontánea como una teoría viable. En 1876, en su Tratado "La fermentation est la vie sans air", describe además el metabolismo fermentativo (y respiratorio).

Estas conclusiones de Pasteur no fueron aceptadas inmediatamente, a ellas se opusieron violentamente Liebig y Wohler y su escuela de químicos (ref), manteniendo el criterio de que las fermentaciones eran el resultado de reacciones puramente químicas, ridiculizando la idea de un organismo vivo como responsable de ellas.

¿Puede alguien decir que Liebig estaba totalmente errado?

Hoy es conocido que la fermentación y la formación de nuevas células proceden a través de una serie de reacciones, catalizadas por enzimas, dirigidas tanto a la formación de etanol a partir de glucosa, la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares. Todas estas reacciones controladas por la acción coordinada de series de enzimas, formadas por otras enzimas, cuyas acciones están codificadas y controladas totalmente por instrucciones derivadas de compuestos químicos. Tal vez Pasteur y Liebig estaban ambos acertados.

Por el mismo tiempo, Hansen en Dinamarca, investigaba la naturaleza de las levaduras de cervecería y panadería. Hizo numerosos aislamientos de cultivos puros de levaduras del género *Saccharomyces*, no obstante en ese tiempo los cerveceros preferían mezclas de cepas por ser menos susceptibles a posibles variaciones.

Hansen estudió por 30 años las características morfológicas y fisiológicas de las levaduras y estableció en 1896 el primer sistema comprensible de taxonomía de las levaduras (**ref**).

Algo después los Buchner hicieron extractos de levaduras libres de células, moliendo levaduras con tierra de diatomeas. Su preparado "en zyme" (significando "en levadura", término acuñado en 1897 por Buchner) era capaz de generar dióxido de carbono a partir del azúcar. El término enzima se adoptó para describir proteína aislada de materiales vivos, que pueden, en ausencia de las células que las originan, catalizar un cambio en el sustrato a productos en condiciones fisiológicas.

Poco después Eduard Buchner (1860-1917), químico alemán, galardonado con el Premio Nobel de Química por su descubrimiento de que el líquido obtenido después de triturar la levadura con fina arena de cuarzo tenía, cuando se filtraba, las mismas propiedades que la levadura activa a los efectos de producir la fermentación de los azúcares. Este experimento demostraba que la fermentación era el resultado, no de una acción fisiológica producida dentro del organismo de la levadura, sino de una acción química causada por una sustancia segregada por la propia levadura. Esta sustancia, descubierta por Buchner en 1897, se llamó zimasa, y los derivados químicos de origen y acción fisiológica similar se llaman enzimas (Biblioteca de Consulta Microsoft ® Encarta ® 2005).

Aquí debemos comenzar a especificar la historia de la levadura que era separada, una vez concluida la síntesis del etanol, por medios muy diversos, todos característicamente artesanales; en la segunda mitad del siglo XVIII apareció en Europa esta producción, que se realizaba filtrando, mediante una tela, los fondos de los fermentadores de cerveza, exprimiéndose manualmente para eliminar los restos del licor fermentado, resultando de ello una pasta de levadura semiprensada que era vendida a los panaderos. El sabor amargo que le impartía el lúpulo resultaba un inconveniente.

Un hito lo constituye, sin dudas, que todas las referencias estudiadas indican que la producción de levadura se estableció como industria independiente a fines del

siglo XVIII, realizándose por primera vez las fermentaciones con el propósito único y directo de obtener el microorganismo. Esto hizo preciso desarrollar sistemas más efectivos de recuperación de la levadura, que redujeran las pérdidas propias del sistema de filtrado y “exprimido” manual. En 1828 se instaló por Trebbenhoff la primera prensa de palanca (ref).

En los inicios del siglo XIX Mantuer (ref) introduce el empleo del maíz como sustrato para la fabricación de levadura panadera en sustitución del centeno que era más caro. Es interesante que el enorme interés que despertó esta tecnología desatara el surgimiento del “espionaje industrial”, al punto de que el holandés Huarbren de Delft reconociera públicamente que se introdujo en la fábrica de Mantuer, vestido con uniforme de obrero, para conocer el proceso (ref).

En el período entre 1850 y 1870 tiene lugar una acelerada multiplicación de las fábricas de levadura panadera; se presentan numerosas patentes para los procesos de fermentación y separación, hasta que en 1867 aparece el Filtro Prensa para la recuperación de levadura inventado y desarrollado por A. L. G. Delme en Halle.

Resulta especialmente interesante conocer que fue el sistema de impuestos de la época, más que los estudios técnico-científicos el promotor de los cambios tecnológicos más importantes. Así, hasta ese momento de la historia la producción de levaduras se realizaba anaeróbicamente, sin embargo, fueron los severos gravámenes sobre la producción de alcohol en exceso los que promovieron la aplicación del aire y no los estudios acerca del metabolismo celular. Similar circunstancia motiva los esfuerzos en la búsqueda de mayor productividad volumétrica en razón de que los impuestos se aplicaban en correspondencia con el tamaño de los fermentadores.

Todo indica que el primer productor de levadura aeróbica fue el inglés K.W. Howman en 1896, desarrollo respaldado por trabajos científicos de von Maercker, Delbrick, Hayduck, Hausen y otros (ref).

La tecnología del cultivo aeróbico de levaduras pasa de Inglaterra a Holanda, Dinamarca, Suecia y por último a Alemania, curioso circuito movido por razones

político-militares, promoviéndose en estas dos últimas, en el cambio del siglo XIX al XX la aparición de las separadoras centrífugas para la recuperación de las levaduras producidas, fabricadas por las firmas -Laval y Wesfalia respectivamente. La primera patente que ampara el empleo de las melazas como sustrato para la fabricación de levaduras aparece en Austria en 1895.

Por otra parte, los trabajos de Delbrick en ese período fueron los que iniciaron la alternativa de empleo de las levaduras como fuente proteica para uso forrajero, pero también como opción en la alimentación humana. En la misma época fue Hemenberg el primero en reconocer "que las levaduras salvajes del género *Torulopsis* en medios de melazas diluidas y fuertemente aireadas producían cantidades mínimas de alcohol, crecían a alta velocidad y asimilaban perfectamente fuentes inorgánicas de amonio" (ref). Este tipo de levadura por su utilidad recibió el nombre de *Torulopsis utilis*.

En la primera década del siglo XX se produce también un sólido desarrollo de los sistemas de aireación, unos rotatorios de diferentes diseños, otros de cuerpos porosos, así como sistemas combinados, todo en la búsqueda de una eficaz transferencia de oxígeno, con costos energéticos razonables.

Se abre así un camino nuevo, diferente del que transitaron por siglos, sin rivales, las levaduras del género *Saccharomyces* como productoras de bebidas y panes; comienza el de *Torulopsis* y *Candida*, que no debe entenderse como alternativo ó excluyente, sino que la historia ha mostrado como complementario.

La crisis alimentaria originada por la I Guerra Mundial hace que se apele a la *Candida utilis* y a la *Saccaromyces cerevisiae* como fuente alternativa de alimentos para la población, no solo en Europa sino también en el Caribe. Se reporta la entrada en operación de varias fábricas que alcanzan una capacidad de producción de 10 000 toneladas por año. En 1916 las instalaciones europeas tuvieron que detener la producción al agotarse las fuentes de melazas, las antillanas las fabricaron hasta el final de esa conflagración mundial.

Las experiencias acumuladas -tanto positivas como negativas- de esta primera tentativa de producción masiva de proteína unicelular para uso humano propició el

retorno entre 1934 y 1935 del tema de las **proteínas unicelulares** (PUC) en Alemania; mientras en esta oportunidad Scholler, Leidel y colaboradores llevan el liderazgo de los desarrollos técnicos de la recuperación centrífuga y el secado del producto vía tambores rotatorios; Fink, Lechner y su equipo enfocan los aspectos científicos (**ref**), especialmente el empleo de nuevas materias primas más baratas y de mayor disponibilidad, lo que permite conocer que diferentes especies del género *Candida* pueden metabolizar pentosas, lejías sulfíticas residuales, vinazas de destilerías, prehidrolizados de paja, etc.

En esta década del 30 del siglo XX se desarrollan procesos de aireación de alta efectividad en la transferencia de oxígeno en el complejo sistema sólido (levadura)- líquido (sustrato)- gas (aire) , como los equipos de los sistemas Scholler/Seidel, Waldhof/Clan y el Phrix basados en ingeniosas soluciones ingenieriles.

El período de los primeros 45 años del siglo XX acumula un inmenso volumen de datos científicos y comerciales vinculados a las técnicas de producción, recuperación, formulación y conservación de las levaduras tanto destinadas a la alimentación humana y animal como las dirigidas a la fabricación de bebidas y la panificación. Para estas últimas las levaduras prensadas, de 27-33 % de materia seca, que deben ser almacenadas a 4 °C, donde pierden 5-10 % de viabilidad semanalmente, que obliga a que tengan que ser empleadas dentro de los 30 días posteriores a su fabricación y que tengan que ser transportadas bajo refrigeración se produce a fines de la década del 50 del pasado siglo el salto cualitativo del desarrollo y generalización de la fabricación de las "levaduras secas activas", que mediante una *pelletización* previa de la masa celular, seguida de un secado a bajas temperaturas en equipos de lecho fluidizado permiten obtener pequeños *pellets* o esferas de menos de 7 % de humedad, con plena actividad metabólica, altamente estables, que no requieren refrigeración y pierden apenas un 1 % de actividad por mes en condiciones de almacenamiento a temperatura y humedad ambiente. Muy útiles tanto para pequeñas como grandes panaderías, para la fabricación doméstica de pan y su viabilidad es tan alta como  $2,2-2,5 \times 10^{10}$  levaduras viables

por gramo; resultando que la técnica tradicional de conservar una porción de masa panadera fermentada para iniciar la próxima lote se ha olvidado ya en el arte de hacer pan.

Estos beneficios a la industria panadera se están extendiendo a la industria cervecera, enológica y de producción de alcohol etílico; ya se fabrica levadura seca activa para cada una de esas industrias y esto constituye, sin dudas, un importante punto de cambio en lo actual y en lo futuro de la aplicación industrial de las levaduras.

Un trascendental y nuevo hito en la evolución de las biotecnologías, que impactó notablemente el desarrollo de la producción de las levaduras, tiene lugar como consecuencia de que terminada la II Guerra Mundial, cuando se hace necesario encontrar un agente bactericida de más amplia actividad que las sulfas, la penicilina (que dormía desde 1928) resultó exactamente lo que todos buscaban.

Antes de la fermentación de la Penicilina los requerimientos de la pureza de los cultivos en los procesos de fermentación no se controlaban estrictamente. En la producción de alcohol la concentración de productos eran suficientemente altas para deprimir el crecimiento de la mayoría de los contaminantes y los procesos empleados para fabricar levadura eran favorecidos por condiciones de valores de pH y dinámica de crecimiento menos apropiados para los microorganismos ajenos. Así los ingenieros debieron -para fabricar la penicilina- enfrentar el diseño y operación de fermentaciones de cultivos puros, en fermentadores intensamente aireados, que eran ambiente ideal para el crecimiento de contaminantes oportunistas.

Además de diseñar una operación de fermentación aséptica, los ingenieros debieron también diseñar sistemas de compresión y suministro de aire y métodos eficientes de agitación y aireación de la fermentación.

Las reacciones metabólicas de los microorganismos son exotérmicas y se desarrollaron métodos para mantener la temperatura en los fermentadores dentro de un estrecho rango. Igualmente, se encontraron y resolvieron otros problemas de instrumentación y control de procesos.

Este desarrollo marcó, en mi opinión, el inicio de la verdadera ingeniería bioquímica. Y sus resultados impactaron inmediatamente la producción de levaduras y sus industrias relacionadas.

El resultado es un período especialmente activo, en la década de los 60, de fermentadores más eficientes, sistemas de purificación de materias primas, la diversificación de los substratos, para posibilitar la expansión exponencial de sus volúmenes de producción, métodos de separación, termólisis y secados de alto nivel tecnológico, dirigidos no solo a obtener levaduras no solo en cantidades masivas, sino con muy reducidos niveles de pérdidas, con una seguridad real de su pureza, en modo más efectivo, confiable y a menores costos.

Hace aproximadamente 50 años, y tal vez como consecuencia indirecta de los desarrollos mencionados, se hizo cada vez más evidente que era necesario trabajar con sistemas bien definidos, que pudieran ser controlados con precisión.

Una de las alternativas fue la transición de procesos discontinuos, cerrados, de simple etapa o cíclicos (como la alimentación incrementada aplicada desde los años 20), a procesos "abiertos" y totalmente de flujo continuo.

Solamente en un sistema "abierto", de flujo continuo, se puede alcanzar el "estado estacionario" y bajo estas condiciones constantes puede controlarse total e intencionadamente el proceso en su integralidad.

Los procesos continuos de fermentación combinan cuatro características de la producción industrial moderna: alta productividad con respecto a la utilización de la capacidad instalada, y el empleo de la fuerza laboral, la comprensión fundamental de los procesos y consecuentemente su pleno control, la posibilidad de su automatización integral y altos rendimientos en la conversión de las materias primas.

El cultivo de flujo continuo representa, por tanto, un mayor nivel técnico y la base de la transición desde los procesos empíricos al genuino control científico.

El cultivo continuo fue un hito, de enorme trascendencia en el desarrollo de la biotecnología industrial en general y de las levaduras en particular.



Ambas piezas claves, que se materializan entre los años 50 y 60 del pasado siglo transformaron el mundo de la producción de levaduras.

Se desarrollan grandes sistemas de fermentación, de elevada productividad volumétrica y altas capacidades unitarias: Lefrancois, , Schoeller Bleckman, Sulzer, Mitsubishi, con diversas formas de aireación y homogenización, con y sin agitación mecánica, diseñados para dos alternativas: altas y bajas concentraciones celulares en el estado estacionario, capaces de asegurar niveles de aireación superiores a 1,2 volúmenes de aire por volumen de medio por minuto (vvm) y productividades de 1,5 a 4,5 kg de masa biológica por metro cúbico de fermentador por hora, con intensidades de aplicación energética de 0.4 a 0.5 kwh por kg de levadura.

Las fábricas se diseñan con sistemas termoquímicos y de purificación centrífuga del sustrato, procesos de evaporación de película descendente ó ascendente, termolización de la levadura, secado por atomización y sistemas de envase altamente productivos, con niveles muy elevados de automatización y alternativas de control químico y biológico novedosos de alta confiabilidad.

En el desarrollo de las levaduras en la década del 70 y 80 del pasado siglo, es posible identificar tendencias muy claras, caracterizadas por la elección de las materias primas y el destino del producto.

Una **tendencia** liderada por la British Petroleum, a la que se sumaron los consorcios petroquímicos franceses, italianos, rumanos y soviéticos, que aprovechando la prevalencia de precios reducidos del petróleo crudo (de menos de \$ 2.00 US\$/barril) se proponía la producción, empleando *Candida sp.*, de concentrados proteicos a partir de parafinas.

La BP instaló y operó entre 1975 y 1980 una planta semicomercial de capacidad de 10 t por día, que evidenció la viabilidad de producir levadura seca con 45 % de proteína verdadera, comprobando además de su uso en la dieta porcina y avícola, a más de estudios iniciales de toxicidad aguda en humanos con resultados alentadores. Estas investigaciones de la BP, a una escala significativamente alta que prometía un exitoso escalado de los resultados, fueron complementados por estudios realizados por la Total, la Agip e instituciones científicas de Rumania y la

entonces Unión Soviética, en esta específicamente en la República Federativa de Rusia.

Estas iniciativas preveían el empleo de las levaduras obtenidas para la alimentación humana alternativa, de bajo costo, para países subdesarrollados muy pobres y como base proteica de los forrajes de animales monogástricos. En la década del 80 se erigieron instalaciones fabriles en Inglaterra, Francia, Rusia, entre otros, de capacidades cercanas a las 200 000 TM de levadura seca por año.

El diseño e ingenierización de plantas de tales dimensiones resultaron en apreciables contribuciones a la industria de las levaduras, en la forma de nuevos diseños de fermentadores, diversidad metabólica, usos novedosos de substratos, métodos de alcanzar aireaciones que asegurarán crecimientos estrictamente aerobios y una extensa información sobre la alimentación con PUC a hombres y animales.

No obstante la fabricación de proteína unicelular a partir de aceites, parafinas, metanol, metano, etc, concluyó prácticamente en los primeros años de la década del 90 con el cierre de la casi totalidad de las facilidades en todo el mundo.

Las razones fundamentales: el incremento del precio del petróleo crudo y la confirmación de la presencia de residuos carcinogénicos en la PUC producida de parafinas y aceites.

Otra tendencia de producción de levadura, muy vigorosa en la década del 70, especialmente en Europa del Este, era la obtención de licores ricos en carbohidratos a partir de la hidrólisis química, a altas temperaturas y presiones, de residuos lignocelulósicos, que se empleaban como substratos para el crecimiento de levaduras de diferentes géneros y especies.

La valoración económica hizo evidente a la larga, en la propia década del 80, la inviabilidad comercial de esta alternativa, que se extinguió **con la desaparición del campo socialista.**

Una tercera línea, iniciada en modo comercial a finales de la década del 70 del siglo XX, fue la producción masiva de PUC empleando mieles finales del proceso de

producción de azúcar de caña. Proceso altamente viable, capaz de rendir una PUC de estructura y características especialmente sana y de confiabilidad elevada.

Cuba resultó la individualidad que con mayor desarrollo esta alternativa en el período de 1975 a 1990 con la instalación de 10 fábricas, capaces de alcanzar, en conjunto, 120 000 t/año de levadura seca con más de 45 % de proteína verdadera y 92 % de humedad. El proceso, diseñado por científicos cubanos, junto a la tarea de diseño, erección y puesta en operación estable por casi dos décadas, propició la obtención de una cultura tecnológica, que en los años iniciales del siglo XXI permitió la rápida implantación comercial exitosa de una tecnología para la producción, en esas mismas instalaciones fabriles, de levadura para uso forrajero empleando como substrato, en sustitución de las mieles finales de caña, las vinazas residuales de la producción de alcohol etílico, con un innegable impacto económico, social y ambiental.

No quedaría completa la imagen del quehacer histórico de los esfuerzos y los destinos de producir levadura alimentaria si no mencionamos los reiteradamente fallidos esfuerzos de I&D iniciados en la segunda mitad de los años 60 del pasado siglo, para lograr un proceso viable técnica y económicamente para la conversión en biomasa proteica los residuos celulósicos mediante la simultánea sacarificación biológica y síntesis celular, originados en la Universidad Estatal de Louisiana , que finalmente se desvanecen en los años finales de los 80, sin concreción práctica, pero que para mi resultan aún hoy una alternativa atractiva, quizás en espera de un momento propicio.

Volvamos un poco atrás. Un hito científico de indiscutible y extraordinario impacto sobre toda la Ciencia de la Vida resultó cuando en abril de 1953 Watson y Crick presentaron su teoría acerca de la estructura molecular de los ácidos nucleicos y el mecanismo de copiado para el material genético con sus tres principales procesos: replicación, transcripción y transducción. **El sueño** de bioquímicos, biólogos e ingenieros bioquímicos de poder “diseñar a la medida ó “pedir a la orden” microorganismos, mediante la ingenierización de sus códigos genéticos y transformar sus procesos metabólicos, **se convirtió en realidad**.

Esto abrió la posibilidad de hacer que microorganismos simples, con reducidos requerimientos energéticos y de procesos y elevadas tasas de reproducción, fueran capaces de sintetizar valiosos y complejos productos, con mayores rendimientos y productividades y dramáticamente bajos costos de producción

Desde entonces el empleo de levaduras en la biotecnología ha aumentado a un ritmo cada vez mayor. La razón es clara, las levaduras poseen ventajas ciertas sobre las bacterias para la producción de proteínas heterólogas y casi cualquier proteína, sintetizada por un gen suficientemente pequeño para poder ser incluido en el genoma de una célula de levadura, pudiendo ser así sintetizado por la levadura y excretado si se desea.

Recientemente, hace apenas 10 años, han ocurrido dos importantes desarrollos: la inclusión de secuencias de DNA cada vez más largas en cromosomas artificiales de levaduras y su transformación en levadura y el uso de otras levaduras además de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de proteínas heterólogas. Especialmente las levaduras metilotróficas, *Pichia pastoris*, *Hansenula polimorfa* y algunas otras, muestran grandes promesas; mediante la síntesis de las proteínas deseadas por un gen sustituido por aquel para alcohol c oxidasa en el genoma de la levadura e inducido entonces mediante el cambio de la fuente de carbono a metanol, puede sintetizar con mucho más altos rendimientos la proteína razonablemente pura.

Pero no olvidemos que el uso de las levaduras en biotecnologías, para este y otros propósitos, está en su infancia.

## **DEL ESTADO DEL ARTE Y ALGUNAS TENDENCIAS RECIENTES**

A más de lo dicho hasta aquí, los últimos años del siglo XX y los primeros del XXI muestran tendencias realmente interesantes y de innegable utilidad en la acción y relación levaduras –hombre. como se verá de modo muy claro y preciso en los Capítulos siguientes de esta Monografía.

Las levaduras se emplean actualmente para la producción comercial de cantidades relevantes de alcohol dehidrogenasa, gliceraldehído-3-hidrogenasa, hexoquinasa,

lactato hidrogenasa, glucosa-6-fosfato hidrogenasa, así como Coenzima A, nucleótidos difosfopiridinos y mono, di y tri-fosfatos de adenina, guanina, citidina y uridina. Tres enzimas derivadas de las levaduras, que tienen un apreciable significado comercial, se emplean en modo creciente: la invertasa, la lactasa y la melibiasa.

Cada vez más, en estos inicios de siglo, las levaduras muestran habilidades –que inteligentemente aprovechadas– tienen un indisputado espacio en la salud, la nutrición y la producción industrial.

Ejemplo de esto es la propiedad de las levaduras de acumular cantidades variables de los minerales presentes en su medio de cultivo; por tanto el contenido de minerales de células de levadura cultivadas en un medio particular de propagación puede ser ajustado para resultar de significación como suplemento de salud ó nutricional para animales y humanos.

Un ejemplo de esta técnica, que ha recibido especial atención desde alrededor del año 2000, es el empleo de levaduras para obtener Selenio orgánico para ser empleado como suplemento alimenticio debido a su similitud con la forma en que este elemento se encuentra en la naturaleza, lo que lo hace más disponible para un útil metabolismo y acumulación. Este Selenio orgánico de las levaduras es digerido y metabolizado por la vía de las mismas rutas de los aminoácidos azufrados y es especialmente apreciado por su papel en el incremento del valor nutricional de los productos de origen animal para los humanos, así como en la relación en la elevación del contenido de antioxidante mineral en la dieta del hombre..

Otro caso similar ocurre con el Cromo, constituyente activo del Factor de Tolerancia a la Glucosa ( GTF por sus siglas en inglés ) que resulta un cofactor necesario para potenciar insulina en la glucosa que se mueve de los tejidos circulatorios a los periféricos, también la deficiencia de Cromo se asocia con la pobre respuesta inmune en animales, especialmente sujetos a condiciones de estrés, su suplementación puede aumentar la efectividad de las vacunas y/o reducir la incidencia de enfermedades. La potenciación inmune en animales de

granja con la suplementación de minerales y vitaminas es una ciencia naciente y aquí tienen las levaduras un espacio indisputado.

El papel de las levaduras en la vía del Hidrógeno como opción cierta y de mayor evidencia de viabilidad, para el establecimiento de una alternativa de solución, ecológicamente segura, a la crisis energética, es cada vez de mayor significación y trascendencia.

Hoy y mañana el impacto de las levaduras en la solución de los problemas básicos de la humanidad: la alimentación, la energía y la protección del entorno, pasan de ser quimeras y resultar realidades, que no por tener un origen que se pierde en la memoria de la raza humana, dejan de sorprendernos hoy y que nos sorprenderán cada día más en el futuro.

En los Capítulos siguientes de esta Obra veremos ejemplos tangibles de la acción de esos útiles, incansables e impredecibles organismos.

No es arriesgado profetizar que las siempre crecientes necesidades de la humanidad, serán sin dudas satisfechas, en buena medida, por las ilimitadas posibilidades de estos microorganismos y el talento del hombre.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Almazán, O. Et al (1982) Sources of raw materials and microorganisms used for the production of single cell proteins.

Scientific Publication House, Havana, Cuba ( Span.)

Almazán, O. (1988) The sugar cane agroindustry and the challenges of the future. Lecture. Univ. De Oriente, Santiago de Cuba. (Span.)

Almazán, O. (1994 a). Notes for a strategy in the energetic development of the sugar cane industry. Proceedings of the IV Congress of ATALAc. Guatemala City.

Almazán, O (1994 b). Past, present and future of the byproducts of the sugar industry. S.N. Gunderao Memorial Lecture, Pune, India.

Almazán, O. (1997). Applied Biotechnology: The State of the Art. Proceedings of the XXII Congress of the ISSCT, pp 23-28, Cartagena, Colombia.

Blanco, G. (1989). Integral economic evaluation of alternatives in the uses of sugar cane molasses. Ph.D thesis. Univ. Central, Villa Clara, Cuba. (Span.)

Blanco, G. & Herryman, M. (1993)The sugar industrial integration in Cuba. Alternatives for the agroindustrial development. Univ Autónoma de Chapingo, México, pp 227-235.

Sugar Industry Abstracts. (1990- 2004). A reviewInternatinal Sugar Organization Year Book. (1998-2003) A review.

I

## **CAP 1 ESTRUCTURA CELULAR Y FUNCIONES**

Roxana García MSc

Dirección de Biotecnología, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).

### **INTRODUCCIÓN**

Al revisar las innumerables acepciones generalizadas para definir a las levaduras, pudiéramos en una frase describirlas como hongos que crecen en forma de células solitarias y se reproducen por gemación. Por supuesto, este constituye un concepto muy amplio de esta taxa, que se distingue sobre la base de un sinnúmero de aspectos morfo-fisiológicos más complejos como la presencia o ausencia de cápsulas, el tamaño y forma de las células, el mecanismo de formación de células hijas (conidiogénesis), la formación de pseudohifas e hifas verdaderas y la presencia de esporas sexuales en conjunto con datos fisiológicos.

La morfología se emplea principalmente para distinguir las levaduras al nivel de género, mientras que la habilidad para asimilar y fermentar varias fuentes de carbono, utilizar nitratos como fuente de nitrógeno; así como la composición de ácidos grasos en su membrana citoplasmática, polimorfismos en el ácido desoxirribonucleico (ADN) cromosómico y mitocondrial y secuencias nucleotídicas del ácido ribonucleico (ARN) ribosomal (Chen *et al*, 2001), son recurridos junto con la morfología para identificar especies.

Son abundantes en la naturaleza encontrándose en el suelo, aguas naturales y contaminadas, plantas e insectos, mayoritariamente (Spencer y Spencer, 1997). En comparación con los otros grandes grupos de microorganismos, las levaduras presentan escasa diversidad (39 géneros, 350 especies) y no constituyen una unidad taxonómica propiamente dicha, sino que se encuentran dentro de diversos grupos de hongos filamentosos como *Ascomycetos*, *Basidiomicetos* y *Deuteromicetos*.

Su tamaño puede variar desde 1 hasta 12  $\mu\text{m}$  de diámetro, resultando la especie *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 1) una de las mas grandes, especialmente cuando se encuentra en fase hexaploide. Sus formas suelen ser redondeadas, elipsoidales, elongadas, cilíndricas y algunas adoptan formas excepcionales como la especie *Trigonopsis variabilis* con



células triangulares y yemas en sus ángulos exteriores bajo determinadas condiciones nutricionales.

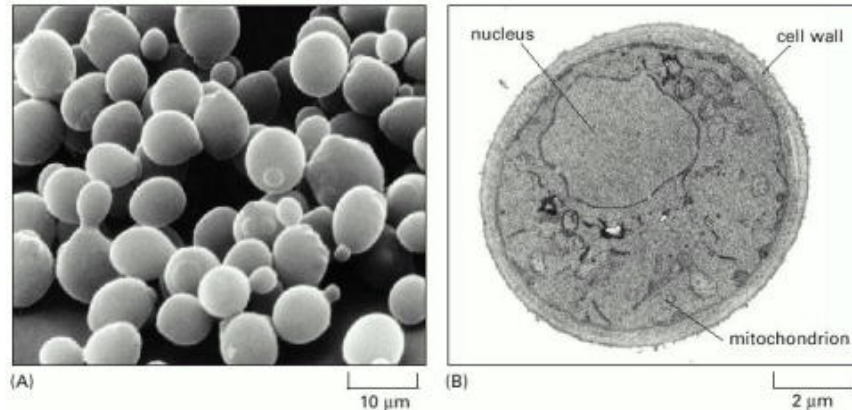
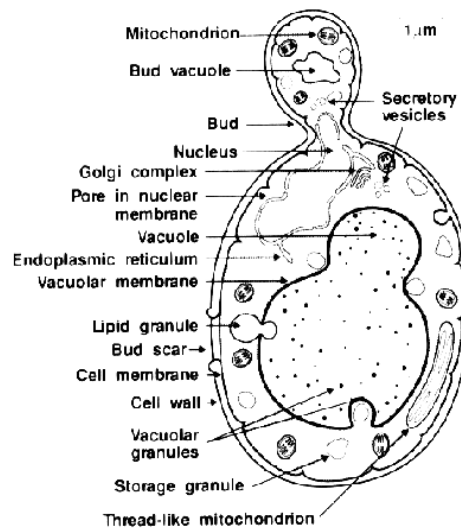


Figura 1. La levadura *Saccharomyces cerevisiae*. A: Agrupación de células bajo el microscopio electrónico de barrido. B: Fotomicrografía de corte transversal de una célula bajo el microscopio electrónico de transmisión.

Además del aspecto que muestre su forma vegetativa, pueden formar pseudomicelios, micelios verdaderos, blastosporas, clamidosporas, tubos de germinación, artrosporas y ascosporas en dependencia de la especie, cada una de estas con disímiles aspectos. El máximo exponente de su ambigüedad morfológica es el pleomorfismo, fenómeno mediante el cual una especie puede presentarse en estado micelial o como células libres en dependencia de las condiciones de temperatura, concentraciones de CO<sub>2</sub>, pH, niveles de cisteína u otros compuestos sulfhidrúlicos. Los casos típicos lo constituyen *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*.

Por ser un organismo eucarionte posee un alto grado de compartimentación celular caracterizado por la presencia de su material hereditario dentro de un núcleo verdadero y estructuras subcelulares enmarcadas por membranas dentro de su citoplasma (Figura 2). Estos organelos proporcionan compartimentos discretos en los cuales tienen lugar actividades celulares específicas. La subdivisión resultante permite a las células de levadura funcionar eficientemente a pesar de su gran tamaño (cerca de cientos de veces mayor que el volumen de las bacterias).



**Figura 2. Organización celular en *Saccharomyces cerevisiae***

En este capítulo describiremos las estructuras celulares más importantes y su conexión con los eventos de mayor relevancia para garantizar el adecuado funcionamiento de la célula, tales como: la perpetuación de la información genética, el control celular, la síntesis y procesamiento proteico, energética y metabolismo celular, movimientos celulares, así como la interacción de la célula con su entorno ambiental.

## **EL NÚCLEO**

La presencia de un núcleo constituye la principal característica que distingue a las células eucarióticas de las procariotas. Al albergar el genoma celular, funciona ya sea como almacén de la información genética, así como centro de control celular. La replicación y transcripción del ADN, así como el procesamiento del ARN tienen lugar en su interior; únicamente la etapa final de la expresión génica (traducción) se localiza en el citoplasma.

### ***La envoltura nuclear y el tráfico entre núcleo y citoplasma.***

La envoltura nuclear está compuesta de membranas interna y externa, unidas a complejos de poros nucleares y a una lámina nuclear subyacente. Actúa como barrera preventiva al paso libre de moléculas entre el núcleo y el citoplasma y proporciona una armazón estructural a este organelo manteniéndolo como un compartimiento bioquímico diferenciado.

Los canales a través de la envoltura nuclear están provistos de complejos de poros nucleares, que permiten el intercambio regulado de moléculas. El tráfico selectivo de proteínas y ARNs a través de estos complejos, no solo establece la composición interna del núcleo, sino que juega un papel crítico en la regulación de la expresión génica en levaduras.

Estos complejos de poros nucleares no son más que grandes estructuras que proveen las únicas rutas a través de las cuales las moléculas pueden viajar entre el núcleo y el citoplasma de forma regulada. Las moléculas pequeñas son capaces de difundir libremente a través de canales abiertos en este complejo. Las macromoléculas son transportadas selectivamente en un proceso dependiente de energía.

El transporte selectivo de proteínas hacia y desde el núcleo es un proceso complejo donde las proteínas destinadas a ser importadas por el núcleo contienen señales de localización nuclear que son reconocidas por receptores que dirigen el transporte hacia el complejo de poros nucleares. Las proteínas que son transbordadas bidireccionalmente entre el núcleo y el citoplasma contienen señales de exportación nuclear que las localizan para el transporte desde el núcleo hacia el citoplasma, un ejemplo de estas es la proteína Ran enlazada al guanín-trifosfato (GTP), la cual determina la dirección del transporte. La actividad de algunas proteínas, como algunos factores de la transcripción, esta controlada por la regulación de su importación hacia el núcleo.

Los ARNs mensajeros (*ARN<sub>mens</sub>*), ribosomal (*ARN<sub>rib</sub>*) y de transferencia (*ARN<sub>transf</sub>*) son exportados también a través de estos poros como complejos de ribonucleoproteína desde el núcleo para funcionar en la síntesis proteica.

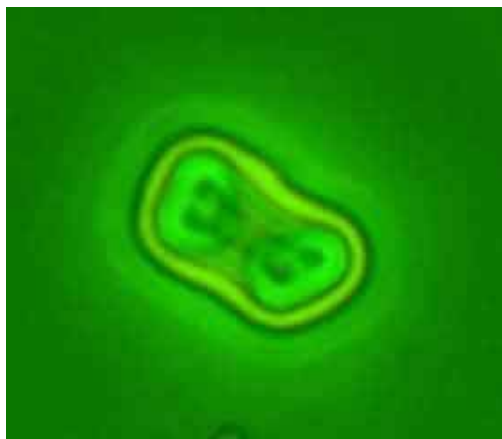
Al separar el genoma del citoplasma, la membrana nuclear permite que la expresión génica sea regulada por mecanismos únicos a eucariontes: los ARNs *mens* sufren un procesamiento post-transcripcional (empalme alternativo) antes de ser transportados del núcleo al citoplasma (Nasmith, 2005). Por su capacidad para limitar el acceso de proteínas al material genético, la membrana nuclear también proporciona oportunidades para el control de la expresión genética al nivel de transcripción.

### ***Organización interna del núcleo***

El núcleo es más que un contenedor en el cual la cromatina, ARNs y proteínas nucleares se mueven libremente en una solución acuosa. En lugar de esto, presenta una estructura interna que organiza el material genético y localiza algunas funciones nucleares a sitios específicos. El aspecto más obvio de la organización interna del núcleo es el nucleolo, el cual como se discute en la siguiente sección, es el sitio en el cual los genes del ARN $_{rib}$  son transcritos y las subunidades ribosomales ensambladas. Han sido sugeridos elementos adicionales de la estructura interna del núcleo por la organización de los cromosomas y la localización potencial de funciones como la replicación del ADN y el procesamiento de los pre-ARN mitocondriales (ARN $_{mit}$ ) a distintos dominios nucleares.

El núcleo en interfase contiene heterocromatina altamente condensada inactiva transcripcionalmente, así como eucromatina no condensada. Los cromosomas en interfase son organizados dentro del núcleo y divididos en grandes dominios plegados que funcionan como unidades independientes. En la mayoría de las levaduras, específicamente en *S. cerevisiae*, los cromosomas son pequeños y difíciles de visualizar, pero existen pruebas genéticas que indican la existencia de al menos 17 pares y varios fragmentos en células diploides (Castrejon *et al*, 2004). El ADN cromosómico (ADN $_{crom}$ ) constituye alrededor del 80% del total y para una cepa diploide de esta especie posee un tamaño estimado de  $2 \times 10^4$  Kb (Figura 3).

Algunos procesos nucleares, como la replicación del ADN y el metabolismo de los pre-ARN $_{mit}$  pueden estar localizados en ciertos dominios o estructuras subnucleares específicas.



**Figura 3. ADN cromosómico en *Saccharomyces cerevisiae*.**

### ***El nucleolo***

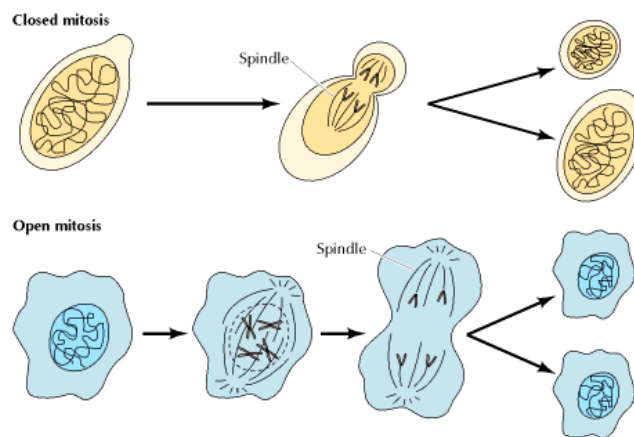
La subestructura mas prominente dentro del núcleo es el nucleolo, sitio de la trascricpción y procesamiento del ARN*rib*, así como del ensamblaje de los ribosomas (Shaw y Doonan, 2005). Constituye una fábrica de producción de ribosomas, diseñada para satisfacer la necesidad de una producción a gran escala de ARNs *rib* y ensamblaje de subunidades ribosomales.

El transcripto primario de los genes del ARN*rib* es el pre-ARN*rib* de 45S, el cual es procesado para rendir ARNs*rib* de 18S, 5.8S y 28S mediante ARNs nucleolares pequeños (Gonsalvez *et al*, 2005). Las subunidades ribosomales son ensambladas dentro del nucleolo a partir de ARNs y proteínas ribosomales (Correia *et al*, 2004).

### ***El núcleo durante la mitosis***

En las levaduras este proceso se denomina mitosis cerrada (Cooper, 2000), ya que a diferencia de otras células eucarióticas la envoltura nuclear no se quiebra y permanece intacta (Figura 4), en este proceso los cromosomas hijos migran a polos opuestos del núcleo, el cual se divide en dos.

La condensación de los cromosomas mitóticos está correlacionado con la fosforilación de las histonas H1 y H3, se activa un complejo de proteínas por fosforilación de Cdc2 llamadas condensinas envolviendo el ADN en una estructura compacta.



**Figura 4. Características distintivas de la mitosis en levaduras con respecto a otras células eucarióticas.**

### ***Material genómico extranuclear***

Se ha puesto de manifiesto en *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Zygosaccharomyces rouxii* y *Schizosaccharomcyes pombe* la existencia de un plásmido de ADN circular de 2  $\mu\text{m}$  de tamaño (*Scp1*), que contiene, aproximadamente 6,3 Kb, y que se presenta en una cantidad variable de copias comprendida entre 60 y 100 en el citoplasma (Dobson *et al*, 2005). Su estructura está formada por dos bucles conectados entre sí por una zona de doble hélice antiparalela y se ha reportado como una secuencia de ADN de gran aplicación en trabajos de Biología Molecular.

En el citoplasma de algunas levaduras aparecen dos moléculas de doble cadena de ARN (controladas por genes del núcleo), asociadas a una proteína que actúa a modo de cubierta

protectora, y que le confieren a este grupo microbiano el denominado factor *killer* (Tamás *et al*, 2003). Las cepas que manifiestan este carácter producen una toxina que actúa sobre la pared y la membrana celular de las cepas sensibles, alterando su potencial electroquímico hasta causar su muerte. Además producen una proteína defectuosa que compite con la forma activa en los sitios de unión a la membrana celular que las hacen insensibles a la toxina.

En *S. cerevisiae* se han descrito tres toxinas diferentes: K1, K2 y K3 (Buzzini *et al*, 2003). Las cepas industriales que se inoculan para iniciar los procesos de fermentación deben poseer este factor para poder desplazar a las cepas indígenas de levaduras. Algunas especies actúan sobre otros géneros como por ejemplo *Hansenula saturnus* sobre *Z. bailii* (un contaminante de vinos) y *S. cerevisiae* contra algunas cepas de *C. albicans*, *Candida krusei*, *Kluyveromyces phaffii*, entre otras.

## **CLASIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y TRANSPORTE. EL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO, APARATO DE GOLGI Y LISOSOMAS**

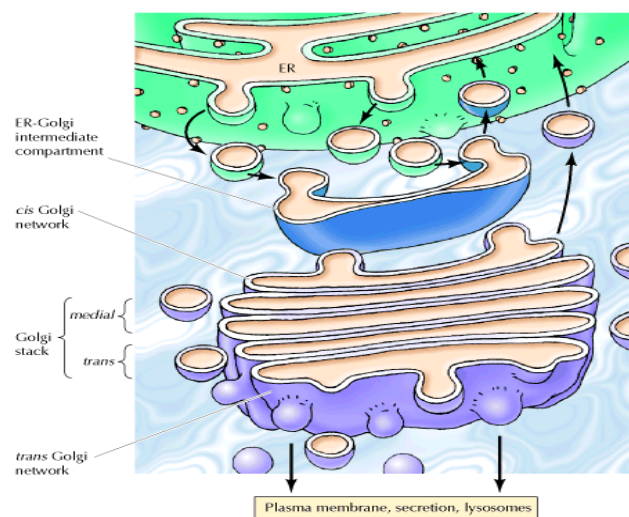
Debido a la organización interna compleja de las células de levaduras, el ordenamiento y señalización de las proteínas hacia sus destinos apropiados resultan tareas considerables. El primer paso de el ordenamiento proteico tiene lugar mientras la traducción se encuentra en progreso, donde muchas proteínas destinadas para el retículo endoplasmático (RE), el aparato de Golgi, lisosomas, membrana plasmática y secreción desde la célula son sintetizadas en los ribosomas unidos a la membrana del RE. En la medida que avanza la traducción, las cadenas polipeptídicas son transportadas hacia el RE, donde tiene lugar el plegamiento de las proteínas y procesamiento. De éste, las proteínas son transportadas en vesículas al aparato de Golgi, donde son luego procesadas y ordenadas para transportarlas a los lisosomas, membrana plasmática, o para su secreción desde la célula. Estos compartimientos celulares, resultan por tanto distinguibles de otros organelos citoplasmáticos por estar involucrados en común en el procesamiento y conexión de las proteínas mediante el transporte vesicular.

### ***El retículo endoplasmático***

El retículo endoplasmático es una red de túbulos y sacos (cisternas) envueltos por membranas que se extienden desde la membrana nuclear hasta el citoplasma. En su totalidad está enmarcado por una membrana continua y constituye el organelo más grande de la mayoría de las células eucariotas. Sus membranas pueden constituir cerca de la mitad de todas las membranas celulares y el espacio que enmarca (lumen o espacio cisternal) puede representar cerca del 10% del volumen total de la célula. Existen dos tipos distintos de RE que ejecutan diferentes funciones: el RE rugoso, cubierto por ribosomas en su superficie exterior, que funciona en el procesamiento de las proteínas y el RE liso, no asociado a ribosomas, e involucrado en el metabolismo de los lípidos. En levaduras, muchas proteínas como chaperonas moleculares, proteínas de estrés y otras que regulan la homeostasis en la célula son procesadas vía RE (Papp *et al*, 2003).

### ***El aparato de Golgi***

Este complejo funciona como una fábrica en la cual las proteínas que llegan desde el RE son procesadas y organizadas para su transporte hacia sus destinos eventuales: lisosomas, membrana plasmática o secreción; adicionalmente, son sintetizados glicolípidos y polisacáridos. Esta estructura está por tanto involucrada, en el procesamiento de un amplio rango de constituyentes celulares que viajan a través de vías secretorias (Conibear y Stevens, 1995) (Figura 5).



**Figura 5. Regiones del aparato de Golgi**



Las proteínas son transportadas desde el RE hacia la cadena Golgi *cis*, para luego viajar al depósito del Golgi, sitio de mayores actividades metabólicas de este aparato. Una vez modificadas, las proteínas transitan desde este punto a la red *trans*, donde son clasificadas y empacadas en vesículas para el transporte hacia los lisosomas, la membrana plasmática (Nothwehr y Stevens, 1994) o el exterior celular.

Dentro de este aparato se efectúa también la glicosilación de las proteínas, modificando los N-oligosacáridos adicionados a las proteínas en el RE. Las proteínas destinadas para los lisosomas son específicamente fosforiladas en residuos de manosa.

### ***El mecanismo del transporte vesicular***

Las vesículas de transporte juegan un papel central en el tráfico de moléculas entre diferentes compartimientos recubiertos por membranas de la vía secretoria y se encuentran similarmente involucradas en el transporte de materiales tomados en la superficie celular. El transporte vesicular es así una actividad celular especializada, responsable del tráfico molecular entre una variedad de compartimientos específicos encerrados por membrana (Novick *et al*, 1980) y su selectividad constituye la llave para mantener la organización funcional de la célula. Un ejemplo muy estudiado en levaduras es la regulación de la proteína de membrana transportadora de  $Mn^{2+}$  regulada por mecanismos vesiculares dependientes de ubiquitina (Eguez *et al*, 2004).

### ***Lisosomas***

Funcionan como el sistema digestivo de la célula, sirviendo tanto para descomponer material tomado del medio extracelular, así como componentes obsoletos de la propia célula. Son organelos encerrados por membrana que contienen una variedad de enzimas (hidrolasas ácidas) capaces de degradar todo tipo de polímeros biológicos como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos. En levaduras pueden adquirir un alto grado de especialización, como por ejemplo los proteasomas (Wolf, 2004) centralizados en actividades proteásicas para mantener la regulación celular, así como la disposición de materiales celulares de desecho. En su forma más simple son visualizados como vacuolas esféricas densas, pero pueden mostrar variaciones considerables en cuanto a tamaño y forma como

resultado de las diferencias de los materiales que han sido tomados para la digestión. Los lisosomas por tanto representan organelos diversos morfológicamente definidos por la función común de degradar material intracelular.

## **BIOENERGÉTICA Y METABOLISMO. MITOCONDRIA Y PEROXISOMAS**

Adicionalmente a estar involucrados en la clasificación y transporte de proteínas, los organelos citoplasmáticos constituyen compartimientos especializados en los cuales tiene lugar una variedad de actividades metabólicas. La generación de la energía es la principal actividad de todas las células y dos organelos citoplasmáticos están específicamente destinados al metabolismo energético y producción de Adenosin-trifosfato (ATP) en levaduras: la mitocondria, responsable de generar la mayoría de la energía útil derivada de la ruptura de lípidos y carbohidratos y el peroxisoma que contiene enzimas involucradas en una variedad de vías metabólicas diferentes, incluyendo la degradación de ácidos grasos.

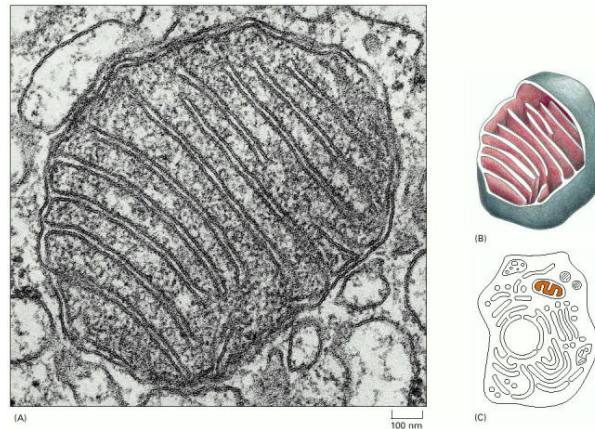
La mitocondria y los peroxisomas difieren de los organelos discutidos anteriormente no solo en sus funciones, sino también en su mecanismo de ensamblaje. Lejos de ser sintetizados en ribosomas de membrana y translocados hacia el RE, las proteínas destinadas a estas subestructuras celulares son sintetizadas en ribosomas libres en el citosol e importadas dentro de sus organelos blanco como cadenas polipeptídicas terminadas. Las mitocondrias contienen sus propios genomas los cuales incluyen algunos genes que son transcritos y traducidos en su interior.

### ***Mitocondria***

La mitocondria juega un papel crítico en la generación de energía metabólica en las células eucarióticas. Ellas son responsables de la mayor parte de la energía útil derivada de la ruptura de carbohidratos y ácidos grasos, que es convertida a ATP mediante el proceso de fosforilación oxidativa. La mayoría de las proteínas mitocondriales son traducidas en ribosomas citosólicos libres e importadas al organelo mediante señales blanco específicas. Son únicas entre los organelos citoplasmáticos ya discutidos porque contienen su propio ADN, el cual codifica ARNs de transferencia, ribosomales y algunas proteínas mitocondriales (Schafer *et al*, 2005). El ensamblaje de la mitocondria de esta forma involucra proteínas

codificadas por sus propios genomas y traducidas dentro del organelo, así como proteínas codificadas por el genoma nuclear e importadas del citosol.

Está rodeada por un sistema membranoso doble con una matriz que contiene las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, una membrana interna conteniendo complejos de proteína involucrados en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa y su membrana externa es libremente permeable a moléculas pequeñas (Figura 6).



**Figura 6. Mitocondria de célula eucariota. A: Corte transversal bajo microscopía electrónica. B: Dibujo tridimensional de un corte transversal. C: Representación esquemática de una célula eucariótica con la mitocondria y ribosomas coloreados.**

En levaduras, las mitocondrias son visibles en el citoplasma por microscopía electrónica como objetos elongados, ovales y redondeados; algunas veces con estructuras internas poco visibles, como en *S. cerevisiae* creciendo bajo condiciones limitadas de aireación y/o excesos de glucosa. Pueden contener cristas desarrolladas bien o pobremente, dependiendo de la especie de levadura, las condiciones culturales (Pereira *et al*, 2003) y su metabolismo oxidativo.

El tamaño del ADN<sub>mit</sub> en levaduras varía, desde 6.0  $\mu\text{m}$  en *Torulopsis glabrata* (PM  $12.8 \times 10^{-6}$ ) hasta 21-25  $\mu\text{m}$  de largo (PM  $46-52 \times 10^{-6}$ ) en *S. cerevisiae* y 34  $\mu\text{m}$  (PM  $71 \times 10^{-6}$ ) en *Brettanomyces custersii*. Porta algunos de los genes que codifican enzimas de la cadena transportadora de electrones, particularmente citocromos a y b, además de genes de resistencia a altos niveles de antibióticos. Podemos citar para *S. cerevisiae* 24 ARN<sub>transf</sub> mitocondriales, 2 ARN<sub>rib</sub>, tres subunidades de la citocromo c oxidasa (subunidades COI, II y

III del complejo IV) y de la apoproteína citocromo b (incluyendo el locus *cob-box*) y dos subunidades del complejo de síntesis del ATP (subunidades 6 y 9 de la ATPasa mitocondrial). Contiene además numerosos fragmentos de lectura no asignados (URFs) y determina el tamaño de la proteína *var I*, asociada con los mitorribosomas.

La naturaleza de las interacciones entre el núcleo y la mitocondria es más sutil de lo que se pensó años atrás: funciones que se atribuyeron al control total del genoma nuclear como la fermentación de carbohidratos, floculación, esporulación, germinación, entre otras se ha demostrado que también son asistidas por la función mitocondrial.

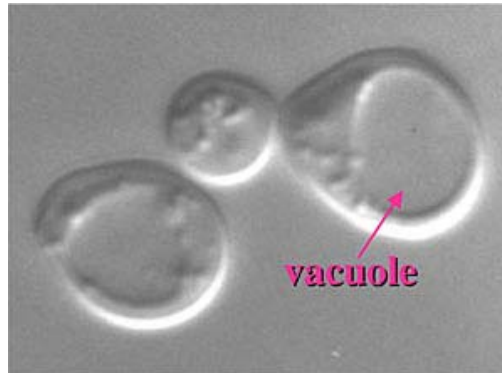
### ***Peroxisomas***

Los peroxisomas son pequeños organelos cubiertos por membranas, conteniendo enzimas involucradas en una variedad de reacciones metabólicas como la oxidación de ácidos grasos y algunos aspectos del metabolismo energético (van den Bosch *et al*, 1992; van der Klei *et al*, 1991). A pesar de que son morfológicamente similares a los lisosomas, ellos son ensamblados como las mitocondrias, a partir de proteínas sintetizadas en ribosomas libres y luego importadas a los peroxisomas como cadenas polipeptídicas a término. A pesar de que no contienen su propio genoma, se asemejan a las mitocondrias en que se replican por división, diferenciándose además por poseer una matriz homogénea y membrana simple única.

En levaduras metilotróficas, crecidas en metanol como única fuente de carbono, el citoplasma se empaca con peroxisomas conteniendo las enzimas alcohol oxidasa y catalasa, por ejemplo *Candida tropicalis* cuando crece en n-alcanos.

### ***Vacuola***

La vacuola constituye un importante almacén de sustancias de reserva, que serán utilizadas en caso de que las condiciones ambientales sean desfavorables (Weisman, 2003), contiene además una gran cantidad de enzimas implicados en la digestión intravacuolar de orgánulos como mitocondrias no funcionales (Figura 7).



**Figura 7. Aspecto de la vacuola en células de levadura.**

Están rodeadas de una membrana sencilla, que porta numerosas partículas pequeñas, las cuales pueden ser ribosomas (Schwencke, 1991). Puede contener gránulos de polimetrafosatos (volutina), gotas de lípidos, numerosas enzimas hidrolíticas como proteinasas, ribonucleasas y estearasas, muchas de las cuales pueden estar localizadas solamente en este orgánulo. Pueden acumularse S-adenosilmetionina, lisina, y otros aminoácidos, purinas como isoguanina, ácido úrico e iones de potasio.

### ***El citoesqueleto y movimiento celular***

Los organelos envueltos en membrana discutidos con anterioridad constituyen solo un nivel de la subestructura organizacional de células de levaduras; el otro peldaño adicional está asegurado por el citoesqueleto, el cual consiste en una cadena de filamentos proteicos que se extienden por todo el citoplasma de todas las células eucarióticas. El citoesqueleto proporciona una armazón estructural para la célula, sirviendo como andamio que determina la forma celular y la organización general del citoplasma. Adicionalmente a desempeñar este rol estructural, es responsable de los movimientos celulares como el transporte interno de organelos y otras estructuras (como los cromosomas mitóticos) a través del citosol. Esta estructura es mucho menos rígida y permanente que lo que su nombre implica; por el contrario, es un componente dinámico que se reorganiza continuamente en la medida que las células cambian su forma durante la división.

Está compuesto de tres tipos de filamentos proteicos principales: filamentos de actina, intermedios y microtúbulos, los cuales están entrelazados y unidos a organelos subcelulares y la membrana plasmática por una variedad de proteínas accesorias.

### ***Estructura y organización de los filamentos de actina.***

La proteína citoesquelética principal de las células de levaduras es la actina, la cual se polimeriza para formar fibras delgadas y flexibles de aproximadamente 7nm de diámetro y hasta varios micrómetros de largo. Dentro de la célula, los filamentos de actina (también denominados microfilamentos) están organizados en estructuras de orden superior, que forman paquetes o cadenas tridimensionales con las propiedades de geles semisólidos. El ensamblaje y desacoplamiento de estos filamentos, su eslabonamiento cruzado y asociación con otras estructuras celulares (como la membrana plasmática) están regulados por una variedad de proteínas que se unen a la actina, las cuales son componentes críticos del citoesqueleto (Koo *et al*, 2004). Los microfilamentos son particularmente abundantes por debajo de la membrana plasmática, donde forman una cadena que proporciona soporte mecánico, determina la forma celular y permite el movimiento de la superficie celular durante la división, (Kono *et al*, 2005) favoreciendo además el anclaje en las regiones de contacto célula-célula y célula-sustrato.

### ***Filamentos intermedios***

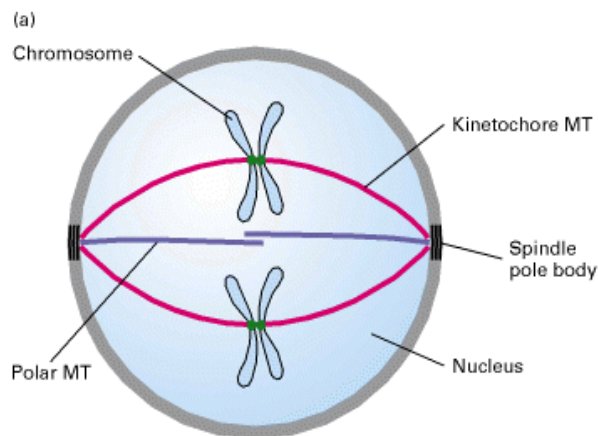
Los filamentos intermedios tienen un diámetro de aproximadamente 10 nm, lo cual es intermedio entre los diámetros de los otros dos tipos de elementos principales del citoesqueleto: fibras de actina (cerca de 7 nm) y microtúbulos (cerca de 25 nm). En contraste a estos otros elementos, los filamentos intermedios no están directamente involucrados en los movimientos celulares; en su lugar, ellos parecen jugar un papel básicamente estructural aportando fuerza mecánica a las células (Skalli *et al*, 1992).

Son polímeros de más de 50 proteínas diferentes que se expresan en varios tipos de células y se forman a partir de dímeros de dos cadenas polipeptídicas arrolladas en una estructura espiral (Steinert y Roop, 1988). Los dímeros luego se asocian para formar tetrámeros, que se

ensamblan en protofilamentos que al arrollarse en estructuras en forma de cuerda forman finalmente los filamentos intermedios.

### ***Microtúbulos y movimientos***

Los microtúbulos, el tercer componente principal del citoesqueleto, son bastones ahuecados rígidos de aproximadamente 25 nm en diámetro. Al igual que los filamentos de actina, son estructuras dinámicas que experimentan ensamblajes y desacoplamiento continuos dentro de la célula (Pardo y Nurse, 2005). Funcionan bien sea para determinar la forma celular o en una variedad de movimientos celulares que incluyen el transporte intracelular, el posicionamiento de vesículas membranosas y organelos y la separación de los cromosomas formando el huso mitótico (Figura 8).



**Figura 8. Microtúbulos durante la formación del huso mitótico en *S. cerevisiae***

Se forman por una polimerización reversible de la tubulina, mostrando su inestabilidad dinámica durante los continuos ciclos de ensamblaje y desacoplamiento como resultado de la acción de proteínas motoras que utilizan la energía derivada de la hidrólisis del ATP para producir fuerza y movimiento, destacándose en levaduras las quinesinas.

En levaduras el producto del gen KAR3 es esencial para la fusión nuclear o cariogamia y es miembro probablemente de una gran familia de quinesinas (Korolyev *et al*, 2005) las cuales están asociadas con los procesos dependientes de microtúbulos como la separación del

cuerpo polar del huso mitótico, elongación del huso, meiosis, segregación cromosómica y fusión nuclear.

### ***La superficie celular***

Todas las células, ya sean procariotas y eucariotas están rodeadas por una membrana plasmática, la cual define la frontera de la célula y separa su contenido interno del ambiente. Al servir como una barrera selectiva al paso de moléculas, esta cubierta determina la composición del citoplasma y define la identidad de la célula, por lo cual esta estructura es una de las más importantes de la evolución celular. De hecho, la primera célula se piensa que surgió a partir de una membrana de fosfolípidos que delimitaba un ARN autoreplicante.

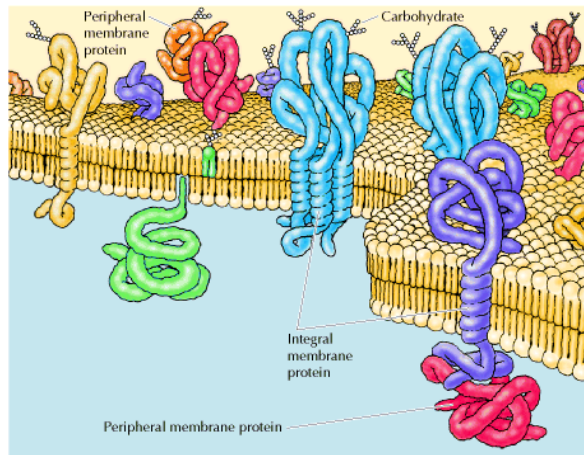
La membrana plasmática está compuesta de lípidos y proteínas con una estructura básica de bicapa fosfolipídica, impermeable para la mayoría de las moléculas solubles en agua. El paso de iones y la mayoría de las moléculas biológicas a través de ella está por consiguiente mediado por proteínas, las cuales son responsables del tráfico selectivo de moléculas dentro y fuera de la célula. Otras proteínas de la membrana plasmática controlan las interacciones entre células y sirven como sensores a través de las cuales se reciben señales desde el ambiente. La membrana plasmática por tanto juega un rol dual: aísla el citoplasma y media las interacciones entre la célula y su entorno.

### ***Estructura de la membrana plasmática***

Como otras membranas celulares, la membrana plasmática consta de lípidos y proteínas. La estructura fundamental de la membrana es la bicapa fosfolipídica, la cual forma una barrera estable entre dos compartimientos acuosos (el interior y exterior celular).

Las proteínas embebidas en la bicapa fosfolipídica ejecutan funciones específicas, que incluyen el transporte selectivo de moléculas mostrando a la membrana como un mosaico fluido (Figura 9), son libres de difundir lateralmente a través de esta bicapa aunque la movilidad para algunas de ellas está restringida por sus asociaciones con otras moléculas.





**Figura 9. Modelo de mosaico fluido para la membrana plasmática**

En levaduras la membrana posee tres componentes esenciales: los lípidos, mayoritariamente fosfolípidos, que comprenden dos cadenas de ácidos grasos no polares hidrofóbicas esterificadas vía glicerol a un fosfato polar y a una base orgánica; proteínas estructurales, catalíticas para el transporte y enzimas y carbohidratos representados por glicolípidos o glicoproteínas, que ocupan de un 3 al 6 % de la membrana.

La mayoría de los lípidos de membrana son fosfoglicerolípidos, fosfoesteres del diacilglicerol y esfingolípidos (Zink *et al*, 2005). La base orgánica puede ser colina, lecitinas, etanolamina, serina o inositol. El ergosterol también afecta la fluidez de la membrana por interacción de los anillos planares rígidos con las colas hidrofóbicas de los residuos de ácidos grasos, disminuye la permeabilidad de la membrana a moléculas pequeñas hidrofílicas y probablemente incrementa la flexibilidad y estabilidad mecánica de la misma; está íntimamente relacionado con los procesos de tolerancia al etanol en levaduras.

La membrana plasmática en levaduras es alrededor de un 50 % de su peso en proteínas. Numerosos sistemas de señales transmembrana se encuentran localizados en ella (Frieman y Cormack, 2004) y el más importante es el sistema de apareamiento. Los factores de apareamiento  $\alpha$  y  $a$  son péptidos para iniciar la conjugación entre células haploides y el tipo sexual opuesto, ellos arrestan el ciclo celular en G1, inducen la formación de tubos de copulación y la expresión de muchos genes esenciales para la conjugación. Las proteínas receptoras de membrana, codificadas por los genes STE2 y STE3 reconocen a estos factores sexuales.

### ***Transporte de moléculas***

Se ha comprobado que el control de la homeostasis y el tráfico de membrana en células de levaduras está regido por la interacción de los genes ARL1 y CCZ1 (Love *et al*, 2004), manteniendo la composición interna de la célula a través de una permeabilidad selectiva a pequeñas moléculas. La mayoría de las moléculas biológicas son incapaces de difundir a través de la bicapa fosfolipídica, por lo tanto la membrana plasmática forma una barrera que bloquea el intercambio libre de moléculas entre el citoplasma y el ambiente externo de la célula. Existen proteínas de transporte específicas (proteínas transportadoras y de canales) que median el paso selectivo de moléculas pequeñas a través de la membrana, permitiendo a la célula controlar la composición de su citoplasma.

Las moléculas hidrofóbicas pequeñas son capaces de cruzar la membrana plasmática mediante difusión pasiva a través de la bicapa fosfolipídica. Mediante esta vía se intercambian gases (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>), alcoholes, ácidos orgánicos no disociados, bases y otras moléculas no cargadas pequeñas, agua e iones pequeños como H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>.

El paso de la mayoría de las moléculas biológicas está mediado por proteínas transportadoras que permiten a moléculas polares y cargadas cruzar la membrana plasmática sin interactuar con su interior hidrofóbico, a esta difusión se le denomina facilitada.

Los canales para iones median el paso rápido de iones seleccionados a través de la membrana plasmática.

El transporte activo puede derivarse de la energía generada de la hidrólisis del ATP conduciendo al transporte de moléculas en contra de sus gradientes electroquímicos y se muestra en levaduras mediante ATPasas con la bomba de H<sup>+</sup> (Goffeau, 1993). Otra variante de este tipo de transporte en levaduras esta mediado por gradientes de H<sup>+</sup> que se usa frecuentemente como fuente de energía que conduce el transporte activo de otras moléculas.

### **PARED CELULAR**

A pesar de que los límites de la célula de levadura están definidos por la membrana plasmática, ellas están rodeadas de un arreglo insoluble de macromoléculas secretadas. Esto conforma la pared celular rígida, que constituye una parte integral de la célula.

En levaduras presenta una capa externa amorfa de mananos, fosforilados a diferentes grados según la especie, una capa media de  $\beta$ -glucanos solubles en álcali y una capa rígida interna de  $\beta$ -glucanos insolubles en álcali, esta última es la que le brinda la forma y rigidez a la célula. Los glucanos con grupos enlazados en las posiciones ( $\beta$ 1-3) y ( $\beta$ 1-6) componen alrededor de un 50 al 70 % de la pared celular en levaduras, sugiriéndose que estos pueden impedir el acceso de la anfotericina B a la membrana plasmática.

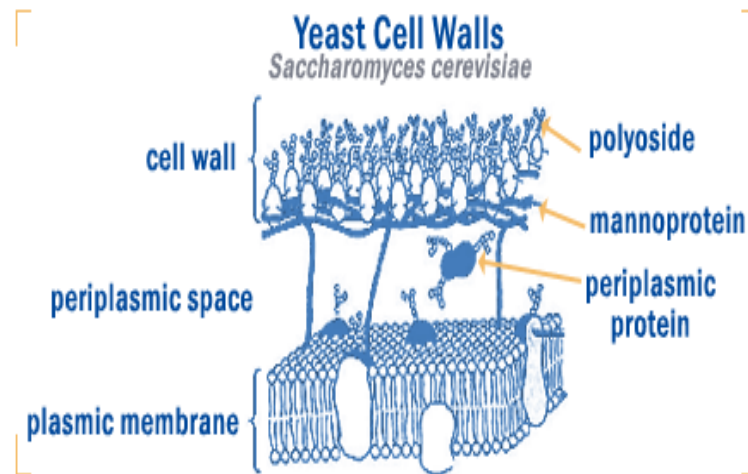
La pared contiene varias inclusiones de proteínas, presentes en cicatrices que muestran el historial de la célula: la escara original de su nacimiento y escaras de gemación que varían en número y posición de acuerdo a las especies. Presenta también glicoproteínas como aglutininas que se unen unas a las otras en la superficie celular y permiten el contacto entre células para formar diploides y otras proteínas importantes para mantener la integridad de la pared celular (Pardo *et al*, 2004).

La estructura química de la capa de manano externa es característica de la especie de levadura y puede ser empleada como ayuda taxonómica. Como ejemplo tenemos que aproximadamente un 20 % de la pared celular en *C. albicans* es manano, mientras que la pared celular de sus micelios contiene una cantidad sustancialmente menor de este azúcar. Esta especie posee tres serotipos, designados A, B y C que se distinguen uno de otros en la base de sus mananos (Herrero *et al*, 2004). El determinante antigénico para el serotipo A es su cadena lateral de manoheptosa, en el B su cadena lateral de manohexosa.

Tienen peptidomananos solubles como componentes de su pared celular externa en una matriz de  $\alpha$  y  $\beta$ -glucanos. Los mananos, galactomananos, y menos frecuentes ramnomananos son los responsables de la respuesta inmunológica a levaduras de interés médico, de hecho la determinación de la concentración de mananos en suero de pacientes con candidiasis diseminadas ha sido probada como técnica diagnóstica de gran utilidad.

Las levaduras basidiomicetáceas contienen quitina en su pared; mientras que las ascomicetáceas solo la presentan en las cicatrices de las yemas. En *S. cerevisiae* la síntesis de quitina está determinada por una cadena interactiva de genes (Lesage *et al*, 2005) y su deposición está regulada por Rcr1, proteína de membrana procesada en el RE. Las especies de *Schizosaccharomyces* no contienen quitina, pero contienen pseudonigerano.

Generalizando en cuanto a estructura química de la pared celular, podemos citar a *Candida albicans*, una de las especies donde mas se ha profundizado en la composición de esta cubierta. Posee una pared celular que contiene aproximadamente de un 30 a un 60 % de glucanos, 25-50 % de mananos (manoproteína), 1-2 % de quitina (localizada básicamente en las cicatrices de gemación en la pared celular de células madres), 2-14 % de lípidos y de un 5-15 % de proteína. En la Figura 10 observamos la representación esquemática de esta cubierta junto con la membrana citoplasmática para la especie *S. cerevisiae*.



**Figura 10. Representación esquemática de las cubiertas externas en *S. cerevisiae*.**

Al emerger las yemas o esporas, la pared celular externa de la célula madre se estrecha. De forma concurrente son sintetizados nuevos materiales para la pared celular interior y membrana plasmática al sitio donde esta ocurriendo el nuevo crecimiento. Este material para la pared celular se forma localmente por activación de la sintetasa de polisacáridos cimógeno. Un adecuado tratamiento de las células, usando mezclas de enzimas hidrolíticos procedentes de otros organismos (como el caracol comestible, *Helix pomatia* y el moho *Trichoderma harzianum*), en una solución estabilizada osmóticamente, permite la degeneración total o parcial de la pared celular, obteniéndose respectivamente lo que se denominan, protoplastos (degeneración total) o esferoplastos (degeneración parcial). En levaduras se habla de formación de esferoplastos ya que el empleo de estos enzimas hidrolíticos sólo produce degradación parcial sobre la pared, no llegándose a una situación de desaparición completa de la pared.

La obtención de esferoplastos de levaduras permite un fácil aislamiento de orgánulos y componentes celulares, así como el estudio detallado de la propia estructura de la pared. Igualmente, ha sido de gran importancia en investigaciones genéticas, ya que se ha logrado la fusión y transformación de protoplastos con material genético exógeno.

La pared celular es permeada por alguno de los enzimas segregados por la levadura; el más importante es la invertasa, que hidroliza la sacarosa antes de que penetre en la célula; entre ellos se encuentra también la fosfatasa.

### ***Cápsulas***

Muchas levaduras producen material capsular, usualmente fosfomananos,  $\beta$ -mananos, heteropolisacáridos conteniendo residuos de pentosas y ácido glucurónico, D-galactosa y unas pocas como *Hansenula ciferrii*, producen compuestos hidrofóbicos como esfingosinas (Spencer y Spencer, 1997). Algunas especies de *Cryptococcus* producen almidón extracelular. *Cryptococcus neoformans* produce un polisacárido capsular compuesto por al menos tres polímeros distintos: glucuronoxilomanano, galactoxilomanano y manoproteína sobre la base de la proporción de los residuos de ácido glucurónico y xilosa, el grado en el cual la manosa tiene sustitutos de cadena laterales, y el porcentaje de uniones O-acetil. En base a esto los aislamientos de *C. neoformans* pueden ser separados en cuatro grupos antigénicos designados A, B, C, y D.

La cápsula es antifagocítica, sirve como un factor de virulencia y persiste en fluidos corporales, permitiendo a la levadura evadir la detección del sistema inmunológico del hospedero.

## BIBLIOGRAFÍA

- Buzzini, P; Berardinelli, S; Turchetti, B; Cardinali, G; Martini, A (2003) Fingerprinting of yeasts at the strain level by differential sensitivity responses to a panel of selected killer toxins *Syst Appl Microbiol* **26** (3):466-470.
- Castrejon, F; Martinez-Force, E; Benitez, T; Codon, A (2004) Genetic analysis of apomictic wine yeasts *Curr Genet* **45** (4):187-196.
- Chen, Y; Eisner, J; Kattar, M; Rassouljian-Barrett, S; Lafe, K; Bui, U; Limaye, A; Cookson, B (2001) Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts *J Clin Microbiol* **39** (11):4042-4051.
- Conibear, E; Stevens, T (1995) Vacuolar biogenesis in yeast: Sorting out the sorting proteins *Cell* **83**:513-516.
- Cooper, G (2000) The cell, a molecular approach. 2da Edición, (Cooper, G ed.) Cap. III. Cell structure and function. Ed. SINAUER.
- Correia, H.; Medina, R.; Hernández, A.; Bustamante, E.; Chakraborty, K.; Herrera, F (2004) Similarity between the association factor of ribosomal subunits and the protein Stm1p from *Saccharomyces cerevisiae* *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99** (7):733-737.
- Dobson, M; Pickett, A; Velmurugan, S; Pinder, J; Barrett, L; Jayaram, M; Chew, J (2005) The 2 microm plasmid causes cell death in *Saccharomyces cerevisiae* with a mutation in Ulp1 protease. *Mol Cell Biol* **25** (10):4299-4310.
- Eguez, L; Chung, Y; Kuchibhatla, A; Paidhungat, M; Garrett, S (2004) Yeast Mn<sup>2+</sup> transporter, Smf1p, is regulated by ubiquitin-dependent vacuolar protein sorting. *Genetics* **167** (1):107-117.
- Frieman, M; Cormack, B (2004) Multiple sequence signals determine the distribution of glycosylphosphatidylinositol proteins between the plasma membrane and cell wall in *Saccharomyces cerevisiae* *Microbiology* **150** (10): 3105-3114.
- Goffeau, A (1993) Transport ATPases and yeast metabolism. En: *Metabolic compartmentation in yeast* (Scheffers, W; van Dijken, J eds) Pasmans, the Hague, pp 42-44.
- Gonsalvez, G; Urbinati, C; Long, R (2005) RNA localization in yeast: moving towards a mechanism *Biol Cell* **97** (1):75-86.

Herrero, A; Magnelli, P; Mansour, M; Levitz, S; Bussey, H; Abeijon, C (2004) KRE5 gene null mutant strains of *Candida albicans* are avirulent and have altered cell wall composition and hypha formation properties *Eukaryot Cell* **3** (6):1423-1432.

Kono, K; Matsunaga, R; Hirata, A; Zuzuki, G; Abe, M; Ohya, Y (2005) Involvement of actin and polarisome in morphological change during spore germination of *Saccharomyces cerevisiae* *Yeast* **22** (2):129-139.

Koo, J; Lee, B; Young, M; Koo, S; Cooper, J; Baek, D; Lim, C; Lee, S; Yun, D; Cho, M (2004) Pn-AMP1, a plant defense protein, induces actin depolarization in yeasts *Plant Cell Physiol* **45** (11):1669-1680.

Korolyev, E; Steinberg-Neifach, O; Eshel, D (2005) Mutations in the yeast kinesin-like Cin8p are alleviated by osmotic support *FEMS Microbiol Lett* **244** (2): 379-383.

Lesage, G; Shapiro, J; Specht, C; Sdicu, A; Menard, P; Hussein, S; Tong, A; Boone, C; Bussey, H (2005) An interactional network of genes involved in chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* *BMC Genet* **6** (1):8.

Love, S; Manlandro, C; Testa, C; Thomas, A; Tryggestad, K; Rosenwald, A (2004) The yeast genes, ARL1 and CCZ1, interact to control membrane traffic and ion homeostasis *Biochem Biophys Res Commun* **319** (3):840-846.

Nasmith, K (2005) How do so few control so many? *Cell* **120** (6):739-746.

Nothwehr, S.; Stevens, T. (1994). Sorting of membrane proteins in the yeast secretory pathway *J Biol Chem* **269**: 10185-10188.

Novick, P; Field, C; Schekman, R (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway *Cell* **21**:205-215.

Papp, E; Nardai, G; Soti, C; Csermely P. (2003) Molecular chaperones, stress proteins and redox homeostasis *Biofactors* **17** (1-4):249-257.

Pardo, M; Monteoliva, L; Vázquez, P; Martínez, R; Molero, G; Nombela, C; Gil, C (2004) PST1 and ECM33 encode two yeast cell surface GPI proteins important for cell wall integrity *Microbiology* **150** (12):4157-4170.

Pardo, M; Nurse, P (2005) The nuclear rim protein Amo1 is required for proper microtubule cytoskeleton organisation in fission yeast *J Cell Sci* **118** (8):1705-1714.

- Pereira, E; Panek, A; Eleutherio, E.(2003) Protection against oxidation during dehydration of yeast *Cell Stress Chaperones* **8** (2):120-124.
- Schafer, B; Hansen, M; Lang, B (2005) Transcription and RNA-processing in fission yeast mitochondria *RNA* **11** (5): 785-795.
- Schwencke, J (1991) Vacuoles, internal membranous systems and vesicles. En: (Rose, A; Harrison, J eds) *The yeasts*, Vol 4, 2<sup>da</sup> edn. Yeast organelles. Academic Press, New York, pp. 347-432.
- Shaw, P; Doonan, J (2005) The nucleolus. Playing by different rules? *Cell Cycle* **4** (1):102-105.
- Skalli, O; Chou, Y; Goldman, R (1992) Intermediate filaments: not so tough after all *Trends Cell Biol* **2**:308-312.
- Spencer, J; Spencer, D (1997) Outside and inside: the morphology and cytology of the yeast cell En: *Yeasts in natural and artificial habitats* (Spencer, JFT; Spencer, DM eds) Springer-Verlag Berlin pp 86.
- Steinert, P; Roop, D (1988) Molecular and cellular biology of intermediate filaments *Ann Rev Biochem* **57**: 593-625.
- Tamás, L; Czárán, R; Hoekstra, F (2003) Killer-sensitive coexistence in metapopulations of micro-organisms *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **270** (1522): 1373-1378.
- Van der Bosch, H; Schutgens, R; Wanders, R; Tager, J (1992) Biochemistry of peroxisomes *Ann Rev Biochem* **61**:157-197.
- Van der Klei, I; Harder, W; Veenhuis, M (1991) Selective inactivation of alcohol oxidase in two peroxisome-deficient mutants of the yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **7**: 813-821.
- Weisman, L (2003) Yeast vacuole inheritance and dynamics *Ann Rev Genet* **37**: 435-60.
- Wolf, D (2004) From lysosome to proteasome: the power of yeast in the dissection of proteinase function in cellular regulation and waste disposal *Cell Mol Life Sci* **61** (13):1601-1614.
- Zink, S; Mehlgarten, C; Kitamoto, H; Nagase, J; Jablonowski, D; Dickson, R; Stark, M; Schaffrath, R. (2005) Mannosyl-diinositolphospho-ceramide, the major yeast plasma



membrane sphingolipid, governs toxicity of *Kluyveromyces lactis* zymocin *Eukaryot Cell* 4 (5): 879-889.

## **CAP 2. MATERIAS PRIMAS. CARACTERIZACIÓN Y CALIDAD**

Miguel A. Otero-Rambla

Dirección de Biotecnología, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).

### **INTRODUCCIÓN**

Las levaduras, al igual que otros organismos vivos, requieren fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, elementos trazas y factores de crecimiento para crecer y multiplicarse (Phaff et al 1979). Aunque las levaduras pueden crecer en ausencia de oxígeno prefieren hacerlo o lo hacen más eficientemente en presencia del mismo. Todas las levaduras salvajes utilizan la glucosa, manosa y fructosa. Algunas otras especies pueden crecer a expensas de otros azúcares y ácidos orgánicos. Con relación a las fuentes de nitrógeno, algunas especies pueden metabolizar los nitratos, mientras que otras solo sales de amonio. En realidad, tomadas como familia, pueden crecer en una amplia gama de compuestos nitrogenados entre ellos aminoácidos D y L (LaRue y Spencer 1966).

Todas las levaduras requieren de elementos trazas. Algunas sintetizan sus propios factores de crecimiento, otras no pueden hacerlo y es preciso suministrárselos en el medio de cultivo. La función del medio nutriente es idéntica a la de los medios de reacción química, es decir, proporcionan los componentes químicos necesarios y en las proporciones adecuadas para que la reacción ocurra (Sykita 1984). En adición, deben asegurar los componentes que garanticen el crecimiento de los microorganismos en todas sus facetas, en la forma más accesible o lo que es lo mismo en medio líquido. Solo en casos especiales se usan medios con nutrientes sólidos o gaseosos. Además de los componentes esenciales, como fuente de carbono y de energía y nitrógeno, el medio debe contener otros muchos nutrientes que se requieren para la propagación de las células microbianas. El ajuste de la composición del medio y las propiedades físico-químicas ayuda en el mantenimiento de las tasas máximas de producción y la dirección adecuada de un cierto proceso.

Los medios complejos o naturales difieren de los sintéticos en que ellos son preparados a partir de materias primas naturales de origen animal o vegetal. La composición exacta de esos materiales es a menudo desconocida y los componentes individuales solo pueden determinarse parcialmente, y aun así, con gran dificultad. Un medio complejo se prepara

disolviendo las sustancias naturales en agua pura y frecuentemente, es preciso su procesamiento posterior a través de hidrólisis, clarificación, complementación con otros nutrientes, factores de crecimiento y elementos trazas.

A escala de laboratorio, el consumo de los substratos es bajo, lo que hace posible el empleo de sustancias que por razones económicas están prohibidos en el ámbito industrial.

Los precios de las materias primas son componentes primordiales de los costos de producción y operación de todas las producciones microbiológicas industriales. Estos costos tienen que ser compensados con una escala de producción y calidad de productos óptimas. En el caso de las producciones basadas en productos de desecho, el factor limitante no es el precio sino la calidad y disponibilidad de éste. Otros factores que afectan la utilización de una materia prima básica, sea un desecho o no, son:

- necesidad de procesamiento antes de la etapa de cultivo y complejidad del tratamiento requerido
- disponibilidad de la materia prima en cantidades suficientes
- facilidad de colección de ésta, si es un substrato natural
- requerimientos de agua y energía durante la producción
- disponibilidad de equipamiento tecnológico para su procesamiento y manipulación, y
- la existencia de otro proceso más rentable compitiendo por la misma materia prima

Veamos ahora con más detalle, los componentes individuales de un medio de cultivo

## **AGUA**

El agua es indispensable en los procesos biológicos por su importancia en el desarrollo de los microorganismos y en general en todos los seres vivos. Más del 70 % de la materia orgánica viva, está compuesta por agua. Los microorganismos, como parte de ésta, requieren de un ambiente acuoso para efectuar el intercambio de nutrientes y productos de desecho que acompañan su crecimiento y reproducción, los que, salvo muy raras excepciones, son solubles en agua.

Todos los microorganismos requieren de un determinado valor de actividad del agua ( $A_w$ ) para poder crecer. Las levaduras y bacterias precisan de valores de  $A_w$  relativamente altos, mientras que los hongos pueden desarrollarse a valores más bajos. La mayoría de los

microorganismos exigen de valores de  $A_w$  en el intervalo de 0,8 a 1,0 para su desarrollo y reproducción (Scott 1957, Welti y Vergara 1997).

### ***Concepto de $A_w$***

La  $A_w$  de una solución es la fracción molar de agua en esa solución, así

$$A_w = n_w / n_w + n_s$$

Donde  $n_w$  número de moles de agua y  $n_s$  es número de moles de la solución

Otra forma de expresar la  $A_w$  es a través de la presión de vapor

$$A_w = p/p_0$$

Siendo  $P$  la presión de vapor del agua en el medio y  $P_0$  la presión de vapor del agua pura (Chen 1990).

El valor de  $A_w$  puede ser relacionado también con la humedad relativa

$$A_w = \text{HR\%/100}$$

La velocidad de crecimiento de los microorganismos disminuye en la medida que decrece  $A_w$  hasta paralizarse por completo a valores de  $A_w = 0,60$ . La tasa máxima de crecimiento ocurre en el rango de  $A_w$  entre 0,98-0,99. La Tabla 1 ofrece los valores de  $A_w$  a que pueden crecer los diferentes microorganismos.

En los bio-procesos, el empleo del agua corriente está limitado a los procesos de separación y lavado de las células etc. En la refrigeración, regulación de temperatura y lavado de equipamiento tecnológico es deseable el uso de agua de menor calidad y acoplada a sistemas de reciclaje siempre que sea posible.

**Tabla 1 Valores de  $A_w$  para el crecimiento de los microorganismos**

<b>Microorganismo</b>	<b>Actividad de agua (<math>A_w</math>)</b>
Bacterias	0,91
Levaduras	0,88
Hongos	0,80
Hongos xerofílicos	0,65
Levaduras osmófilicas	0,60

## **REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES**

### ***Fuentes de carbono***

La levadura más conocida, *Saccharomyces cerevisiae* y sus parientes más cercanos asimilan y fermentan las hexosas, sus dímeros, trímeros y tetrámeros tales como: glucosa, galactosa, maltosa, sacarosa, melibiosa, rafinosa, melezitosa, pero muy raras veces los almidones o aún sus dextrinas. La mayoría no asimila la lactosa, solo unas pocas especies lo hacen y todas del género *Kluyveromyces*. Además de las hexosas y sus dímeros, *Saccharomyces cerevisiae* parece emetabolizar solo unos pocos compuestos no fermentables incluyendo el ácido láctico y otros ácido y alcoholes polihidroxiados. No es capaz sin embargo, de metabolizar las pentosas.

Otras especies de levadura son capaces de crecer sobre n-alcanos (Tanaka y Fukui 1989), ácidos grasos y sus ésteres (Spencer et al 1979), hidrocarburos aromáticos, flavonoides y una miriada de otros compuestos carbonados.

### ***Fuentes de nitrógeno***

La casi totalidad de las levaduras utilizan las sales de amonio. El uso del amonio depende del anión presente; los sulfatos se utilizan con mayor eficiencia en tanto los cloruros son asimilados más lentamente. Las levaduras no pueden fijar el nitrógeno molecular.

Los nitratos no son asimilables por algunos de los más importantes géneros de levaduras como *Saccharomyces*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*. La levadura de cerveza crece bien sobre amino ácidos como glutámico y aspártico en un medio bien balanceado con factores de crecimiento. Puede hacerlo sobre triptófano muy pobremente y no utiliza la histidina, la glicina o la cisterna.

Algunas especies de *S. cerevisiae* pueden utilizar la urea como fuente de nitrógeno en lugar de las sales de amonio, sin embargo, lo hace con más dificultad. Puede usar también otras fuentes de nitrógeno como pirimidinas y purinas como alantoína, adenina, guanina o citosina. Las levaduras de este género y *Candida*, usan muy pobremente los péptidos y nada en lo absoluto las proteínas.

En ocasiones pueden reutilizar parte de sus metabolitos excretados como oligopéptidos, aminoácidos y amidas.

### ***Fósforo***

Todas las levaduras, sin excepción entre las conocidas hoy, utilizan los fosfatos inorgánicos como fuente de fósforo. Este es integrado a la célula en forma de anión monovalente  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . Se prefiere como sal monobásica y se almacena siempre como metafosfato en las vacuolas. El crecimiento rápido de las levaduras requiere de metafosfato por ser este uno de los componentes del ácido ribonucleico de los ribosomas, sitio de la síntesis de proteínas en la célula. Cuando se encuentra en defecto en el medio de crecimiento, las células de levadura reaccionan de la misma manera que lo hacen ante la ausencia o defecto de nitrógeno, acumulando polímeros de reserva.

### ***Azufre***

Las especies de *Saccharomyces* pueden utilizar tanto el sulfato inorgánico como los sulfitos y tiosulfatos. No pueden hacerlo sin embargo a partir de los aminoácidos sulfurados (cisterna, cistina y metionina). *Candida utilis* sin embargo, puede utilizar además de estos compuestos mencionados sulfuros y taurina también.

La incorporación a la célula del sulfato, requiere de consumo de energía por tanto debe contener el medio algún componente que asegure su obtención y una fuente de nitrógeno disponible. Los sulfatos pueden ser tomados tanto aeróbica como anaeróticamente.

### ***Otros elementos inorgánicos***

La mayoría de los elementos comunes son tóxicos para la levadura. Algunos son extremadamente tóxicos como el cadmio, el mercurio o el arsénico. Magnesio, potasio, estroncio, calcio, azufre y fósforo son inocuos o metabólicamente necesarios a las levaduras. El potasio es esencial y puede ser reemplazado parcialmente por sodio, litio, rubidio o cesio. El magnesio es un activador de una multitud de enzimas alostéricas y además se requiere para el crecimiento de las levaduras. Forma parte imprescindible de algunas reacciones metabólicas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. El calcio estimula la fermentación de los azúcares siempre y cuando el magnesio esté presente.

Cobre, hierro y zinc son esenciales. El manganeso se requiere en cantidades pequeñas pero puede ser tóxico en grandes cantidades. El cromo forma parte del Factor de Tolerancia a la Glucosa (FTG) y se han desarrollado levaduras ricas en este componente y en selenio, ambos necesarios en la dieta humana y en general deficitarios (Soriano y Guerrero 2005).

### ***Factores de crecimiento***

La biotina es esencial para *Saccharomyces cerevisiae* e interviene en los procesos de síntesis de membrana. Otras especies como *Hansenula anomala* o *Candida utilis*, no tienen esta necesidad. Las levaduras pueden precisar ácido pantoténico, tiamina, inositol, niacina, piridoxina, riboflavina, ácido fólico etc (Umezawa y Kishi 1989). El ácido pantoténico es un componente de la Coenzima A, esencial para la continuidad de la oxidación del ácido pirúvico, producto final de la ruta glucolítica durante la aerobiosis, en la degradación de ácidos grasos de cadena larga y también en la síntesis de los ácidos grasos.

La tiamina estimula el crecimiento de la levadura panadera y algunas cepas de *S. cerevisiae* las requieren. La levadura de cerveza (Ale) precisa tiamina o piridoxina, en tanto la fermentación sumergida (*S. ovarum*) no las requiere. Por su parte, las especies del género *Kluyveromyces* caracterizadas por fermentar la lactosa, necesitan ácido nicotínico, uno de los componentes del NAD y NADP.

La piridoxina es esencial para algunas especies de *Saccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia* etc.

La riboflavina y el ácido fólico son sintetizados por todas las levaduras. El ácido *p*-aminobenzóico es necesario.

### ***Oxígeno***

Es también un nutriente para las levaduras. Las especies del género *Saccharomyces* pueden crecer bajo condiciones microaerófilas, sin embargo, no existen en las levaduras anaeróbicos estrictos. Por el contrario muchas son aerobios estrictos y no pueden subsistir sin oxígeno. El oxígeno es el aceptor final de electrones en la cadena respiratoria en la que se libera la energía de los sustratos carbonados en forma de ATP a través de la fosforilación oxidativa asociada.

El oxígeno difiere del resto de los nutrientes por el hecho de que su solubilidad en agua es extremadamente baja en relación con los requerimientos de los organismos vivos, y que para su incorporación a la célula debe atravesar la interfase sólido-líquido entre la burbuja de aire y el medio que la contiene. La concentración de oxígeno en la fase gaseosa afecta la tasa de transferencia (OTR) pero no es suficiente conocer el oxígeno disuelto para determinar su

efecto sobre el metabolismo, sino que debe determinarse su consumo real a través de alguna medida indirecta como es la medición del calor evolucionado o el CO<sub>2</sub> formado. Este último se produce en cantidades estequiométricas durante la actividad metabólica y el crecimiento por lo que el estudio del cociente respiratorio (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> es aproximadamente igual 1 durante la aerobiosis) es un indicador adecuado a estos efectos.

## FUENTES COMERCIALES DE NUTRIENTES

Dentro de las fuentes comerciales de nutrientes, las melazas sean de caña o remolacha, el mosto de uvas, la cebada malteada, los licores sulfúricos, la masa panadera y en menor medida los hidrocarburos, son probablemente las más importantes. Los jugos de caña y la caña troceada se pueden usar también en la producción de etanol como está siendo utilizado en Brasil (Goldemberg y Macedo 1994). Los hidrolizados de almidón, por ejemplo de yuca, y el suero lácteo (rico en lactosa) pueden ser empleados también como sustrato aunque su uso no es extensivo en la actualidad.

### *Jugos de caña*

A partir de los resultados del programa de alcohol brasileño, los jugos de caña han ido ganando en el interés general como fuente directa de azúcares para la fermentación alcohólica (Goldemberg y Macedo 1994). En 1975 se inauguró el programa PROALCOOL y su mayor objetivo era reducir las importaciones de combustible automotor. Hoy numerosos países se han sumado a esta iniciativa (Buillon 2005, Koizimi 2005; Horta-Nogueira 2005). Los jugos de caña usados directamente son una alternativa para la producción actual de alcohol (Goldemberg y Macedo 1994, Damodaran 2002). La Tabla 2 muestra la composición promedio de los jugos de una fábrica de azúcar cubana que produce alcohol de jugos (Bello et al 2005).

**Tabla 2 Composición media de los diferentes jugos de la fábrica de azúcar Heriberto Duquesne, Villa Clara, Cuba**

Jugo	°Brix	Polarización	Pureza,	Lodos, %
------	-------	--------------	---------	----------



			%	
Primer molino	19.66	16.99	86.36	ND
Jugo Mezclado, molinos 2-4	14.85	12.71	85.73	9.80
Jugo Mezclado filtros*	14.72	12.56	85.34	8.72
Jugo de los filtros	13.63	11.53	80.95	18.30

\* mezcla de jugos de los filtros con jugos molinos 2-4

El sistema de molienda de la caña consta de varios molinos en el tandem, generalmente entre 4 y 7. El primer molino rinde el jugo primario que contiene alrededor del 60 % del azúcar que entra en la fábrica y se emplea en la fabricación de azúcar normalmente. Los jugos secundarios son los más adecuados para la fermentación alcohólica (Damodaran 2002). Su pureza es muy alta en comparación con las melazas y otros siropes intermedios, lo que redundaría en mayores eficiencias de fermentación (Saura et al 2005). La utilización de las corrientes de jugos secundarios trae además otras ventajas para la fábrica de azúcar. Al no tener que evaporar el volumen total de jugo en caña, el bagazo sobrante se puede desviar a la cogeneración eléctrica, el azúcar producido es de mayor calidad al partir de jugos más puros.

La comparación de la fermentación de jugos y a partir de melazas, arroja diferencias de eficiencia favorables a los primeros (Bello et al 2005).

### ***Melazas de caña y remolacha***

Son los productos más ampliamente utilizados para la producción de levadura panadera. Aunque se distinguen diferentes tipos de melazas provenientes de la caña, a saber: meladura invertida (*High test molasses*), de refinera y la melazas como tal, solo estas últimas responden al nombre genérico de melazas. Al igual que las melazas de remolacha, contienen 50 % de azúcares residuales, azúcares invertidos (en las melazas de caña) y sacarosa en las de remolacha. Ambas contienen compuestos nitrogenados tales como: amino ácidos, purines y pirimidinas, así como betaína en las melazas de remolacha. El contenido de nitrógeno es mayor en estas últimas, alcanzando entre 1 y 2 % de su materia orgánica y algo más bajo en las de caña (0.4-1.4 %).

El nivel de biotina es de 2.7-3.2 ppm y significativamente inferior en las melazas de remolacha en las que asciende solamente a 0.04-0.13 ppm. Esto obliga a suplementar las melazas de remolacha con este factor de crecimiento, algo innecesario si de las melazas de caña se trata.

En general, las melazas son siropes viscosos, oscuros que se obtienen como residuo final de la producción de azúcar (Meade 1967).

La sacarosa, así como glucosa y fructosa son los azúcares que se utilizan en la propagación de la biomasa microbiana o en su conversión en algún producto fermentativo como el etanol (Munene et al 2000; Sikander 2002)

Las propiedades de las melazas fluctúan de acuerdo con: la variedad de planta, la que a su vez cambia en función de la zona, época del año y de las condiciones climáticas. Otros factores que afectan la composición de las melazas están relacionados con el proceso fabril. La Tabla 3 muestra la composición promedio de las melazas cubanas.

**Tabla 3 Composición promedio de las melazas de caña cubanas**

Año	°bx	msg, %	SRL, %	SRT %	Coloides, %	Cenizas, %	NA/A, %
66/67	90	85.3	24.8	65.3	4.5	11.2	0.53
67/68	89	84.4	26.7	64.9	6.6	9.8	0.54
68/69	88.7	84.6	25	62.4	7.9	10.4	0.60
69/70	ND	88.6	24.6	62.1	9.2	10.6	0.61
72/73	ND	90.4	24.9	61.5	9.9	9	0.62
73/74	ND	90.1	21.3	60.5	7.5	9.6	0.65
74/75	ND	91	22.6	61.4	6.1	9.1	0.63
75/76	ND	83.9	20.3	56.3	6.1	9.4	0.78
76/77	88.9	82.2	23.1	53.4	ND	9.8	0.87
78/79	89.6	80.3	18.1	46.6	9.1	9.5	0.75
80-89	86	85.4	20.5	55.5	9.5	12.3	0.82

Las melazas fueron el edulcorante más popular en todo el siglo XIX. Usadas para endulzar bebidas así como en la repostería, fueron también empleadas en el aderezo de carnes, especialmente de cerdo y jamón. Solo después de la Primera Guerra Mundial las melazas cedieron su puesto al azúcar como el edulcorante universal.

Estos siropes no solamente se han utilizado en la fabricación de rones, sino que también han sido incorporadas a la alimentación humana directa a través de una amplia gama de productos horneados.

Dada su composición rica en azúcares reductores (glucosa y fructosa) y compuestos aminados, las melazas son propensas al deterioro químico producido por la reacción entre estos compuestos mencionados (reacción de Maillard). Los intermediarios y productos de esta reacción son fuertes inhibidores de los procesos microbianos como el 5-hidroximetilfurfuraldehído.

La Tabla 4 muestra la composición de una miel almacenada por 90 días a 60 °C y su influencia sobre la tasa máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) de levadura *Candida utilis* (Otero et al 1994a).

**Tabla 4 Influencia del almacenamiento de la miel final de caña a 60 °C sobre la tasa de crecimiento de la levadura *Candida utilis* NRRL Y-660**

Tiempo, días	Coloides irreversibles, %	Sacarosa, %	Glucosa, %	Lodos, %	$\mu_{max}$ , h <sup>-1</sup>
0	3.1	21.8	15.0	4.07	0.50
22	4.7	20.2	13.0	4.09	0.47
30	5.2	17.3	9.8	4.75	0.46
60	10.6	8.7	2.8	7.32	0.31
90	23.7	5.3	ND	9.07	0.20

#### ***Vinazas de destilerías de alcohol***

En la producción de etanol, las aguas residuales son un subproducto de las aguas de enfriamiento de los condensadores y fermentación, o residuos de las torres de destilación

(Martínez et al 2004). De las aguas residuales producidas por los complejos productores de azúcar y etanol, las más contaminantes debido a su elevado contenido de sustancias orgánicas biodegradables y no biodegradables, son las vinazas. Estas se producen a una tasa de 12 a 16 m<sup>3</sup> HL<sup>-1</sup> de etanol. La Demanda Química de Oxígeno (DQO) varía según la eficiencia en la fermentación y la destilación, pero en general oscila entre 50 y 65 kgm<sup>-3</sup> (Martínez et al 2005a).

Sin embargo, las vinazas aún contienen una serie de nutrientes asimilables por la levadura como residuos de etanol no destilado, glicerol etc. De ahí que, convenientemente suplidas con sales inorgánicas y estimuladores de crecimiento microbiano (Martínez et al 2005b) pueden sustentar el crecimiento microbiano y por tanto, resultan una alternativa interesante debido a la economía que introduce en la utilización de recursos y energía (Saura et al 2003; Martínez et al 2004) y por razones de índole ecológica. La Tabla 5 ofrece la composición de diferentes vinazas (Decloux y Bories 2002).

**Tabla 4 Composición típica de las vinazas de diferentes procedencias. Valores en gL<sup>-1</sup> (Kampen y Saska 1999)**

<b>Vinazas de:</b>	<b>Melazas de remolacha</b>	<b>Melazas de caña</b>	<b><i>Maíz</i></b>
pH	4.6-4.9	4.6-4.9	3.7-4.1
DBO <sub>5</sub>	30-40	28-38	22-32
Sólidos totales	70-95	70-90	55-80
Glicerol	6.5-9.0	24-30	7-12
Betaína	15-20	----	----
Ácido succínico	0.8-0.9	1.5-2.0	0.85-1.0
Inositol	0.4-0.9	0.9-2.8	---
Ácido aconítico	---	0.9-1.3	---
Ácido itacónico	---	0.7-1.1	---

Las vinazas que se producen en Cuba, difieren un tanto en cuanto a composición y esto depende básicamente de la eficiencia en la destilación de cada destilería en particular (ver Tabla 5).

**Tabla 5 Composición media de las vinazas cubanas**

Materia seca, °bx	7 ± 1.1
DQO, kg/m <sup>3</sup>	60 ± 15
pH	4.5 ± 0.5
Acidez, %	0.56 ± 0.08
Ácidos volátiles, %	0.20 ± 0.06
Azúcares reductores, %	1.64 ± 0.97
Azúcares invertidos, %	1.34 ± 0.92
Reductores no fermentables, %	0.8 ± 0.03
Etanol, %	0.25 ± 0.05
Glicerol, %	19 ± 1.12
Cenizas, %	1.3 ± 0.04

Las mezclas de vinazas con melazas de caña o estimuladores de crecimiento (Martínez et al 2005b) han demostrado ser un sustrato adecuado para la propagación de levaduras primarias con propósitos forrajeros (Saura et al 2003, Martínez et al 2004), lo que además sirve como tratamiento primario de éstas. Bajo estas condiciones, una destilería de 5000 L de etanol por día, produce vinazas suficientes para sustentar una producción de 13 toneladas de levadura por día (Saura et al 2002a, 2002b, Otero et al 2002; Saura et al 2003). La calidad de la vinhos producida sobre este medio, no difiere significativamente de la obtenida de las melazas directamente. La comparación entre los dos productos puede observarse en la Tabla 6 (Martínez et al 2004).

**Tabla 6 Composición de la biomasa de levadura a partir de vinazas y mezclas vinazas:melazas**

Componente	Vinazas	Vinazas:melazas (80:20)
Proteína Kjeldahl, %	46.54	47.06
Ácidos nucleicos, %	9.24	9.46
P como P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , %	3.43	3.12
Cenizas, %	8.43	9.17
Aminoácidos, %		

Lisina	4.03	3.95
Serina	1.84	1.97
Treonina	2.20	2.56
Valina	5.31	5.46
Metionina + Cisteína	0.81	0.77

### ***Cebada malteada***

La cebada malteada, sustrato principal en la fabricación de la cerveza, se producen por la hidrólisis de los polisacáridos del grano y sus adjuntos amiláceos. Esto incluye glucosa, maltosa, fructosa, sacarosa, maltotriosa y maltotetraosa, así como pequeñas cantidades de otros azúcares. La cebada malteada contiene nitrógeno amoniacal  $\alpha$ -amino, aunque no lo suficiente para soportar la fermentación (Apex Publishers 2005). La cebada malteada es a la producción de cervezas como las uvas lo son a la del vino. Este cereal posee una gran cantidad de enzimas que convierten el almidón en glucosa y contiene además proteínas indispensables para la nutrición de la levadura.

Los constituyentes de la malta son mayormente carbohidratos compuestos por celulosa, hemicelulosas, dextrinas, almidón y azúcares simples. En la fabricación de la cerveza, la fermentación tiene lugar sobre los azúcares simples.

### ***Alcoholes***

Los alcoholes sintéticos, básicamente etanol y metanol, pueden ser utilizados como fuentes de C y energía en los procesos biológicos. El etanol es miscible en agua en todas las proporciones y produce una espuma ligera que facilita la distribución de aire en el medio de cultivo. Sin embargo, esta práctica ha caído en desuso debido los actuales requerimientos de oxigenantes para la gasolina en sustitución del MTBE (Adam et al 2002; Beer et 2002; Deeb et al 2003). El metanol también es soluble en agua y posee propiedades similares al etanol. En los años 80, la ICI (Imperial Chemical Industries) desarrollo un proceso el llamado Pruteen de propagación de bacterias metilotróficas para la producción de proteína unicelular para la alimentación animal. La Tabla 7 ofrece algunos microorganismos capaces de propagarse sobre metanol.

**Tabla 7 Microorganismos capaces de crecer sobre metanol como fuente de carbono (Otero et al 1982)**

Microorganismo	<i>Proporción del peso seco</i>	
	Proteínas, %	Ácidos nucleicos, %
<i>Kloeckera sp</i>	45	5.5
<i>Hansenula polymorpha</i>	50	9.0
<i>Torulopsis glabrata</i>	83	16
<i>Methylomonas methanolica</i>	82	NR
<i>Methylomonas sp</i>	71.5	12.8

El glicerol puede ser igualmente utilizado para soportar la multiplicación celular. La Tabla 8 (Martínez et al 2005b) muestra algunos parámetros cinéticos del crecimiento de levadura *Candida utilis* sobre etanol y glicerol y su comparación con mezclas vinazas/ melaza.

**Tabla 8 Comportamiento cinético de *Candida utilis* NRRL Y-660 propagada sobre etanol y glicerol en un medio de crecimiento mínimo y diferentes mezclas de vinazas-miel (Martínez et al 2005b)**

Fuente de C	$\mu_{max}, h^{-1}$	Y x/s	Reducción de DQO %
Etanol	0.338	0.641	-----
Glicerol	0.330	0.627	-----
Vinazas-miel (expresados como aporte de DQO)			
70:30	0.429	0.382	38.90
80:20	0.391	0.323	39.37
85:15	0.338	0.325	41.90
PCM 0.03 g/L	0.274	0.307	65.32
PCM 0.05 g/L	0.278	0.315	64.28

### ***Licores sulfíticos***

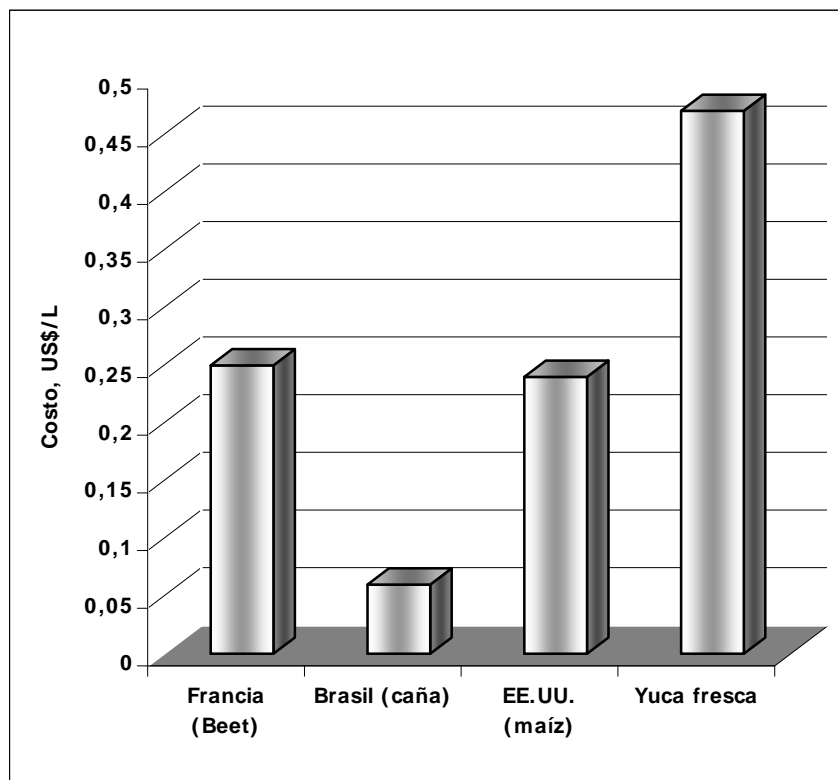
Estos desechos de la industria papelera contienen lignosulfonatos, ácidos aldónicos, ácido urónico, polisacáridos y monosacáridos como glucosa, arabinosa, manosa etc. Manosa es el azúcar mayoritario. *Candida utilis* crece excelentemente en esta fuente de carbono si está presente una fuente de nitrógeno amoniacal y se añade cloruro de potasio. Otras especies como las del género *Saccharomyces*, si bien son capaces de crecer en este medio, no son capaces de utilizar las pentosas.

### Yuca (*Manihot utilisima*)

En los últimos tiempos, la yuca principal producto agrícola de muchos países del Tercer mundo y en especial de África y el Sudeste asiático, está siendo valorada seriamente para la producción de etanol a partir de los grandes volúmenes cosechados y la ya establecida industria de almidón de yuca (Asadu et al 2002a, 2002b; Barrigossi et al 2002).

Como sustrato carbonado, su cuello de botella radica en los precios de cultivo y preparación. El precio del tubérculo fluctúa desde US\$ 35.00/t en Tailandia hasta cerca de US\$ 70.00/t en Brasil, varias veces más caro que el de la caña, que por demás requiere una menor preparación.

La Fig 2 ofrece los precios de distintos productos agroindustriales como sustrato para la producción de etanol (Otero et al 2005).





## Fig 2 Costes de producción etanol a partir de diferentes materias primas

La Tabla 9, por su parte, muestra la producción estimada de yuca, harina de yuca y almidón en el sur y Sudeste brasileño para 2005 (Otero et al 2005).

La yuca, al igual que otros tubérculos como el sorgo dulce (ver más adelante) requiere de cierta preparación antes de que las levaduras puedan fermentarla (Paolucci et al 2000). El proceso de preparación pasa por el troceado de la masa en *chips* para aumentar la superficie, seguido del secado al sol. Una vez secos los *chips* se someten a la liquefacción por acción de una  $\alpha$ -amilasa y posteriormente las dextrinas resultantes convertidas en glucosa por una enzima del tipo glucoamilasa (Fontana et al 2001).

**Tabla 9 Estimados de producción de raíz de yuca, harina y almidón en Brasil en 2005\***

estado	Tubérculo	Almidón	Harina
Paraná	4.08	0.562	0.229
Mato Grosso del Sur	0.78	0.128	0.034
Santa Catarina	0.59	0.015	0.067
Sao Paulo	0.86	0.045	0.085
Total	6.31	0.750	0.414

\* millones de toneladas

La yuca es un cultivo de zonas tropicales y subtropicales. La temperatura media ideal para su desarrollo oscila entre los 18 y los 35 °C y la temperatura mínima que puede tolerar es de 10 °C. Pudiendo, bajo esas condiciones, desarrollarse en alturas hasta de 2 m. Es, además, resistente a las sequías.

El cultivo puede permanecer en producción desde 10 meses hasta 3 años. Las cosechas son mayores a medida que el cultivo tiene más tiempo (Otero et al 2005).

### ***Sorgo dulce (Sorghum bicolor)***

El tallo del sorgo dulce puede almacenar azúcares hasta el 40 % del peso seco de éste. Estos azúcares son mayormente sacarosa (25-30% del peso seco) y menores cantidades de glucosa y fructosa. En los países templados de Europa, el sorgo dulce se cultiva entre abril y octubre en tierras con regadío (Monti y Venturi 2003; Venturi y Venturi 2003). El sorgo dulce ha sido cultivado por más de 100 años en el sureste de los EE.UU. en pequeñas plantaciones para producir sirope dulce (<http://nariphaltan.virtualave.net/sorghum.htm>).

La especie híbrida de sorgo dulce llamada "Madhura" ha sido desarrollada para la producción de etanol, siropes y azúcar sin refinar. Recientemente en la India, se ha establecido la obligatoriedad de incluir 5 % de etanol en la gasolina por lo que se ha iniciado un programa para incrementar la producción de sorgo dulce con estos fines (<http://pune.sancharnet.in/nariphaltan/seedworld.htm>). El sorgo dulce es altamente nutritivo, como lo demuestra la comparación del sirope azucarado con la miel de abejas (ver Tabla 10).

**Tabla 10 Comparación de los constituyentes del sirope de sorgo dulce (Madura) con la miel de abejas**

	<b>Sorgo dulce (Madura)</b>	<b>Miel de abejas (Promedio)</b>
Valor calórico, Kcal/g	2.60	3.26
Sólidos totales, % en peso	77.00	81.00
Azúcares reductores totales, % en peso	70.30	70.40
Proteínas (N x 6.25), % en peso	1.65	-
Cenizas, % peso	3.69	0.59

### ***Mieles cítricas***

Estas melazas son producidas del líquido que resulta del prensado de las cáscaras de naranja. Se concentra generalmente hasta 40-50 °bx y se venden a las destilerías para su empleo en la fermentación alcohólica, o simplemente se vuelven a unir con las cáscaras

prensadas para comercializarlas como alimento animal, que es su uso principal. Si las melazas se van a almacenar por más de 72 horas se concentran a 72 °bx (Vincent Corp 1998) para evitar la fermentación de los azúcares por microorganismos contaminantes.

## **FUENTES DE NITRÓGENO**

Varias sustancias orgánicas e inorgánicas que contienen N, pueden ser empleadas como fuentes de este elemento para el crecimiento microbiano. El rango de mecanismos para la incorporación de nitrógeno a la biomasa microbiana, es mucho más amplio que para las fuentes de carbono. Una gran cantidad de microorganismos, especialmente hongos inferiores, levaduras y bacterias utilizan el nitrógeno de fuentes inorgánicas. El más usado es el sulfato diamónico y a la vez el más barato. En conjunción con el fosfato diamónico, el amoníaco o la urea puede ser empleado para el control del pH.

### ***Fuentes inorgánicas y orgánicas sintéticas***

El  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  es altamente soluble en agua lo que facilita su suplementación a los medios de cultivo. La forma más usada en la industria es de grado técnico con un mínimo de 20,7% de nitrógeno. El hidrógenofosfato diamónico es usado básicamente en la producción de etanol por levaduras, así como en la propagación primaria de estos microorganismos. Es una excelente fuente de nitrógeno y fósforo. Contiene alrededor de 20% del primero y hasta 47-50% de fósforo, expresado como  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

El  $\text{NH}_3$  es usado tanto como fuente de nitrógeno como en el control de pH. Se puede suministrar en forma de agua amoniacal (25% de  $\text{NH}_3$ ) o en fase gaseosa. La urea se usa en la industria con frecuencia por ser una fuente de nitrógeno más barata, aunque el nitrógeno que contiene está en forma menos asimilable que en los sulfatos. En la producción de levadura forrajera puede emplearse junto con el sulfato de amonio para el control de pH, en procesos en los que se utilizan melazas finales como fuente de carbono, no así en las mezclas vinazas-miel por su tendencia a incrementar el pH del medio. De cualquier forma, las levaduras la utilizan con dificultad por carecer de la enzima ureasa.

### ***Fuentes naturales de Nitrógeno***

#### ***Licor de maíz.***

Es una de las fuentes básicas de N orgánico utilizadas en la bioindustria. Es un subproducto de la producción de almidón de maíz y contiene numerosas sustancias bioactivas en diferentes proporciones en función de la calidad del maíz y el proceso de obtención. Estas sustancias son liberadas durante el remojo de maíz y en este proceso participan las bacterias lácticas. Su composición es muy completa a los efectos del crecimiento microbiano y la producción de metabolitos no asociados al crecimiento.

***Extracto de levadura.***

Los autolizados de levadura son concentrados de los componentes solubles de las células de levadura que se producen predominantemente por autólisis. Los autorizados se conocen también como extractos de levadura (cuando son libres de residuos celulares) y se emplean regularmente en la industria fermentativa como fuente de nitrógeno y otros nutrientes, y también como potenciador de sabor en la industria alimenticia (Sommer 1996).

La fuente principal para la producción de extracto de levadura la componen diferentes cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas con este propósito. Los extractos pueden ser elaborados también a partir de levadura de cerveza desamargada (*Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces uvarum*). Otras materias primas en uso son levaduras como *Kluyveromyces fragilis* (cultivada sobre suero lácteo) o *Candida utilis* (propagada sobre diferentes sustratos).

El proceso de autólisis se inicia por un choque térmico u osmótico controlado que causa la muerte celular sin inactivar sus enzimas intracelulares, particularmente las proteasas. El proceso puede ser acelerado por la desintegración celular previa (Vasallo et al 2001). La Tabla 11 muestra la composición típica de un extracto de levadura de *K. fragilis* (Vasallo et al 2001)

**Tabla 11 Composición química de extracto de levadura de *Kluyveromyces fragilis* cultivada sobre melazas de caña**

Componentes, %	<i>Extracto</i>
Nitrógeno total	<i>6.17 ± 0.35</i>
Nitrógeno Kjeldahl (Nx6.25)	<i>38.56 ± 2.33</i>
Proteína Lowry	<i>18.89 ± 0.78</i>

Nitrógeno no proteico	$3.15 \pm 0.11$
Nitrógeno amínico	$2.64 \pm 0.09$
Carbohidratos	$9.01 \pm 0.97$
<i>Cenizas</i>	$7.9 \pm 0.39$

### **ELEMENTOS TRAZAS.**

El P y el Mg son nutrientes importantes en los medios de crecimiento por la participación que tienen en las reacciones mediadas por ATP. La biomasa microbiana contiene Ca, K, S y Na y por tanto estos elementos tienen que estar presentes en el medio. Otros elementos como Zn, Cu, Cr, Mn etc son también necesarios pero están presentes regularmente como impurezas en las sales nutrientes o de los propios sustratos carbonados como es el caso de las melazas de caña. La Tabla 12 muestra los contenidos de cationes metálicos de las mieles de caña del nordeste cubano (Otero et al 1993).

**Tabla 12 Contenido de Ácidos Orgánicos Volátiles en las Melazas del Nordeste de Cuba<sup>(1)</sup>.**

Fábrica	Acético	Propiónico	Butírico	Valérico
1	660	ND	ND	ND
2	180	90	80	1.4
3	240	60	100	3.3
4	650	TR	ND	ND
5	260	31	70	7.0
6	140	60	76	2.0
7	140	TR	130	ND

(1) Los valores expresados en mg/kg responden a las medias de tres zafras consecutivas; ND = no detectado; TR = trazas.

## **CONTROL QUÍMICO Y BIOLÓGICO DE MATERIAS PRIMAS. ALMACENAMIENTO Y HOMOGENIZACIÓN.**

### ***Control químico y biológico de materias primas***

Los microorganismos utilizados para propósitos de producción son en general muy sensibles a mínimas trazas de sustancias tóxicas o estimulantes. El análisis químico de una sustancia no puede por tanto proporcionar un panorama real de su adecuación para un determinado proceso biológico. Esto es particularmente importante cuando se emplea sustancias que no poseen una composición química definida como son los sustratos de origen natural, que en realidad son mezclas complejas de diferentes sustancias. El análisis químico de todos y cada uno de sus componentes está más allá de lo que se considera racional además de que puede encarecer innecesariamente el trabajo.

La calidad de cada lote de materias primas solo puede ser determinada por la prueba biológica. Así cada sustrato o nutriente debe ser sometido a una prueba de cultivo donde se comparen los resultados con los obtenidos con un lote estándar.

### ***Almacenamiento y transporte de materias primas***

La producción de ciertas materias primas es estacional y solo pueden ser obtenidas en determinadas épocas del año y almacenarse durante el tiempo entre dos producciones (o cosechas). Tales son los casos de las melazas azucareras, aceite de maní etc. Otras materias se obtienen durante todo el año y en ese caso solo se precisa mantener una reserva mínima que garantice una operación continuada (e.g. vinazas).

En caso de almacenamiento prolongado, las condiciones de éste deben ser tales que no produzcan variaciones en la calidad que puedan afectar el proceso de producción. Como la mayoría de las materias primas para los procesos biológicos son de origen vegetal, van a estar seriamente afectada por condiciones externas como la humedad, temperatura, iluminación, deterioro microbiano etc. La temperatura y la humedad deben controlarse dentro de los límites establecidos para cada material. La organización y manejo de estas materias primas dentro de la planta, es también importante.

## **EVALUACIÓN DE MATERIAS PRIMAS**

En general los sustratos naturales son en extremo variables y su composición depende no solo de factores naturales como clima, variedad de la planta de donde proceden etc, sino también de la tecnología de procesamiento aplicada y las variables operacionales de ésta (Otero et al 2003). Es por eso que la correcta y minuciosa evaluación del sustrato a escala de banco es una etapa imprescindible antes de introducirla en la industria.

Una metodología sencilla para la evaluación de las mieles finales y otros sustratos azucarados consiste en preparar un experimento de 8-12 horas de duración, en dependencia de las observaciones horarias, para la determinación de la tasa máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) y el rendimiento final de biomasa sobre el sustrato. Se determina la concentración de biomasa presente cada hora por materia seca y el consumo de sustrato por ART, DQO o cualquier otro método adecuado para el sustrato en cuestión.

En el caso de sustratos utilizados durante mucho tiempo es conveniente contrastar los resultados con las medias obtenidas a lo largo del tiempo con aquellos lotes con resultados satisfactorios.

A los efectos de la determinación todos los otros componentes del medio deben estar en exceso de 10-20 % para asegurar que la fuente a evaluar sea el sustrato limitante (Otero et al 2001).

## BIBLIOGRAFÍA

- Adam, G; Gamoh, K; Morris, DG; Duncan, H (2002) Effect of alcohol addition on the movement of petroleum hydrocarbon fuels in soil *Sci Total Environm* **286** (1-3):15-25.
- Anon (2005) Project INT04/K04 Development of New Technologies and Products for the Whole Utilization of Marginal and Primary Yeasts as Sources of Food (YAF) Output No 2. Information of detailed operation in each industry. <http://www.org.cu/documentos/ProgRepIndustryDiagnosis.pdf>
- Apex Publishers (2005) The Brewer's Handbook [http://www.apexpublishers.com/apex\\_books\\_titles/brewer\\_handbook.htm](http://www.apexpublishers.com/apex_books_titles/brewer_handbook.htm)
- Asadu, CLA; Dixon, AGO (2002) Comparative effects of continuous cultivation of seven crop combinations on soil physicochemical properties in two soils of different land use history in eastern Nigeria *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* **33** (19-20):3545-3566.
- Asadu, CLA; Dixon, AGO; Okechukwu, R (2002) Comparative evaluation of the contributions of soil physicochemical properties to variations in the yields of four major staple food crops in eastern Nigeria *Soil Tillage Res.* **65**:141-155.
- Barrigossi, JAF; Zimmermann, FJP; da C. Lima, PS (2002) Consumption rates and performance of *Erinnyis ello* L. on four cassava varieties *Neotrop Entomol* **31**:429-433.
- Beer, T; Grant, T; Williams, D; Watson, H (2002) Fuel-cycle greenhouse gas emissions from alternative fuels in Australian heavy vehicles *Atmosphere Environ* **36** (4): 753-763.
- Bello, D; García, R; Otero, MA; Saura, G (2005) Fermentación alcohólica con jugo de caña mezclado Empresa Mielera Heriberto Duquesne *Sobre los deriv* **39** (2):
- Buillon, A (2005) Etanol trends *Int. Sugar J* **107** (1275):138-141.
- Chen, CS (1990) Predicting water activity in mixed solutions *J Food Sci* **55**:494
- Damodaran, H. (2002) Alcohol from cane juice a better alternative says user industry *The Hindu Bussiness Line*, Financial Daily, Tuesday, April 23th
- Decloux, M; Bories, A (2002) Stillage treatment in the French industry *Int Sugar J* **104** (1247):509-517
- Deeb, R; Chu, KH; Shih, T; Linder, S; Suffet, IM; Kavanaugh, MC; Alvarez, CL (2003) MTBE and other oxygenates: Environmental sources, analysis, occurrence, and treatment. *Environ Eng Sci* **20** (5): 433-447.



Fontana, JD; Passos, M; Baron, M; Mendes, SV; Ramos, LP (2001) Cassava starch maltodextrinization/monomerization through thermo-pressurized aqueous phosphoric acid hydrolysis *Appl Biochem Biotechnol* **91-93**:469-478

Goldemberg, J; Macedo, IC (1994) Brazilian alcohol program: an overview *Energy for Sustainable Development* **1** (1):17-22

Horta-Nogueira, LA (2005) Ethanol from sugarcane for gasohol in Central America *Int. Sugar J* **107** (1275):183-186.

Kampen, WH; Saska, M (1999) Value added products from Stillage of ethanol from molasses plants. *Symp. Adv. Technol. for Raw Sugar and Cane and Beet Refined Sugar*, New Orleans, Louisiana, USA

Koizumi, T (2005) The Brazilian ethanol programme: impacts on world ethanol and sugar markets *Int Sugar J* **107** (1275): 168-177.

LaRue, TA; Spencer, JFT (1968) Utilization of organic nitrogen compounds by yeasts of the genus *Saccharomyces Antonie Leeuwenhoek* **34**:153-158

Martínez, JA; Almazán, O; Saura, G; Otero, MA (2004) Production of fodder yeast from stillage in Cuba: an environmental approach *Zuckerindustrie* **129**:92-95

Martínez, JA; Otero, MA; Saura, G; Valdés, IF (2005a) Utilization of yeast nutrient QZ-350 as substitute of cane molasses in fodder yeast production *Wrap up Meeting of Project PGTF INT04/K04*, Mexico DF, March 8-10

Martínez, JA; Otero, MA; Saura, G (2005b) Producción de biomasa de levadura *Candida utilis* (torula) a partir de vinazas de destilerías de etanol Enviado a *Rev Facultad Farmacia* (Universidad de los Andes, Venezuela)

Meade, GP (1967) Manual de Azúcar de Caña (Roget-Paijá, J ed) Cap 2. Pag 43-49, Edición Revolucionaria, La Habana

Monti, A; Venturi, G (2003) Comparison of the energy performance of fibre sorghum, sweet sorghum and wheat monocultures in northern Italy *Eur J Agron* **19** (1):35-43

Munene, CN; Kampen, W; Prinyawiwatkul, W (2000) Balancing ethanol and glycerol production from cane molasses fermentation IFT Conference tomado de: ([http://iftconfex.com/ift/technoprogram/paper\\_3334.htm](http://iftconfex.com/ift/technoprogram/paper_3334.htm))

- Otero, MA; Bernal, GL; Almazán, OA (1982) Fuentes de materias primas y microorganismos utilizados en la producción de proteína unicelular (Collazo, N ed) Editorial Científico-Técnica, Ministerio de Cultura, La Habana
- Otero, MA; Reyes, A; Carrera, E; León, MA (1993) Composition and properties of sugar cane molasses from northeastern Cuba *Int Sugar J* **95** (1129):4
- Otero, MA; Saura, G; Valdés, I; Peña, MA; Martínez, JA; Pascual, A (2002) Análisis operacional del complejo destilería-planta de levadura en el CAI Antonio Guiteras. Parte II *Sobre los deriv* **36** (2):24
- Otero, MA; Peña, MA; Álvarez, I (2003) Evaluación de nutrientes para la industria de levadura forrajera *Sobre los deriv* **38** (2-3):33-37
- Otero, MA; Reyes, E; Saura, G; Martínez, JA; Fundora, N; Vasallo, MC; García, L; Valdés, IF; Roxete, A (2003) Caracterización química y microbiológica de mieles finales e intermedias de diferentes complejos agroindustriales *Sobre los deriv* **35** (2-3):69-73
- Otero, MA; Saura, G; Martínez, JA (2005) Producción de etanol a partir de diferentes materias primas. Un análisis comparativo *Sobre los deriv* **39** (1):
- Paolucci-Jeanjean, D; Belleville, MP; Zakhia, N; Rios, GM (2000) Kinetics of cassava starch hydrolysis with Termamyl(R) enzyme *Biotechnol Bioeng* **68** (1):71-7
- Phaff, HJ; Miller, MW; Mrak, EM (1979) The life of yeasts, 2nd edition. Harvard University Press, Cambridge
- Rajvanshi, A; Nimbkar, N (2001) Sweet sorghum R&D at the Nimbkar Agricultural Research Institute (NARI) tomado de: (<http://nariphaltan.virtualave.net/sorghum.htm>).
- Rajvanshi, A (2003) Sweet Sorghum Ideal for Biofuel: terms and conditions of use *Seed World* **14** (8) tomado de: (<http://pune.sancharnet.in/nariphaltan/seedworld.htm>).
- Sadae-Tano, M y Batista-Buzato, J. (2003) Efeito da presença de etanol inicial na produção de etanol em caldo de cana-de-açúcar fermentado por *Zymomonas mobilis* *Braz J Microbiol* **34** (3)
- Saura, G; Valdés, I; Martínez, JA; Fundora, N; Reyes, E; Pascual, A; Otero, MA (2002) Tecnología de producción de levadura utilizando las vinazas de destilería como fuente mayoritaria de carbono y energía *Sobre los deriv* **36**:18

- Saura, G; Otero, MA; Valdés,I; Peña. MA; Martínez, JA; Pascual, A (2002) Análisis operacional del complejo destilería-planta de levadura en el CAI Antonio Guiteras. Parte I *Sobre los deriv* **36** (1):28
- Saura, G; Otero, MA; Martínez, JA; Fundora, N; Reyes, E; Vasallo, MC; Almazán, O (2003) Propagation of yeast biomasa from distillery wastes. Process and product evaluation *Int Sugar J* **105** (1249):36-39
- Saura, G; Otero, MA; Pérez, MC; García, R; Martinez, JA (2005) Ethanol fermentation from sugar cane juices-molasses mixtures *Biomass Bioenergy* (enviado a)
- Scott, N.F. (1957). Water relation of food-spoilage microorganisms *Adv Food Res* **7**:83-127
- Sikander, A; Ikram-ul-Haq; Qadeer, MA; Javed, I (2002) Production of citric acid by *Aspergillus niger* using cane molasses in a stirred fermentor *Electronic J Biotechnol* **5** (3)
- Sommer, R (1996) Yeast Extracts. Production, Properties and Components *9th International Symposium on Yeasts, Sydney, August 1996*
- Soriano, J; Guerrero, I (2005) Levadura como complemento alimentario para humanos En:
- Spencer, JFT; Spencer, DM; Tulloch, AP (1979) Extracellular glycolipids in yeasts In: The Yeasts (Rose, AH; Harrison, JS eds) Vol 2, Academic Press, New York pp. 523-540
- Sykita, B (1984) Substrates for Microbial Processes. En: Modern Biotechnology (Krumphanzl, V. y Řeháček, Z). Institute of Microbiology, Czechoslovak Academy of Sciences
- Tanaka, A; Fukui, S (1989) Metabolism of n-alkanes In: The Yeasts (Rose, AH; Harrison, JS eds) Vol 2, Academic Press, New York pp. 5-40
- Umezawa, C; Kishi, T (1989) Vitamin metabolism In: The Yeasts (Rose, AH; Harrison, JS eds) Vol 2, Academic Press, New York pp. 457-488
- Vasallo, MC; Otero, MA; García, L; Dopico, JR; López, JC (2001) Effect of homogenization as pretreatment for the improvement of autolysis efficiency of *Kluyveromyces fragilis* *Food Sci Technol Int* **7**:445-450
- Venturi, P; Venturi, G (2003) Analysis of energy comparison for crops in European agricultural systems. *Biomass Bioenergy* **25** (3):235-255
- Vincent Corp (1998) Citrus Molasses tomado de: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/DS/DS14900.pdf>.
- Welti, J; Vergara, F (1997) Actividad de agua. Concepto y aplicación en alimentos con alto contenido de humedad. En. *Temas en Tecnología de Alimentos* (Parada-Arias, E. ed)

Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), Dirección de Publicaciones de IPN, México

### **CAP 3. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE LEVADURA FORRAJERA. EVALUACIÓN DE MATERIAS PRIMAS**

Gustavo Saura-Laria

Dirección de Biotecnología, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).

#### **INTRODUCCIÓN**

Bajo la denominación de levaduras forrajeras se estudian aquellas especies que se propagan, especialmente, para ser usadas en la alimentación animal, con vistas a aprovechar los componentes nutricionales que la constituyen, sobre todo proteínas y vitaminas.

Los géneros preferidos de levadura para su producción industrial son: *Candida* y *Saccharomyces*, mencionándose las especies *Candida utilis*, *C. pulcherrima*, *C. reukauffi*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. ovarum* entre otras. La elección de una cepa para que pueda ser desarrollada industrialmente debe considerar los siguientes factores: capacidad de asimilación del sustrato deseado, elevados rendimientos, alta velocidad de crecimiento, estabilidad bioquímica y de cultivo, fácil recuperación, valor nutricional elevado, sabor agradable y buena apariencia.

La experiencia mundial ha probado la posibilidad de utilización de los licores sulfúricos, melazas, hidrolizados de madera y de residuos celulósicos, hidrocarburos, residuos de almidón, suero de leche, mieles cítricas, vinazas de destilería de alcohol, etc., como fuente de carbono para esta producción. De los microorganismos que se pueden utilizar, se ha mostrado favorecido el uso de la especie *Candida utilis*, ya no solamente por su capacidad en asimilar hexosas y pentosas, sino también otros compuestos orgánicos no azúcares, tales como ácidos, alcoholes y aldehídos. Sin embargo, no es exclusivamente levadura forrajera la producida en específico para esos fines, sino también se destina aquella que se obtiene como subproducto de otros procesos fermentativos, tales como la producción de alcohol etílico (levadura de destilería) y de la fabricación de cerveza (levadura de cerveza). La levadura, en estos procesos, se le llama, en general, "levadura

secundaria' y tiene un valor nutricional un poco más bajo que la que se propaga; específicamente, para uso forrajero.

### ***Levadura forrajera a partir de las mieles finales de caña***

En los países tropicales, poseedores de una amplia industria azucarera a partir de la caña de azúcar, la producción de levadura forrajera, a partir de mieles finales, resulta particularmente atractiva, sobre todo si se tiene en cuenta la imposibilidad de contar con proteínas vegetales de bajo costo, tales como la soja, motivado por características climáticas. Es, además, una forma de independizarse de las variaciones del mercado exterior, en cuanto a la importación de materiales proteínicos adecuados para la producción de piensos.

La producción de levadura forrajera, a partir de mieles, se caracteriza por ser un proceso continuo en el cual la miel aporta carbohidratos, fuente de energía y factores de crecimiento en forma de vitaminas y minerales. Esta producción se lleva a cabo mediante cinco unidades básicas de proceso:

- Preparación de materias primas y auxiliares.
- Propagación de la levadura.
- Separación o recuperación de la levadura.
- Concentración y secado de la levadura.
- Envase, almacenamiento y manipulación.

### **MATERIAS PRIMAS Y AUXILIARES**

En esta producción se consideran como materias primas fundamentales la miel final y las sales nutrientes, aunque se utilizan otras en el proceso, que pudieran denominarse auxiliares, tales como agentes antiespumantes, ácidos o álcalis, productos de limpieza, de tratamiento de agua, combustible, lubricantes, etc.

La melaza es un substrato que por su naturaleza ya que contiene gran número de impurezas en forma coloidal y de suspensión, así como ácidos orgánicos volátiles y una flora microbiana elevada-, puede afectar el proceso de propagación de la levadura en aspectos fundamentales, como son el rendimiento y la calidad de la misma, así como a

otros parámetros no menos importantes, en los fermentadores. Por las razones expuestas anteriormente esta materia prima debe ser sometida a un tratamiento previo antes de su utilización en los fermentadores como veremos con posterioridad.

Las sales nutrientes aportan al medio, para propagar las levaduras en los fermentadores, la mayor parte del nitrógeno y fósforo requeridos para el desarrollo del microorganismo, pues el contenido de estos elementos es deficitario en las mieles. Las empleadas en la industria de levadura forrajera son el sulfato de amonio y la urea, como fuentes de nitrógeno y el fosfato diamónico, como fuente de fósforo, a la vez que suministra también parte del nitrógeno.

## **DESCRIPCIÓN TECNOLÓGICA, BALANCE DE MATERIALES Y DE ENERGÍA**

La industria de levadura forrajera cuenta, actualmente, con 2 tecnologías de producción. Lo que las diferencia como tales, es el proceso de propagación, tecnología de alta concentración celular, la cual emplea fermentadores, con sistema de aireación agitado de alta eficiencia, en los cuales se obtiene una concentración de levadura 3 veces mayor que en los equipos de la tecnología de baja concentración, donde el aire se utiliza como agente de mezclado y de suministro del Oxígeno.

### ***Secciones de proceso y de utilidades***

Para facilitar la descripción, consideraremos las distintas agrupaciones de equipos tecnológicos o secciones que conforman una instalación completa para la producción de levadura seca forrajera, dividida en 2 grandes grupos: las agrupaciones de equipos o secciones donde se realizan los procesos y operaciones que tienen que ver con las materias primas, así como el producto, las cuales llamaremos secciones de proceso y las que tienen que ver con los servicios auxiliares que demandan las anteriores que se llamarán secciones de servicios auxiliares.

Las secciones de proceso comprenden:

1. Almacenamiento, conducción y preparación de las mieles.
2. Preparación de las sales nutrientes y productos auxiliares.
3. Preparación del inóculo.

4. Fermentación-desemulsión.
5. Separación-lavado-recirculación.
6. Termólisis, concentración por evaporación.
7. Secado y envase-almacenamiento.

Las secciones de servicios auxiliares son:

8. Laboratorio de control.
9. Suministro de energía eléctrica.
10. Suministro de agua para consumo industrial.
11. Tratamiento de agua.
12. Refrigeración y circuitos de enfriamiento.
13. Almacenamiento y circuito de fuel.
14. Producción de vapor.
15. Estación de aire para instrumentación.
16. Estación de aire para fermentación.
17. Estación de limpieza y desinfección.
18. Taller de mantenimiento y almacenes.
19. Sistema contra incendio.

Los equipos tecnológicos que conforman las anteriores secciones deben garantizar una operación continua, es decir, aquellos equipos fundamentales que pudieran interrumpir el flujo continuo, por operaciones de mantenimiento y limpieza, están duplicados, tienen su reserva instalada.

Además, estas secciones o agrupaciones de equipos tecnológicos se encuentran ubicadas, en su mayor parte, en áreas techadas tales como las de producción, equipos auxiliares, taller de mantenimiento y almacenes. Otra área techada es la constituida por el edificio socio-administrativo y el comedor. Los equipos instalados a la intemperie son los que constituyen la sección de fermentación-desemulsión, los tanques de almacenamiento general y diario, la sección auxiliar de tratamiento de agua, en su



mayor parte (descarbonatación del agua cruda), la estación de transformación, parte de la sección de secado y envase-almacenamiento (cámara de secado, horno, algunas bombas, ventiladores, etc.) y el sistema de enfriamiento, así como el tanque almacén de agua de pozo.

### ***Almacenamiento, conducción y preparación de mieles***

La materia prima utilizada en esta sección es miel final de caña de 89 °Bx, aproximadamente, con una viscosidad que puede llegar hasta 100 000 cP y un contenido de azúcares reductores totales de 58 - 60 %. El objeto de la misma es el almacenamiento de la miel final, su predilución y calentamiento para la conducción hasta los tanques de diario de la planta, la dilución de la miel, clarificación, tratamiento térmico, enfriamiento y distribución hacia los fermentadores.

Esta primera sección o agrupación de equipos tecnológicos comprende:

### ***Almacenamiento y estación de bombeo de mieles***

Existen 2 alternativas de almacenamiento de las mieles. En el caso de las plantas que están ubicadas en el área de grandes centrales azucareros, con buena capacidad de almacenamiento, se utiliza la misma capacidad instalada y solamente se ha adicionado la estación de bombeo para conducir las mieles hasta los tanques de diario de la planta. En esta alternativa, si las plantas están muy distantes del central se ha instalado un tanque almacén intermedio con la estación de bombeo. En los casos de algunas plantas adjuntas a centrales pequeños, que no pueden abastecer el consumo anual de mieles requeridas para la producción de levadura, se han construido cisternas de recepción de mieles, junto con los tanques almacenes, esto posibilita recibir mieles de centrales tributarios de lá zona, mediante carros tanques de ferrocarril o por carretera. Para facilitar el bombeo de la miel desde los tanques de almacén hasta la planta es necesario reducir su viscosidad, lo cual se logra mediante 2 alternativas: calentamiento de la miel hasta unos 50 - 60°C, que es la alternativa que utiliza la tecnología de baja concentración o mediante una predilución discreta para llevar al grado Brix de 89 - 90, hasta 80, que es la que emplea la tecnología austriaca. En este último sistema, las

mieles, a la salida del tanque almacén, se filtran y se mezclan con condensados calientes, obtenidos en la evaporación de la crema de levadura, los cuales se adicionan mediante una bomba dosificadora, para efectuar la reducción señalada en el grado Brix de la miel. Esta operación se realiza en un mezclador estático.

### ***Preparación de mieles***

La miel diluida a 80 °Bx es recibida en los 2 tanques de diario, para almacenamiento de la miel en planta, en forma alternativa. Cada tanque tiene la capacidad requerida para 1 d de producción, de forma que cuando se esté llenando uno de ellos, se esté consumiendo miel del otro para la producción. Estos tanques están equipados con muestreador continuo que opera con bomba dosificadora, lo cual permite conocer la calidad de la miel que se va a utilizar cada día.

A la salida de los tanques de diario, la miel es filtrada y bombeada hasta el tanque pesa, en porciones de 8 t. La miel pesada es descargada en un tanque intermedio, desde donde se descarga, por gravedad, al tanque de dilución, al cual se le adiciona agua en forma automática, para llevar el contenido de sólidos totales de la miel hasta aproximadamente 43 °Bx. Este sistema de control de densidad opera de la siguiente manera: mediante una bomba se toma un flujo de 3 m<sup>3</sup>/h, desde el fondo del tanque de dilución, que es enviado a través de un filtro al equipo donde se controla la densidad de la miel mediante la regulación automática del flujo de agua. La miel que pasa por el densímetro es retornada de nuevo al tanque de dilución, este ciclo se mantiene de forma continua.

La miel diluida es transferida, continuamente, por un vaso comunicante a un tanque donde se inyecta vapor para elevar la temperatura. En este tanque la miel de 43 °Bx se mantiene a 80°C, aproximadamente, y de aquí es filtrada y bombeada hasta la estación de clarificación. Esta estación está constituida por 3 clarificadoras centrífugas, en 2 de las cuales se efectúa la separación mecánica y automática de los fangos que contiene la miel, mediante la fuerza centrífuga.

Los fangos obtenidos en estos 2 equipos son descargados en un tanque, donde se diluyen con agua para posteriormente filtrarse y bombearse a la tercera clarificadora,

cuya función es recuperar los azúcares contenidos en el fango. A partir de esta clarificadora las aguas dulces recuperadas se aprovechan, retornándolas al tanque de dilución de mieles, el fango libre de azúcares pasa a un tanque donde se diluye con agua y se envía a la zanja.

La estación de clarificación está diseñada de forma que se puedan utilizar, indistintamente, los 3 equipos para ambas funciones, es decir, 2 cualesquiera de ellos, para clarificar mieles y el tercero para recuperar las pérdidas de azúcares en fango. Además, la operación es automática, las descargas de fango se fijan a un intervalo de tiempo, de acuerdo con el contenido de fango en las mieles crudas. La miel diluida y clarificada es transferida por un vaso comunicante a un tanque, de almacenamiento intermedio, de donde es bombeada al inyector de vapor con un flujo controlado. Este inyector es alimentado, también, con vapor vivo de 2 atm absolutas de presión por medio de un sistema de control que opera en función de la temperatura de salida de la mezcla. La miel calentada hasta una temperatura de 110 - 120°C, pasa por una cámara de retención para completar el proceso de esterilización, desde aquí la miel es descargada a la torre de expansión, donde la temperatura de la miel baja a 85°C, aquí ocurre la condensación de los vapores (1000 - 1 100 kglh), en un condensador de contacto directo, al cual llega un flujo de agua de 15,6 m<sup>3</sup>/h, desde la torre de enfriamiento pequeña. En el condensador se mantiene un vacío de 0,3 - 0,4 atm, mediante una bomba de vacío, la cual mantiene, automáticamente, la temperatura de la miel en la torre de expansión.

La miel diluida, clarificada, esterilizada y libre de ácidos volátiles, es tomada del fondo de esta torre y bombeada, a través de intercambiadores de placa donde se enfría a 35 - 40 °C, hasta el tanque de miel preparada donde se distribuye, por gravedad, y con medidores de flujo hasta los fermentadores.

La diferencia fundamental de esta sección, con su homóloga en la tecnología francesa, estriba en que en ésta, la estación de clarificación solamente está constituida por 1 equipo, es decir, durante la limpieza manual del mismo, la miel continúa por una derivación sin clarificarse.

Además, el sistema de recuperación de las pérdidas en fango es menos eficiente. En la tecnología de alta concentración no existe derivado de la estación de clarificación, o sea, es obligatoria la clarificación continua de las mieles. En ambas tecnologías, todos los equipos que garantizan la continuidad del flujo de producción están instalados por duplicado, es decir, uno en operación y otro en reserva.

## **PREPARACIÓN DE LAS SALES NUTRIENTES Y PRODUCTOS AUXILIARES**

El objeto de esta sección es la preparación de las sales nutrientes, así como de los productos auxiliares utilizados en el proceso de producción.

### ***Preparación de sales nutrientes***

Es necesaria la suplementación del medio de fermentación con nitrógeno y fósforo, pues el contenido de ellos, en la miel, no es suficiente para el desarrollo del microorganismo (levadura). Se requiere el nitrógeno, fundamentalmente, como elemento básico en la formación de los aminoácidos, constituyentes de las proteínas, y el fósforo, como elemento esencial en los compuestos de alta energía, necesarios para el metabolismo.

El suministro de estos elementos se realiza, en esta tecnología, mediante 3 fuentes: sulfato de amonio, fosfato diamónico y urea. Dos tanques provistos de agitadores son utilizados para efectuar la preparación de las 3 sales. Se adiciona, primeramente, una cantidad determinada de agua al tanque donde se va a preparar la solución y se pone en marcha el agitador; posteriormente, una porción pesada de sal es introducida al tanque mediante un elevador de cangilones.

Una vez efectuada la carga de toda la sal se continúa la agitación durante corto tiempo y después se deja sedimentar por espacio de 2 ó 3 h o si es posible un mayor tiempo.

El sistema completo, además de los 2 tanques disolutores, consta de un tanque almacén-sedimentador, que se utiliza, preferentemente, para la solución de sulfato de amonio, por ser la sal de más difícil sedimentación, aunque se puede utilizar también, para el fosfato o la urea. Las soluciones de cada sal, una vez terminado el período de

sedimentación, son filtradas y bombeadas a sus respectivos tanques de alimentación, de donde pasan, por gravedad, a los fermentadores, a través de medidores de flujo del tipo rotámetro. La dosificación de ellas se realiza mediante un balance de esos elementos, de acuerdo con los requerimientos de la levadura y el aportado por la miel.

La relación de dosificación de las soluciones de sulfato de amonio y urea puede ser cambiada en función del pH que se quiere mantener en fermentación, siempre que permanezca constante la cantidad de N que deben suministrar ambas sales. Este método de controlar el pH en los fermentadores, es más económico y eficiente que la utilización de ácido o base, los cuales se deben emplear, solamente, en casos en que el control con las soluciones de sales mencionadas, no sea posible.

### **ANTIESPUMANTE**

Este producto se utiliza para controlar la espuma en los fermentadores y en el tanque de desemulsión. El antiespumante es almacenado en un tanque, desde donde es bombeado, una vez por día, al tanque de preparación. En el caso del Glanapón 2 000 FKW, que es el agente antiespumante recomendado para esta tecnología, se mezcla 1 volumen del mismo con 1 volumen de agua y se mantiene la mezcla, permanentemente agitada con aire. Desde este tanque el antiespumante es filtrado y bombeado a los fermentadores y al tanque de desemulsión.

### **ACIDO SULFÚRICO**

Puede ser utilizado para desinfección a bajo pH, eventualmente, para regular el pH de las mieles, para hacer más efectivo el tratamiento térmico, para controlar el pH en la sección de preparación del inóculo y, excepcionalmente, para corregir el pH de los fermentadores.

Para la recepción del ácido sulfúrico concentrado se emplea un tanque de acero al carbono desde donde es transportado, mediante una bomba especial colocada encima del mismo, hasta el tanque alimentador. En un tanque disolutor, primero, se adicionan 1 700 l, aproximadamente, de agua de proceso (1500 mm de altura en el nivel), se agita

con aire y se adicionan, lentamente, desde el tanque alimentador 100 l de ácido sulfúrico.

El sistema trabaja automáticamente, de manera que la relación de mezcla de agua y ácido puede ser prefijada al valor deseado. Además, está previsto un sistema de seguridad que no permite la adición de ácido al tanque disolutor en el caso que éste se encuentre vacío o cuando el aire para la mezcla no se suministre.

### **ETAPAS DE LABORATORIO Y PROPAGACIÓN DE CULTIVO PURO**

Para iniciar la fermentación se parte de un cultivo puro de laboratorio, el cual se pasa al propagador o fermentador de cultivo puro que tiene un volumen total de 1 m<sup>3</sup>, para un volumen útil de trabajo de 800 l.

El medio de cultivo, para este equipo, se prepara con miel diluida de aproximadamente 40°Bx a la que se adiciona agua, sales nutrientes y se le regula el pH, mediante ácido sulfúrico concentrado. El medio así preparado (800 L) tendrá alrededor de 12 °Bx y un pH de 4,0.

Antes de la inoculación mediante el frasco Carlsberg de laboratorio, el medio, en el fermentador de cultivo puro, se esteriliza hasta una temperatura de 95°C, enfriándose luego hasta 35T. Durante la fermentación no se hacen nuevas adiciones de miel y nutrientes. El tiempo de fermentación será alrededor de 20 - 24 h, en dependencia de la cantidad y calidad del inóculo. La temperatura de fermentación comenzará a subir después de algunas horas, por lo que será necesario aplicar enfriamiento por agua, a través de la camisa del propagador para mantenerla, aproximadamente, a unos 30°C.

Después de 8 h de fermentación se comienza el control de la temperatura, el pH y el grado Brix; cada 2 h se realiza el control y se ajusta la temperatura al valor mencionado anteriormente y el pH a un valor entre 3,5 - 4,0. La fermentación se dará por terminada cuando el mosto fermentado quede agotado, es decir, cuando el grado Brix no descienda más y quede constante.

En este momento, el mosto del fermentador de cultivo puro debe ser pasado al prefermentador.

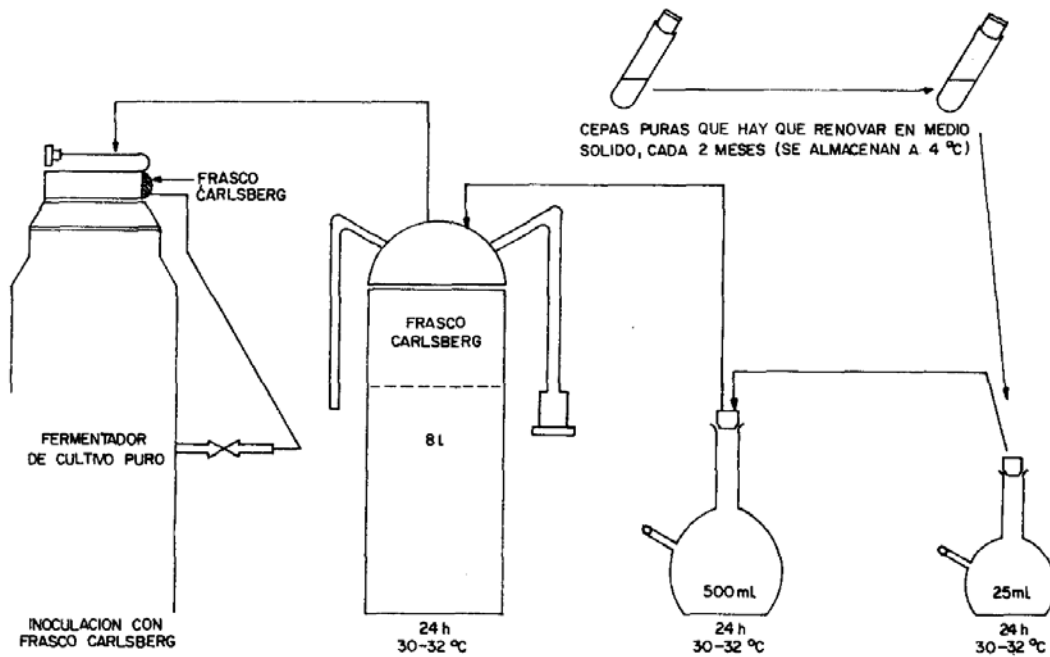


Fig. 164 Etapas de laboratorio desde las cepas puras en cuñas de sustrato sólido hasta el frasco Carlsberg e inoculación del fermentador de cultivo puro.

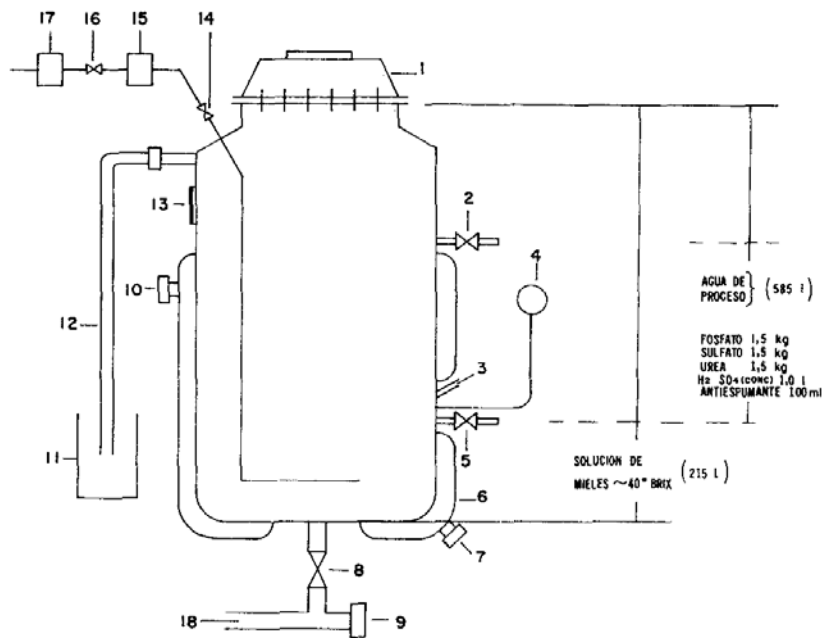


Fig. 165 Esquema del fermentador de cultivo puro.

## PREFERMENTACION

En el prefermentador se realiza una fermentación discontinua (batch) con alimentación de soluciones nutrientes. La inoculación se puede realizar mediante 2 alternativas:

1. Con el mosto fermentado de propagador de cultivo puro.
2. Con crema del proceso principal de fermentación, escogida de un fermentador, donde el cultivo tenga buenas condiciones morfológicas y fisiológicas. Con esta crema se llena un balón de 6 l y se mantiene en refrigeración a 4 °C.

El mosto agotado que se obtiene, en esta etapa, rinde entre 200 - 300 kg de levadura seca y es suficiente para inocular uno de los fermentadores principales.

### **FERMENTACION-DESEMULSION**

Esta operación es la principal del proceso, la calidad del producto, así como la eficiencia en la asimilación del sustrato dependerán, fundamentalmente, del curso exitoso de esta operación.

El proceso de producción de levadura es aeróbico y exergónico, por lo tanto, se hace necesario el suministrar grandes volúmenes de aire, así como disponer de algún sistema de evacuación de calor, para mantener temperaturas adecuadas para el proceso. La ecuación empírica que puede representar la formación de levadura es la siguiente, de acuerdo con Harrison :

200 g  $C_{20}H_{22}$  + 10,4 g  $NH_3$  + 102,5 g  $O_2$             100,0 g materia seca levadura (incluye 9,5 g materia inorgánica) + 145,2 g  $CO_2$  + 77,2 g  $H_2O$

$\Delta H = - 353$  kcal.

Lo cual escrito en formulación molar balanceada será:

$0,585 C_{12}O_{11}H_{22} + 0,612 NH_3 + 3,20 O_2 \sim C_{3,720} O_{1,952} N_{0,612} + 3,3 CO_2 + 4,289 H_2O$

$\Delta H = 0,11$  kcal/mm  $O_2$ .

Donde el calor desprendido por la reacción se ha tomado, de acuerdo con el índice de C. Cooney y colaboradores, de 3,44 kcal/g  $O_2$  consumido.

Sin embargo, el balance presentado, respecto a la conversión de azúcar en masa biológica (50 %), puede ser sustancialmente afectado por las condiciones en que se efectúe la fermentación, así como por las características de la cepa utilizada. Esta conversión, que es lo que se denomina rendimiento en el proceso de producción de



masa biológica (levadura forrajera, en este caso) encuentra 2 aspectos limitantes fundamentales que se hacen críticos para la fermentación a escala industrial y que son: la eficiencia del sistema de aireación en cuanto a su capacidad para disolver oxígeno en el medio, que pueda ser consumido por la levadura y la homogeneización del medio, de forma que las sustancias nutritivas puedan ser también asimiladas por el microorganismo. Estos 2 aspectos se hacen aún más limitantes para el caso de fermentadores industriales en los que se quiere conseguir una alta concentración de masa biológica (tecnología de altas concentraciones).

Entre otros factores de importancia, que influyen en el rendimiento, aunque no son limitantes en el diseño de un fermentador industrial, se pueden citar los siguientes: temperatura y pH de la fermentación (Fig. 166), la razón de dilución y el contenido de fósforo en levadura. La figura 167 muestra la dependencia del rendimiento, en función de esos parámetros.

Los rendimientos alcanzables con las tecnologías existentes, actualmente, en Cuba, para la producción de levadura forrajera están alrededor de 45 - 46 %.

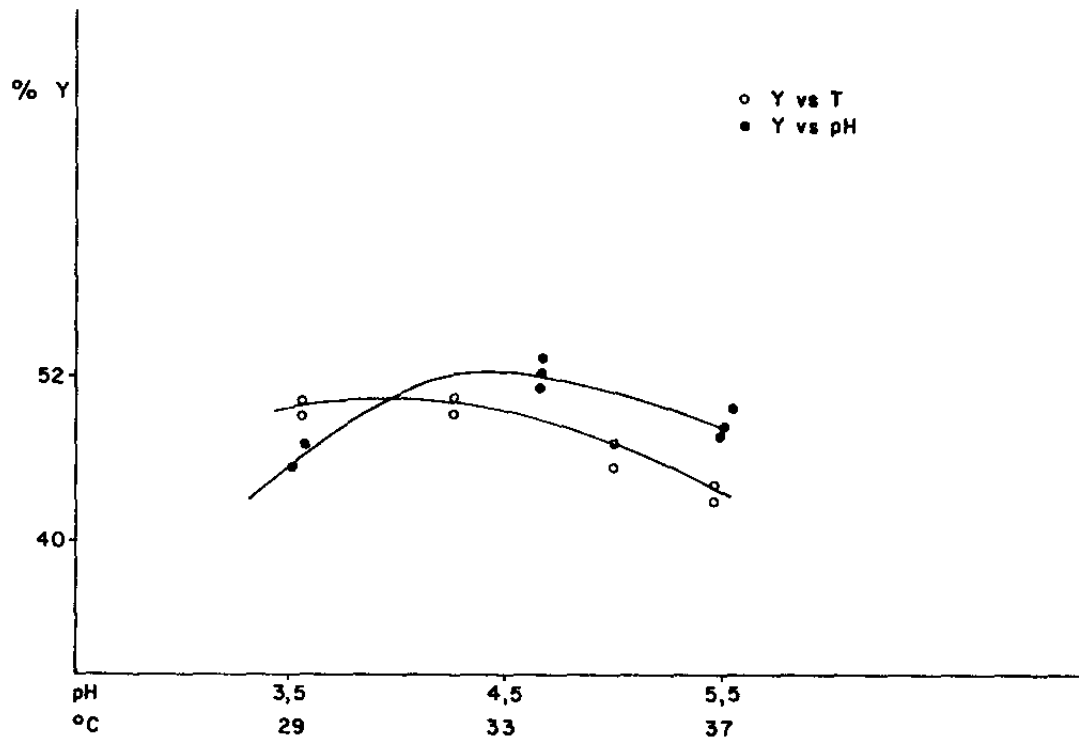


Fig. 166 Comportamiento del rendimiento con la temperatura y el pH, para el cultivo de *Candida utilis*.

## DESCRIPCIÓN TECNOLÓGICA DEL PROCESO

El proceso de fermentación es continuo y la operación normal es en serie; 2 líneas de 2 fermentadores, en 2 etapas cada una. Es decir, que fermentadores que conforman 2 etapas en serie, equivalen a media capacidad de la planta de levadura.

De los 2 fermentadores de cola (segunda etapa) de cada línea, el mosto agotado es bombeado al tanque de desemulsión, para degasificarlo y poder realizar, eficientemente, la siguiente operación en la sección de separación.

El sistema se puede operar, también, con los 4 fermentadores en paralelo, descargando al tanque de desemulsión.

Los fermentadores son de 220 m<sup>3</sup> de capacidad total cada uno. Están equipados con 1 ciclón para rompimiento de la espuma y con 1 sistema de aireación mediante agitador, que toma la potencia del fondo del tanque. El aire se suministra mediante un soplador

del tipo roots para cada fermentador, existe un quinto soplador, como repuesto, instalado.

Para iniciar la fermentación industrial se, prepara una de las líneas de fermentación y se comienza una fermentación discontinua (batch) en la primera etapa, que consiste en los siguientes pasos: se bombea el mosto agotado del prefermentador ( $17 \text{ m}^3$ ) sobre una cantidad de agua y se comienza la alimentación de solución de miel y de nutrientes hasta el volumen de trabajo.

La cantidad total de miel se calcula en función de la cantidad de levadura en el fermentador, para un volumen de trabajo dado y el rendimiento en levadura por litro de miel; la distribución de los litros de miel por hora se deduce de la curva de crecimiento para la fermentación discontinua. La cantidad de agua que se añade, inicialmente, antes de la inoculación, será

la diferencia entre el volumen de trabajo y la suma de los volúmenes del inóculo y la solución total de miel que se añadirá. La cantidad de nutrientes que se adicionara, se calcula en función de la cantidad de levadura en el fermentador para un nivel de trabajo dado, la cantidad de N y P que requiere esa levadura, la cantidad de esos elementos que se quiere mantener en el mosto agotado y las concentraciones de las soluciones que se deben suministrar, la distribución se hará en partes proporcionales de acuerdo con la cantidad de horas que demore alcanzar el nivel de trabajo.

Una vez alcanzado el nivel de trabajo en la primera etapa, se hace un pase hacia la segunda etapa durante, aproximadamente, 2 h, al cabo de las cuales se comienza la alimentación en el fermentador de segunda etapa, en la misma forma que se señaló anteriormente, durante este tiempo si el fermentador de primera etapa ha alcanzado todos sus parámetros de trabajo, se comienza su operación en continuo. Una vez que la segunda etapa ha llegado también a su nivel de trabajo, se establece la operación continua y en serie de la línea completa. De igual manera, se pone en marcha la otra línea de fermentación la cual puede recibir el inóculo, en el fermentador de la primera etapa, desde el prefermentador o desde la primera línea que ya opera en continuo.

El proceso de fermentación es controlado, regularmente, mediante el chequeo y ajuste de los parámetros, de acuerdo con el resultado de los análisis del laboratorio de control.

Además, se controla, automáticamente, la anaerobicidad del proceso, mediante la medición del contenido de alcohol en los gases de salida del fermentador esto permite ajustar, rápidamente, los parámetros que influyen en la misma y que pueden afectar el rendimiento en levadura.

El mosto agotado extraído de los fermentadores contiene una gran cantidad de aire, por lo que es necesaria la degasificación antes de proceder a la operación de separación. Este proceso se realiza en el tanque de desemulsión al que llega, continuamente, el mosto emulsionado que se bombea desde los fermentadores de segunda etapa de las 2 líneas de fermentación. Este tanque tiene un volumen total de 156 m<sup>3</sup> y un volumen de trabajo entre 32 m<sup>3</sup> (mínimo) y 80 m<sup>3</sup> (máximo); recibe, además del mosto fermentado, 300 - 600 m<sup>3</sup>/h de aire, a una presión de 4 - 5 m de la columna de agua y de 1 - 2 l/h de aceite antiespumante. A partir del mismo se extrae, continuamente, mosto desemulsionado que es bombeado hacia la siguiente sección donde se efectúa la separación de la crema.

La figura 168 muestra un esquema de esta sección donde se señala el balance de materiales, así como algunos datos tecnológicos. La diferencia principal de esta sección, con su homóloga en la tecnología francesa, es que los equipos de fermentación son diferentes. El fermentador de tecnología francesa es de patente Lefrancoise con circulación invertida; es un equipo de gran volumen total (1000 m<sup>3</sup>, aproximadamente) abierto y sin sistema de aireación agitado, es decir, el aire suministrado al fermentador realiza las 2 funciones: suministrar el oxígeno a la levadura y agitar el medio para su homogeneización. Es un sistema de aireación menos eficiente que se utiliza en tecnologías de bajas concentraciones. Puede operar como el sistema austriaco en paralelo o en serie, diferenciándose en esta última alternativa, en que de los 3 fermentadores que poseen estas plantas, 2 actúan como primera etapa y el tercero como segunda etapa.

El tanque de desemulsión también es diferente, en su diseño general; es abierto, de menor altura y más diámetro, presenta un tanque central en forma de cono truncado, que es el que recibe el mosto emulsionado de los fermentadores. El tanque central se comunica por un vaso-comunicante, con una canal que lo rodea en toda su periferia, y

desde donde es bombeado el mosto desemulsionado a la siguiente sección. El conducto vaso comunicante está equipado con válvula de regulación, de manera que el mosto que llega al compartimiento central se puede hacer que derrame por su pared exterior o que pase, directamente, a la canal, sin rebosar. En la parte superior se halla un anillo distribuidor perforado, cuya función es ayudar a la desemulsión, mediante el chorreo, a presión sobre la fase espumosa del compartimiento central. La presión se garantiza, mediante una bomba que toma el mosto desemulsionado del fondo del tanque central y lo conduce al anillo distribuidor. A la descarga de esa bomba está previsto un sistema de 2 filtros y en la aspiración tina inyección de antiespumante químico.

### **SEPARACION-LAVADO-RECIRCULACION**

En esta sección, en una primera etapa, la levadura es separada del mosto fermentado y desemulsionado, a continuación en una etapa de lavado, las impurezas son separadas de las células de levadura. Estas 2 etapas suelen denominarse primera y segunda separaciones.

Los equipos fundamentales de esta agrupación tecnológica son: 2 filtros autolimpiados con cepillo giratorio sobre tamiz fijo y 5 separadoras centrífugas con descarga de la crema a presión y flujo libre (sin presión) del claro o efluente.

De las 5 separadoras instaladas, 2 operan para separar la crema del mosto fermentado (primera etapa) y 2 como separadoras de lavado (segunda etapa), la quinta separadora se utiliza para garantizar la limpieza de estos equipos, es decir, se puede utilizar como primera o segunda etapa según sea necesario. A plena capacidad de la planta, operan 4 separadoras, que conforman 2 líneas de separación en las que se combina, 1 filtro autolimpiado, 1 separadora de primera etapa y 1 de segunda etapa. Cada línea de separación opera con el flujo proveniente de una línea de fermentación, y todo este conjunto, equivale a media capacidad de producción.

La mezcla de la crema de levadura, obtenida en la primera etapa, con el agua de lavado, se realiza en un mezclador tubular estático. El agua se controla mediante medidores de flujo (1 para cada línea) . El efluente o líquido claro de esta etapa, es canalizado a la zanja.

La crema de levadura obtenida en la segunda etapa, es enviada a la siguiente sección de la instalación, la termólisis. El efluente o claro de esta etapa puede ser recirculado a los fermentadores, en cuyo caso, el flujo es controlado mediante rotámetros y el pH ajustado a un valor entre 2,5 - 3,0. Cada día se debe desmontar, al menos, 1 separadora, para efectuar su limpieza y chequearla, de acuerdo con las prescripciones del fabricante.

La sección homóloga en la tecnología francesa, se diferencia en algunos aspectos tecnológicos, aunque el proceso y las operaciones realizadas son las mismas. En primer lugar, al ser esta tecnología de bajas concentraciones, los flujos que se van a manipular en esta sección, para una misma capacidad, son mayores que en la tecnología austriaca y la cantidad de separadoras instaladas es casi el doble, 5 para la primera etapa, 2 para la segunda y 1 que opera indistintamente para garantizar la limpieza. En general, toda la sección está más equipada (filtros, bombas, etc .) . Las separadoras son de descarga libre (sin presión) de la crema concentrada de levadura y del efluente; el lavado de la crema se realiza en 2 tanques agitadores y la crema de segunda etapa se recoge, también, en 2 tanques, desde donde es bombeada a la sección de termólisis-concentración, por evaporación. Los efluentes que se recirculan son los de la primera etapa, los mismos se enfrían y no se les da tratamiento ácido.

## **TERMÓLISIS Y CONCENTRACIÓN POR EVAPORACION**

### **TERMÓLISIS**

El objeto de esta sub sección es el rompimiento de la pared celular, para aumentar la digestibilidad de la levadura, así como para provocar los últimos cambios que darán lugar a la composición final del producto terminado. Esta agrupación de equipos tecnológicos está integrada por 2 intercambiadores de placa, uno en operación y el otro en reserva para garantizar la limpieza de estos equipos; 1 tanque de retención y recirculación; 2 bombas de recirculación; 2 tanques de crema termolizada y 2 bombas de alimentación al evaporador.

El flujo de operación es el siguiente: la crema de levadura de la segunda etapa de separación llega a uno de los intercambiadores donde se mantiene automáticamente,

con vapor como fluido de calentamiento, de 87 – 90°C que corresponde a la temperatura de termólisis. El tiempo de retención necesario se completa con la recirculación a través de un tanque, desde donde se recircula una fracción, que se mezcla con la crema no termolizada, antes de su entrada al intercambiador de calor, de manera que la precaliente de unos 30°C hasta unos 58°C, al mismo tiempo que facilita el proceso de termólisis. La otra fracción, que es equivalente al flujo de crema entregado por la segunda etapa de separación, rebotó desde el tanque de retención-recirculación a los tanques receptores de crema termolizada, desde donde se bombea al evaporador. Esta unidad está constituida por 1 evaporador de doble efecto al vacío, del tipo de película descendente, de patente Vogelbusch y por 2 tanques receptores de crema evaporada. El objeto de la misma es la concentración de la crema por evaporación, desde 13 % hasta 20 % de materia seca, aproximadamente.

La unidad de evaporación opera en 2 etapas, el calentamiento de la primera etapa se realiza con vapor de 8 atm absolutas, mediante un termocompresor que utiliza parte de la evaporación o vapor residual de la primera etapa (producido en el separador del primer cuerpo). El resto de la evaporación se utiliza para realizar el calentamiento de la crema en la segunda etapa. El vapor residual, producto de la evaporación de la crema en la segunda etapa, es condensado en un condensador de superficie. El vacío es mantenido, en parte, por la columna barométrica y, en parte, por la bomba de vacío, que lo mantiene constante en forma automática. El agua para condensar estos vapores ( $\sim 50 \text{ m}^3/\text{h}$ ) es suministrada desde la misma torre de enfriamiento que suministra la que condensa los vapores de miel en la cámara de vaporización.

Lo anterior se refiere al circuito de vapor, el circuito de crema es el siguiente: la crema termolizada es bombeada desde los tanques receptores hasta el distribuidor de crema, en la parte superior del primer cuerpo de evaporación, derramándose en forma de fina película por la pared interior de los tubos verticales que forman la flusería del cuerpo (el vapor calienta por la pared exterior de los tubos). La crema pasa al separador del primer cuerpo, de donde es extraída por 2 bombas, una recircula una fracción y la otra envía el resto al distribuidor de crema del segundo cuerpo. Del separador de esta

segunda etapa la fracción no recirculada es bombeada hasta los tanques receptores de crema evaporada.

La sección homóloga, en la tecnología francesa, posee la unidad de termólisis integrada al mismo evaporador que también es un doble efecto al vacío del tipo de película descendente, pero de patente Wiegand. Es decir, la unidad de evaporación tiene 2 intercambiadores de calor tubulares y una cámara cilíndrica de retención adicionales, donde se efectúa la termólisis de la crema. Además, los tanques receptores de crema termolizada y crema evaporada no existen en la tecnología francesa, éstos se corresponden con los 2 tanques receptores de crema de segunda separación existentes. Tanto en una tecnología como en la otra, estos tanques de balance constituyen una capacidad de retención entre 4 y 6 h para efectuar la limpieza diaria del evaporador, así como realizar otras operaciones de mantenimiento, sin necesidad de detener la marcha continua de los fermentadores.

## **SECADO Y ENVASE-ALMACENAMIENTO**

En esta sección la crema de levadura termolizada y evaporada, es secada en un secador por atomización desde 19 - 20 % hasta 94 - 95 % de materia seca, aproximadamente. Con posterioridad la levadura seca es envasada en sacos de papel de 4 capas, para 25 kg de capacidad y transportada hasta el almacén.

### ***Secado por atomización***

Esta unidad es un secador por atomización. Está constituida, fundamentalmente, por una cámara de secado cilindro-cónica, en cuyo interior se produce el secado de la crema de levadura, el equipo atomizador, colocado en la parte superior y central de la cámara, mediante turbina o disco de atomización que gira de 5 600 - - 7 100 rpm, accionado por motor eléctrico, atomiza la crema en forma de neblina fina, que se pone en contacto con los gases calientes producidos por la combustión de petróleo pesado, en un horno vertical de calentamiento directo; por último, la unidad se completa con el sistema de transporte neumático, constituido por 4 ciclones separadores y un ciclón colector. Este sistema es el que extrae la levadura seca de la cámara de secado.



El flujo hacia y desde esta unidad es el siguiente: la crema de levadura evaporada es bombeada al tanque de homogeneización y de aquí se bombea a través de un sistema de filtro hasta la turbina o disco del equipo atomizador.

La levadura seca, en forma de polvo, extraída de la cámara de secado por el sistema de transporte neumático, es introducida por el ciclón colector en las tolvas de almacenamiento. El secador es capaz de producir 1850 kg/h de levadura a 92 % de materia seca (m s.), a partir de 8 000 l/h de crema, con un contenido de 1 700 kg de materia seca, para un índice de evaporación de aproximadamente, 6 500 kg de agua evaporada/h.

### ***Envase-almacenamiento***

Por el fondo de la tolva de almacenamiento, el polvo de levadura es extraído mediante un tornillo sin fin que lo descarga en el elevador de cangilones. Este lo transporta hasta los embudos alimentadores de las ensacadoras-pesadoras, que garantizan el llenado en sacos de papel del tipo valvulado que no requieren ser cosidos.

La capacidad de estos equipos permite envasar la producción de 1 d en un turno de 8 h. Los sacos llenos se colocan en paletas de madera hasta el número de 30 por cada una. El almacenamiento de las paletas se prevé en 3 niveles, es decir, que la unidad de almacenamiento equivale a 3 paletas y ocupa un volumen de 4,212 m<sup>3</sup>.

La capacidad de almacenamiento máximo es de 528 unidades, que se deben colocar dejando pasillos entre ellas, de forma que circule el aire para mantener la humedad lo más constante posible.

Esta capacidad, en unidades de almacenamiento, es igual a 1 584 paletas o 47 520 sacos equivalentes a 1 188 t de levadura, es decir, que el tiempo de cobertura es, aproximadamente, para 1 m de producción. Todos los movimientos, en el almacén, se llevan a cabo con 2 montacargas, tipo Diesel, con suficiente altura para el almacenamiento a los niveles previstos.

y del balance de materiales.

## **LABORATORIO DE CONTROL**

La función del laboratorio es el suministro de los datos y resultados de análisis, necesarios para el control de la operación total de la planta, así como de la calidad de las materias primas y el producto terminada. También es función del laboratorio el mantenimiento de las cepas del microorganismo (levadura), utilizadas en el proceso de propagación, así como de la realización de las etapas correspondientes al cultivo puro de laboratorio) y la supervisión y control microbiológico del proceso y operaciones en la planta .

### **SUMINISTRO DE ENERGIA ELÉCTRICA. ESTRUCTURA DE LA INSTALACIÓN ELÉCTRICA**

La instalación eléctrica comprende:

1. Parte de transformación-distribución constituida por los equipos de transformación de la energía eléctrica de alta tensión y sus paneles de distribución hacia las estaciones de mando y control.
2. Parte de fuerza motriz-control, que comprende los paneles centralizados de fuerza y control de automatismos, ubicados en cada sección de la planta. Desde estos paneles se alimentan los distintos receptores de energía eléctrica (motores, resistencias de calentamiento, etc.), así como los circuitos de servomecanismo, de mando, de señalización, de programación secuencial y de control.
3. Parte de iluminación con sus transformadores, pizarras, tomacorrientes, etc.
4. Parte de equipos anexos que comprende los circuitos de puesta a tierra, protección contra rayos, teléfono, etc.

### **SUMINISTRO DE AGUA PARA CONSUMO INDUSTRIAL**

El suministro de agua industrial es mediante el bombeo de agua de pozo, la cual llega a un tanque cisterna, desde donde se distribuye a los distintos puntos de la planta. De acuerdo con esta tecnología, el consumo de agua industrial es de 150 m<sup>3</sup>/h, cuando se utiliza la recirculación de efluentes o claros de la segunda etapa de separación y de, aproximadamente, 180 m<sup>3</sup>/h, cuando no se recirculan los efluentes.

.

## **TRATAMIENTO DE AGUA**

El objeto de esta sección es garantizar los requerimientos de agua blanda para la alimentación de la caldera de vapor, reposición del circuito de la torre de enfriamiento y para distintos usos en el área de producción, fundamentalmente en el enfriamiento de la miel preparada (10,5 m<sup>3</sup>/h), enfriamiento y lubricación de los fermentadores y las clarificadoras, así como en las bombas con sello mecánico.

Los equipos fundamentales que constituyen esta sección auxiliar son los siguientes: 1 reactor de cal con capacidad para 40 m<sup>3</sup>/h; 1 tanque para diluir la cal y 1 bomba dosificadora para suministrar la lechada al reactor; 1 tanque de agua descarbonatada de 100 m<sup>3</sup> de capacidad, 2 bombas de agua descarbonatada de 40 m<sup>3</sup>/h de capacidad, cada una (1 en reserva), 1 unidad de suavización, con 2 intercambiadores iónicos, ciclo sodio, con capacidad para tratamiento de 70 m<sup>3</sup> de agua descarbonatada cada uno, 1 unidad regeneradora con CINA.

## **REFRIGERACIÓN Y CIRCUITOS DE ENFRIAMIENTO**

El objeto de esta sección auxiliar es garantizar el enfriamiento requerido en distintos puntos del proceso. El núcleo central de esta sección, es una unidad de refrigeración por amoniaco, compuesta de 3 compresores con una capacidad de enfriamiento de 850000 kcal/h cada uno. El circuito de enfriamiento se completa con una torre de enfriamiento, con una capacidad de, aproximadamente, 7 000 000 kcal/h y una torre de enfriamiento menor situada en el nivel + 12 m, con una capacidad de 1700 000 kcal/h.

La recirculación total de agua, en todos estos circuitos, es de unos 1 670 m<sup>3</sup>/h, en la torre mayor y en los condensadores y evaporadores de la unidad de refrigeración por amoniaco, con la que se disipa el calor producido en la sección de fermentación-desemulsión, en los condensadores de la unidad de refrigeración y en los intercambiadores de calor para enfriar el aire que se suministra a los fermentadores. Además, en la torre de enfriamiento menor se recirculan unos 66 m<sup>3</sup>/h, con los que se condensan los vapores producidos en la segunda etapa del evaporador de crema y en la cámara de vaporización de la sección de preparación de mieles.

La pérdida de agua en estos circuitos es por evaporación en las torres de enfriamiento, 8 m<sup>3</sup>/h en la mayor y 2 m<sup>3</sup>/h en la menor, aproximadamente. Además, en la primera se hace una extracción de 5 m<sup>3</sup>/h. Es decir, se hará una reposición de 13 m<sup>3</sup>/h y 2 m<sup>3</sup>/h, respectivamente, con agua tratada, aunque está prevista la reposición con agua cruda para cualquier eventualidad.

### **ALMACENAMIENTO Y CIRCUITO DE COMBUSTIBLE**

El objeto de esta sección es garantizar la descarga, almacenamiento, calentamiento y distribución del combustible necesario para el funcionamiento de la caldera y del horno de calentamiento directo para el secado de la levadura.

Está constituido, fundamentalmente, por un tanque almacén de 800 m<sup>3</sup> de capacidad, con calentamiento mediante vapor y por 2 tanques de diario, contiguo a la caldera y el horno, también con calentamiento de vapor y con una capacidad de 10 m<sup>3</sup> cada uno. Además, el sistema de bombas, tuberías, filtros y equipos de medición y control necesarios para la distribución y contabilización del combustible consumido por la caldera y el horno.

### **PRODUCCIÓN DE VAPOR**

El objeto de esta sección auxiliar es producir el vapor necesario para los calentamientos requeridos en diversos puntos del proceso.

### **ESTACION DE AIRE PARA INSTRUMENTACIÓN**

El objeto de esta sección auxiliar es producir el aire comprimido y seco, necesario para el funcionamiento de los equipos de medición, regulación y control instalados en la planta. Los equipos fundamentales de esta sección son 2 compresores de aire de 3 etapas, que pueden entregar 180 m<sup>3</sup>/h de aire, a una presión de 7 bar cada uno. Se mantiene uno de los equipos operando y el otro en reserva.

### **ESTACIÓN DE AIRE PARA FERMENTACIÓN**

El objeto de esta sección auxiliar o de utilidades, es suministrar a los fermentadores el aire necesario para el proceso aeróbico de desarrollo del microorganismo (levadura), en los 4 fermentadores de la sección de proceso, fermentación--desemulsión. Los equipos fundamentales de esta sección son 5 sopladores de lóbulos tipo roots, de los cuales 1 se utiliza como reserva instalada. La capacidad unitaria nominal de estos equipos es de 10 000 m<sup>3</sup>/h.

### **ESTACION DE LIMPIEZA Y DESINFECCION**

El objeto de esta sección es la limpieza y desinfección de todos los equipos de la planta que así lo requieran. Esta sección de servicios auxiliares reviste gran importancia, ya que la limpieza y desinfección son fundamentales en este proceso de producción.

### **TALLER DE MANTENIMIENTO Y ALMACENES**

Estos servicios se utilizan para garantizar la operación de la planta, mediante mantenimiento de los equipos y su aseguramiento en piezas de repuesto.

### **ALMACENES DE PRODUCTOS TERMINADOS, MATERIAS PRIMAS Y AUXILIARES**

En estos almacenes se puede considerar:

1. Almacén principal para el producto terminado, con un área de tránsito para la producción diaria y una cobertura aproximada para 1 tm de producción.
2. Almacén de sales nutritivas, con un volumen total de unos 14 000 m<sup>3</sup> y un volumen útil de almacenamiento en sacos de unos 5 000 m<sup>3</sup>, con un tiempo de cobertura de, aproximadamente, 6 m para el sulfato y el fosfato y unos 9 m para la urea.
3. Almacén de productos auxiliares, tales como los de tratamiento de agua, limpieza, desinfección y otros con cobertura que van desde 4 a 8 m. Todos los productos anteriormente mencionados deben ser almacenados en unidades volumétricas, de acuerdo con las características específicas de cada uno, sobre paletas de madera y respetando las normas de almacenamiento adecuadas para su conservación.

## **SISTEMA CONTRA INCENDIOS**

El objeto de este sistema es obvio. El agua contra incendios es tomada de la torre de enfriamiento mediante 2 bombas con capacidad unitaria de 100 m<sup>3</sup>/h y una carga de 50 m de la columna de agua. El sistema se completa con las mangueras hidrantes y otros accesorios necesarios. Además, en las áreas que no se puede utilizar agua para sofocar incendios están previstos los medios necesarios como extintores con los productos requeridos.

## **EQUIPOS FUNDAMENTALES DE LA INSTALACIÓN**

En este epígrafe trataremos de los equipos más específicos que caracterizan este tipo de industria, ya que fundamentales son la mayoría de ellos, inclusive la bomba que se encuentre instalada como reserva, para garantizar el proceso continuo de producción. Entre los más importantes de estos equipos específicos se pueden mencionar: fermentadores, equipos de la sección de preparación del inóculo, separadoras y clarificadoras centrífugas, sopladores, evaporador para concentrar crema de levadura, secador por atomización y ensacadora-pesadoras. Además, se pueden considerar también como equipos específicos de esta industria, algunos de instrumentación y control tales como: sistema controlador de pH en los fermentadores, analizador de gases de salida de los fermentadores, densímetro controlador para mieles diluidas, control de espuma y otros.

## **LEVADURA TORULA A PARTIR DE OTROS SUSTRATOS**

La composición de la levadura producida con otros sustratos de la Industria Azucarera y de Derivados como son: jugo mezclado, (JM), jugo de los filtros de cachaza (JFC), jugo diluido de los últimos molinos (JDUM) y vinazas de destilerías (VD), es muy similar a la que presenta la que se cultiva en mieles finales de caña (MFC), descritas en el acápite de Levadura Torula a partir de miel final. Sin embargo hay dos características físico-químicas muy deseables en la levadura crecida en estos nuevos sustratos, un contenido menor de cenizas de 5 a 7 % y color mucho más claro.

El destino de esta levadura es el mismo que se reportó para la levadura *Torula* cultivada en MFC (mieles finales de caña), aunque las nuevas características mencionadas permiten con una mayor purificación en el proceso de lavado, su utilización directa en el consumo humano, siempre que se utilice la dosificación o mezcla adecuada en cuanto al contenido permisible de ácidos nucleicos en la dieta. Estas características, sobre todo el color, son muy importantes también en la producción de levadura de consumo humano por el proceso de desnucleización con álcali, pues no se produce un aumento de color en alimentos enriquecidos con la misma, tales como pan, pastas, embutidos, etc. Tanto su uso directo o tratada con álcali, sería más conveniente la utilización de cepas seleccionadas para el consumo humano, como la *Kluyveromyces fragilis*.

### **PROCESO TECNOLÓGICO**

Los sustratos de mayores perspectivas económicas, en cuanto a la integración de las producciones de un ingenio azucarero, destilería de alcohol son el jugo de los filtros de cachaza y las Vinazas de la destilería, pudiéndose emplear para el período de la zafra azucarera la sustitución total de la miel final de caña, por la mezcla Vinazas de destilería(VD) +jugo de los filtros de cachaza(JFC) en proporción VD/JFC = 50/50 (% de la materia orgánica. suministrada a fermentación) y posterior al mismo la mezcla VD + MFC en proporción VD/MFC (90/10). Existe experiencia del uso de 100% de las vinazas de destilería como fuente de carbono y energía en la producción de levadura *Torula*, con la adición de suplementos nutricionales que garanticen los aportes de probióticos y otros microelementos necesarios para la fermentación.

El proceso tecnológico de producción de levadura es el mismo descrito en el acápite de Levadura *Torula*.

## BIBLIOGRAFÍA.

Almazán, O. (1968) Utilización de los mostos residuales para la producción de levadura de forraje (torula) *sobre los deriv.* 2 (2):17

Almazán, O.; Gregr, V. (1967) Significado de la investigación para el desarrollo de la industria de fermentación en Cuba *Cuba-Azúcar* 18, abril-marzo

Sillinger, V.; Almazán, O. (1970) Producción de biomasa a partir de las mezclas mostos-miel. *Memorias de la 39 Conferencia de la ATAC*, pp. 422

Otero, M.A.; Klibansky, M.M.; García, A.; Estévez, R.E. (1982) *Sobre los deriv* 16 (1)

Saura, G.; Martínez, J.A. Valdés, I. (2000) Vi Congreso Internacional sobre Azúcar y Derivados de la Caña, La Habana, junio 13-16

Estévez, R.E.; Martínez, J.A.; Valdés, I.F.; Carreras, W. (1999) Manual de Operaciones de las Plantas de Levadura de Vinazas.

Aiba, S., A. E. Humphrey and N. Millis (1973) *Biochemical Engineering*. 2<sup>nd</sup> edn. Chap.8 Academic .New York.

Murray Moo – Young (editor chief) (1985). *Comprehensive Biotechnology*. Volume 2. Pergamon Press.

La industria de los derivados de la caña de azúcar. ICIDCA 1986. Editorial Ciencia y Técnica 1986.

Manual de los Derivados de la caña de azúcar. Tercera edición 2000. Imprenta Minaz Cuba.2000

Producción de proteína unicelular a partir de subproductos de la industria azucarera. Editorial Científico técnica 1982.



## **CAP 4 LEVADURAS RESIDUALES**

Miguel A. Otero-Rambla

Dirección de Biotecnología, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).

A pesar de su aspecto inerte, un fragmento de un bloque de levadura prensada está, en realidad formado por un número extremadamente grande de organismos unicelulares visibles solamente con el auxilio del microscopio. Un pequeño cubo de 1 cm<sup>2</sup> pesa alrededor de 1 gramo y contiene más de 10 billones de células de levadura vivas.

Cada célula, que constituye un ser vivo independiente, de forma esférica u ovoidal no es otra cosa que un minúsculo hongo imperfecto cuyo tamaño no excede 6-8 milésimas de mm.

### **INDUSTRIAS TRADICIONALES DE LEVADURA**

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es utilizada en la industria de alimentos y bebidas en formas diversas (Dziezak 1987; Kinight 1986; Halasz y Lásztity 1991; Otero et al 1998). En forma activa *Saccharomyces* es empleada en la industria de panificación y productos horneados (Peixoto 1996), en la fermentación alcohólica (Furco 1996; Saura et al 2005) y otros procesos fermentativos como la producción de salsa de soja (Luh 1995). De forma inactiva, la levadura se emplea mayormente e la alimentación animal (Butolo 1996) por su aporte de proteínas y otros nutrientes y en la alimentación humana fundamentalmente sus derivados como los extractos y autorizados de levadura (Halasz y Lásztity 1991; Peixoto 1996; Vasallo et al 2001).

En las destilerías de alcohol y en las cervecerías, se generan excedentes de levadura que inactivadas previamente o no, pueden usarse íntegramente o ser procesadas para la obtención de diferentes derivados (Kollar et al 1992; Lieske and Honrad 1994; Otero et al 1996).

En general, las células enteras se utilizan en la alimentación animal, mientras que para el uso humano se prefieren otros productos procesados que se

incorporan a los alimentos como complementos fundamentalmente (Dixon 1999).

Las levaduras además de presentar elevados contenidos de proteínas, entre 40 y 55 % de su peso seco, son ricas en vitaminas del complejo B (Reed y Nagodawithana, 1991), minerales y otros microelementos, particularmente selenio y cromo (Ingledeew 1999; Dixon 1999) fibra dietética, como polisacáridos de pared celular, en especial mananos y glucanos (Cameron et al 1988; Fleet 1991).

## **LEVADURA DE CERVEZA**

La levadura de cerveza se deriva de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la que produce el proceso de fermentación básico para la producción de cerveza. Se utilizan diferentes tipos de levaduras en la producción de diferentes tipos de cerveza ([http://www.pdrhealth.com/drug\\_info/nmdrugptofiles/nutsupdrugs/bre\\_0043.shtml](http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugptofiles/nutsupdrugs/bre_0043.shtml)).

La fermentación de la malta depende de la composición del medio, la levadura y las condiciones de operación. La fermentación con levadura-lager (sumergida) tiene lugar a temperaturas entre 4 y 9 °C y toma alrededor de 8 días, al término de los que la levadura se deposita en el fondo del reactor. La levadura-ale (fermentación de superficie) fermenta el medio en 4 ó 6 días a 15-20 °C (Anon 2005).

### ***Recuperación de la levadura***

La eliminación del exceso de levadura de la cerveza al final de la fermentación primaria, es necesaria para minimizar la carga del filtro de medio, evitar el metabolismo ulterior de la levadura en defecto de nutrientes, y la consecuente autólisis.

El tiempo para que se manifieste la autólisis depende de la temperatura y la cepa de levadura. La levadura, en general se mantiene en buenas condiciones fisiológicas a bajas temperaturas. De hecho temperaturas en el entorno de 50 °C resultan óptimas para la autólisis (Vasallo et al 2001). Esto evidencia que la

separación de la levadura en esta etapa es vital para la obtención de una cerveza de calidad y la recuperación de levadura.

La levadura de cerveza seca es una fuente rica en varios nutrientes, incluyendo las vitaminas del complejo B tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, ácido pantoténico, folato, vitamina B12 y biotina, y minerales tales como selenio (Ingledew 1999; Reid et al 2004) y cromo (Anderson 1998; Davis et al 1997).

La levadura de cerveza ha constituido un suplemento alimenticio por muchos años. Sin embargo, una gran parte de la levadura comercializada con estos fines, se cultiva especialmente para este mercado (Lyons 1995).

Los suplementos se preparan a partir de la levadura seca y molida, e los que la levadura se encuentra inactiva. Existen otros preparados de *Saccharomyces* sp. En los que las células están vivas y se usan como probióticos.

La levadura de cerveza puede producirse desde varias especies de levaduras *Saccharomyces*. Ésta se recupera durante el proceso producción de cerveza, o puede propagarse especialmente en un medio rico en nutrientes para incrementar los rendimientos y modificar su contenido mineral (Ingledew 1999).

La levadura de cerveza puede ser útil en el tratamiento de acné crónico, eczemas, gota artrítica, diarrea infecciosa y algunas disfunciones cardiovasculares. Posiblemente juegue un papel importante en la reducción del colesterol, estimulación del sistema inmune e incremento de las capacidades físicas y mentales (Girard y Dawson 1995).

## **LEVADURA PANADERA**

Las levaduras pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno. El crecimiento anaeróbico (ausencia de oxígeno), es lento e ineficiente como es el caso de la masa de pan en el que la levadura crece muy poco. En lugar de convertirse en biomasa, se produce mayormente etanol y dióxido de carbono. Solo una pequeña parte del sustrato es empleada para el mantenimiento celular y el crecimiento. En contraste, bajo condiciones aeróbicas, en presencia de una cantidad suficiente de oxígeno disuelto, la levadura emplea la mayor parte del

sustrato en el crecimiento y muy poco en la producción de etanol (Klibansky 1986).

Sin embargo, en condiciones de propagación aeróbica, si la concentración de azúcares es significativa, se produce alcohol por las células de *Saccharomyces* spp aún con exceso de oxígeno.

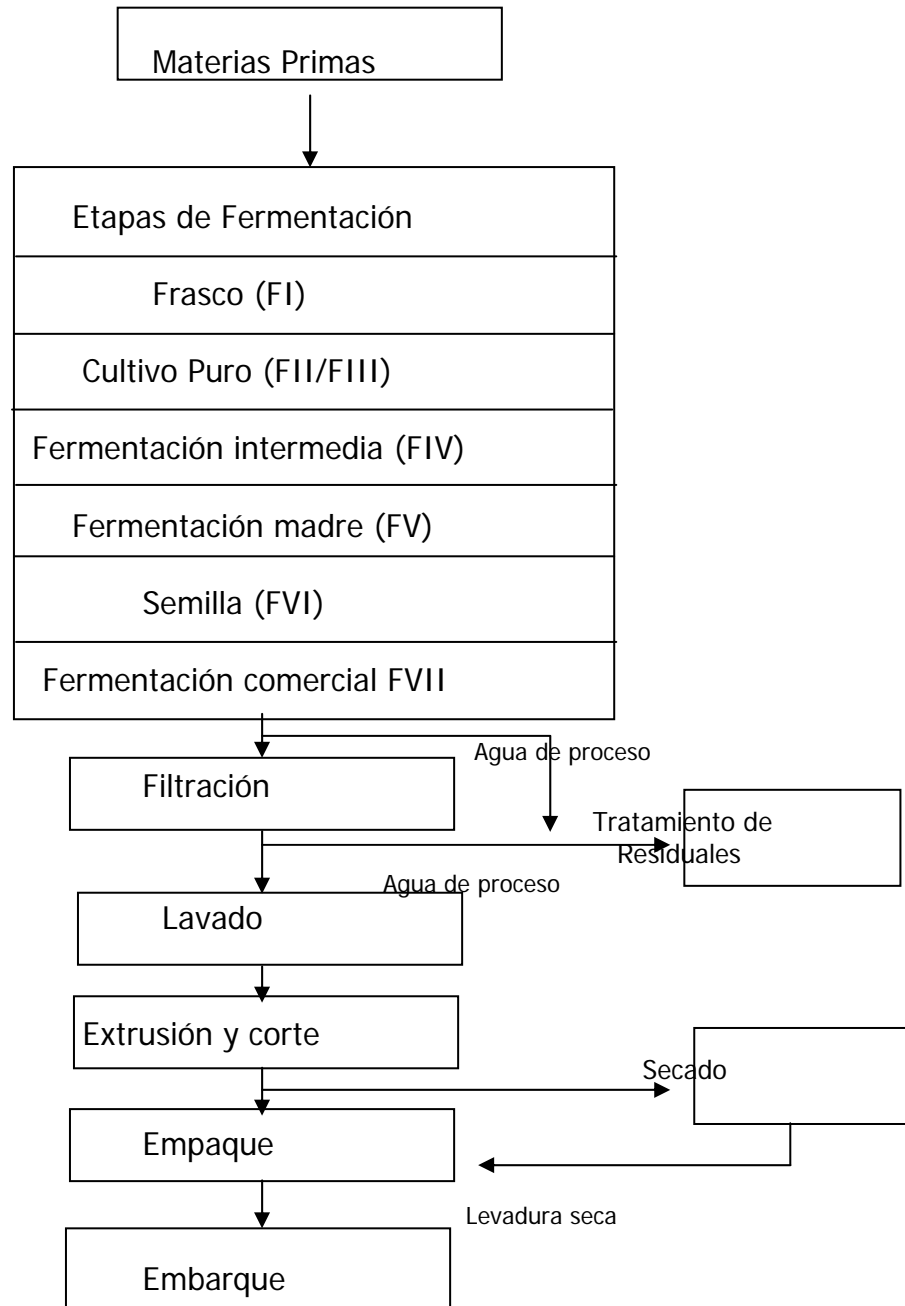
La levadura panadera difiere de la utilizada en la producción de cerveza en que el producto deseado no es etanol sino la propia biomasa. La levadura panadera puede ser empleada para producir cerveza o vino, sin embargo, lo contrario raras veces es posible. De hecho algunos intentos de utilizar la levadura de recuperación de cerveza han conducido a pobres resultados y eso ha estimulado la búsqueda de nuevos procesos para la producción de levadura panadera.

Actualmente la levadura panadera se comercializa como levadura húmeda compactada en forma de bloques o como levadura seca activa (LSA). La levadura activa instantánea (LSAI) se produce a partir de los bloques de levadura pasados por presión a través de una malla fina (0.5-3 mm) lo que rinde una especie de *spaghettis* finos que luego son secados en lecho fluidizado.

Los requerimientos de una levadura panadera buena son superiores a los de la levadura de cerveza y a la vez diferentes (Evans 1990). Primeramente, como se ha dicho ya, el producto principal es la biomasa, no un derivado metabólico. En segundo lugar, la condición de la levadura es fundamental en el horneo pues tiene que evolucionar CO<sub>2</sub> que eleva la masa. Esta elevación modifica las proteínas del trigo (gluten) y afecta las propiedades organolépticas del pan.

La Fig 2 muestra el diagrama de flujo de producción de levadura panadera (Chen y Chilar 1985).

Las materias primas fundamentales para la producción de levadura panadera son las melazas y el cultivo de levadura puro, amén de la utilización de sales de amonio de calidad alimenticia.



**Fig 2 Proceso típico de producción de levadura panadera en siete etapas**

### LEVADURA DE VINO

La producción vinícola es probablemente la tecnología concerniente a las levaduras que ha cambiado menos en los últimos 3000 años. Las uvas se cosechan, se exprimen para extraer el jugo y este se fermenta posteriormente. Cuando el vino está listo para consumir, se embotella. Para otros vinos el

proceso es un poco más complicado. De hecho la tecnología de producción del famoso champán y otros vinos espumosos fueron desarrolladas como una alternativa para comercializar vinos fuera de parámetro.

La levadura de vino, al contrario de lo que sucede en los procesos de producción de levadura panadera y cervecera, no es recuperada al final del proceso.

## **LEVADURA ALIMENTICIA**

En la levadura alimenticia, al igual que en la levadura panadera, el objetivo es también la biomasa como tal, aunque los requerimientos son menos exigentes que para ésta. Esta levadura se usa para la alimentación de peces en estanques como salmónidos, animales productores de pieles valiosas y alimentación de cerdos y aves. Esta levadura puede cultivarse en un rango de sustratos más amplio que la levadura panadera. De hecho, no solamente se emplean levaduras del género *Saccharomyces*, sino que han sido empleados otros géneros como *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces* y otros (Klibansky 1986; Saura et al 2003).

La levadura alimenticia así como la panadera pueden ser propagadas en cultivo continuo a escala comercial. *Candida utilis* ha sido propagada sobre licores sulfíticos, mieles de caña y mezclas de mieles-vinazas de destilerías. *Yarrowia lipolytica* por su parte, ha sido cultivada sobre n-alcanos.

Los métodos de cultivo continuo con altas densidades celulares de hasta 100-200 kg/m<sup>3</sup> (Sudbery y Gleeson 1989; Burden y Eveleigh 1990) han sido desarrollados para levaduras metilotróficas. Estos sistemas abren un campo promisorio para el futuro de las fermentaciones industriales en muchos aspectos por reducir dramáticamente los costes de producción, al menos teóricamente, pues permiten obviar la etapa de centrifugación.

## **LEVADURA DE DESTILERÍAS**

La vida requiere energía y con el incremento de la población mundial y la prohibición de aditivos oxigenantes a la gasolina por razones ecológicas (Adam et al 2002; Beer et al 2002; Borrero et al 2003), la producción de etanol

carburante ha experimentado un explosivo desarrollo. El etanol como fuente renovable de energía presenta múltiples ventajas respecto a los combustibles fósiles (Deeb et al 2003; Grosjean et al 2002)

Las levaduras convierten los carbohidratos en etanol y este puede ser adicionado a la gasolina para incrementar el octanaje o sencillamente para recuperar la energía que almacenan.

Uno de los factores económicos de mayor importancia en la producción de etanol, son los costes de recuperación del producto. El factor más importante es la eficiencia de fermentación, aunque se acepta comúnmente que el límite mínimo de concentración de etanol en el medio fermentado está alrededor de 8 % (Goldemberg y Macedo 1994). Bajo estas condiciones, las vinazas resultantes de la destilación del alcohol están en el entorno de DQO entre 40 y 70 kg/m<sup>3</sup>, el que debe ser reducido significativamente antes de verterlo al ambiente.

La fermentación alcohólica produce levadura marginal en concentración de 3-6 kg/m<sup>3</sup>. Las células se dejan sedimentar por gravedad para reducir la cantidad que se introduce en la columna, pues eso incrementa las incrustaciones en los platos. Ciertas cantidades de etanol se pierden con la crema, pero esto es preferible a asumir los gastos de separación mecánica, muy altos para ser económicos. Esta levadura deshidratada es una buena fuente de proteínas y otros compuestos de interés alimentario y metabólico.

## **COMPOSICIÓN DE LAS LEVADURAS**

La composición química de la biomasa de levaduras, nos da una idea de por qué estos microorganismos tienen un valor y aplicaciones potenciales aplicables en la industria. Se conocen los rangos de concentración de los componentes celulares tanto de la levadura panadera como la de cervecera, con mucho los dos mayores preparados de levadura en la industria. La Tabla 1 es una compilación de los valores promedio de estos preparados.

**Tabla 1. Composición aproximada de las levaduras panadera y cervecera industriales (Ingledeew 1999)**

Componente*	Levadura panadera	Levadura de cerveza
Carbohidratos	180-440	390-600
Proteína	380-590	370-420
Cenizas	45-75	73-81
(DNA + RNA)	52-95	39-43
P	10-19	14-20
S	3.9	
Ca	0.6-0.75	1.3
Fe	0.02-0.03	0.1
Mg	1.3-1.65	2.3
Cu	0.008	0.033
Mn	0.0059	0.0057
Cr	0.0005-0.0025	
V	0.00004	
Se	0.005	
Pantotenato (Coenzima A)	0.065-0.10	0.110-0.120
Cholina (membranas)	2.71-4.00	3.80-4.55
Tiamina (Vit B1)	0.090 -0.165	0.092-0.150
Riboflavina (Vit B2)	0.040-0.100	0.035-0.045
Niacina (NAD)	0.30-0.585	0.450
Pridoxina (Vit B6)	0.020-0.040	0.043-0.050
Biotina	0.0006-0.0013	0.001

Aunque estos valores pueden variar de un lote a otro, la importancia de este análisis composicional permite evaluar la utilidad de estas levaduras en sus usos potenciales en la industria (O'Connors-Cox e Ingledew 1991).

Los constituyentes de cada levadura varían significativamente entre cepas de un mismo género, así como entre géneros diferentes (Spencer y Spencer 1997). De igual manera, los cambios causados por la composición de medio de crecimiento, pueden ser también importantes (Spencer et al 1997).

La composición de la levadura de recuperación de destilerías por el contrario, es en extremo variable en dependencia de las condiciones específicas de cada fábrica de alcohol y su régimen de operación.



La Tabla 2 muestra la composición centesimal de la levadura de destilería integral (Yamada et al 2003; UNDP 2005)

**Tabla 2 Composición de la levadura de destilería**

<b>Componente, % BS</b>	<b>Yamada et al 2003</b>	<b>INT04/K04 2005</b>
Proteína Kjeldahl (Nx6.25)	42.67	38.70
Fibra dietética	31.40	28.75
Cenizas	4.60	17.28
Lípidos totales	0.5	0.50
RNA	9.00	7.50
No determinados	28.75	14.77

## BIBLIOGRAFÍA

Adam, G; Gamoh, K; Morris, DG; Duncan, H (2002) Effect of alcohol addition on the movement of petroleum hydrocarbon fuels in soil *Sci Total Environ* **286** (1-3):15-25.

Anderson, RA (1998) Chromium, glucose intolerance and diabetes *J Am Coll Nutr* **17**:548-555.

Anon (2005) The Brewer`s Handbook, Apex Publishers

Beer, T; Grant, T; Williams, D; Watson, H (2002) Fuel-cycle greenhouse gas emissions from alternative fuels in Australian heavy vehicles *Atmosph Environ* **36** (4):753-763. Burden, DW; Eveleigh, DE (1990) Yeasts-diverse substrates and products En: *Yeast technology* (Spencer, JFT and Spencer, DM eds) Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 199-227

Borrero, MAV; Pereira, JTV; Miranda, EE (2003) An environmental management method for sugar cane alcohol production in Brazil *Biomass Bioenergy* **25** (3):287-299.

Butolo, JE (1996) Uso de biomassa de levedura em alimentação animal: propriedades, custo relativo a outras formas de nutrientes. En: Anais do *Workshop* Produção de Biomassa de Levedura em Alimentação Animal e Humana; Agosto: Campinas. Ital; p.70-89.

Cameron, DR; Cooper, DG; Neufeld, RDJ (1988) The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier *Appl Environ Microbiol* **6**:1420-1425.

Chen, SL; Chigar, M (1985) Production of Baker's yeast, en: *Comprehensive Biotechnology* (Moo-Young, M ed) Vol 20, pergamon Press, New York

Davis, CM; Vincent, JB (1997) Chromium oligopeptide activates insulin receptor tyrosine kinase activity *Biochemistry* **36**:4382-4385.

Deeb, RA; Chu, KH; Shih, T; Linder, S; Suffet, IM; Kavanaugh, MC; Alvarez, CL (2003) MTBE and other oxygenates: Environmental sources, analysis, occurrence, and treatment *Environ Eng Sci* **20** (5) 433-447.

Dixon, B (1999) Yeasts: rising stars in biotechnology. *ASM News* **65** (1):2-3.

Dziedzic, JD (1987) Yeast and yeast derivatives: definitions, characteristics and processing *Food Technol* **42** (2):104-121.

- Evans, IH (1990) Yeast strains for baking: recent developments en: Yeast Technology (Spencer, JFT and Spencer, DM eds) Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 13-54
- Fleet, GH (1991) Cell walls. In: The Yeasts Vol 4. Cell Organelles. (A.H. Rose and J.S. Harrison, eds). Academic Press, London.
- Furco, AM (1996) Produção de biomassa de levedura em destilarias de álcool. In: Anais do Workshop Produção de Biomassa de Levedura em Alimentação Animal e Humana. Campinas: Ital; p.52-8.
- Girard, I.D. and K.A. Dawson. 1995. Stimulatory activities from low-molecular weight fractions derived from *Saccharomyces cerevisiae* strain 1026. 23rd Biennial Conference on Rumen Function, Chicago, Ill, p. 23.
- Goldemberg, J; Macedo, IC (1994) Brazilian alcohol program:an overview *Energy Sustain Dev* **1** (1):17-22
- Grosjean, D; Grosjean, E ; Moreira, LFR (2002) Speciated ambient carbonyls in Rio de Janeiro, Brazil. *Environ Sci Technol* **36** (7):1389-1395.
- Halasz, A; Lásztity, R (1991) Use of yeast biomass in food production. Boca Raton: CRC Press
- Ingledeu, WM (1999) Yeast - could you base a business on this bug?  
Alltech Symposium
- Kinight, S (1986) Yeast protein enhances flavour and nutrition *Food Process* **55** (10):13-14.
- Klibansky, MM (1986) Screening, productive and composition evaluation of yeast strain for human consumption. PhD Thesis; National Centre for Scientific Research, MES, Cuba
- Kollar, R; Sturdik, E; Sajbidor, J (1992) Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass *Food Biotechnol* **6**:225-231
- Lieske, B; Konrad, G (1994) Protein hydrolysates: the key to meat flavouring systems *Food Rev Int* **10**:287-312
- Luh, BS (1995) Industrial production of soy sauce *J Ind Microbiol* **14**:467-471
- Lyons, T.P. 1995. Biotechnology in the feed industry. A look forward and backward. In: Biotechnology in the Feed Industry, Proceedings of the 11th

Annual Symposium (T.P. Lyons and K.A. Jacques, eds). Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp. 1-29.

Otero, MA; Vasallo, MC; Verdecia, O; Fernández, VM; Betancourt, D (1996) A process for the complete fractionation of baker's yeast *J Chem Technol Biotechnol* **67**:67-71

Otero, MA; Cabello, AJ; Vasallo, MC; Garcia, L; Lopez, JC (1998) Preparation of an imitation soy sauce from hydrolyzed dried yeast *Candida utilis* *J Food Processing Preservation* **22**:471

O'Connor-Cox, ESC; Ingledew, WM (1991) Alleviation of the effects of nitrogen limitation in high gravity worts through increased inoculation rates *J Ind Microbiol* **7**:89-96.

PDR Health tomado de: [http://www.pdrhealth.com/drug\\_info/nmdrugptofiles/nutsupdrugs/bre\\_0043.shtml](http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugptofiles/nutsupdrugs/bre_0043.shtml).

Peixoto, N (1996) Processamento de produtos de biomassa de levedura para alimentação humana; potencial, mercado interno e externo. *In: Anais do Workshop Produção de Biomassa de Levedura: em alimentação humana e animal*; Campinas: Ital; p.90-8.

Reed, G; Pepler, H (1973) Yeast Technology (Harrison, A; eds), AVI Publishing Company, Westport, CT

Reed, G; Nagodawithana, TW (1991) Yeast technology. 2ed., New York: Van Nostrand Reinhold, 378.

Reid, ME; Stratton, MS; Lilloco, AJ; Fakih, M; Natarajan, R; Clark, LC (2004) A report of high-dose selenium supplementation: response and toxicities *J Trace Elements in Medicine and Biology* **18**:69-74.

Saura, G; Otero, MA; Martínez, JA; Fundora, N; Reyes, E; Vasallo, MC; Almazán, O (2003) Propagation of yeast biomass from distillery wastes. Process and product evaluation *Int Sugar J* **105** (1249):36-39

Spencer, JFT; Spencer, DM (1997) Outside and inside: the morphology and cytology of yeast cells en: *Yeasts in Natural and Artificial Habitats* (Spencer, JFT and Spencer, DM eds), Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, pp. 80-94

Spencer, JFT; Spencer, DM; de Figueroa, LIC (1997) Yeasts as living object: yeast nutrition en: *Yeasts in Natural and Artificial Habitats* (Spencer, JFT and Spencer, DM eds), Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, pp. 68-79

Sudbery, PE; Gleeson, MAG (1989) Genetic manipulation of methylotrophic yeasts En: *Molecular and cell biology of yeasts* (Walton, EF and Yarranton, GT eds) Blackie, London, van Nostrand Reinhold, New York, pp. 304-329

UNDP (2005) INT04/K04, PGTF Project: Development of New Technologies and Products for the Whole Utilization of Marginal and Primary Yeasts as Sources of Food (YAF), Progress Report 2005, <http://undp/org>.

Vasallo, MC; Otero, MA; García, L; Dopico, JR; López, JC (2001) Effect of homogenization as pretreatment for the improvement of autolysis efficiency of *Kluyveromyces fragilis* *Food Sci Technol Internat* **7** (5):445-450

Yamada, EA; Alvim, ID; Sgabieri, VC (2003) Composição centesimal e valor protéico de levedura da fermentação etanólica e seus derivados *Rev Nutr, Campinas* **16** (4):423-432

## **LAS LEVADURAS COMO ALIMENTO**

Agustín J. Cabello-Balbín

### **INTRODUCCIÓN.**

El interés en el uso de la levadura como alimento animal ó humano ha respondido básicamente a los siguientes factores:

- El desarrollo tecnológico alcanzado en la producción de levadura de panificación a finales del siglo xix y principios del xx que permitió conocer a fondo los mecanismos biológicos de su multiplicación y contar con el equipamiento necesario para su producción (fermentadores, centrifugas, secadores, etc.) (Bergander1959 ).
- La disponibilidad de levadura residual proveniente de otros procesos, fundamentalmente la producción de alcohol y en menor medida de vino.
- La disponibilidad de fuentes de materias primas abundantes y de bajo costo, casi siempre residuales de otros procesos como melazas, vinazas de destilerías de alcohol, suero de leche, almidón y sus derivados, lejías sulfíticas ó gas natural y n- alcanos utilizables como sustrato para su desarrollo (Otero 1982).
- Baja disponibilidad ó alto precio de fuentes convencionales de alimento, sobre todo harinas proteicas debido a sequías, guerra ó alto precio de los combustibles.

En la actualidad los problemas asociados con la protección del ambiente han venido a sumarse a los factores antes apuntados. En algunos casos la producción de levadura ha pasado a ser una variante de disminución de la carga poluente de algunos tipos de industria como es el caso de la industria alcoholera por vía fermentativa.

Por otra parte, el desarrollo experimentado por la ganadería intensiva ha provocado no solo una aumento dramático en el consumo de alimentos de alta concentración de energía y proteínas, que compiten con el consumo humano, sino que también requiere de una amplia gama de aditivos y nutrientes deficitarios en las fuentes básicas de alimentación como son los cereales, especialmente el maíz, y las harinas proteicas, especialmente la de soja (Cabello 2002).

Además de los macro nutrientes, en los sistemas actuales de producción animal se balancean una gran cantidad de micro elementos como vitaminas y minerales

mediante programas de computación diseñados para lograr satisfacer los requerimientos con un costo mínimo en los que se toman en cuenta adicionalmente propiedades físicas y funcionales de los alimentos que puedan limitar su inclusión. Todo esto demanda una gran variedad de alimentos que permita seleccionar en función de sus características nutricionales, físicas y de precio lo que posibilita la inclusión de algunos no convencionales como las levaduras.

Una discusión más detallada de todos estos aspectos puede encontrarse en otras fuentes de información ( Ferranti y Fiechter 1983, Baldwin 1980).

Las décadas de los 70 y 80 del siglo pasado produjeron una gran cantidad de información al respecto debido a las crisis de los precios del petróleo, los problemas de la agricultura en países como India, China y la ex Unión Soviética y la creación de capacidades de producción de levadura y otros microorganismos con fines alimenticios como en el caso de Cuba que llegó a contar con una capacidad instalada para producir 100000 toneladas por año en un país pequeño ó el “boom” de las proteínas obtenidas de hidrocarburos y de productos como el metanol y el etanol sintéticos.

Este “boom” iniciado originalmente por multinacionales petroleras como BP, logró materialización industrial a mayor escala en Europa del Este y fundamentalmente en la ex Unión Soviética donde se instaló una planta de gran porte para producir levadura conocido como proyecto Mozyr.

La producción de proteína unicelular a partir de hidrocarburos fue descontinuada por su potencial carcinogénico.

### **Valor de las levaduras como alimento.**

Con independencia de la especie que lo va a consumir cualquier alimento debe reunir una serie de requisitos que lo hagan aceptable como tal. Estos requisitos y su relación con las levaduras se discuten a continuación.

### **Inocuidad**

Es obvio que un alimento no debe ser causa de enfermedades, trastornos metabólicos ó mutaciones genéticas en él que lo consume. Esta afirmación tan sencilla se complica en la práctica por la gran diversidad de componentes que

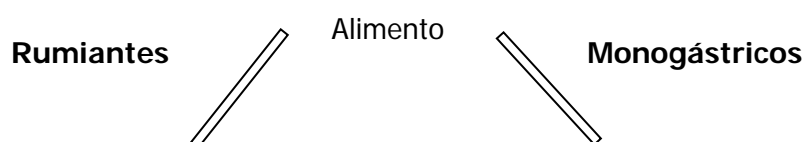
contienen los alimentos, por la complejidad de las reacciones asociadas a su digestión y metabolismo y no en menor medida por la contaminación química ó microbiológica que puede acompañarlos durante su producción, procesamiento, almacenamiento y forma de consumirlos.

Como quiera que no es posible lograr alimentos “perfectos” se han elaborado algunos criterios sobre la inocuidad de los mismos en los cuales se fijan límites a la presencia ó contenido de determinados factores constituyentes ó acompañantes que son generalmente aceptados como dañinos.

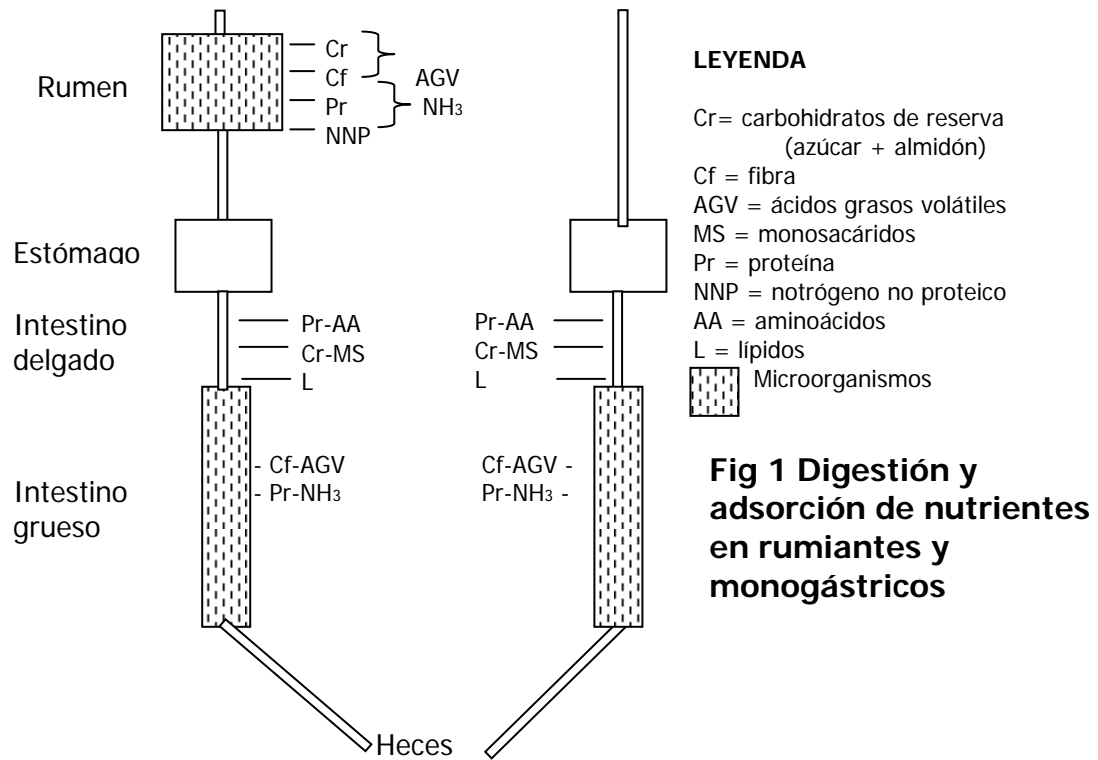
En el caso de los productos constituidos por células de microorganismos conocidos como proteína unicelular (single cell protein ó SCP en inglés) al cual pertenecen las levaduras, la FAO y la WHO (organizaciones de Naciones Unidas especializadas en la alimentación y la salud respectivamente), a través de un grupo consultor, han elaborado un grupo de recomendaciones cuyas recomendaciones principales han sido recogidas en documentos específicos (PAG/UNU 1983a y b, PAG/UNU 1984) que no solo fijan límites a la presencia de microorganismos y compuestos patógenos sino que también proponen las pruebas clínicas y preclínicas a las que deben ser sometidos estos productos a fin de ser reconocidas como GRAS (generally recognized as safe) .

### **Digestión y absorción**

Para lograr su aprovechamiento los componentes nutritivos del alimento tienen que estar disponibles tanto en la etapa de digestión como en la etapa de absorción. En este sentido es necesario diferenciar entre especies poligástricas ó rumiantes y especies monogástricas (incluyendo al hombre) ya que el rumen ó panza de los rumiantes constituye una etapa de degradación microbiológica previa a la digestión estomacal que le permite a este tipo de animales degradar carbohidratos estructurales de tipo lignocelulósico y otros macrocompuestos incluyendo las proteínas. En la Fig1 y en la Tabla 1 se muestran de manera comparativa las diferencias entre ambos tipos de animales en cuanto a la digestión y absorción de los principales tipos de nutrientes (Wenk 1983).







**Tabla 1 Utilización de nutrientes por monogástricos y rumiantes**

Nutrientes	Utilización en el tracto digestivo		Utilización en los tejidos
	Monogástricos	Rumiantes	
<i>Sustancias nitrogenadas</i>			
Proteína			
Alta calidad	***	*_ ***	***
Baja calidad	*	*_ ***	* (**)
N no proteico (incl. Ac. nucleicos)	0 - *	*_ ***	0 - ** {solo rum}
<i>Carbohidratos</i>			
Reserva	***	**	***
Paredes celulares (fibra)	*	**	***
<i>Lípidos</i>			
Ácidos grasos C 20	***	**	***

o insaturados Ácidos grasos C 20 saturados	*_**	*_**	***
---	------	------	-----

\*\*\* alto; \*\*medio; \* bajo; 0 ninguno

En el caso de las levaduras y en general de los microorganismos la envoltura ó pared celular constituida por polisacáridos en lo fundamental constituye una barrera natural a la digestión gástrica. Esto no debe sorprender pues una de las principales funciones naturales de esta estructura celular es la de proteger al organismo de las agresiones externas. Mientras la digestibilidad de los constituyentes intracelulares es del orden del 95%, la de las células enteras no sobrepasa un 65-70% en bacterias y levaduras y es aún menor en los hongos debido a la presencia de esta pared (Cabello 1988). Existen una serie de métodos de tratamiento de este tipo de materiales diseñados con el objetivo de quebrar mecánicamente ó de disolver estas estructuras por vía química o enzimática. Los métodos mecánicos se utilizan por lo general cuando se pretende recuperar componentes intracelulares específicos de alto valor de forma intacta, son propios de procesos en pequeña escala y presentan costos de inversión y operación elevados.

Los álcalis son especialmente efectivos en este sentido según se puede apreciar en la Tabla 2. Este tipo de tratamiento degrada colateralmente los ácidos nucleicos, desnaturaliza en cierta medida a las proteínas aumentando su solubilidad en condiciones fisiológicas de tracto digestivo y pueden llegar a afectar la disponibilidad de algunos aminoácidos como la lisina (Otero 1989)

**Tabla 2 Eficiencia del tratamiento alcalino sobre la proteína y el ARN de levadura**

NaOH, %	Tiempo, min	ARN residual, %	Reducción ARN, %	Rendimiento, %	
				biomasa	proteína
2	5	8.19	26.81	95.22	95.13
	10	8.00	30.43	94.13	93.78
	15	7.95	34.56	94.22	93.66

	20	5.73	51.11	93.87	93.04
3	5	7.528	32.76	88.75	88.31
	10	7.33	34.28	87.41	87.69
	15	6.09	44.54	86.64	87.00
	20	5.11	56.21	84.21	86.48
5	5	4.57	64.83	85.14	86.18
	10	2.43	83.27	85.00	86.21
	15	2.00	83.76	84.72	85.34
	20	1.96	84.16	84.03	85.01

En la industria, sin embargo, el método más empleado es la llamada termólisis que consiste en someter a las células en suspensión acuosa a una temperatura de 95 °C durante 5-7 minutos con lo que se logra el estallido de la mayor parte de las mismas y se garantiza colateralmente la muerte térmica del microorganismo. Esta etapa del proceso está generalmente incorporada en el sistema de concentración por evaporación de la suspensión celular previa al secado.

### **Valor nutritivo Intrínseco.**

Ningún alimento contiene cualitativa ni cuantitativamente todos los nutrientes en relación con los requerimientos del que lo consume. En el caso de las levaduras su composición nutricional comparativa se muestra en la Tabla 3 (Maloney 1998).

Como se puede apreciar esta corresponde a la de las llamadas harinas proteicas y en tal sentido su composición en aminoácidos resulta de gran importancia por cuanto la utilización de levadura en la ración estará encaminada principalmente a suplir requerimientos de proteína, especialmente de aquellos aminoácidos considerados esenciales porque no pueden ser sintetizados por el organismo del consumidor.

La evaluación y comparación del valor nutricional de las proteínas ha sido objeto de gran estudio y se han desarrollado una gran cantidad de indicadores comparativos que toman generalmente como patrón de proteína de mayor calidad la caseína de la leche ó la albúmina de

**Tabla 3 Composición aproximada de levaduras industriales (g./kg.m.s.)**

<b>Componente*</b>	<b>Levadura panadera</b>	<b>Levadura de cerveza</b>
Carbohidratos	180-440	390-600
Proteínas	380-590	370-420
Cenizas	45-75	73-81
AND + ARN	52-95	39-43
Lípidos	40-50	
Fósforo	10-19	14-20
Azufre	3.9	
Potasio	20-21	17
Sodio	0.12-0.3	0.7
Calcio	0.6-0.75	1.3
Hierro	0.02-0.03	0.1
Magnesio	1.3-1.65	2.3
Cobalto	0.008	0.0002
Cobre	0.008	0.033
Manganeso	0.0059	0.0057
Zinc	0.170-0.197	0.0387
Cromo	0.0005-0.0025	
Niquel	0.003	
Estaño	0.003	
Molibdeno	0.00004	
Litio	0.000017	
Vanadio	0.00004	
Selenio	0.005	
Pantotenato (Coenzima A)	0.065-0.10	0.110-0.120
Colina (membranas)	2.71-4.00	3.80-4.55
Tiamina (Vit B1)	0.090 -0.165	0.092-0.150
Riboflavina (Vit B2)	0.040-0.100	0.035-0.045
Ácido nicotínico/niacina (NAD)	0.30-0.585	0.450
Piridoxina (Vit B6)	0.020-0.040	0.043-0.050
Biotina	0.0006-0.0013	0.001
<i>p</i> -aminobenzoato	0.160	0.005
Inositol	3.0	3.9-5.0
Ácido fólico	0.013-0.015	0.010

huevo. Una discusión en detalle de estos indicadores se puede consultar en el clásico trabajo de Sheffner (1967). Las levaduras se ubican de acuerdo a estos indicadores en una posición similar a otras proteínas de origen vegetal como la soja.

Lo más interesante en relación con las levaduras es que su alto contenido de lisina permite un mejor aprovechamiento de las proteínas de los cereales en las cuales este aminoácido esencial es limitante si ambas fuentes se combinan en la ración.

Aunque en el mercado existe la posibilidad de adquirir lisina obtenida por vía fermentativa y se han desarrollado genotipos de maíz de alto contenido de lisina, el aporte de otros aminoácidos y nutrientes no proteicos aportados por la levadura resulta generalmente más eficiente y económico.

El déficit de metionina y otros aminoácidos azufrados de la levadura es típico de todas las proteínas vegetales convencionales ó de origen microbiano y puede ser subsanado con metionina sintética. Estudios realizados en Cuba relacionados con el uso de metionina sintética al 0.2% en raciones de cerdos donde la proteína fue aportada de forma total por la levadura demostraron que se justifica económicamente por la mejora de la conversión alimentaria en términos de carne (Namer et al 1989). En pruebas en ratas el valor biológico de la levadura aumentó de 56 a 92.4% al ser suplementadas con metionina (Lezcano 1989).

La composición comparada de las vitaminas en cereales se presenta en la Tabla 4. Los valores de vitaminas de la levadura (Tabla 3) deben ser multiplicados por 100 para compararlos con los de los cereales lo que permite apreciar que las levaduras son aportadores de vitaminas en mayor medida que estos.

**Tabla 4 Contenido de vitaminas del complejo B en cereales (mg/100 g. de m.s.)**

Material	Trigo	Centeno	Cebada	Avena	Maíz	Sorgo	Mijo
Tiamina	3.5-5	2.6-4.4	3.1-3.7	4.3-6.4	2.8-3.7	4	1.1
Niacina	42-43	9-16	53-65	8-18	14-21	29	28
Riboflav.	1.1-1.3	1.3-1.5	1.2-1.4	1-1.3	0.6	0.9	0.8
Piridox.	4.6	2.3	3.6-4.3	1.2	4.8	---	2.3
Pantoten.	10.9	9-10	10	11.2	8	11	9.4
Fólico	0.44	----	0.59	0.22	0.31	---	0.14
Biotina	0.09	0.05	0.07- 0.13	0.18-0.29	0.065	---	0.01

Es importante tomar en cuenta en el caso de la levadura y otras proteínas de origen microbiano que el análisis bromatológico convencional de proteína bruta basado en la técnica de Kjeldahl y consistente en multiplicar el contenido de nitrógeno por un factor de 6,25 induce a una sobrestimación del contenido de proteína verdadera por la presencia de sustancias nitrogenadas no proteicas, fundamentalmente ácidos nucleicos en este tipo de material. El alto contenido de ácidos nucleicos en levaduras y bacterias es debido a su altísima velocidad de reproducción en comparación con los vegetales y los animales. Un factor de multiplicación del nitrógeno total de 5,5 brinda una aproximación más exacta del contenido de proteína en levaduras

La ingestión excesiva de ácidos nucleicos provoca acumulación de ácido úrico en articulaciones (gota) en animales que no disponen de la enzima uricasa que permite la eliminación por la orina de alantoína como producto de degradación de estos ácidos.

Por otro lado, el contenido de vitaminas hidrosolubles de la levadura está influenciado en gran medida por el sustrato ó fuente de carbono a partir del cual se produce la misma. En general la levadura más rica en vitaminas es la de cerveza por lo que ha sido empleada tradicionalmente para afecciones cutáneas como el acné en humanos.

Los minerales constituyen el otro grupo de nutrientes importantes presentes en la levadura por su efecto en el metabolismo animal. En la Tabla 5 se presentan los niveles de minerales tolerables en diferentes especies de animales (Wenk 1983).

Una simple comparación de las Tablas 3 y 5 permite comprobar que la levadura es un importante aportador de macroelementos como fósforo, calcio y magnesio.

El fósforo en la levadura está en buena medida formando parte de los ácidos nucleicos, aunque también como fosfolípidos y ATP. En cualquier caso su disponibilidad es alta por encontrarse en forma de ión fosfato y no formando parte de compuestos no asimilables del ácido fítico como sucede en muchos vegetales.

**Tabla 5 Niveles tolerables de minerales en animales domésticos**

Elemento	Unidades	Especie				
		Bovino	Ovino	Cerdo	Pollo	Caballo
Al	ppm	1000	1000	(200)	200	(200)
As inorg	ppm	50	50	50	50	(50)
As org	ppm	100	100	100	100	(100)
Br	ppm	200	(200)	200	2500	(200)
Ca	%	2	2	1	1.2-4	2
Cu	ppm	100	25	250	300	800
F	ppm	50	60-150	150	200	(40)
I	ppm	50	50	400	300	5
Fe	ppm	1000	500	3000	1000	(500)
Pb	ppm	30	30	30	30	(30)
Mg	ppm	1000	1000	400	2000	(400)
Hg	ppm	2	2	2	2	(2)
P	%	1	0.6	1.5	0.8-1.2	1
K	%	3	3	(2)	(2)	(3)
Se	ppm	(2)	(2)	2	2	(3)
NaCl	%	4-9	9	8	2	(3)
Zn	ppm	500	300	1000	1000	(500)

Algunos microelementos son cofactores necesarios para la actividad de ciertas enzimas ó ejercen un papel decisivo en la biosíntesis de sustancias reguladoras del metabolismo. La adición de estos elementos en premezclas de uso forrajero y en suplementos alimentarios de uso humano se ha convertido en una práctica común. La disponibilidad biológica ó asimilación de los mismos en forma orgánica es mayor que cuando se suministran en forma de sales inorgánicas.

En tal sentido se han reportado resultados impresionantes para el selenio y el cromo (Hemken et al 1998, Mahan et al 1996, Mowat 1994) cuando se han utilizado estos

elementos en forma levaduras enriquecidas en los mismos obtenidas por técnicas de fermentación diseñadas a tales efectos.

Bajo estas condiciones estos elementos son incorporados a proteínas como el glutatión y a aminoácidos azufrados y metabolizados por las mismas vías. En el caso del cromo trivalente, este es el cofactor de la insulina y como tal juega un papel importante en el metabolismo de los azúcares.

### **Efectos sobre la salud**

Los sistemas de producción ganadera actuales son de tal intensidad que generan stress sobre los animales. La alta densidad de animales por unidad de área, el corto ciclo de vida, la alta concentración de nutrientes de la ración y la selección de líneas genéticas de rápido desarrollo y alta conversión pero de baja capacidad de respuesta a las agresiones del ambiente han conllevado al uso frecuente de antibióticos y otros medicamentos para proteger sobretodo el tracto digestivo donde radica el mayor peso de la eficiencia de producción de carne, leche, huevos y otros productos pecuarios.

En los últimos años la presión de instituciones gubernamentales y de los consumidores ha obligado a disminuir ó eliminar el uso de sustancias químicas y antibióticos en los alimentos para animales.

Dentro de la diversidad de nuevos productos utilizados los llamados probióticos de origen microbiano" son capaces de establecerse y eventualmente colonizar el tracto gastrointestinal y de esa forma mantener ó incrementar la biota natural para prevenir la colonización de organismos patógenos y asegurar una utilidad óptima del alimento" (Vanbelle et al 1990). Para una discusión más detallada sobre los efectos fisiológicos de los probióticos puede consultarse a Brizuela (2003).

Junto a las bacterias lácticas las levaduras del género *Sacharomyces* son utilizadas como estabilizadoras de la flora intestinal. En este caso las células se alimentan enteras y vivas por lo que los preparados deben tomar en cuenta el ataque de los jugos gástricos a nivel del estomago. Existe una amplia disponibilidad de estos productos en el mercado de aditivos forrajeros como el Biosaf de la firma Lesaffre y algunos para la prevención ó tratamiento de diarreas en humanos como el Floratil de la firma Merck .



A diferencia de los probióticos, los llamados "prebióticos", son compuestos derivados de la pared celular de las levaduras y constituidos por polisacáridos del tipo glucanos y mananos. Su modo de acción no está totalmente establecido aunque aparentemente actúan sobre más de un mecanismo inmunológico sirviendo de sitio de adhesión para toxinas y patógenos que de otra forma se fijarían en la pared intestinal (Spring 1996,1998).

### **Propiedades físicas y funcionales.**

Además de sanos y nutritivos los alimentos deben reunir otras características de índole física y químico física que faciliten su empleo práctico y que permitan su inclusión en presencia de otros alimentos y nutrientes. Estas propiedades son importantes tanto para el fabricante de fórmulas ó balanceados como para el consumidor final e incluyen aspectos tales como humedad, tamaño de partículas, densidad de bulto, palatabilidad, oxidación y otras. En el caso de alimentos de consumo humano preparados industrialmente estas exigencias aumentan en función del tipo de alimento y del objetivo buscado.

La humedad además de su influencia sobre la conservación juega un papel importante en la compactación (caking) del producto y guarda una estrecha relación con el tipo de envase a emplear y con la altura de la estiba de sacos en los almacenes. La experiencia en Cuba con levaduras producidas a partir de melazas, envasadas en sacos multicapas de papel kraft de 25 kilogramos y estibados hasta una altura de 8 sacos es que se produce compactación en los sacos que demanda operaciones adicionales de desgranamiento del material antes del mezclado con los otros componentes del alimento.

La inclusión de una capa de PVC de densidad media mejora sustancialmente este problema.

La opción de utilizar levadura en forma de crema termolizada y concentrada hasta 20-22% de sólidos en raciones para cerdos en engorde tal cual ó en mezcla con siropes azucarados (mieles enriquecidas) ha sido ampliamente explorada en Cuba como un vía de disminuir sustancialmente los costos de producción de la levadura al eliminar el secado y el envase en el proceso tecnológico. Esta variante se aplica cuando es posible garantizar un alto nivel de higiene en la manipulación del

producto y lograr que el mismo sea consumido en las siguientes 24 horas después de su fabricación. Aunque se logran ahorros siempre que la transportación sea a corta distancia ó pueda ser efectuada por bombeo este sistema de operación es muy tenso y riesgoso por lo que su aplicación solo es posible en casos aislados.

El tamaño de partículas está asociado con el carácter más o menos pulverulento del material y la afectación que esta propiedad puede tener en afecciones respiratorias de los animales y del personal que lo manipula.

El secado por atomización (spray drying) se ha generalizado porque permite un tiempo de contacto a alta temperatura muy corto lo que evita daños térmicos de las proteínas, por una mayor densidad de bulto del material en comparación con el secado en secadores de tambor ó rodillos y porque permite altas capacidades de producción con equipamiento compacto. Este tipo de secado entrega un material sumamente fino, similar al de la leche en polvo con la diferencia de que ésta generalmente se diluye en agua para ser consumida lo que evita problemas de este tipo.

En raciones con alta proporción de trigo esta levadura produce empaste en el pico de las aves lo que limita el consumo de alimento.

Las levaduras de recuperación de la producción de alcohol generalmente se secan en secadores de tambor por tratarse de volúmenes menores y porque en las destilerías es posible aplicar diferentes esquemas de uso del vapor que facilitan el empleo del mismo. Este producto se obtiene en forma de escamas u hojuelas con una densidad de bulto algo menor y mucho menos polvo.

Experimentalmente se ha podido comprobar que la levadura secada de esta forma tiene, en ratas, una digestibilidad algo mayor y un valor biológico ligeramente inferior a la secada por atomización (Álvarez et al 1981).

En relación con la palatabilidad las levaduras no presentan problemas en los animales. En humanos cuando su incorporación en la dieta es mayor que la de un simple aditivo su sabor no resulta agradable. Solo en épocas de guerra ha sido utilizada la levadura de forma más ó menos masiva como en el caso de Alemania durante las dos Guerras Mundiales del siglo XX.

La incorporación de proteína vegetal en embutidos como extensor cárnico y en menor medida en productos lácteos es algo que se realiza comúnmente utilizando

concentrados y aislados proteicos de soja y que ha sido intentado en varias oportunidades utilizando levadura. En este tipo de aplicación además del sabor resultan de gran importancia otras propiedades tales como la solubilidad de la proteína, su capacidad de retención de agua, la viscosidad, la capacidad de emulsionar grasas ó la formación de espumas.

Hasta la fecha el mayor uso encontrado ha sido en productos a base de cereales y de repostería con niveles de inclusión máximos del orden de 10%.

Un trabajo extensivo en el tratamiento de levaduras para modificar sus propiedades fue el realizado por Giehart y Potter (1978).

Contradictoriamente a partir de levadura se producen saborizantes de agradable tono de sabor cárnico de amplio uso sobretodo en sopas en polvo y sazoadores para carnes líquidos ó secos. La producción de este tipo de producto conocido como autolizado ó extracto de levadura se detalla en otro capítulo de esta monografía.

### **Resultados en el uso de levaduras en alimentación animal.**

El uso de levaduras en diferentes especies está condicionado además de por los aspectos de inocuidad, valor alimenticio, aspectos de salud y propiedades físicas y funcionales de manera decisiva por el precio de mercado de las mismas. Estos precios dependen en cada país de una compleja interacción de factores económicos, fiscales y hasta jurídicos que norman el sector agropecuario y la protección a productores agrícolas de determinados cultivos.

Estos factores determinan que el interés por el uso de levaduras como fuente proteica sea mucho menor en países con abundancia de soja y otras fuentes convencionales de proteína y que el uso de levaduras se restrinja al de un aportador de vitaminas y eventualmente de lisina.

Por otra parte, siendo la proteína un componente de costo decisivo en la producción animal resulta lógico que las proteínas más costosas se destinen a los usos de mayor atractivo económico ó donde los requerimientos de la especie así lo exigen. Algunos de los casos donde la levadura ha logrado un nivel de introducción apreciable en función de estos criterios es en la formulación de sustitutos lácteos para terneros y en la alimentación de especies marinas en cautiverio como el camarón.

En el caso de engorde toros resulta más ventajosa la utilización de fuentes proteicas de menor calidad y precio como la harina de semilla de algodón ya que en este tipo de animal la proteína se degrada en buena medida en el rumen y es transformada en proteína de constitución de los microorganismos que lo pueblan.

El cerdo constituye una especie donde la levadura no tiene límites de inclusión en la etapa de crecimiento-engorde (Lezcano 1989).

En la Tabla 6 se presentan los límites de inclusión propuestos para diferentes especies y categorías de animales por un fabricante europeo de levadura forrajera obtenida a partir de lejías sulfíticas residuales de la producción de papel (Biocel, a. s. 2002). Estos límites de inclusión resultan conservadores y pueden estar asociados a la materia prima de procedencia para la levadura.

**Tabla 6 Niveles de inclusión máximo de levadura para diferentes especies**

<b>Especie</b>	<b>Nivel Máximo, %</b>	<b>Especie</b>	<b>Nivel Máximo, %</b>
Lechones	5	Ganso	3
Cerdo (< 35 kg)	10	Trucha	8
Cerdo (35-65 Kg.)	ilimitado	Carpa	10
Cerdas (reprod)	ilimitado	Nutria	6
Broiler (Fase 1)	3	Perro	5
Broiler (Fase 2)	9	Armiño	10
Gallinas	10	Faisán	5
Pavo (Fase 2)	3	Ciervo	ilimitado
Pavo (Fase 3)	8	Caballo	15 (premezcla vit + minerales)
Pato	6		

## **BIBLIOGRAFÍA**

Álvarez R; Cabello A; Otero MA (1981) Una Nota sobre el Valor Biológico de la Levadura *Candida utilis* Secada por Diferentes Métodos *Rev Cub Ciencia Agrícola* **15** (1):71-73.

Baldwin RL (1980) "Animals, Feed, Food and People". American Association for the Advancement of Sciences (AAAS), Selected Symposium 42. Westview Press Inc. Boulder Colorado.

Biocel a. s. (2002) "Vitex"(folleto de la empresa), Ostrava, Republica Checa.

Brizuela M. A., (2003) "Selección de Cepas de Bacterias Ácido Lácticas para la Obtención de un Preparado con Propiedades Probióticas y su Evaluación en Cerdos". Tesis de Doctorado. ICIDCA. B2-011-4520-2003.

Bergander E. (1959) "Biochemie und Technologie der Hefe". Theodor Steinkopff Verlag, Dresden und Leipzig.

Cabello A. (1988) "Caña de Azúcar y Alimento Animal". Capitulo 15 de "La Industria de los Derivados de la Caña de Azúcar". Edit. Científico-Técnica. La Habana

Cabello A. (2002) "Los sistemas agroalimentarios actuales y la caña de azúcar. Un análisis comparativo". Edit. ICIDCA, La Habana

Ferranti M.P., Fiechter A. (edit.) (1983) "Production and Feeding of Single Cell Protein". Applied Science Publishers. London and New York.

Giehart D. L., Potter N.N. (1978) "Effects of Ribonucleic Acid Removal Methods on Composition and Functional Properties of *Candida utilis*". *Journal of Food Sciences*, Vol. 43, pp1705-1713.

Lezcano P. (1989) "Utilización de la Levadura *Torula* en Dietas de Mieles para Cerdos en Crecimiento"en "La melaza comoRecurso Alimenticio para Producción Animal". Geplacea.Serie Diversificación, México D. F.

Mahan D. C. (1995) "Selenium Metabolism in Animals: What Role does Selenium Yeast Have . En "Biotechnology in the Feed Industry". Proceedings of the 11<sup>th</sup> Annual Symposium (T.P. Lyons and K.A. Jacques eds.). Nottingham University Press, Nottingham, U.K., pp 257-267.

Maloney D. (1998) "Yeasts" en Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 4<sup>th</sup> Edition, (J.I. Kroschwitz and M. Howe-Grant, eds.), John Wiley & Sons, New York, pp 766-778.

- Mowat D. N. (1994) "Organic Chromium: a New nutrient for Stressed Animals". En "Biotechnology in the Feed Industry". Proceedings of the 11<sup>th</sup> Annual Symposium (T.P. Lyons and K. A. Jacques eds.). Nottingham University Press, Nottingham, U.K. , pp 275-282.
- Namer I., Cabello A. (1989) "Consideraciones Económicas del Empleo de Metionina en las Dietas de Miel Proteica " ICIDCA, Dpto. de Investigaciones Económicas, diciembre 1989.
- Otero M. A. (1982) "Fuentes de materias primas y microorganismos utilizados para la producción de proteína unicelular" Edit. Científico- Técnica. La Habana.
- Otero M. A. (1989) "Estudio y Evaluación de Diferentes Métodos de Reducción del RNA de Levadura para el Consumo Humano". ICIDCA. La Habana.
- PAG/UNU (1983 a) "Preclinical Testing of Novel Sources Of Foods". The United Nations University Food and Nutrition Bulletin. Vol.5, No.1, p. 60-65.
- PAG/UNU (1983 b) Guideline No. 7 "Human Testing of Novel Foods". UNU Food and Nutritional Bulletin. Vol 5, No. 2, p77-80.
- PAG/UNU "(1984) Guideline No.12 "The Production of Single Cell Protein for Human Consumption". UNU Food and Nutrition Bulletin. Vol.6, No.1, p 64-66.
- Ross Breeders (2000) "Antibióticos Promotores del Crecimiento".Industria Avicola (Edición Latinoamericana de Poultry Science). Vol 47, No. 7, pp 14-18.
- Sheffner A. L. (1967) "In Vitro Protein Evaluation" en "Newer Methods of Nutritional Biochemistry". Vol. III. Academic Press. New York and London.
- Spring P. (1996) "Effect of Mannanligosacharide on Different Cecal Parameters and on Cecal Concentrations of Enteric Pathogens in Poultry". Ph. D. Dissertation Thesis, Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Switzerland.
- Spring P. (1998) "Mannanligosacharide.Its logical role as a Feed Additive for Piglets". En "Biotechnology in the Feed Industry". Proceedings of the 14<sup>th</sup> Annual Symposium ( T. P. Lyons and K. A. Jacques eds.), Nottingham University Press, Nottingham, U. K.
- Vanbelle M., Teller E., Focant M. (1990) « Probiotics in Animal Nutrition ». Arch. Anim. Nutr. Berlin Vol. 4, No. 7

Wenk C. (1983) "The Animal Nutritionists Dream of a New SCP" en "Production and Feeding of Single Cell Protein", Ferranti and Fiechter (edits.) Applied Science Publishers. London and New York.

## **CAP 6 POTENCIADORES DE SABOR A PARTIR DE LEVADURAS**

Isabel Guerrero Legarreta

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

### **EL SABOR DE LOS ALIMENTOS Y LOS COMPUESTOS QUE LO PRODUCEN**

La calidad de un alimento se basa en: sanidad; color, sabor y textura, y valor nutricional. El sabor describe la respuesta a un estímulo, aunque el término también se emplee para describir al estímulo mismo. El sabor, sin embargo, se define como la suma de todas las características de un alimento percibidas en la boca por los sentidos del gusto y del olfato, así como por los receptores táctiles de la boca, e interpretados por el cerebro (Hall, 1968).

Esta definición indica la complejidad del reconocimiento físico de los sabores en los alimentos. El sabor, o "flavor", existe solamente cuando los aromas y característica texturales se combinan y son reconocidos por parte del consumidor. De tal forma que los anosmicos, o personas que han perdido la capacidad de percibir olores, consideran que los alimentos no son apetecibles.

El sabor está compuesto de sensaciones químicas; gusto, olfato y sensaciones nerviosas (trigeminales). Los estímulos que producen sensaciones de sabor son compuestos químicos que reaccionan con los receptores en las cavidades oral y nasal produciendo respuestas reconocibles.

Las sustancias que producen sabor derivan de una gran variedad de fuentes: algunos se encuentran en forma natural en los alimentos mientras que otros se producen durante el procesamiento por la acción de las condiciones de operación, o por interacción entre componentes químicos. En gran número de alimentos la acción enzimática inicia la liberación de compuestos relacionados con el sabor; al romper el tejido durante el procesamiento o la masticación la acción de las enzimas sobre el sustrato también da como resultado la producción de sabores. El metabolismo de los lípidos produce varios compuestos de sabor como ésteres, éteres, aldehídos y cetonas, mientras que los aminoácidos generan compuestos fenólicos, y los carbohidratos producen terpenos.



Otro tipo de compuestos químicos relacionados con el sabor son los volátiles, los cuales se liberan durante la masticación y son percibidos por la cavidad olfativa (que incluye la boca y la nariz).

Finalmente, el sabor también es producido por la interacción de compuestos presentes en el alimento. Tal es el caso de las reacciones de oscurecimiento en sus varios tipos (reacciones de Maillard, oxidación de ácido ascórbico, caramelización y acción de enzimas), por oxidación de lípidos y por interacciones entre carbohidratos.

La aceptación por parte de los consumidores del sabor de un alimento implica, no solo las notas de sabor características, también la percepción de "cuerpo" o "satisfacción", las cuales están relacionadas con una apreciación intensa del sabor. Se ha estudiado ampliamente a los compuestos químicos responsables de esta sensación de "satisfacción", reportándolos como potenciadores de sabor. Los componentes no volátiles o hidrosolubles de los alimentos causan las sensaciones de "satisfacción", y son los componentes considerados como responsables del gusto de los alimentos; estos componentes hidrosolubles incluyen nucleótidos, aminoácidos, péptidos, ácidos orgánicos, azúcares, bases orgánicas como la creatina, creatinina, betainas, etcétera, así como iones inorgánicos. Cada componente tiene al menos uno de los sabores básicos (salado, dulce, amargo y ácido). Sin embargo, la calidad de sabor característica cambia en función de la concentración de cada componente, del pH y de las interacciones entre componentes. Consecuentemente, el sabor de un alimento se determina por una combinación compleja de compuestos hidrosolubles y volátiles en condiciones específicas.

### **UMBRAL DE PERCEPCIÓN DE SABOR**

La presencia de un compuesto en concentraciones mínimas puede afectar su reconocimiento. El umbral de detección de sabor es la concentración a la cual se puede distinguir un compuesto de su control; el umbral de reconocimiento es la concentración a la cual un compuesto se puede identificar correctamente. Para la mayoría de los consumidores, la concentración del umbral de reconocimiento es

mayor que la de detección. Ambos umbrales, detección y reconocimiento, varían para cada uno de los sabores básicos. Para un sujeto promedio, el sabor amargo tiene el umbral mas bajo, seguido por ácido, salado y dulce. El umbral también varía entre individuos, y aún de un día a otro para la misma persona. Los cuatro sabores básicos también tienen temperaturas óptimas de detección: dulce y ácido a 35 a 50 °C; salado a 18 a 35 °C y amargo a 10 °C (Carden y Baird, 2000).

## POTENCIADORES DE SABOR

El término de potenciadores de sabor se aplica a cerca de diez compuestos: ácido glutámico, y ácidos guanílico e inosínico y sus sales. Estos compuestos están presentes en forma natural en varias materias primas en alimentos (Tabla 1). Existe la teoría de que las concentraciones altas de potenciadores de sabor en carnes y pescado son la causa de la amplia aceptación de estos alimentos. Sin embargo, la concentración de nucleótidos es considerablemente mayor en levaduras.

Tradicionalmente, se han empleado dos potenciadores de sabor: la salsa de soya y los extractos de levaduras, ambos obtenidos por hidrólisis enzimática de proteínas vegetales o animales, y conteniendo uno o varios de los compuestos antes mencionados. Estos ingredientes se han empleado por siglos en la preparación de comida del Sureste de Asia, y en el resto del mundo a partir de 1970.

**Tabla 1. Concentraciones de potenciadores de sabor encontrados en forma natural en alimentos (mg/ración)**

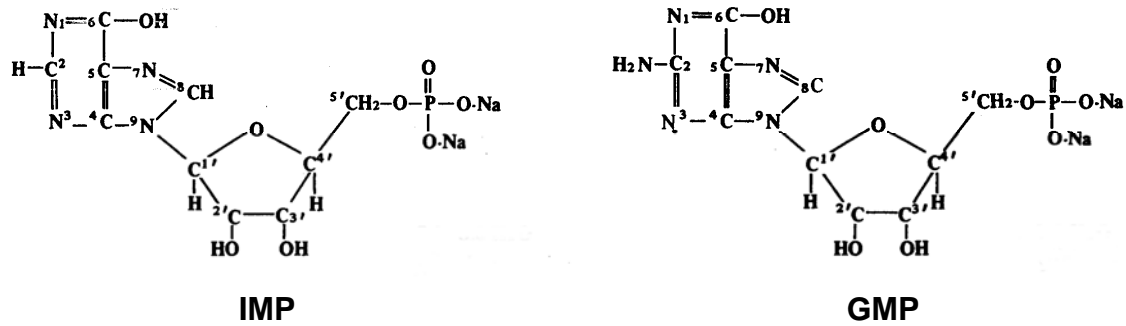
	IMP	GMP	AMP	MSG
espárragos	0	trazas	4	trazas
tomate	0	0	12	5
pepinos	0	0	2	trazas

cebollas	trazas	0	1	4
champiñones	0	216	31	2
setas	0	trazas	19	0
res	163	3.7	7.5	42
puerco	186	3.5	8.6	29
pollo	115	2.2	13.1	56
atún	286	-	5.9	24
macarela	630-1310	-	trazas	7

---

Aunque se han reconocido cuatro sabores básicos (salado, dulce, amargo y ácido) se consideran también otros sabores: astringente y *umami*. La astringencia se relaciona químicamente con la presencia de taninos; es fundamentalmente una reacción muy suave de precipitación de glucoproteínas de la saliva que reduce las características de lubricación de esta. El *umami* es la palabra japonesa que describe algo delicioso o con sabor intenso. Los compuestos químicos responsables del *umami* son bases puricas, 5'-nucleótidos: inosinato disódico (IMP), guanilato disódico (GMP) y adenilato disódico (AMP), así como el glutamato monosódico, sales de inosín monofosfato, guanosín monofosfato y adenosín monofostato, respectivamente Sin embargo, la industria alimentaria utiliza principalmente IMP y GMP (figura 1).

Debido a supuestos o reales problemas relacionados con el consumo de ácido glutámico y su sal, el glutamato monosódico (MSG), que van desde efectos leves como aumento en la sensación de sed hasta muy graves como reacciones alérgicas (Moriselli y Garanthini, 1970, la demanda del MSG ha disminuido; como alternativa, la industria alimentaria emplea a los 5'-nucleótidos.



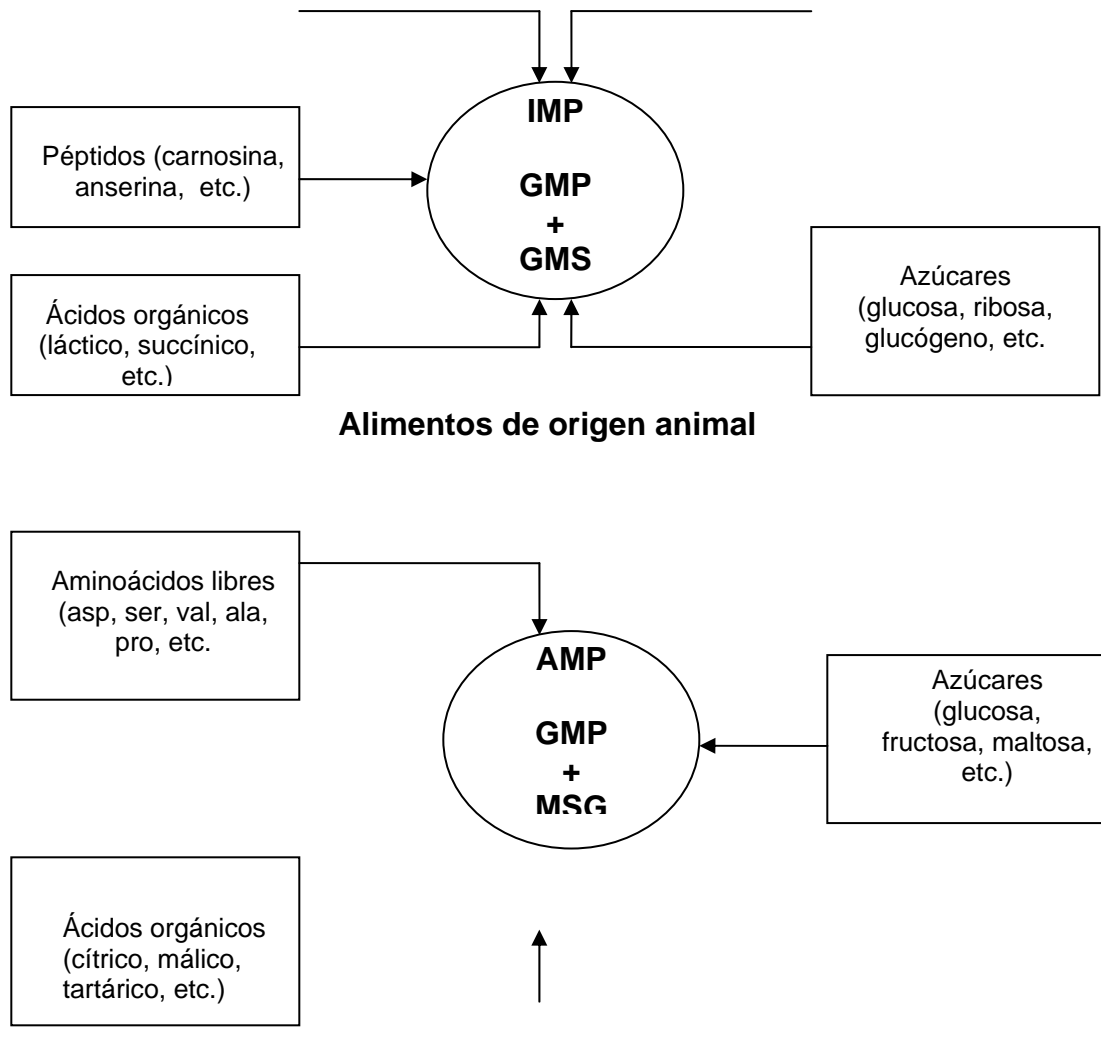
**Figura 2. Estructura de inosín monofosfato y guanosín monofosfato, principales compuestos potenciadores de sabor.**

La figura 2 indica los componentes principales de sabor en alimentos de origen vegetal y animal que se relacionan con los nucleótidos así como el MSG.

Kemp y Beauchamp (1994) sugirieron algunas definiciones que aclaran el papel que juegan en los alimentos potenciando o modificando su sabor. Estos autores consideraron a un potenciador de sabor como un compuesto que aumenta la intensidad percibida del sabor sin intervenir con este; un modulador de sabor en apariencia lo potencia pero en realidad suprime a otros sabores presentes de tal forma que el primero domina. En general, un potenciador de sabor aumenta la sensación de sabor placentera producida por otra sustancia (Pszczola, 2004).

Aminoácidos libres  
(gly, ala, pro, etc)

Bases orgánicas  
(creatina, creatinina,  
betainas, oxido de  
trimetilamina)



**Figura 1. Modelo constitutivo del sabor de alimentos de origen**

La combinación de IMP y GMP tiene efecto sinérgico; la potenciación de sabor de la combinación de ambos es mayor que la suma de cada uno si se añadiera por separado. Si se añade MSG a las mezclas de IMP y GMP, el umbral de percepción de sabor se reduce drásticamente, por lo que se potencian los sabores aún más. Sin embargo, se detectan diferencias en el sabor si se emplea una solución de MSG puro, y se emplea una mezcla de MSG con nucleótidos, aunque la intensidad de sabor se ajusten a la misma detección. Los nucleótidos comercialmente

disponibles, permitidos para su uso en alimentos (generalmente se usan sales de calcio), son IMP, GMP y una mezcla al 50% de ambos.

Se creía que los potenciadores de sabor no tenían sabor o gusto en sí mismos, sino que aumentaban o modificaban el sabor de los alimentos a los cuales se añadían. La diferencia en calidad de sabor entre MSG solo y una mezcla de nucleótidos más MSG, es que las mezclas tienen un sabor a cárnico, además de potenciar el sabor. Por este motivo son más empleados en alimentos como sopas, salsa, productos cárnicos, etcétera (Varavinit y cols., 2000). Más aún, aunque la calidad de sabor de IMP y GMP en presencia de MSG es similar, GMP da más sabor de "cuerpo" que IMP. El MSG tiene sabor por sí mismo, los nucleótidos no. En presencia de MSG los valores de umbral de IMP y GMP son 0.25 y 0.125 g/L, respectivamente.

## **RELACIÓN DE LA ESTRUCTURA CON EL SABOR**

Las teorías de potenciación del sabor han sido varias y controvertidas, los investigadores no están de acuerdo si el *umami* posee o no un sabor característico por sí mismo. Recientemente se reportó que la respuesta oral del MSG y de los nucleótidos es independiente a los sabores básicos, lo que confirma que *umami* es un sabor por sí mismo. Los compuestos involucrados en el *umami* parecen que reaccionan en forma sinérgica con los nucleótidos que se encuentran naturalmente en los alimentos, potenciando el sabor (Sugita, 1986). Se ha sugerido también que los compuestos *umami* contribuyen a la sensación de saciedad bucal. Los potenciadores aumentan la percepción de sabor en los alimentos, pero no incrementan la intensidad de los sabores básicos. De hecho, los moduladores de sabor tales como el MSG reducen los sabores dulce y amargo, y aumentan el salado. Los sabores procedentes de los nucleótidos también pueden suprimir o enmascarar sabores y aromas en alimentos. Uno de las más importantes características de los potenciadores de sabor es su habilidad para "redondear" o "suavizar" el efecto de sabor del alimento, lo que es debido a la activación múltiple de varios receptores del sabor (Kemp y Beauchamp, 1994; Nagodnawithana, 1994). Otra teoría acerca de la causa en que algunos compuestos actúen como

potenciadores de sabor se basa en el hecho de que tienen tres sitios receptores del sabor disponibles para unirse con compuestos del sabor en las papilas gustativas, en lugar de dos sitios como es el caso de los sabores básicos.

Kuninaka (1960) estudió la relación entre la potenciación del sabor y la estructura química de los nucleótidos; concluyó que los ribonucleótidos puricos, que tienen un radical hidroxilo en el carbono 6 del anillo de purina, y un éster fosfato en el carbono 5' de la fracción ribosa, son potenciadores mientras que los fosforilados en las posiciones 2' y 3' de la ribosa no lo son. Consecuentemente, IMP, GMP y XMP (xantilato disódico) son potenciadores. Los desoxiribonucleótidos de la purina que tienen un radical hidroxilo en el carbono 6 del anillo de purina y un fosfato esterificado en la posición 5' de la fracción desoxiribosa también son potenciadores, pero con menor intensidad a los ribonucleótidos (Nakao y Ogata, 1960). El fosfato esterificado en la posición 5' de la fracción ribosa es necesario para reducir el umbral de percepción; además, es necesario que exista una disociación del hidroxilo ya que, si este está esterificado o acidificado, la capacidad potenciadora desaparece (Honjo y cols., 1963). Los derivados sintéticos de nucleótidos tales como 2-metil-IMP, 2-etil-IMP, 2-N-metil-GMP, 2-metil-tio-IMP y 2-etil-tio-IMP potencian en mayor grado en presencia de MSG (Yamasaki y cols., 1968; Yamaguchi y cols., 1968).

## **PRODUCCIÓN DE 5'-NUCLEÓTIDOS A PARTIR DE LEVADURAS**

Aunque los 5'-nucleótidos están presentes en varias materias primas alimentarias tales como proteínas vegetales y animales hidrolizadas, extractos de levaduras, extractos de carne, extractos vegetales, etcétera, industrialmente se producen a partir de levaduras.

Las levaduras, con un alto contenido de ácido nucleico (cerca del 10% RNA en base seca), son una excelente fuente de 5'-nucleótidos al procesar la biomasa por autólisis o hidrólisis parcial. Si estos compuestos se incorporan a la biomasa de la levadura se produce un extracto enriquecido. Se han empleado como materias primas levaduras, primarias o residuales de panadería, cervecería y de la producción de alcohol a partir de caña de azúcar.

La liberación del contenido citoplasmático se lleva a cabo por autólisis o por hidrólisis empleando enzimas exógenas. En el caso de la autólisis, previamente se aplica desintegración sónica; la autólisis se lleva a cabo en presencia de ácido adípico u otro inductor de lisis (HCl o NaOH 1 M) ajustado el a pH 4-7, y elevando la temperatura a cerca de 50°C por 24 horas. Las enzimas se inactivan calentado a 85°C por 10 min. Finalmente el sobrenadante se separa por centrifugación. Debido a que el contenido citoplásmico contiene comúnmente péptidos amargos, estos se eliminan por adsorción empleando carbono activado o algún adsorbente similar, y calentando a cerca de 50°C; finalmente se centrifuga el extracto.

La hidrólisis enzimática generalmente se lleva a cabo por acción de 5'-fosfodiesterasa, la cual actúa sobre la pared celular así como sobre el RNA; se practica también la conversión de 5'-AMP en 5'-IMP por acción de 5'-desaminasa adenilica. La suspensión, rica en nucleótidos, se centrifuga y finalmente se seca. Sin embargo, es práctica corriente promover que la autólisis y la hidrólisis enzimática ocurren en forma serial para aumentar el rendimiento del proceso.

En algunos casos, por ejemplo cuando se utiliza levadura residual de panadería, con el fin de aumentar la cantidad de compuestos citoplásmicos extraídos se emplea una mezcla de enzimas citolíticas (beta-1,3-glucanasa, proteasas, hemicelulasas, pectinasas y amilasas).



Komorowska y cols. (2003) reportan una extracción máxima de 13.28 mg/g (IMG+GMP) a partir de levaduras de panadería, mientras que Lee y cols. (2004) obtuvieron un rendimiento de máximo de 6.2 mg/g biomasa (IMP), 35.5 mg/g biomasa (GMP) y 7.8 mg/g de biomasa (AMP) empleando una mutante de *Pichia anomala*.

Además del origen de las levaduras, las condiciones de proceso afectan profundamente la calidad y rendimiento de los extractos de levadura. Chae y cols. (2001) reportan la extracción de nucleótidos a partir de levaduras residuales de panadería y de cervecería empleando una combinación de enzimas (endo y exoproteasas, 5'-fosfodietearasa y AMP-desaminasa), observando que la dosis de exoproteasa disminuye notablemente el rendimiento y las características sensoriales del extracto; los autores obtuvieron un rendimiento óptimo de 3.67% de 5'-nucleótidos empleando una combinación de las enzimas mencionadas.

## **COMERCIALIZACIÓN DE POTENCIADORES DE SABOR**

La producción de potenciadores de sabor a partir de hidrólisis de levaduras es un mercado muy amplio para la industria alimentaria. La tabla 2 enlista algunas compañías que comercializan este tipo de producto.

Nippon Paper Chemicals<sup>MR</sup> (Japón) comercializa un extracto de levadura (SK Yeast Extract Series<sup>MR</sup>) fabricado a través de procesos de fermentación e hidrólisis de *Candida utilis* en sustrato de melazas; este producto tiene un alto contenido de 5'-IMP y 5'-GMP, menos olor residual que los producidos a partir de levadura de cervecería. Las concentraciones de extracto de levadura recomendadas por esta empresa para su adición en alimentos son 0.1 a 0.5% en productos cárnicos y pescado; 0.1 a 5% en sopas y salsas; 0.1 a 0.5% en encurtidos; 0.1 a 1% en productos lácteos y congelados; 0.1 a 5% en snacks y sasonadores

([http://www.npchem.co.jp/e/product/yeast\\_extract/food.html](http://www.npchem.co.jp/e/product/yeast_extract/food.html)),). La levadura de panadería es comercializada por empresas como Levapan S.A.<sup>MR</sup> ([www.levapan.com](http://www.levapan.com)) en productos imitación de sabor a pollo y res, para su adición a entradas, salsas, sasonadores, sopas, snacks y otros.

La producción de extractos de levaduras a través de hidrólisis enzimática plantea algunos problemas; si hay presentes amilasas termoestables en el extracto final, pueden alterarse las propiedades físicas de alimentos como sopas o salsas ya que las amilasas degradan el almidón haciendo al alimento menos viscoso. Novozymes<sup>MR</sup> comercializa la enzima Alcalase<sup>MR</sup> para ser usada en la hidrólisis de levaduras. El productor indica que esta enzima no contiene actividad de amilasa, evitado problemas de reducción de viscosidad en pastas o sopas ([www.novozymes.com](http://www.novozymes.com)).

Empleando la propiedad de IMP y MGP en presencia de GMS de impartir notas a cárnicos en los productos a los que se añade, varias empresas comercializan potenciadores que también imparten sabores cárnicos (Provesta<sup>MR</sup>). Los extractos de levadura también producen notas a queso, como es el caso de un producto comercializado por Edlong Flavors<sup>MR</sup>; Gaalrd-Schlesinger Industries<sup>MR</sup> produce extractos a partir de *Torula*, en una variedad de sabores (Pszczola, 2002). Provesta<sup>MR</sup> ofrece extractos con sabores a pollos, res y jamón, entre otros.

**Tabla 2. Algunas compañías productoras y comercializadoras de potenciadores de sabor**

---

Accurate Ingredients, E.U.A.	Lallemmand Advanced Baking Solutions, Canadá
Ajinomoto, Japón	Lea & Perrins, E.U.A.
Alltech, E.U.A.	Levapan, S.A., Colombia
Anhui Koyo, Japón	Macco Organiques Inc., Canadá
Arnhem Group, E.U.A.	Mitusbishi, Japón
Astaris, E.U.A.	Nippon Paper Chemicals, Japón
Basic Food Flavors, E.U.A.	Ningxia Huinong Lihe, China
Bell Flavor & Fragrances, E.U.A.	Novozymes, e.u.a.
Carmi Flavors & Fragrances, E.U.A.	Oxford Chemicals, Gran Bretaña
Comax Flavors, E.U.A.	Provesta, E.U.A.
DNP International, E.U.A.	RC Treatt, Gran Bretaña
DSM Food Specialties, E.U.A.	Savoury Systems, E.U.A.
Eastman Chemical, E.U.A.	Sensory Effects, E.U.A.
Edlong Flavors, e.u.a.	Shenzen SED, China
Fushun Dufengxuan Food Ingredients, China	Sigma-Aldrich Flavors & Fragrances, E.U.A.
Gaard-Sclesinger Industries, E.U.A.	Star Lake Biosciences, China
H&A Canada Industria, Canadá	Superior Quality Foods, Canadá
Helm AG, Alemania	Van Hees & Gewurzmuhlen, Alemania
Kikoman, Japón	

---

Los potenciadores de sabor tienen cada vez más demanda en la industria alimentaria. La utilización de levaduras primarias y residuales para la obtención de estos compuestos se plantea como un proceso redituable y factible.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Carden , L.A. y Baird, C.S. 2000. Flavors. En: Food Chemistry: Principles and applications. G.L. Christen y J.S. Smith (compiladores). Science Technology Systems, West Sacramento, California.

Chae, H.J., Joo, H., In, M.J. 2001. Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1: Effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. *Bioresource Technology* 76(3):253-258.

Conn, H. 1992. *Umami*: the fifth basic taste. *Nutrition and Food Science* 2 21-23.

Dillon, M. 1993. Invasion of the MSG-free ingredients. *Food Engineering* 65(4):133-134.

Hall, R.L. 1968. Food flavors: Benefits and problems. *Food Technology* 22 (1):54.

Honjo, M., Imai, K., Furusawa, S., Moriyama, H., Imada, T., Yasumatusu, K. 1963. Proceedings of the Annual Congress of the Agricultural Chemical Society of Japan, p. 40.

Kemp, S., Beauchamp, G.K. 1994. Flavor modification by sodium chloride and monosodium glutamate. *Journal of Food Science* 59:682-686.

Komorowska, A., Sieliwanowicz, B., Mrówka, E., Stecka, K., Hałasińska, A. 2003. Studies on yeast extracts enriched in 5'-nucleotides flavour enhancers obtained from spent brewery yeast. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* 6(1) <http://www.ejpau.media.pl/series/volume6/issue1/biotechnology/art-03.html>

accesado 13 de Julio de 2005.

Kuninaka, A. 1960. *Nippon Nogeikagaku* 34:489 (traducción al inglés).

Lee, J-S., Hyun, K-W, Jeong, S-C, Kim, J-H., Choi, Y.J., Miguez, C.B. 2004. Production of ribonucleotides by autolysis of *Pichia anomala* mutant and some physiological activities. *Canadian Journal of Microbiology* 50(7):489-492.

Mermelstein, N.H. 1981. Continuous fermentor produces natural flavor enhancers for foods and pet foods. *Food Technology* 43(7):50-53.

Moriselli P., Garanthini S. 1970. Monosodium glutamate and Chinese restaurant syndrome, *Nature (London)* 227: 611-612.

Nagodawithana, T. 1992. Flavor enhancers: Their probable mode of action. *Food Technology* 48:49-85.

Nakao, Y., Ogata, K. 1960. Abstracts of the Second Kanto Branch Congress of the Agriculture Chemical Society of Japan, p. 9 (traducción al ingles).

Provesta Co. 1993. Yeast ingredients helps maintain chili flavor and texture. *Prepared Foods* 162(6):61-63.

Pszczola, D.E. 2002. Exploring novel flavor and health. *Food Technology* 56(5)34-90.

Pszczola, D.E. 2004. Flavor enhancement: taking the mask off. *Food Technology* 58(8)56-69.

Raiten, D., Talbot, J., Fischer K. 1995. Monosodium glutamate. *Food Technology* 49(10):28.

Sugita, Y. 1986. recent developments in umami reasearch. En: *Developments in Food Flavors*. Birch, G.G. y Lindley, M.G. (editors). Elsevier Applied Science, Nueva York.

Varavinit, S., Shobsngob, S., Bhidyachajorawat, M., Suphantharika, M. 2000. Production of meat-like flavour. *Science Asia* 26:219-224.

<http://buyerguide.ift.org/cms/> accesado 2 Agosto 2005

Yamasaki, A., Kumashiro, I., Takenichi. 1968. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 16:338.

Yamaguchi, S., Yoshikawa, T., Okeda, S., Ninomiya, T. 1968. *Agricultural and Biological Chemistry* 32:797.

[www.novozymes.com](http://www.novozymes.com), accesado 27 junio de 2005

[www.levapan.com](http://www.levapan.com), accesado 27 junio de 2005

[http://www.npchem.co.jp/e/product/yeast\\_extract/food.html](http://www.npchem.co.jp/e/product/yeast_extract/food.html), accesado el 25 de Mayo de 2005.

## LEVADURA COMO COMPLEMENTO ALIMENTARIO PARA HUMANOS

Jorge Soriano-Santos y Isabel Guerrero-Legarreta

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

La levadura como complemento alimentario, se ajusta al concepto de alimento funcional ya que es capaz de producir efectos metabólicos y fisiológicos comprobados, como disminuir la glucemia, profilaxis de cáncer de próstata, etc. Además de sus funciones nutricionales básicas, a los compuestos químicos que contiene, se les puede considerar como nutraceuticos, como son los diferentes complejos de cromo o selenio, etc. (Roberfroid, 1999).

La levadura (*Saccharomyces sp.*) se puede utilizar tanto para la alimentación humana como animal. De todas las levaduras, el género *Saccharomyces* es la de mayor valor industrial, debido a su alto valor de lisina. El uso más extendido esta en la panificación y en las industrias de fabricación de cerveza, vinos y alcohol. La levadura inactivada por temperatura se usa como fuente de nutrimentos en alimentación animal y humana, tanto en forma de levadura íntegra o de sus derivados. La levadura de cerveza consiste de células inviables deshidratadas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Este alimento se utiliza como complemento alimentario y es una fuente rica en fibra dietética, vitaminas del complejo B, contiene además los ocho aminoácidos esenciales (aminoácidos que no se sintetizan en el organismo humano), considerados para un adulto sano y los aminoácidos arginina e histidina que adicionalmente requieren los niños. También es buena fuente de minerales esenciales, especialmente el cromo y selenio (Dziezak, 1987a,b; Halász and Lásztity, 1991; Peixoto, 1996). Comercialmente se presenta en polvo que es la forma más potente del complemento, en hojuelas o tabletas. Esta levadura junto con la levadura torula (*Candida sp.*) se utilizan como sinónimos de la "levadura nutritiva" que es un término que se aplica a la levadura que se cultiva especialmente para ser utilizada como suplemento alimenticio. Esta última se seca a temperaturas mayores que la levadura para panificación, por lo

que queda inactiva. La levadura para panificación se utiliza para la fermentación de la masa que se convertirá en pan y si se consume como suplemento alimenticio, puede disponer de las vitaminas del complejo B del huésped para su mantenimiento, producir productos de fermentación y por lo tanto causar flatulencia. La levadura nutritiva a diferencia de la levadura viable que se utiliza en las industrias de panificación y cervecera, no fermenta puesto que es inviable y no causa infecciones con otro tipo de levaduras como la que se produce por *Candida albicans*. La levadura que más uso ha tenido a lo largo del tiempo es la que se obtiene como residuo de la fermentación alcohólica en la elaboración de la cerveza y se ha considerado como un producto principal en la industria de alimentos saludables desde su inicio, por su fácil digestibilidad y por su alto contenido de nutrimentos. Sin embargo, también se ha comentado que puede ser causa de problemas como fatiga crónica, desordenes mentales, inmunodeficiencia, anormalidades endócrinas, síndrome del intestina irritable, alergias, cáncer, entre otros efectos de los que no existe evidencia científica contundente (Reed and Nagodawithana, 1991). El uso de la levadura y sus derivados en la industria alimentaria es amplia, ya que se utiliza como ingrediente en formulaciones de alimentos como saborizante, complemento nutritivo, etc. (Dziezak, 1987a,b; Camerón *et al.*, 1988; Halász and Lásztity, 1991; Belem and Lee, 1998).

Entre los factores que limitan su uso para consumo humano se pueden considerar: la presencia de una pared gruesa y rígida que resiste la acción de las enzimas digestivas (Zinder, 1970; Gálvez *et al.*, 1990) y un alto contenido de ácidos nucleicos. Una ingesta alta de ácidos nucleicos lleva a la acumulación de ácido úrico, que puede cristalizarse en tejidos y órganos, causando la formación de cálculos en riñones y depósito de calcio en tejido muscular (Lyutskanov *et al.*, 1990). La levadura de cerveza se caracteriza por su marcado sabor amargo y se recupera al final del proceso de elaboración de la cerveza, por lo que también tiene un sabor que recuerda este proceso especialmente a lúpulo. De esta manera se prefiere utilizar un extracto de levadura que se consigue al realizar una lisis a las



células para eliminar sabores, pared celular, concentrándose los nutrimentos de la levadura y aumentando la digestibilidad y valor nutritivo.

La levadura torula (*Candida sp.*) es otro tipo de levadura que se desarrolla en cultivos puros que contienen azúcares y minerales obtenidos de la madera. Al finalizar la fermentación, la levadura se separa, se lava cuidadosamente para eliminar residuos y así se utiliza como sustituto de carne en los productos de imitación o como un sucedáneo. Se utiliza también en la elaboración de coberturas de postres y empanadas por su contenido de proteína del 50 %, su alto contenido de lisina y bajo costo, razón por la cual se está incrementando su uso en la industria alimentaria.

## **EFFECTOS DE LOS NUTRACEUTICOS DE LA LEVADURA SOBRE LA SALUD PROTEINAS**

El valor nutritivo de la proteína de levadura de la célula íntegra y rotas mecánicamente, así como de concentrados proteínicos de *Saccharomyces sp.* se han publicado por diversos autores (Rumsey et al., 1991; Caballero-Córdoba et al., 1997; Pacheco et al., 1997). En un estudio realizado recientemente por Dias et al. (2000), se evaluó el valor proteínico de biomasa (células íntegras), de un autolisado total y de un extracto de levadura (*Saccharomyces sp.*) en comparación a la caseína comercial que se usó como control del experimento. Para ello se utilizaron ratas machos Wistar recién destetados y se evaluaron la relación de eficiencia proteica (PER), la retención neta de proteínas (NPR), la digestibilidad verdadera (DV), el valor biológico (BV) y la utilización neta de proteínas (NPU). En todos los casos se utilizó un nivel de proteína del 10 % proveniente de las diferentes fuentes de *Saccharomyces sp.* En la Tabla 1 se muestran los resultados de este experimento. Se observa que los valores de PER y NPR de levadura íntegra, autolisado total y el extracto de levadura no difieren entre sí estadísticamente ( $p \leq 0.05$ ) y fueron inferiores a los valores de la caseína que se utilizó como control. En cuanto a la digestibilidad verdadera de la proteína, esta fue significativamente mayor e idéntica para la caseína y el extracto de levadura,

pero fueron inferiores en el caso de levadura íntegra y autolisado total ( $p \leq 0.05$ ). El valor biológico no fue diferente estadísticamente ( $p \leq 0.05$ ) para caseína, células íntegras y autolisado de levadura y fueron superiores al valor encontrado para el extracto. En cuanto al valor de NPU las tres fuentes proteínicas de levadura no difirieron entre sí ( $p \leq 0.05$ ), pero fueron inferiores al valor obtenido para la caseína.

En la Tabla 2 se muestran los perfiles de aminoácidos esenciales de las tres diferentes fuentes de levadura (Dias *et al.*, 2000). Las células íntegras y el extracto de levadura presentaron un exceso de aminoácidos esenciales, cuando se le compara al patrón de aminoácidos esenciales de la FAO/WHO (1989). Solo en el caso del autolisado total de *Saccharomyces sp.*, se tuvo una cuenta química de 84% respecto a metionina+cisterna, esto quiere decir que solo en este caso hay una deficiencia del 14% de aminoácidos azufrados respecto al patrón FAO/WHO (1989).

**Tabla 1. Valores de PER, NPR, DV, BV y NPU en ratas alimentadas con tres diferentes fuentes de proteína (10%) de levadura durante 28 días. Caseína (control), levadura íntegra (LI), autolisado total (AT) y extracto de levadura (EL).**

<b>Dieta</b>	<b>PER</b>	<b>NPR</b>	<b>DV</b>	<b>BV</b>	<b>NPU</b>
Caseína	3.95 <sup>a</sup>	4.43a	95.89a	90.44a	<i>86.73a</i>
LI	3.17b	3.65b	83.03b	86.26a	<i>71.65b</i>
AT	3.14b	3.80b	86.49b	87.65a	<i>75.91b</i>
<i>EL</i>	<i>3.10b</i>	<i>3.63b</i>	<i>95.38<sup>a</sup></i>	<i>79.26b</i>	<i>75.58b</i>

<sup>(a,b)</sup> Letras diferentes indican diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos.

En los trabajos de Calloway (1974) y de Smith y Palmer (1976) también se informa que *Saccharomyces cerevisiae* y *Torula* tuvieron deficiencias en los

aminoácidos azufrados. El VB entre el 60-90 %, NPU de 47 % y digestibilidad de 79%. Otro autores como Caballero-Córdoba et al. (1997), Pacheco et al. (1997) y Caballero-Córdoba & Sgarbieri (2000) han informado valores similares para PER, NPR, DV, BV y NPU similares a los presentados en la Tabla 1. Lo anterior se debe a que estos autores han utilizado las mismas técnicas de preparación de las diferentes fuentes de proteína de levadura.

La composición de aminoácidos esenciales de la proteína de levadura no presentan por lo general ninguna deficiencia cuando se le compara con el patrón FAO/WHO, excepto para el autolisado total de levadura que tiene un score químico del 84 % respecto a aminoácidos azufrados. Los valores de PER y NPR que evalúan la calidad proteínica a través de la capacidad de mantener el crecimiento a ratas recién destetadas, es menor a la calidad proteínica de la caseína que se usa como control, a pesar de que el contenido de aminoácidos esenciales es superior al patrón FAO/WHO. La presencia de la pared celular en levadura íntegra y en autolisado de levadura, disminuye significativamente la digestibilidad de la proteína, aunque esto no afecta en el valor de la utilización neta de proteínas. El valor nutritivo de la proteína de levadura representa del 80 al 85 % el valor de la caseína, por lo que la levadura contiene proteína de buena calidad nutritiva, que se recomienda como parte de la dieta humana. Lyutskanov *et al.* (1990) evaluó la calidad nutritiva y la toxicidad de un extracto de levadura de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* 211, con un contenido de proteína del 60-70 %; ácidos nucleicos 2% y carbohidratos 5.7%. El contenido de aminoácidos esenciales, la realización de pruebas de toxicidad en *Tetrahymena pyriformis* y evaluaciones biológicas en animales, mostraron que el extracto de esta levadura es una fuente adecuada de proteína unicelular para consumo humano.

**Tabla 2. Composición de aminoácidos de la proteína de las tres diferentes fuentes de levadura: levadura íntegra (LI), autolisado total (AT) y extracto de levadura (EL). FAO/WHO patrón de referencia de aminoácidos esenciales.**

Aminoácidos	FAO/WHO	LI	AT	EL
<b>mg/100 mg proteína</b>				
Treonina	3.4	6.16	5.84	<i>5.19</i>
Metionina+Cisteina	2.5	2.84	2.11	<i>3.56</i>
Valina	3.5	6.20	5.87	<i>6.76</i>
Leucina	6.6	8.84	7.80	<i>8.07</i>
Isoleucina	2.8	5.64	4.87	<i>5.69</i>
Fenilalanina+Tirosina	6.3	9.98	8.53	<i>6.91</i>
Lisina	5.8	7.13	9.54	<i>8.58</i>
Histidina	1.9	2.06	3.15	<i>3.01</i>
<i>Triptófano</i>	<i>1.1</i>	<i>1.45</i>	<i>1.55</i>	<i>1.31</i>

La levadura se ha utilizado para incrementar la calidad proteínica de las tortillas (De Arriola *et al.*, 1989) por suplementación con un concentrado proteínico obtenido de la crema (*Saccharomyces cerevisiae*) de una destilería de alcohol. Las células una vez rotas fueron separadas de la pared celular concentrándose la proteína a un 55 % su valor inicial, con un bajo nivel de ácidos nucleicos (reducción del 91 % ). Las tortillas suplementadas con el 18% de levadura, conservaron sus propiedades sensoriales características e incrementó en un 60 % el contenido de proteína (comparado al contenido original de la tortilla) y un mayor contenido del aminoácido esencial lisina. Por el bajo contenido de ácidos nucleicos que es un factor limitante en el uso de la levadura en alimentos como las tortillas y no representan un peligro para el consumo humano.

## VITAMINAS

Las levaduras contienen una importante cantidad de vitaminas hidrosolubles del complejo B (Reed and Nagodawithana, 1991), fuente indispensable para el hombre, pues muchas veces deben ser incorporadas para lograr el desarrollo normal de las funciones celulares durante el crecimiento y la reproducción. Un cultivo de levadura enriquecida con hierro incrementa considerablemente el contenido de vitamina B<sub>2</sub> (Varga and Maraz, 2002). El complejo B incluye a las vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, niacina y ácido fólico, biotina y pantotenato. Sus funciones

son las de participar en reacciones enzimáticas como coenzimas (B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, niacina, biotina, ácido fólico y pantotenato), en la síntesis de ácidos nucleicos (biotina y ácido fólico) y como activadores de funciones de la respiración celular (B<sub>2</sub> y niacina). El consumo de 20 g de levadura cubre buena parte del requerimiento de vitaminas del complejo B de la dieta humana. El contenido de levadura en vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y niacina, supera en magnitud al de alimentos tan importantes como leche, queso y carnes. Cabe destacar que las levaduras no aportan normalmente suficiente cantidad de vitaminas A, C, D, E y K, por lo que se deberá consumir una dieta mixta para obtenerlas.

## **CROMO**

El cromo es un nutrimento esencial para humanos y animales (Mertz, 1993). El principal papel fisiológico del cromo es incrementar la acción de la insulina o la sensibilidad en tejidos periféricos (Mowat, 1997; Anderson, 1998). La suplementación con cromo dietario aumenta el consumo celular de glucosa (Mooradian and Morley, 1987) y disminuye la resistencia a la insulina en ratas alimentadas con dietas altas en grasas y bajo contenido de cromo (33 µg Cr/kg). Davis y Vincent (1997) recientemente propusieron que el cromo incrementa la tolerancia a la glucosa a través de un oligopéptido dependiente de cromo que activa la actividad del receptor de insulina, tirosina kinasa. Esto conduce a la traslocación del transportador 4 de la glucosa de un compartimento vesicular intracelular a la membrana plasmática, estimulando el consumo de glucosa en el músculo esquelético y el tejido adiposo (Czech and Corvera, 1999). La levadura de cerveza se ha estudiado ampliamente como una fuente del factor de tolerancia a la glucosa (GTF) que es un extracto de levadura rica en cromo (Intersociety, 1998). La levadura conocida como con alto contenido de cromo se sabe que mejora la tolerancia a la glucosa y mejora la sensibilidad a la insulina (Offenbacher and Pi-Sunyer, 1980). Cuando se alimentan ratas oralmente con GTF se mejora la tolerancia a la glucosa cuando se induce por una dieta libre de cromo (Mertz, 1975). GTF también estimula la utilización de glucosa por células *in vitro*. El

componente activo del GTF nunca ha sido identificado pero se estima que puede estar involucrado un complejo de ácido nicotínico-glutati6n-cromo (III) (Mirsky et al., 1980), un derivado de quinolina (Hwang *et al.*, 1991) y fosfatidilinositol glucano (Muller et la., 1997). Edens *et al.* (2002) publicaron un trabajo en donde analizaron la composici6n de un extracto de levadura que fue un complejo de substancia orgánicas e inorgánicas. Encontraron una fracci6n menos hidrof6bica que fue relativamente inactiva en el metabolismo de la glucosa y lip6lisis. Y otras dos fracciones más hidrof6bicas que fueron más potentes para ambos metabolismos, sugiriendo que moléculas no polares son responsables de los efectos insulina-mimético e insulina-potenciador de la levadura. Recientemente otros investigadores han encontrado otros compuestos biológicamente activos en la levadura. La adenosina se ha propuesto como un componente activo en extractos de levadura (Urumow and Wieland, 1984). Un derivado de la quinolina y fosfatidilinositol glucano (Muller *et al.*, 1997) se han identificado como componentes insulina-miméticos en el extracto de levadura.

Aunque no existen evidencias contundentes de que la reducci6n de azúcar refinada reduce el acné hay quienes han recomendado los suplementos de levadura con alto contenido de cromo para el tratamiento de esta enfermedad. Lo anterior tiene su antecedente cuando dos grupos de investigadores en la década de 1930 en Nueva York y en Inglaterra, notaron que cuando inyectaban insulina a sus pacientes mejoraban su acné. Aunque estos tratamientos reportaron su efectividad, estos estudios no tuvieron grupos de comparaci6n y los pacientes corrían el riesgo de caer en un shock, por la baja de glucosa en la sangre. Debido a que la levadura contiene alta concentraci6n de cromo (que se sabe juega un papel esencial en el metabolismo de azúcar en tejidos) se ha recomendado en el tratamiento del acné. Sin embargo, no hay a la fecha estudios que prueben que los suplementos de cromo son efectivos en el tratamiento de esta enfermedad (Mccarty, 1984).

## **SELENIO**

La selenometionina (Semet) es el principal compuesto de selenio en levadura y este compuesto se metaboliza en todos los organismos animales. Estudios epidemiológicos han mostrado una relación inversa entre el consumo de selenio y la incidencia de cierto tipo de cáncer ya que se encuentra menos selenio en sangre de pacientes con esta enfermedad. La "levadura helenizada" se ha utilizado en la prevención del cáncer por la acción del selenio (Larsen *et al.*, 2004). Se han obtenido especies de selenio de bajo peso molecular por hidrólisis proteolítica y posterior cromatografía líquida de intercambio iónico, con lo que se obtiene la selenometionina (constituye del 54-60 % del contenido de selenio) y otros tres compuestos de selenio no identificados. Este selenio (200 µg/día) se ha administrado a sujetos para contrarrestar cáncer. La Semet que se encuentra en levadura se ha reconocido como el compuesto más activo en la reducción de tumores de cánceres de mama y de colon (Whanger, 2004). Sin embargo el mecanismo responsable del papel protector del selenio contra el desarrollo de los tumores, especialmente cáncer de próstata, no se conoce con exactitud y existe la hipótesis de que el selenio solo reduce el estrés oxidativo (El-Bayoumi *et al.*, 2002). Los límites de selenio que se han establecido sin que se registren efectos tóxicos son un consumo de 400 µg/día y un contenido en plasma de 100 ng/ml (Reid *et al.*, 2004).

Las levaduras también tienen la capacidad de ligar magnesio (Blazejak and Duszklewicz-Reinhard, 2004) y se ha sugerido utilizarla para suplementar dietas deficientes en este mineral. Los compuestos orgánicos ligados al magnesio reciben el nombre de " bioplejos" que son asimilados por el humano y otros animales, lo que representa una muy buena alternativa a la suplementación farmacológica cuando exista deficiencias de magnesio.

## **ERGOSTEROL**

El ergosterol (esterol de 28 carbonos) es el principal esteroles que se encuentra en extractos de levadura de cerveza y de panificación y se ha mostrado en estudios *in vitro*, que es útil en la prevención del desarrollo de células de cáncer de mama,

cuando se encuentra presente el estradiol-17 beta. El receptor de estrógeno de células (+) MCF-7 parece ser más sensible al ergosterol que el receptor de estrógeno de células (-) MDA-231 y los productos de la oxidación del ergosterol parecen tener mayor efecto que él mismo (Subblah and Abplanalp, 2003).

## **PROBIÓTICO**

Se han realizado estudios en varias cepas de levadura aisladas de una bebida búlgara de cereal fermentado y evaluado su potencial como probiótico (previene el desarrollo de patógenos en el intestino y tiene efectos benéficos sobre la salud del huésped) ya que resisten bajos valores de pH (2.0-3.0), altas concentraciones de sales biliares (0.2-2.0 %), resistencia a antibióticos, permaneciendo viables bajo estas condiciones (Gotcheva *et al.*, 2002). *Saccharomyces boulardii* también se ha reconocido como una levadura que actúa como probiótico y como productor de poliaminas (Costalos *et al.*, 2003), esto último ayuda a la maduración intestinal.

La diarrea es un efecto colateral de una terapia antimicrobiana y afecta aproximadamente el 5 % de pacientes con este tratamiento. Debido a la perturbación del metabolismo de los carbohidratos y sales biliares se daña la flora intestinal, causando diarrea osmótica. Esto permite el desarrollo de patógenos como *Clostridium difficile* (Sargent and Wickens, 2004). Una estrategia para el tratamiento de la infección con *Clostridium difficile* es el uso de probióticos como *Saccharomyces boulardii* una cepa tropical de levadura. En una prueba doble ciego se encontró que administrando cápsulas de levadura liofilizada viable, paralelamente al tratamiento con antibióticos, redujo el riesgo de la infección con *Clostridium difficile*. Al parecer el daño de la infección se debe a dos exotoxinas: toxina A y B. La toxina A causa inflamación, secreciones y daño a la mucosa intestinal y es el mediador del daño intestinal en animales con colitis. El tratamiento con *S. boulardii* reduce las toxinas A y B por hidrólisis tanto de la toxina como del receptor (Castagliuolo *et al.*, 2004). *S. boulardii*, también tiene efectos inmunológicos y contiene poliaminas como la espermina y espermidina que están involucradas en la división celular y en la síntesis de DNA y proteínas



(Golledge and Riley, 1996; Bleichner *et al.*, 1997; Bassetti *et al.*, 1998). En algunos países es difícil obtener preparaciones de *S. boulardii* y la infección se trata con tabletas de levadura de cerveza. Estas tabletas contienen *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces carlsbergensis* (McFarland, 1996). Es importante administrar células viables de *S. boulardii* que sobreviven al jugo gástrico y colonicen el intestino. Las tabletas de levadura de cerveza son inviables y en este último caso podría no tenerse el efecto probiótico. Sin embargo existe la necesidad de demostrar si los pacientes reciben un probiótico o simplemente una fuente de vitaminas del complejo B.

El potencial como probiótico también se ha evaluado en otras levaduras, resultando *Kluyveromyces lactis* la más apta para ser utilizada como tal (Kumura *et al.*, 2004). También se ha reportado que una fracción soluble de un hidrolizado enzimático de *Saccharomyces cerevisiae* obtenida del residuo de una destilería posee actividad probiótica (López *et al.*, 2002).

## **TOXICIDAD**

Al inicio se debe consumir de 15 a 30 g de levadura de cerveza al día, debido a que puede causar gas en algunos individuos y posteriormente, el consumo se puede aumentar gradualmente si se observan efectos benéficos, de otra manera es probable que se tenga una infección crónica con *Candida* y entonces se deberá evitar el uso de la levadura como complemento alimenticio. No se han reportado efectos colaterales por la ingesta de levadura, sin embargo, existen algunas personas que desarrollan alergia a este alimento, sobre todo si se está en un periodo de administración de fármacos para el tratamiento de enfermedades, cuyo caso deberá discutirse con un médico (McFarland, 1996; Smith, 1996).

Una ingesta alta de ácidos nucleicos lleva a la acumulación de ácido úrico, que puede cristalizarse en tejidos y órganos, causando la formación de cálculos en riñones y depósito de calcio en tejido muscular (Lyutskanov *et al.*, 1990). Cuando

se ha alimentado a ratas Wistar con dietas que contenían 10 % de proteína de *Saccharomyces sp.* se observó que la concentración del ácido úrico en sangre de las ratas al final del experimento, se elevó de 1.74 mg/dl a 2.1-2.4 mg/dl. Sin embargo, los valores normales del ácido en sangre para ratas, esta en un rango de 1.2 a 7.5 mg/dl, lo cual indicó que la levadura no representa una elevación significativa de ácido úrico y no representó un problema de toxicidad para las ratas. Por otra parte, una dieta con autolisado total de *Saccharomyces sp.* provocó una disminución significativa de triglicéridos en sangre de las ratas utilizadas (Dias *et al.*, 2000).

## BIBLIOGRAFIA

Anderson, RA (1998) Chromium, glucose intolerance and diabetes *J Am Coll Nutr* **17**:548-555.

Bassetti, S; Frei, R; Zimmerli, W (1998) Fungemia with *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with *Saccharomyces boulardii* *Am J Med* **105**: 71-72.

Belem, MAF; Lee, BH (1998) Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative *Crit Rev Food Sci Nutr* **7**:565-598.

Blazenjak, S; Duszkiewicz-Reinhard, W (2004) Yeast cell as a potential source of magnesium bioplexes. A review *Polish J Food Nutr Sci* **13**: 223-232.

Bleichner, G; Blehaut, H ; Mentec, H ; Moyse, D (1997) *Saccharomyces boulardii* prevents diarrhea in critically ill tube-fed patients. A multicenter, randomized, double-blind placebo-controlled trial *Intensive Care Med* **23**:517-523.

Caballero-Córdoba, GM; Pacheco, MTB; Sgarbieri, VC (1997) Composição química de biomassa de levadura integral (*Saccharomyces* sp.) e determinação do valor nutritivo da proteína, em células íntegras ou rompidas mecânicamente *Ciencia y Tecnología de Alimentos* **17**: 102-106.

Caballero-Córdoba, GM; Sgarbieri, VC (2000) Nutritional and toxicological evaluation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) biomass and a yeast protein concentrate *J Sci Food Agr* **80**:341-351.

Calloway, DH (1974) The place of single cell protein (SCP) in man's diet In: (Davis, P ed) *Single Cell protein*, New York, Academic Press, p 129.

Cameron, DR; Cooper, DG; Neufeld, RDJ (1988) The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier *Appl Environ Microbiol* **6**:1420-1425.

Castagliuolo, I; LaMont, JT; Nikulasson, ST; Pothoulakis, C (1996) *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum *Infection Immunity* **64**:5225-5232.

Costalos, C; Skouteri, V; Gounaris, A; Sevastiadou, S; Triandafilidou, A; Ekonomidou, C; Kontaxaki, F; Petrochilou, V (2003) Enteral feeding of premature infants with *Saccharomyces boulardii* *Early Human Develop* **74**:89-96.

Czech, MP; Corvera, S (1999) Signaling mechanisms that regulate glucose transport *J Biol Chem* 274:1865-1868.

Davis, CM; Vincent, JB (1997) Chromium oligopeptide activates insulin receptor tyrosine kinase activity *Biochemistry* 36:4382-4385.

De Arriola, MC; De Zepeda, M; Rolz, C (1989) A protein concentrate from distillery yeast, and its application to supplement corn tortillas *Arch Latinoam Nutr* 39:565-575.

Dias, ES; Sgarbieri, VC; Alvim, ID (2000) Determination of protein value of integral cells, total autolisate and yeast extract (*Sacharomyces sp.*) *Rev Nutr Campinas* 13:185-192.

Dziezak, J. (1987a). Yeasts and yeast derivatives: Definitions, characteristics, and processing. *Food Technol*, 41: 104-121.

Dziezak, J (1987b) Yeast and yeast derivatives: applications *Food Technol* 41:122-125

Gálvez, A; Ramírez, MJ; García-Garibay, M (1990) Chemical composition of a mixture of single cell protein obtained from *Kluyveromyces fragilis* and whey proteins *Arch Latinoam Nutr* 2:252-262.

Edens, NK; Reaves, LA; Bergana, MS; Reyzer, IL; O'Mara, P; Baxter, JH; Snowden, MK (2002) Yeast extract stimulates glucose metabolism and inhibits lipolysis in rat adipocytes in vitro *Amer Soc Nutr Sci* 1141-1148.

El-Bayoumy, K; Richie, JP; Boyiri, T; Komninou, D; Prokopczyk, B; Trushin, N; Kleinman, W; Cox, J; Pirrman, B; Colosimo, S (2002) Influence of selenium-enriched yeast supplementation on biomarkers of oxidative damage and hormone status in healthy adult males: A clinical pilot study *Cancer Epidemiol Biomarkers and Prevention* 11:1459-1465.

Food and Agriculture Organization. Protein quality evaluation. Rome, (1989) 27p. (Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation, *Food and Nutrition Paper* n. 51.

Golledge, CL; Riley, TV; (1996) "Natural" therapy for infectious diseases *Med J Aust* 164:94-95.

Gotcheva, V., Hristozova, E., Hristozova, T., Guo, M., Roshkova, A. and Agelov, A. (2002). Assessment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast strains. *Food Biotech*, 16: 211-225.

Hwang, D., Lev-Ran, A., and Barseghlan, K. (1991). U.S. Patent 4,985,493. Anheuser-Busch Companies, St. Louis MO.

Intersociety Professional Nutrition Education Consortium (1998). Bringing physician nutrition specialists into the mainstream: rationale for the Intersociety Professional Nutrition Education Consortium. *Am J Clin. Nutr* 68: 894-898.

Kumura, H., Tanoue, Y., Tsukahara, M., Tanaka, T. and Shimazaki, K. (2004). Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *J Dairy Sci*, 12: 4050-4056.

Larsen, E. H., Hansen, M., Helge, P., Moesgaard, S., Reid, M. and Rayman, M. (2004). Speciation and bioavailability of selenium in yeast-based intervention agents used in cancer chemoprevention studies. *J AOAC Int*, 87: 225-232.

López, A., García, Y., Boucourt, R., Elias, A., Dihigo, L. E. and Nuñez, O. (2002). Probiotic activity of the soluble fraction of the *Saccharomyces cerevisiae* hydrolyzed enzymatic product from distillery residues. *Cuban J Agr Sci*, 36: 353-357.

Lyutskanov, N., Koleva, L., Stateva, L., Venkov, P. and Hadjiolov, A. (1990). A protein extracts for nutritional purposes from fragile strains of *Saccharomyces cerevisiae*: reduction of nuclei acid content and applicability of the protein extracts. *J Basic Microbiol*, 7: 523-528.

McCarty, M. (1984). Chromium yeast for acne? *Med Hypoth* 14: 307-310.

McFarland, L. V. (1996). *Saccharomyces boulardii* is not *Saccharomyces cerevisiae* (Letter). *Clinical Infectious Diseases*, 22: 200-201.

Mertz, W. (1975). Effects an metabolism of glucose tolerance factor. *Nutr Rev*, 33: 129-135.

Mertz, W. (1993). Chromium in human nutrition: a review. *J Nutr*, 123: 626-633.

Mowat, D. N. (1997). Organic chromium in animal nutrition. Chromium Books, Guelph, ON, Canada.

Mirsky, N., Weiss, A. and Dori, Z. (1980). Chromium in biological systems, I. Some observations on glucose tolerance factor in yeast. *J Inorg Biochem*, 13: 11-21.

Mooradian, A. D. and Morley, J. E. (1987). Micronutrient status in diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*, 45: 877-895.

Muller, G., Wled, S., Crecelius, A., Kessler, A. and Eckel, J. (1997). Phosphoinositolglycan-peptides from yeast potently induce metabolic insulin actions in isolated rat adipocytes, cardiomyocytes, and diaphragms. *Endocrinology*, 138: 3459-3475.

Offenbacher, E. G and Pi-Sunyer, F. X. (1980). Beneficial effect of chromium-rich yeast on glucose tolerance and blood lipids in elderly subjects. *Diabetes* 29: 919-925.

Pacheco, M. T. B., Caballero-Córdoba, G. M. and Sgarbieri, V. C. (1997). Composition and nutritive value of yeast biomass and yeast protein concentrate. *J Nutr Sci Vitaminology*, 43: 601-612.

Peixoto, N. (1996). Processamentos de produtos de biomassa de levedura para alimentação humana; potencial, mercado interno e externo. In; Workshop Sobre Productos de Biomassa de Levadura: Utilizacao Em Alimentação Humana E Animal. Campinas. Anais. Campinas: ITAL, 90-98.

Reed, G. and Nagodawithana, T. W. (1991). Yeast technology. 2ed., New York: Van Nostrand Reinhold, 378.

Reid, M. E., Stratton, M. S., Lillico, A. J., Fakih, M., Natarajan, R. and Clark, L. C. (2004). A report of high-dose selenium supplementation: response and toxicities. *J Trace Elements in Medicine and Biology* 18: 69-74.

Roberfroid, M. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe. *Brit J Nutrition*, 81: S1-S27.

Rumsey, G. L., Hughes, S. G., Smith, R. R., Kinsella, J. E. and Shetty, K. J. (1991). Digestibility and energy values of intact, disrupted and extracts from brewer's dried yeast fed to rainbow trout. *Animal Feed Sci Technol*, 33: 185-193.

Sergeant, G. and Wickens, H. (2004). Brewer's yeast in *C difficile* infection: probiotic or B group vitamins? *The Pharmaceutical Journal*, 273: 230-231.

Smith, D. L. (1996). Brewer's yeast as a cause of infection (Letter). *Clinical Infectious Diseases*, 22: 201.

Smith, R. H. and Palmer, R. A. (1976). A chemical and nutritional evaluation of yeasts and bacteria as dietary protein sources for rats and pigs. *J Sci Food Agr*, 27: 763-768.

Snyder, H. E. (1970). Microbial sources of protein. *Advances in Food Research*, 18: 85-91.

Subblah, M.T. R. and Abplanalp, W. (2003). Ergosterol (major sterol of baker's and brewer's yeast extracts) inhibits the growth of human breast cancer cells *in vitro* and the potential role of its oxidation products. *Int J Vitamin and Nutr Research*, 73: 19-23.

Urumow, T. and Wieland, O. H. (1984). On the nature of the glucose tolerance factor from yeast. *Horm. Metab. Res.* 16: 51-54.

Varga, E. and Maraz, A. (2002). Yeast cells as sources of essential microelements and vitamins B1 and B2. *Acta Alimentaria*, 31: 393-405.

Wanger, P. D. (2004). Selenium and its relationship to cancer: An update. *Brit J Nutrition*, 91: 11-28.

## **CAP 8. PROTEINAS Y AMINOACIDOS DE LEVADURA**

Jorge R. Wagner

Departamento de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes

Miguel A. Otero-Rambla

Dirección de Biotecnología, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)

### **LA BIOMASA DE LEVADURA COMO MATERIA PRIMA EN LA INDUSTRIA**

En adición a la explotación tradicional de la biomasa de levadura en la industria alimenticia como suplemento nutricional o saborizante, esta materia prima es a la vez una magnífica fuente para la producción de otros muchos compuestos de importancia industrial, como son las proteínas, ácidos nucleicos, enzimas, polisacáridos, crioprotectores. Esta posibilidad ha comenzado a llamar la atención de numerosos grupos de investigación en el mundo acerca de las potencialidades de las levaduras en la industria alimenticia y biotecnológica moderna.

En general se sabe que las levaduras contienen alrededor de 50% de proteína bruta (determinado por Kjeldahl como nitrógeno total x 6,25) que pueden ser aisladas por diferentes métodos bien alcalinos o ácidos y posteriormente ser precipitadas para obtener concentrados o aislados de proteínas. Su valor nutricional es alto, y si se eliminan los ácidos nucleicos y los lípidos, la proteína resultante es de una excelente calidad.

Varios preparados proteicos a partir de esta biomasa han sido empleados como suplementos nutricionales o saborizantes. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es la fuente tradicional de invertasa, que se utiliza en la producción de bebidas, en la industria repostería y en la agricultura así como para fines investigativos y tecnológicos. Los ácidos nucleicos son también un producto importante. La producción industrial de ácidos nucleicos está basada en la extracción salina o básica a partir de levaduras, por ser este modo el que posee una relación ARN/ADN más elevada y por tanto reduce los costos de purificación. El ARN aislado puede ser transformado en nucleótidos saborizantes (5'-mononucleótidos). Estos compuestos se preparan por hidrólisis



enzimática con 5'-fosfodiesterasas (Benaiges et al 1990). Incidentalmente, las raicillas de la cebada germinada son ricas en esta enzima y han sido utilizadas con estos propósitos. Puede obtenerse la enzima de otras fuentes microbianas como son el hongo *Penicillium citrinum* y la bacteria *Streptomyces aureus*.

Los polisacáridos son igualmente componentes básicos de las paredes celulares a los que imprimen rigidez y fortaleza. El glucano insoluble de *Saccharomyces cerevisiae* ha sido probado frente una serie de estados patológicos mostrando un significativo efecto inmunomodulador, por otra parte, puede ser utilizado como fibra dietética o espesante en formulaciones de alimentos (Otero et al 1994).

Los lípidos en levaduras son una mezcla de triacilglicéridos, fosfolípidos y esteroides. No se encuentran en ellos los ácidos grasos de cadena larga con número impar de átomos de carbono presentes en la biomasa de muchas bacterias y la levadura crecida sobre n-alcenos. El Grupo Asesor de Proteínas de la Universidad de las Naciones Unidas, ha llamado la atención en sus líneas guías acerca de la utilización de la biomasa microbiana, del carácter no metabólico de estos ácidos grasos y su acumulación en el organismo. En esta fracción se encuentran también cantidades importantes de ergosterol, precursor del ergocalciferol (vitamina D<sub>2</sub>).

## **USO DE LEVADURA PARA ENRIQUECIMIENTO NUTRICIONAL**

La levadura se caracteriza por un elevado contenido de proteínas de una excelente calidad que contienen cantidades importantes de todos los aminoácidos excepto los sulfurados metionina y cisteína. En adición, el incorporar levaduras en la dieta genera un aporte adicional de otros nutrientes ya que son una buena fuente de vitaminas hidrosolubles principalmente del complejo B y de minerales de importancia metabólica como calcio, magnesio, manganeso etc, por lo que pueden ser incorporadas a los sistemas de alimentos para su fortalecimiento nutricional. El complejo B incluye a las vitaminas B1, B2 y B6, niacina y ácido fólico, biotina y ácido pantoténico. Sus funciones son las de participar en reacciones enzimáticas como co-enzimas (B1, B6, niacina, biotina, ácido fólico y pantotenato); en la síntesis de ácidos nucleicos (biotina y ácido fólico) y como activadores de funciones de la respiración celular (B2 y niacina). El

consumo de 20 gr. diarios de levadura cubre buena parte del requerimiento de vitaminas del complejo B de la dieta humana. El contenido de la levadura en vitaminas B1, B2 y niacina, supera en magnitud al de alimentos tan importantes como leche, queso y carnes. Cabe destacar que las levaduras no aportan normalmente suficiente cantidad de vitaminas C, A, E, D y K. Pero, al ser ingeridas junto a otra variedad importante de alimentos (dieta mixta) cubriría en exceso todas las necesidades del organismo.

Los contenidos de cenizas en las levaduras oscilan entre 7 y 9 % lo que asegura un suministro importante de los minerales mencionados e indica el valor nutricional de este alimento. Predominan en la levadura de cerveza los fosfatos y el potasio, que cubren una importante parte de los requerimientos en el hombre, 34 % y 21 % respectivamente con la ingesta de 20 g de levadura por día. El contenido en elementos bioquímicamente importantes como azufre, magnesio y calcio es relativamente alto. Estudios recientes han demostrado que la suplementación con levadura seca, cubre total o parcialmente las deficiencias de hierro, cobre, zinc, cromo, selenio y molibdeno que a veces presentan ciertas dietas. En USA y Europa se producen levaduras con alto contenido en estos últimos minerales -con propiedades antioxidantes- y oligoelementos que son incorporadas a los alimentos para mejorar de ese modo la deficiencia que ocurre con la utilización de ciertos tipos de dietas.

Por su bajo contenido en sodio, el extracto de levadura de cerveza, puede ser utilizado en hipertensos.

Los comprimidos de levadura de cerveza han sido consumidos tradicionalmente para el tratamiento de algunas enfermedades cutáneas como el acné, trastornos gastrointestinales y carencia vitamínica.

El contenido en lípidos de las levaduras puede variar entre 4% y 7 % sobre base seca según las condiciones de propagación impuestas y las especies o cepas utilizadas. La especie *Saccharomyces cerevisiae* empleada en la producción de levadura alimenticia contiene una cantidad considerable de ácidos grasos insaturados. El contenido en ácidos oleico y linoleico es importante desde el punto de vista nutricional (hoy se considera a estos compuestos, al igual que los aceites de pescado de mar ricos en los mismos, como

muy importantes para el buen estado de las arterias). La levadura contiene además esteroides de distintos tipos moleculares y compuestos como la lecitina.

La cantidad total de hidratos de carbono está en el orden del 30 % a 35 % del peso seco. Son principalmente carbohidratos de reserva tales como glicógeno y trehalosa; el material estructural de la pared celular son polímeros de glucosa y manosa (glucanos y mananos) muy poco asimilables por el hombre.

Las levaduras son utilizadas además como agentes espesantes de alimentos porque poseen mananos, los cuales no alteran sus propiedades por el calor y mejoran la viscosidad de ciertas preparaciones como salsas, comidas para niños, pastas, etc. Pueden además ser utilizadas como agentes ligantes en productos que contienen almidón para mejorar su comportamiento al ser sometidos a altas temperaturas (secados) o a altas presiones (extrusión). Otra utilidad industrial sería su empleo como ligante de agua y grasas en productos cárnicos triturados. Además la inclusión de levaduras en ciertos tipos de alimentos contribuye a disminuir la actividad del agua y mejorar su preservación.

La levadura de cerveza es rica en fibra dietética siendo su valor de alrededor del 18 % del peso seco. La fibra dietética de levadura está mayoritariamente constituida por polisacáridos de la pared de alto peso molecular como los  $\beta(1,3)$  y  $\beta(1,6)$  glucanos que son comprobados potenciadores del sistema inmunológico.

La levadura de cerveza se ajusta al concepto de alimento funcional (*functional food*), término acuñado recientemente en Japón, de los cuales los nutracéuticos son una categoría especial.

Contiene adicionalmente sustancias que promueven la buena salud y que contribuyen a evitar enfermedades crónicas relacionadas con una mala nutrición. El interés de la levadura como alimento funcional se centra, además del ya mencionado aporte de proteínas de alta calidad y de complejo vitamínico B, en el contenido de minerales que cumplen funciones metabólicas como antioxidantes naturales y en la acción protectora de los  $\beta$  glucanos.

La levadura de cerveza seca se produce por lavado y deshidratación de las células recuperadas de la etapa de fermentación cuando se ha considerado que no es ya

posible reciclarlas al proceso. El perfil de aminoácidos de la levadura de cerveza se ofrece en la Tabla 1.

## **USO DE LAS LEVADURAS ENTERAS COMO FUENTE DE PROTEÍNAS EN LA ALIMENTACIÓN HUMANA**

Durante los últimos 36 años un considerable interés fue mostrado en la producción de proteínas alimenticias de microorganismos: levaduras, hongos, bacterias y algas. El nombre genérico adoptado para tales proteínas fue Single Cell Protein o SCP (proteínas de organismos unicelulares). El interés en la producción de proteínas de levadura para consumo humano se desarrolló en los principios de la década del 1960 cuando se hizo evidente a través de estudios estadísticos y medidas efectivas que había un desbalance creciente entre alimento y población en el mundo. La denominada “crisis proteica” se hizo más evidente en los países menos desarrollados en los que el desarrollo demográfico fue excesivo y la necesidad de alimentos no pudo ser cubierta, sumando a esto la crisis económica y el avance de la globalización. La perspectiva de producción de proteínas de fuentes microbianas tuvo un interés considerable como un complemento a los métodos tradicionales de producción de alimentos. Las proteínas de origen microbiano, adecuadamente suplementadas, se pueden comparar con las provenientes de fuentes tradicionales tales como huevo o leche en términos de sus perfiles globales de nutrientes (Lipinski y Litchfield, 1974). Las biomásas microbianas en general, son particularmente ricas en vitaminas del complejo B y en proteínas que contienen aminoácidos esenciales en buen balance. De modo que constituyen una potencial fuente de enriquecimiento y fortificación de dietas deficientes.

**Tabla 1 Perfil aminioacídico de la levadura de cerveza y su comparación con el patrón FAO**

Aminoácido	Levadura de cerveza CALSA	Patrones FAO	
		1973	1985
Fenilalanina + Tirosina (aromáticos)	7.0	6.0	6.3
Histidina	1.8	0	1.9
Isoleucina	4.0	4.0	2.8

Leucina	6.0	7.0	6.6
Lisina	6.6	5.5	5.8
Metionina + Cisteína (Azufrados)	<u>2.1</u>	3.5	2.5
Treonina	4.4	4.0	3.4
Triptofano	4.4	1.0	1.1
Valina	4.8	5.0	3.5
Indice químico			
Respecto FAO 73	60		
Respecto FAO 85	84		

El término SCP fue adoptado como nombre genérico para describir las proteínas, sean éstas crudas o refinadas, de levaduras, hongos, bacterias y algas. El desarrollo inicial en esta área fue presentado en publicaciones derivadas de reuniones científicas en el Massachusetts Institute of Technology (MIT) en 1967 y 1973 sobre las perspectivas de uso directo de microorganismos como fuente de alimentos (Guzmán-Juárez, 1982).

En términos de composición, contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos y minerales, los análisis de diferentes levaduras para uso alimentario revelan algunas diferencias, resultando los rangos siguientes: 40-50 % de proteínas, 3-7 % de lípidos, 26-40 % de carbohidratos y 5-10 % de cenizas. El contenido en proteínas es determinado a partir del contenido de nitrógeno total (% N x factor 6.25) el cual incluye no sólo nitrógeno proveniente de las proteínas y aminoácidos libres sino de otros compuestos no proteicos (N no proteico) de los cuales los mas importante son los ácidos nucleicos (N de bases purínicas y pirimidínicas). Debe señalarse que el nitrógeno en altos grados de oxidación como nitratos y nitritos, no son tenidos en cuenta por cuanto la técnica Kjeldahl no es capaz de determinarlos. En la Tabla 2 se muestra la composición informada en los rótulos de algunas levaduras en polvo comercializadas en Argentina.

Las proteínas de las levaduras poseen un buen balance aminoacídico lo que les atribuye un alto valor nutricional, el cual es reflejado como altos valores de Índice Químico (también denominado Score Químico, relación porcentual entre el contenido del aminoácido esencial limitante en la proteína de levadura respecto al contenido del mismo aminoácido en la proteína patrón FAO 1973 o 1985).

La Tabla 2 muestra la composición (g/100 g) de levaduras primarias desarrolladas en distintos medios.

La mayoría de las levaduras tienen en sus proteínas un elevado nivel de aminoácidos esenciales en la dieta humana, como el triptófano y la lisina, pero presentan como limitante al grupo de aminoácidos azufrados, cisteína y metionina, lo cual requiere de una adecuada complementación con proteínas de otras fuentes o de su suplementación.

**Tabla 2 Composición informada de levaduras comerciales en Argentina**

<b>Componente (% base seca)</b>	<b>Levadura de Cerveza Marca VIRGEN. Empresa elaboradora: CALSA</b>	<b>Levadura Natural Marca TITAN (Origen Francia). Fraccionado por ATIME SA</b>	<b>Levadura de cerveza Marca Hoisin Empresa elaboradora: Hoisin SRL</b>
Proteínas	38	50	44.5
Carbohidratos	40	36	41.43
Lípidos	1.5	no informan	2.4

La Tabla 3 muestra el contenido aminoacídico de la biomasa de levadura de diferentes géneros y especies

Para el empleo de las levaduras enteras como aporte proteico en la dieta, no basta que estas tengan un alto contenido de proteínas con aceptable balance aminoacídico. La adecuación de SCP de levaduras para el consumo masivo y para satisfacer, como producto proteico, las necesidades nutricionales y funcionales con perspectiva comercial en la formulación de alimentos de buena aceptación, se deben encarar además las siguientes mejoras:

Incremento de la digestibilidad proteica

- Disminución del contenido de ácidos nucleicos (ARN)
- Aislamiento de las proteínas
- Mejora de las propiedades funcionales

**Tabla 3 Contenido de aminoácidos de diferentes especies de levaduras industriales**

Amino ácido	<i>C.utilis</i> (a)	<i>K. fragilis</i> (b)	<i>S. cerevisiae</i> (c)	<i>S. ovarum</i> (* )	Patrones FAO (d)	
					1973	1985
Ala	3.4	n.d.	n.d.	6.0	---	---
Arg	5.4	4.9	5.5	4.3	---	---
Asp	4.7	n.d.	n.d.	8.4	---	---
Fen + Tir	7.6	3.9	<u>4.5</u>	6.3	6.0	6.3
Gli	4.8	n.d.	n.d.	4.1	---	---
Glu	15.0	n.d.	n.d.	11.3	---	---
His	1.9	2.5.	4.0	2.2	0	1.9
Ileu	5.3	5.5	5.5	3.9	4.0	2.8
Leu	7.0	4.9	7.9	6.3	7.0	6.6
Lis	6.7	8.8	8.2	6.5	5.5	5.8
Met + Cis	<u>1.9</u>	<u>1.5</u>	2.5	<u>1.4</u>	3.5	2.5
Pro	3.5	n.d.	n.d.	3.9	---	---
Ser	5.5	n.d.	n.d.	4.3	---	---
Treo	5.5	5.5	4.8	4.1	4.0	3.4
Trip	1.2	1.5	1.2	1.4	1.0	1.1
Val	6.3	6.6	5.5	5.1	5.0	3.5
Índice Químico						
FAO 73	54	43	75	40		
FAO 85	76	60	71	56		

(a) Cultivada en licores sulfúricos, (b) Cultivada en suero de leche, (c) Cultivada en melazas. (a, b, c) ref. Lipinski y Litchfield, 1970) Patrones de aminoácidos esenciales. El aminoácido esencial limitante de cada proteína está subrayado. n.d. No determinado

## **INCREMENTO DE LA DISPONIBILIDAD PROTEICA POR RUPTURA CELULAR**

La estructura de las células de levadura, se puede describir formada por una parte externa, pared celular, periplasma y membrana plasmática y una interna, que contiene el citoplasma, enzimas, ribosomas, núcleo y demás organelas, siendo esta parte la que contiene la mayoría de las proteínas celulares. La pared de las levaduras es altamente resistente a esfuerzos físicos y la acción de enzimas digestivas. Los principales componentes de la pared celular de levadura son complejos poliméricos gluco-mananos-proteína-quitina (ver esquema de Fig 1).

Las enzimas del tracto digestivo humano son incapaces de digerir los polisacáridos de pared lo que contribuye a la disminución de la digestibilidad de las proteínas de la levadura. Del mismo modo, la funcionalidad de las células enteras de levadura está restringida a la superficie de la pared y de la membrana celular. La forma más eficiente de incrementar la digestibilidad proteica de las proteínas de levadura es la ruptura celular.

La desintegración celular a escala de laboratorio es una operación común en la actualidad y se conocen numerosos métodos para realizarla. Sin embargo, a escala piloto o comercial es una operación costosa y complicada en su mantenimiento. Los métodos disponibles de desintegración celular pueden dividirse en dos grandes grupos: mecánicos y no mecánicos. La Fig 2 muestra esta división.

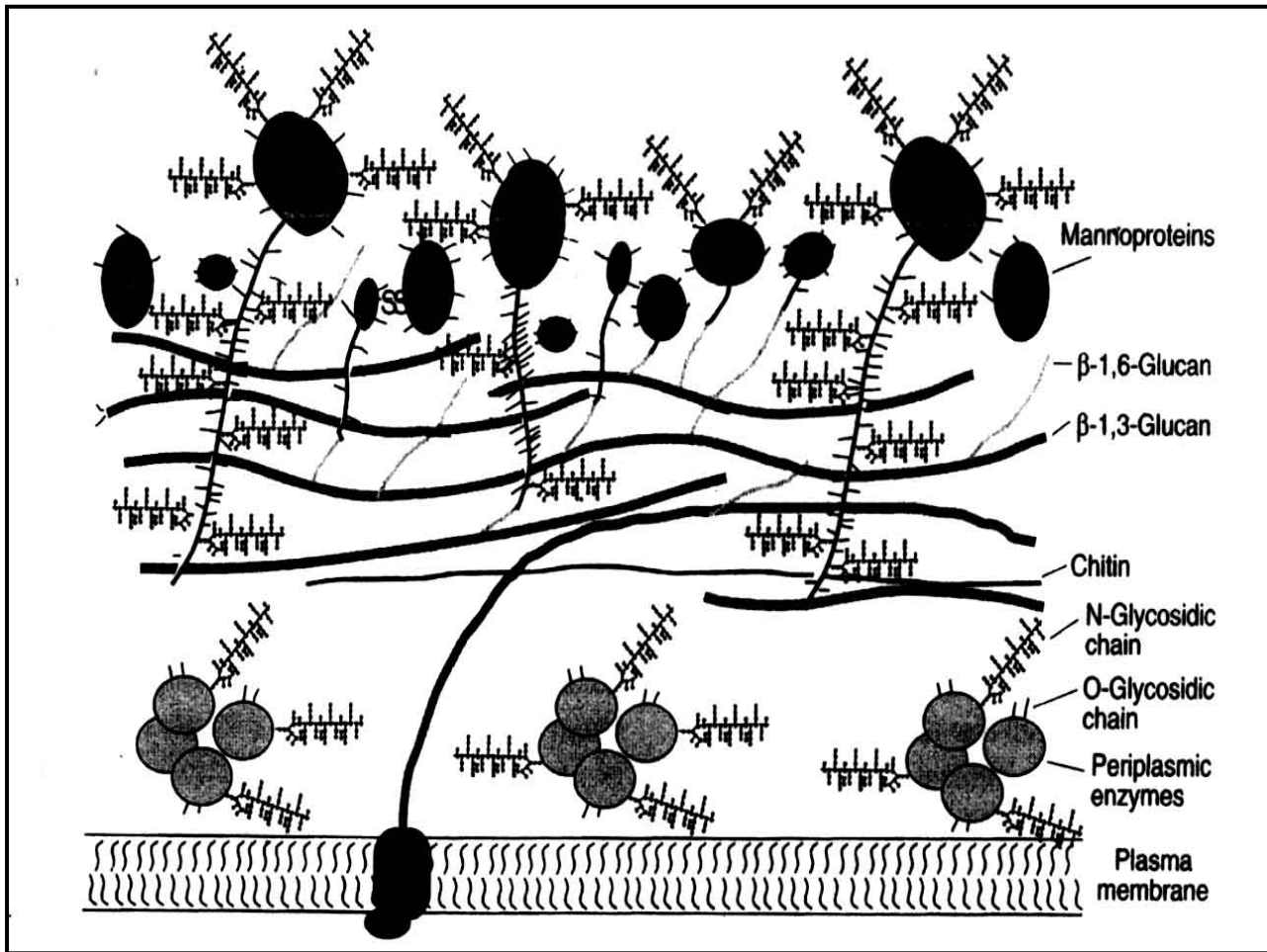
### ***Métodos no mecánicos***

Los métodos no mecánicos de desintegración celular son la lisis y el secado. Cuando se extrae agua de dentro de la célula, las membranas y en menor grado las paredes celulares resultan dañadas lo que propicia la liberación de algunas cantidades de componentes celulares. El método más simple y antiguo es el secado a temperatura ambiente por 2-3 días a partir de texturas pastosas. Métodos más elaborados parten del empleo de secadores tipo tambor, atomización, lecho fluidizado etc. La obtención de polvos de acetona es un método muy empleado a nivel de laboratorio y consiste en sumergir las células en acetona a -20 °C seguida de filtración. Posee como gran ventaja,



que la actividad de muchas enzimas se conserva casi intacta y se pueden almacenar para ser recuperadas posteriormente.

**Fig 1 Estructura de la pared celular de levadura (Schreuder et al 1996)**

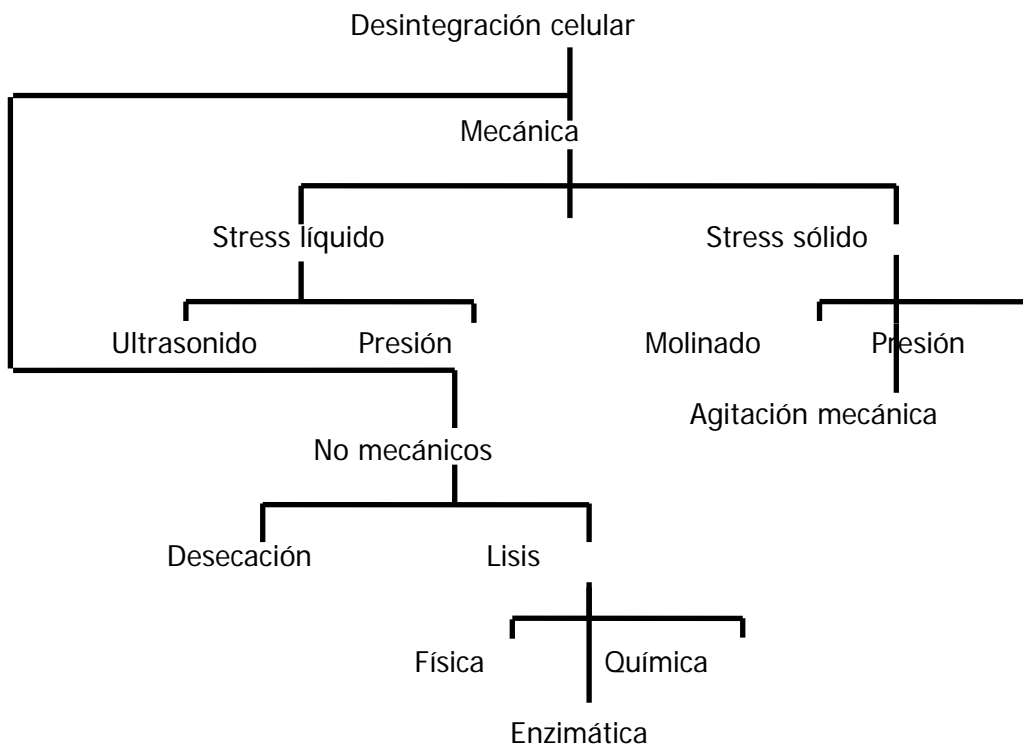


La lisis celular puede ser inducida por medios físicos, químicos y enzimáticos. Los métodos físicos incluyen los ciclos alternados de congelación-descongelación, el choque osmótico que consiste en sumergir las células en una solución de alta presión osmótica como NaCl, urea, sacarosa etc. La ruptura puede ser inducida también por la descompresión brusca de las células previamente comprimidas. Este último método es útil en bacterias pero no en levaduras.

La lisis química más utilizada es la que emplea tolueno, el que altera la composición de las membranas y aumenta la permeabilidad de la misma. Se aplicó durante mucho

tiempo en la producción de autolizados de levadura pero su condición de compuesto no natural ha hecho que caiga en desuso. Las sustancias tensoactivas como los detergentes, la glicina etc., son altamente eficientes para estos propósitos. La glicina por ejemplo, libera el 80 % de la proteína de *Escherichia coli*.

**Figura 2 Diferentes métodos de desintegración de células de levadura**



La lisis enzimática está relacionada con la degradación de ciertos enlaces en la pared celular de los microorganismos. La lisozima ha sido empleada con frecuencia para la desintegración de la pared celular de bacterias, en la obtención de protoplastos. Su uso a nivel industrial es prohibitivo a causa de los precios de la enzima. La activación de endo- $\beta$ -(1, 3)-glucanasas ofrece un camino económico y eficiente para romper la pared celular. Sin embargo, el control de su actividad sigue siendo el factor crucial. El uso de jugo gástrico de caracol ha sido usado con éxito en la degradación de pared celular pero por razones económicas las enzimas microbianas extracelulares ofrecen la mejor alternativa. Los métodos que se basa en la autodigestión de la pared celular presentan

por otro lado el problema de generar pérdidas de rendimiento por degradación simultánea de proteínas, si estas se piensan aislar con posterioridad.

### ***Métodos mecánicos***

Estos métodos presentan una aplicación mucho más amplia que los anteriores. En los últimos años se han desarrollado métodos y equipos de desintegración, aunque solo unos pocos han encontrado su espacio en la industria.

La desintegración ultrasónica se lleva a cabo en un equipo consistente en un oscilador de ultrasonido y un amplificador de señal. Su eficiencia depende del microorganismo, el tiempo y la intensidad de la señal. No se emplean a gran escala solo en el trabajo de laboratorio.

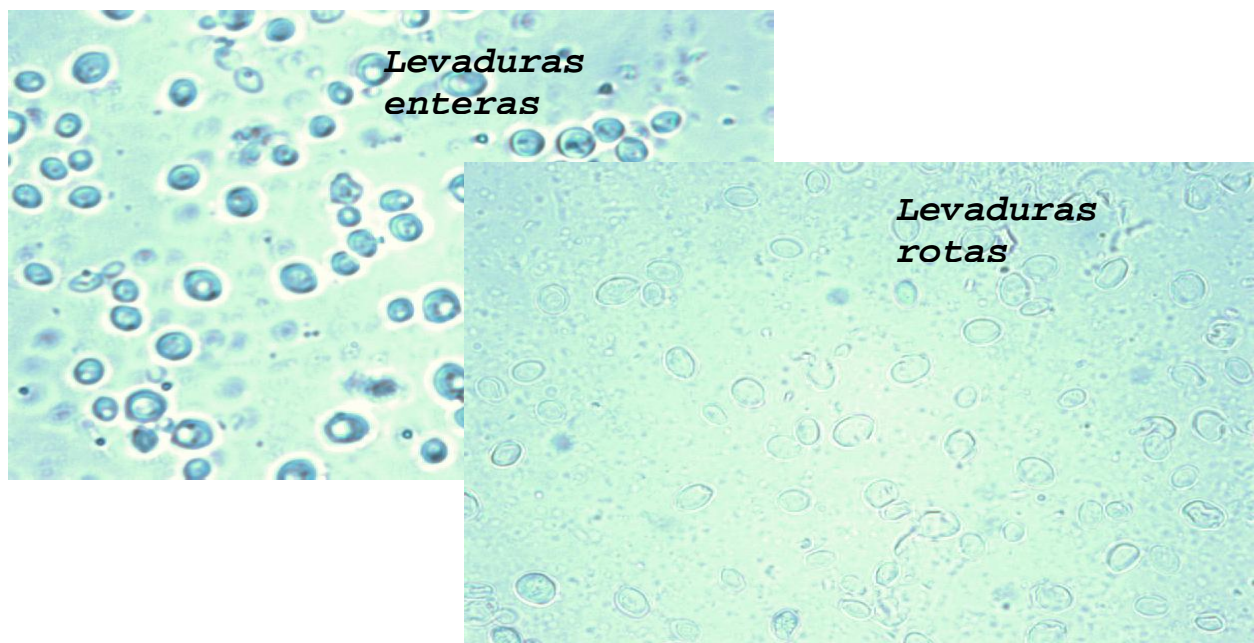
Los métodos más empleados a mayor escala son los molinos de bolas y los homogenizadores de alta presión. Los primeros se comercializan con capacidades de hasta 200 L/h mientras que los últimos son una derivación de los homogenizadores utilizados en las industrias láctea y de pinturas, con capacidades de hasta 53 m<sup>3</sup>/h, a presiones máximas de 45 MPa. Para propósitos de desintegración de células microbianas, es preciso modificar el asiento de la válvula de descarga, lo que hace el fabricante, para intensificar el efecto de presión/descompresión que es uno de los principales involucrados en la ruptura celular. El equipo consiste en una bomba de alta presión de desplazamiento positivo. La suspensión se introduce en el instrumento a través de una válvula de una sola dirección y se hace pasar a alta presión por una válvula de descarga ajustable manualmente con orificio de salida restringido. Para rupturas en el entorno de 90 % se requieren entre dos y tres pases por el equipo y presiones del orden de 48-50 MPa. Como es evidente es una operación cara y alta consumidora de energía. Se ha determinado experimentalmente que por cada 100 MPa se necesita un gasto de 3,5 Kw. Otro inconveniente es el calentamiento de la suspensión a causa de la compresión adiabática la que se encuentra en el entorno de 2 °C por cada 10 MPa, por lo que es preciso refrigerar la suspensión si se pretende recuperar un compuesto termolábil por esta vía. En caso de que el compuesto a obtener

no se vea afectado por la temperatura, el proceso se facilita pues la eficiencia de ruptura aumenta en función de la temperatura.

La autólisis controlada de las células, no es un proceso de desintegración como tal pero es útil en el tratamiento de éstas para la obtención de numerosos compuestos de interés.

En la Fig 3 se puede observar microfotografías ópticas de células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* antes y después de una desintegración empleando un dispositivo Dynamill.

**Fig 3 Microfotografía de células de levadura *S. cerevisiae* desintegradas mecánicamente**



### **REDUCCIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

La toxicidad asociada a dietas con altas ingestas de SCP de levadura es atribuida esencialmente al alto contenido de ácidos nucleicos (ARN y ADN) presente en las células de levadura enteras y otros productos SCP derivados de ellas. Estudios realizados entre otros por Edozien et al (1970) demostraron que ingestas de SCP mayores a 15 g/día (equivalente a 2 g de ácidos nucleicos aproximadamente) puede conducir a altos niveles

de ácido úrico plasmático que superan lo aceptable para un buen estado de salud (4 a 7 mg ácido úrico/100 ml plasma).

Se ha demostrado sin lugar a dudas, en trabajos que hoy en día son clásicos en la materia, que niveles de consumo de ácidos nucleicos suplementarios a niveles superiores de 2 g/día, inducen estados hiperuricémicos que pueden conducir con el tiempo a la aparición de gota, gota artrítica y tofos, por la deposición de este compuesto en los tejidos blandos y en las articulaciones. Con relación con esto, se ha dicho que en algún momento de su evolución, el hombre y otros primates, perdieron la enzima uricasa que convierte el ácido úrico en alantoína, mucho más soluble y fácilmente excretable, de ahí su imposibilidad de metabolizar el ácido úrico, como lo hacen otros animales.

En levaduras, el contenido de ADN es sólo 1-2% del contenido total de ácidos nucleicos (suma de ADN y ARN), el cual varía entre 5 y 13 % en dependencia de la tasa de crecimiento y la fase de éste que se esté analizando. Esto explica porque la mayoría de los estudios tienden a remover principalmente el ARN celular.

En tanto que la proteína de levadura se emplee como fortificante nutricional o como aditivo funcional en los alimentos, el contenido de ácidos nucleicos no conforma ningún problema serio salvo los relacionados con la falta de una adecuada funcionalidad. Sin embargo, en la medida que aumentemos el nivel de inclusión de estos productos en la dieta, comenzarán a aparecer en el consumidor anomalías fisiológicas que pueden conducir a estados francamente patológicos. Si la idea es que la proteína microbiana juegue un papel importante como fuente de proteínas en la humanidad del futuro, es obvio que debe resolverse en primer lugar el problemas de los ácidos nucleicos.

A partir de estas premisas numerosas investigaciones se dedicaron a desarrollar procedimientos de reducción de los ácidos nucleicos en la biomas microbiana para su adecuación al consumo masivo. Se han propuesto diferentes métodos que se pueden clasificar en tres grupos:

- *Reducción de la tasa de crecimiento del microorganismo.* Esta solución presenta dos inconvenientes, la primera es que atenta contra la productividad del proceso y la segunda, que el contenido final de ARN debe mantenerse dentro de los límites de la

viabilidad celular (aproximadamente 5 %) y por lo tanto, la concentración de ácidos nucleicos sigue siendo muy alta para la alimentación humana. De esto resulta que la reducción de la tasa de crecimiento no es el método más adecuado de reducción de ácidos nucleicos, debiéndose recurrir a los dos tipos de métodos siguientes.

- *Métodos químicos.* Debido a su sencillez, alta eficacia y bajo costo son los únicos que han resistido los análisis económicos. El principal problema que presentan es que deben conducirse reduciendo al máximo las posibles alteraciones de la composición de la biomasa, evitando la aparición de compuestos no naturales.
- *Métodos enzimáticos.* Son procesos que se llevan a cabo a temperaturas bajas para minimizar reacciones colaterales y sobre todo para evitar la inactivación enzimática (las proteínas de levadura son muy lábiles al calor, ver Capítulo 11). Se pueden emplear las propias enzimas intracelulares o recurrir al uso de enzimas extracelulares.

### ***Reducción del contenido de ARN por reducción de la tasa de crecimiento.***

Las levaduras primarias usualmente son cultivadas de forma que se alcancen elevadas productividades, independientemente del sustrato empleado. Así, con frecuencia el cultivo se lleva a cabo de modo continuo. El incremento de la productividad es expresado en Kg de levadura por m<sup>3</sup> de medio por hora y por tanto se puede calcular a partir de la concentración celular másica (X), expresada en Kg/m<sup>3</sup> multiplicada por la tasa de dilución D en h<sup>-1</sup>.

Se sabe que en el cultivo continuo en simple etapa, D es numéricamente igual a la tasa de crecimiento  $\mu$ . Cuando se alcanza el cultivo balanceado, las tasas de síntesis de cada uno de los componentes celulares son iguales entre sí e iguales a  $\mu$  para que se mantenga constante la composición de las células. El sitio donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas, es el ribosoma, orgánulo subcelular constituido básicamente por el ARN ribosomal (~60% de la composición del ribosoma) Aunque existen otros tipos de ARN, el ARN ribosomal es con mucho el de mayor concentración en la célula y compone alrededor del 80% de la totalidad de ARN en la misma.

A una temperatura y composición de medio dadas, los ribosomas sintetizan proteínas a una tasa fija, o lo que es igual, trabajan a un nivel de eficiencia único. De esta forma, si el crecimiento precisa de una velocidad de suministro de proteínas mayor para poder multiplicarse de acuerdo con la  $\mu$  (=D) impuesta, se requiere entonces una mayor cantidad de ribosomas incorporados a la síntesis para cumplimentar las necesidades del cultivo. Bajo estas condiciones el contenido de ARN aumentará como una función directa de la  $\mu$ . En experimentos llevados a cabo en nuestros laboratorios, haciendo crecer sobre mieles finales una cepa de *Candida utilis*, a valores de D entre 0.15 h<sup>-1</sup> y 0.52 h<sup>-1</sup>, se encontraron variaciones del contenido de ARN entre 7 y 13 %.

### ***Métodos químicos de reducción de ácidos nucleicos en la biomasa de levadura***

Muchos métodos químicos son capaces de reducir el contenido de ADN en levaduras. Sin embargo son relativamente pocos los que se han usado en el tratamiento de SCP por muchas razones, entre las que se destacan la impracticidad a un nivel de escala industrial, la potencial toxicidad de algunos solventes usados y el riesgo de hidrolizar las proteínas.

La mayoría de los métodos químicos de remoción de ARN explotan el comportamiento de las moléculas de ARN bajo condiciones alcalinas, en las cuales las uniones 2,5-fosfodiéster entre moléculas adyacentes de nucleótidos son capaces de escindirse y formar un diéster cíclico. La hidrólisis de los enlaces fosfodiéster de los ácidos nucleicos rinde compuestos de masa molecular muy inferior a los de la molécula de partida. Por su parte, el ADN no es capaz de formar el 2', 3'-fosfodiéster resultando resistente a la digestión alcalina. Las condiciones alcalinas no son suficientes para remover el ARN si las temperaturas de tratamiento se mantienen bajas (ambiente) aún a valores de pH altos.

**Tabla 3 Reducción de ARN en biomasa de *Kluyveromyces fragilis* por tratamiento alcalino**

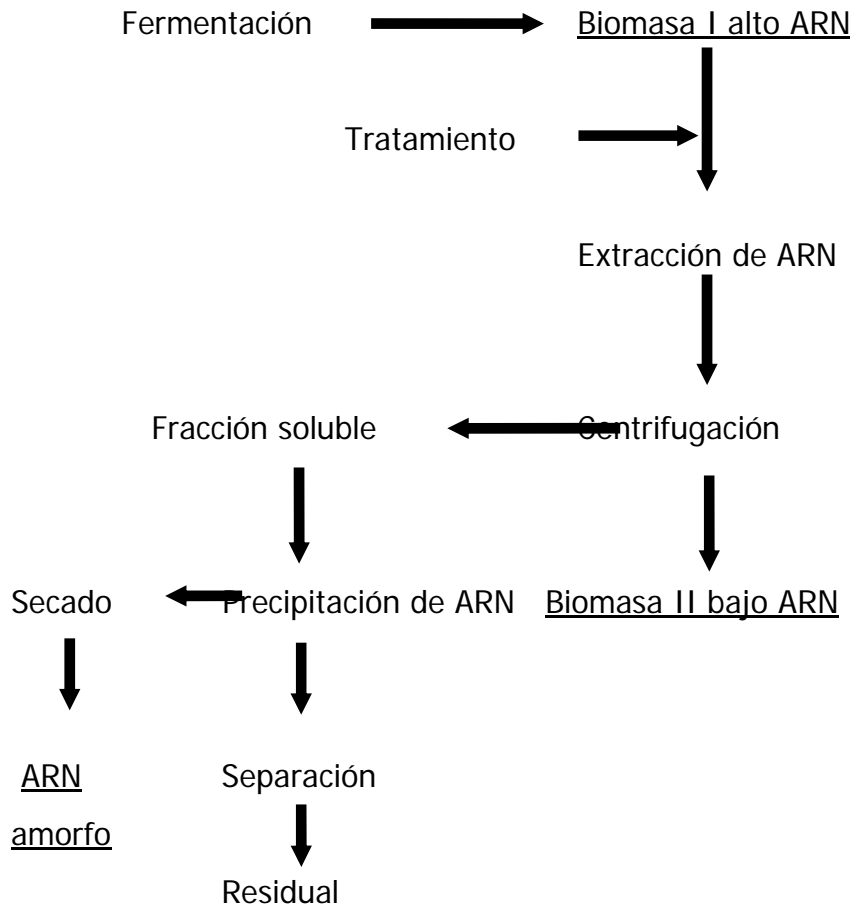
<b>Alcali</b>	<b>Concentración (N)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>ARN residual (%)</b>	<b>Rendimiento de biomasa (% sobre biomasa inicial)</b>
NH <sub>4</sub> OH	0.06	50	10	6.6	83
		50	30	4.8	78
		60	10	3.1	80
		60	30	2.5	80
	0.09	50	10	5.2	84
		50	30	4.4	80
		60	10	2.3	79
		60	30	1.9	75



Si las condiciones alcalinas se mantienen el tiempo suficiente, todo o gran parte del ARN de partida se convierte en mononucleótidos. El procedimiento ha sido empleado para la extracción selectiva de los ácidos nucleicos en células de levadura, hongos y bacterias. Como ejemplo de aplicación de este método se puede ver en la Tabla 3 el efecto del tratamiento alcalino con agua amoniacal sobre el nivel de ácidos nucleicos de biomasa de *Kluyveromyces fragilis* crecidas sobre mieles finales (Otero y Cabello 1980; Andreu et al 1988)

El contenido de proteínas en la biomasa seca resultante de las dos últimas condiciones de tratamiento fue superior al 50%. Si se tiene en cuenta que se parte de una biomasa con 50% de proteínas se evidencia que el tratamiento es muy selectivo en cuanto a la extracción de ARN. La reducción de ARN en levadura entera funciona de alguna manera como un método de concentración ya que en el proceso de extracción, dado que se realiza en medio acuoso, se eliminan componentes nitrogenados no proteicos (aminoácidos, péptidos, iones libres etc). La extracción en medio amoniacal también contribuye a una mejora sustancial en las propiedades organolépticas del producto final por reducción de componentes que aportan sabores, aromas y colores no agradables. En el caso particular de la levadura residual de cervecería el lavado en agua amoniacal permite reducir el sabor amargo por solubilización de las humulonas del lúpulo (obtención de levadura desamargada). Este proceso fue escalado a nivel de planta piloto obteniéndose lotes que fueron evaluados toxicológicamente con resultados positivos. La Fig 4 muestra un esquema alternativo de obtención de biomasa de levadura reducida en ARN.

**Fig 4 Proceso industrial para la extracción de ARN de levadura (Otero y Cabello 1980)**



Estudios similares fueron realizados con células de *Candida utilis* NRRL Y-900 cultivadas en soluciones de glucosa generada por hidrólisis de madera pretratada de *Eucalyptus globulus* (Parajó et al 1995). La biomasa de levadura fue sometida a un tratamiento con soluciones de  $\text{NH}_4\text{OH}$  obteniéndose concentrados proteicos con altos valores de proteína y digestibilidad, y bajo nivel de ácidos nucleicos. Fue posible remover el 95 % de los ácidos nucleicos iniciales de las levaduras con un rendimiento en proteínas del 88 % y sin modificación significativa del perfil de aminoácidos.

Asimismo, se realizaron ensayos para determinar si durante la extracción de los ácidos nucleicos hubo pérdidas de aminoácidos esenciales, y no se detectaron cambios en el contenido de proteína, ni en el tipo de aquéllos. Con estos resultados en puerta, se

realizó un estudio de mercado y de selección de tecnología de los mononucleótidos y mostró que la levadura procesada de esta forma no resultaba económicamente atractiva para la industria alimentaria.

### ***Reducción de ARN por activación de nucleasas intracelulares***

El uso de enzimas para la remoción de ARN de SCP de levaduras es una de las técnicas más comúnmente empleadas. Aunque hay informes del uso de exoenzimas para la reducción de ARN, se ha estudiado más extensivamente el empleo de las ribonucleasas intracelulares presentes en las levaduras (Otero et al 1981, Bueno et al 1985).

Estas enzimas son temperatura-pH dependientes; la mayoría de los tratamientos emplean condiciones levemente ácidas y temperaturas no mayores que 65 °C.

Cuando una suspensión de levaduras se somete a un corto choque térmico (50-65 °C), la estructura interna de las células de levadura sufre cambios importantes en el sistema de enzimas hidrolíticas, las que se activan y comienzan a degradar las estructuras internas de la célula. La liberación de proteasas, nucleasas, fosfatasa y otras enzimas que la célula utiliza para la degradación de nutrientes extracelulares de alto PM, conduce ahora a un proceso similar pero de autólisis, el cual puede ser dirigido a la hidrólisis preferencial de ciertos componentes estructurales, limitando la degradación de otros que interesa conservar.

Se han diseñado varios procesos tendientes a reducir el ARN por medio de una hidrólisis extensiva del ARN ribosomal con pérdidas mínimas de proteínas. El proceso consta de dos etapas:

- Degradación de macromoléculas en el interior celular y
- Difusión libre de los productos de hidrólisis hacia el exterior, lo cual demora varias horas para completarse.

La temperatura de incubación oscila entre 45 y 50 °C en dependencia de la cepa tratada. Para *Candida utilis* la temperatura óptima es de 45 °C mientras que para *Saccharomyces cerevisiae* se requieren valores entre 50 y 52 °C para que se produzca adecuadamente la degradación de ARN. El tiempo de activación también varía en un

rango amplio que va desde 3 hasta 20 seg, lo cual es influido por la concentración de células en suspensión.

En la Tabla 4 se muestran la cinética de degradación de ARN en la levadura *Candida utilis* NRRL Y-660.

**Tabla 4 Cinética de degradación de ARN en células de *Candida utilis* NRRL Y-660 por RNasas intracelulares activadas por choque térmico**

Tiempo, min	ARN residual, % base seca
0	7.0
30	1.8
60	1.4
90	1.3
120	1.2

La eficiencia del proceso es función de la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) de las levaduras: cuando mayor es la tasa menos efectivo es el tratamiento de reducción de ARN RNasa intracelular (Otero et al 1981).

La activación de la ribonucleasa es también favorecida por la presencia de iones metálicos tales como el Na y el Zn. Esto explica porque el proceso de autólisis requiere la presencia de sales, de las cuáles la más empleada por su efectividad, costo y falta de toxicidad es el NaCl, que adicionalmente auxilia en la extracción de los componentes intracelulares. Lindblom y Mogren (1974) encontraron que para iniciar la degradación de ARN en un homogenato de células desintegradas de levadura panadera se requería 3 % de NaCl. Con un tratamiento a pH 5.6 y 50 °C y posterior incubación de 20 minutos se logró una remoción del 85 % del ARN. El producto obtenido (conteniendo restos de pared celular) resultó finalmente con un contenido de 1.4 % de ARN.

Los procedimientos hasta ahora analizados para mejorar la digestibilidad por ruptura celular y de reducción de ARN por sí solos y aplicados separadamente no resuelven el empleo de las proteínas de levadura en alimentos para humanos. La aplicación de ambos procedimientos en forma conjunta, es decir la reducción de ARN sobre células

desintegradas sumado al aislamiento de las proteínas libres de ácidos nucleicos permite obtener proteínas aisladas de levadura con sus propiedades funcionales mejoradas y aún mayor digestibilidad. Esto será tratado en el capítulo 11.

## BIBLIOGRAFÍA

Andreu, G; Benaiges, M; López, J; Solá, C (1988) A simple method for ARN extraction from yeast *Biotechnol Bioeng* **32**:927

Benaiges, MD; López-Santín, J; Solá, C (1990) Production of 5'-ribonucleotides by enzymatic hydrolysis of RNA *Enzyme Microb Technol* **12**:86-89

Bueno, GE; Otero, MA; Klibansky, MM; González, AC (1985) Nucleic acid reduction from yeast. Activation of intracellular RNase *Acta biotechnol* **1**:91-100

Edozien, JC; Udo, UU; Young, VR; Scrimshaw, NS (1970) Effects of high levels of yeast feeding of uric acid metabolism in young men *Nature* (London) **228**: 180-181.

Guzmán-Juárez, M (1982) Yeast proteins. In: Development in Food Proteins-2. (Hudson, BJF ed), Applied Science Publishers. London. Chapter 7, pp. 263-291.

Parajó, JC; Santos, V; Domínguez, H; Vázquez, M (1995) Protein concentrates from yeast cultured in wood hydrolysates *Food Chemistry* **53** (2):157-163

Lindblom, M; Mogren, H (1974) *Biotechnol Bioeng* **16**:1123.

Otero, MA; Cabello, AJ (1980) SCP low in nucleic acid by alkaline treatment. *Biotechnol Letters* **2**:379-382

Otero, MA; Bueno, GE; González, AC (1981) Influence of growth rate on RNA degradation by intracellular RNase *Biotechnol Letters* **3**:537-541

Otero, MA; Verdecia, O; Vasallo, MC; Mansur, M; González, PC; Fernández, VM; Infante, JF; Campa, C; Sierra, G; Muñoz, E; Malberty, A; Beoto, S (1994) Actividad inmunológica de algunos polisacáridos de pared celular de la levadura *Kluyveromyces fragilis* *Sobre los derive* **28** (1-3):107-111

Otero, MA; Vasallo, MC; Verdecia, O; Fernández, VM; Betancourt, D (1996) A process for the complete fractionation of baker's yeast *J Chem Technol Biotechnol* **67**: 67-71  
Chem Technol Biotechnol **67**, 67-71

Schreuder, MP; Deen, C; Boersma, WJA; Pouwels, PH; Klis, FM (1996) Yeast expressing hepatitis B virus surface antigen determinants on its surface: implications for a possible oral vaccine *Vaccine* **14**:383-388.

Shay, LK (1981) Process for making SCP having a low nucleic acid content UK Pat Appl GB 2 078 754 A

## **CAP 10. PIGMENTOS**

Araceli Tomasini

Dpto. de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

### **INTRODUCCIÓN**

Los pigmentos, llamados también colorantes, son sustancias que imparten color a los organismos, alimentos y otros productos y su uso data de las primeras civilizaciones. El término color está basado en la percepción humana de la luz y constituye una banda angosta del espectro magnético, llamada espectro visible. El color es uno de los principales criterios que utiliza el ser humano para ser atractivo un producto, dicho color puede ser adicionado a un producto, con el fin de incrementar su intensidad o cambiarlo, en forma de un pigmento natural o sintético. Los pigmentos naturales más conocidos y usados en la industria pertenecen a los carotenoides, hay otro grupo de pigmentos como el Red mould rice or ang-kak es un término publicado desde el primer siglo en un libro de medicina herbal. Es un colorante o especia usado en la cocina China. Producido por el hongo *Monascus* spp. Este hongo produce seis pigmentos (dos amarillos, dos naranjas y dos rojos). Otros pigmentos que se encuentran naturalmente en ciertos organismos y alimentos son carotenoides, melaninas, clorofilas, antrocianinas y flavonoides. Los carotenoides representan el grupo de pigmentos de mayor valor industrial por sus aplicaciones en la industria farmacéutica, química y de alimentos.

En este capítulo se dará una visión breve de los carotenoides producidos por levaduras y como se ha mejorado la producción

## **USOS DE LOS PIGMENTOS CAROTENOIDES**

Los carotenoides son pigmentos muy importantes desde el punto de vista alimenticio ya que confieren color atractivo a una gran variedad de alimentos y además son precursores de la vitamina A, así como desde el punto de vista médico ya que se ha demostrado que los carotenoides presentan actividad antioxidante. El papel de los antioxidantes es neutralizar a los radicales libres actuando como donadores de electrones, de esta forma los antioxidantes evitan el daño que causan dichos radicales libres a las células vivas. Se ha observado que los antioxidantes mejoran el sistema inmune, protegen contra el cáncer y tienen un papel importante en la prevención de enfermedades degenerativas. Recientemente se ha descubierto que los carotenoides presentan actividad anti-cancerígena y pueden actuar como agentes preventivos de cáncer en las personas que no desarrollan pigmentación (Vershmin 1999; Onogi et al 1998; Buzzini et al 2005). También se ha demostrado que los carotenoides actúan en la prevención de enfermedades crónicas, por lo que la demanda y el mercado de estos pigmentos se ha incrementado drásticamente en los últimos años (Bertram 1999, Sing y Lippman 1998, Smith 1998).

Los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en plantas, animales y microorganismos, en la mayoría de los casos son responsables del color que ellos presentan. Además de impartir color, también juegan papeles biológicos importantes ya que actúan como componentes para almacenar luz en organismos fotosintéticos, también actúan como fotoprotectores, antioxidantes y reguladores de fluidos de la membrana.



## PROPIEDADES QUÍMICAS Y TIPOS DE CAROTENOIDES

Químicamente, los carotenoides son de la familia de los terpenoides, compuestos por unidades de isoprenoides. Los terpenoides son derivados del acetato a través de la ruta de biosíntesis del ácido mevalónico que es el precursor de estas moléculas. Son compuestos generalmente de  $C_{40}$ , aunque pueden encontrarse moléculas más grandes y/o más pequeñas. También hay carotenoides cíclicos como la astaxantina, zeaxantina, luteína y no cíclicos ó acíclicos como el licopeno y el fitoeno. Los carotenoides se han clasificado como carotenos y xantofilas. Los carotenos que son hidratos de carbono como  $\beta$ -caroteno, licopeno, innato y las xantofilas que son hidratos de carbono que contienen átomos de oxígeno en los anillo o en las cadenas de carbono terminales como astaxantina, canthaxantina, capsanthin, (Umeno et al 2005, Simpson et al 1981). En general los carotenoides son llamados por sus nombres triviales, las xantofilas llevan el sufijo "xantina". Actualmente se está haciendo un esfuerzo para llamarlos por su nomenclatura según la convención del IUPAC, sin embargo en la mayoría de los casos resultan nombres muy largos, por ejemplo el nombre de la astaxantina, según la convención del IUPAC es 3,3 dihidroxi-4,4'-diceto- $\beta$ -caroteno.

Se conocen alrededor de 600 carotenoides naturales (obtenidos de plantas y microorganismos) y muy pocos son usados industrialmente, por ejemplo el licopeno, un carotenoide aciclíco, el carotenoide biciclíco, el  $\beta$ -caroteno y los carotenoides biciclícos oxigenados como las xantofilas como la cantaxantina y la astaxantina .

En 1999 la venta aproximada de carotenoides fue de US\$ 750-800 millones y se espera una proyección estimada de 1 billón de dólares para 2005. (Lee y Schmidit-Dannert 2002).

## PRODUCCIÓN

Los carotenoides pueden ser producidos comercialmente por síntesis química, por fermentación o por extracción de fuentes naturales (vegetales y crustáceos). Los carotenoides obtenidos por síntesis química son poco aceptados por el consumidor final, debido a esto los carotenoides obtenidos de fuentes naturales, ya sea por fermentación o por extracción tienen mayor demanda. Las plantas, algas y microorganismos sintetizan cientos de moléculas con diferentes estructuras, entre ellas una gran diversidad de carotenoides. Los carotenoides son producidos por algunos microorganismos como las bacterias *Mycobacterium lacticola* y *Brevibacterium spp.* (Simpson et al 1981), como las microalgas *Hematococcus pluvialis* (Boussiba et al 1992), *Neochloris wimmwieri* y *Chlamydomonas nivalis* (Jonson y Schroeder 1995), hongos como *Peniphora spp.* (Goodwin 1980) y por levaduras como *Xanthophyllomyces dendrodhous*, formalmente llamada *Phaffia rhodozyma*, (Vázquez, 2001) y *Rhodotorula glutinis* (Bhosale y Gadre 2001), *R. rubra* (Simova et al 2004).

Actualmente para la producción comercial de carotenoides se emplean principalmente al alga *Hematococcus pluvialis* y a la levadura *Phaffia rhodozyma*. Sin embargo hay estudios que reportan la producción de carotenoides, principalmente toruleno y  $\beta$ -caroteno, por otras levaduras pertenecientes al género *Rhodototula* y *Sporobolomyces* (Johnson y Schroeder, 1995; Davoli y Weber 2002). Se ha estudiado la producción de carotenoides por *Rhodotorula glutinis*, (Buzzini 2001 y Bhosale y Gadre 2001 y 2002). Se ha reportado la producción de carotenoides por esta levadura empleando como fuente de carbono desechos agroindustriales como el mosto de la uva y el licor de maíz. Debido a que muchos de estos sustratos contienen cantidades elevadas de almidón, se han realizado estudios cultivando *R. glutinis* junto con otras levaduras amilolíticas con el fin de incrementar la producción de carotenoides (Buzzini, 2000 y 2001). Buzzini et al. (2005) reportaron la producción de carotenoides por *Rhodotorula graminis* y el efecto de la concentración de elementos trazas en la producción de  $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno, toruleno y torularodina.

También se ha demostrado la producción de carotenoides por *Rhodoturula rubra* GED8 crecida junto con bacterias iniciadores lácticas empleando suero de leche como sustrato (Simova et al 2004).

## ***Phaffia rhodozyma* Y LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA**

### ***Características de Phaffia rhodozyma***

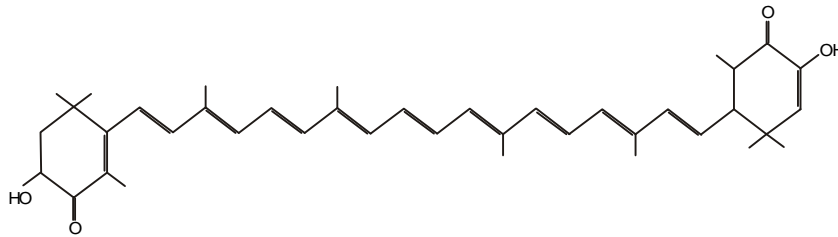
Esta levadura pertenece al grupo de basidiomicetos, fue aislada por primera vez a principios de los 70's a partir de los exudado de árboles de la regiones montañosas de Japón y Alaska. (An et al 1989). Las principales características de esta levadura son: forma colonias de color rojo-naranja, debido a la presencia de pigmentos carotenoides. Fermenta glucosa y otros azúcares incluyendo hemicelulosas, xylosas, almidón, maltosa, rafinosa, glicerol entre otras. Los azúcares que no puede asimilar son la lactosa, galactosa, glucosamida, D-ribosa y D-arabinosa. Es aerobia facultativa y presenta reproducción sexual y asexual. *P. rhodozyma* es el estado asexual de la levadura, recientemente Golubev (1995) reportó el estado sexual y lo llamó *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Posteriormente por estudios moleculares se demostró la existencia de más de una especie de *P. rhodozyma* y no todas ellas presentan estado sexual o hasta el momento no se les conoce (Fell y Blatt 1999).

## **PROPIEDADES QUÍMICAS Y USOS DE LA ASTAXANTINA**

La astaxantina (3,3-dihydroxi- $\beta,\beta$ -carotene-4,4'-dione) es un pigmento perteneciente al grupo de los carotenoides. Su fórmula molecular es  $C_{40}H_{52}O_4$  (Fig. 1). Es un polvo cristalino de color café-violeta oscuro. Su punto de fusión es de 224 °C. Es insoluble en agua. Se disuelve, a temperatura ambiente, en algunos solventes orgánicos como el diclorometano, cloroformo, acetona y dimetilsulfóxido. Este pigmento es el responsable del color rojo-naranja de muchos organismos marinos incluyendo pescados y crustáceos y de algunas aves como los flamencos. La astaxantina es un pigmento autorizado por Administración Norteamericana de alimento y drogas para peces salomonoides (Food and Drug Administration for

salmonid fish U.S). Por lo tanto, se usa ampliamente en la industria de la acuicultura, como un aditivo en el alimento de las truchas y el salmón. De esta forma estos peces adquieren el grado de pigmentación apropiada, según el gusto del consumidor.

Además la astaxantina es un potente antioxidante, se sabe que puede ser 1000 veces más efectiva como antioxidante que la vitamina E. Debido a su gran actividad antioxidante, la astaxantina tiene grandes posibilidades para ser usado con aplicaciones farmacéuticas para humanos.



**Figura 1. Estructura de la molécula de astaxantina**

### ***Producción de astaxantina por *P. rhodozyma****

Se ha estudiado el efecto de la luz, de la temperatura y de la fuente de carbono en la producción de astaxantina empleando *P. rhodozyma* (An y Jonson 1990; Fontana et al 1996; Sanpietro y Kula 1998). Por ejemplo Reynders et al (1996) propusieron un modelo matemático para describir la producción de astaxantina por la levadura en cultivo por lote alimentado. Yamane et al 1997 estudiaron la influencia del oxígeno y de la glucosa en la producción de astaxantina por *P. rhodozyma* en cultivos por lote y lote alimentado. Por otro lado, se ha demostrado que cuando se crece a *P. rhodozyma* cultivada bajo estrés oxidativo se incrementa la producción de astaxantina (Schroeder y Jonson 1995; Kanmuri et al 1999). Vázquez (2001) estudió el efecto de la luz en la producción de astaxantina con diversas cepas de *P. rhodozyma* crecidas sobre xylosa, demostró que en presencia de luz el rendimiento es mayor, independientemente de la cepa utilizada, que cuando se cultiva en oscuridad. Por ejemplo, la cepa de *P. rhodozyma* ATCC 24228

produjo 2.13 mg astaxantina/ml en presencia de luz y solamente 1.38 mg astaxantina/l en oscuridad. Jonson (2003) demostró que las condiciones nutricionales y ambientales regulan la biosíntesis de astaxantina y que éste pigmento protege a *P. rhodozyma* de especies reactivas de oxígeno.

Para la producción de astaxantina, *P. rhodozyma* también puede usar como fuente de carbono materias de desecho agroindustriales como material lignocelulósico y hemicelulósico hidrolizados, y subproductos de destilado del etanol. Kusdiyantini et al (1998) reportaron la producción de astaxantina por *P. rhodozyma* empleando glicerol como fuente de carbono. Diversos autores han propuesto el uso de jugo de caña de azúcar (Fontana et al 1996; Florencio et al 1998), jugo de uva (Meyer y du Preez 1994), subproductos de maíz macerado (Hayman et al 1995) y agua de coco (Domínguez 2003) para la producción de astaxantina por la levadura. Estos autores han realizado estudios modificando algunas condiciones cultivo, de acuerdo al sustrato utilizado y en general reportan mayor producción de astaxantina sobre sustratos complejos que cuando se obtiene de cultivos donde la fuente de carbono es glucosa. Por ejemplo, *P. rhodozyma* cultivada en agua de coco produjo 1.85 mg astaxantina/g de células, mientras que cultivada en medio YM (extracto de levadura, malta y con 10 g glucosa/l) se produjo 1.05 mg astaxantina/g células.

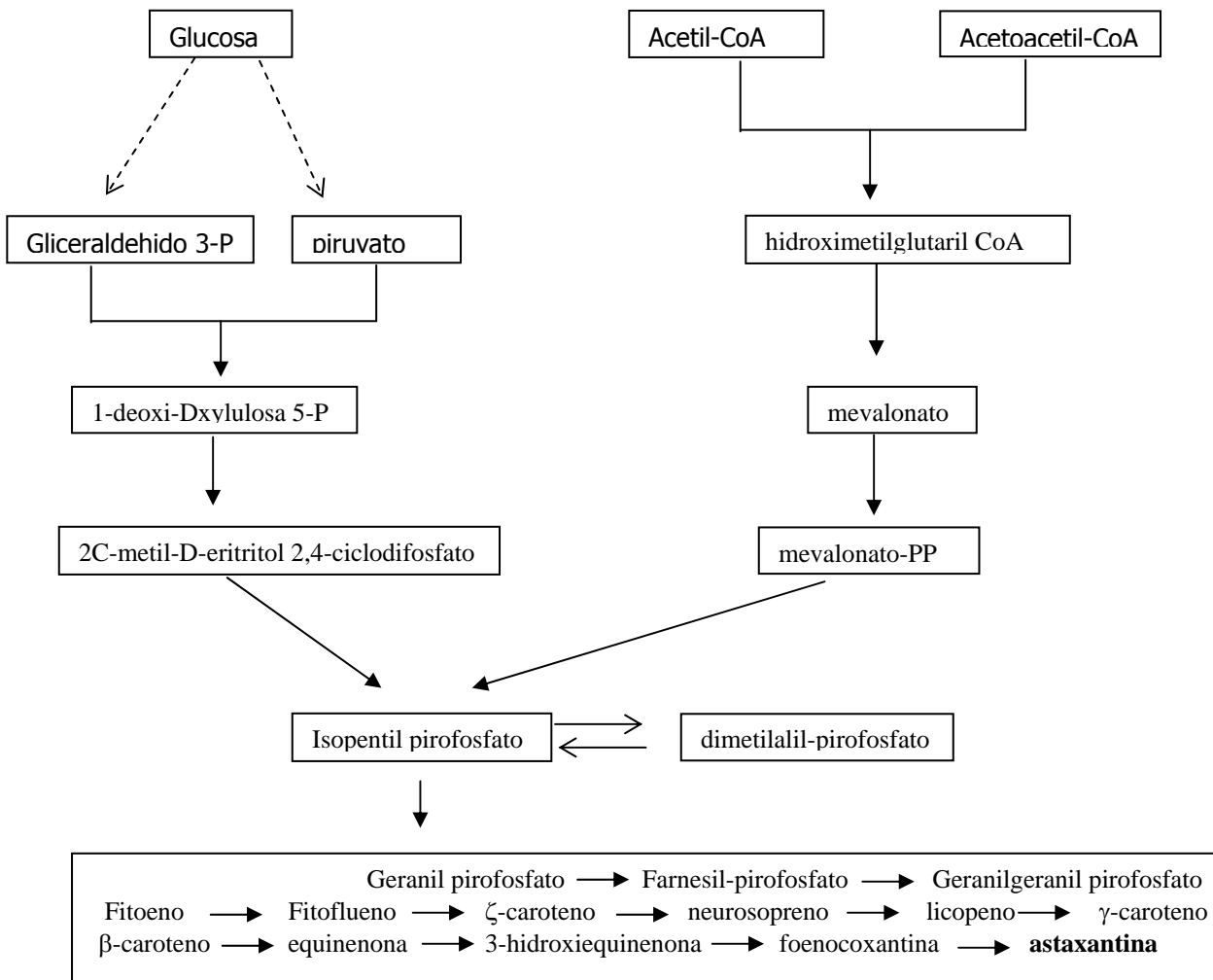
También se ha propuesto el empleo de *P. rhodozyma* como un aditivo en la preparación de alimentos para animales, principalmente para peces. Para ello, la levadura sufre un tratamiento ácido y térmico seguido de una deshidratación (An y Choi 2003).

### ***Biosíntesis y regulación de astaxantina por P.rhodozyma***

La astaxantina es un tetraterpeno, que es de la familia de los poliisoprenoides que se forman por dos rutas, la del mavalonato y la del no-mevalonato (o piruvato/gliceraldehido, 3-fosfato). Cualquiera de estas dos rutas conduce a la formación de la primera unidad de isopreno, el isopentil pirofosfato (IPP). Después se presenta el alargamiento de las cadenas por condensación sucesiva (cabeza-

cola) de los terpenoides para formar dimetil alil pirofosfato (DMAPP) que es el isómero reactivo de IPP y se forman cadenas de poliprenil pirofosfato. El tamaño de las cadenas de poliprenil pirofosfato varía, las de cadena corta forman geranio pirofosfato (C10), las de cadena media forman farnesil pirofosfato (C15) y las largas forman geranilgeranil pirofosfato (C20). Todas ellas son precursoras de mono, di y tri terpenos y carotenoides. Por condensación de dos residuos de geranilgeranil-PP se produce el fitoeno. Las cadenas de fitoeno sufren desaturación y forman compuestos con dobles enlaces conjugados, como el licopeno, el  $\beta$ -caroteno y la astaxantina que tiene 13 dobles enlaces conjugados (Fig 2). Estas moléculas presentan colores intensos y actúan como fotorreceptores (Lee y Schmidt-Dannert 2002; Vustin et al 2004).

**Fig 2. Ruta biosintética de la síntesis de carotenoides.**



Los pasos biosintéticos de la astaxantina en *P. rhodozyma* parecen involucrar sistemas sintéticos y degradativos que están regulados por el estrés oxidativo. La exposición a especies reactivas de  $O_2$  ( $O_2$  singlete) altera rápidamente los niveles de los intermediarios carotenoides y también se forman distintos productos degenerativos como respuesta a los radicales peroxil. *P. rhodozyma* presenta un sistema sofisticado con habilidad para alterar rápidamente la capacidad carotenogénica que depende de las condiciones ambientales y del estado fisiológico de la célula. La biosíntesis de astaxantina por *P. rhodozyma* es inducida por especies reactiva de oxígeno (Schroeder y Jonson 1995).

### ***Producción de carotenoides por Rhodotorula glutinis.***

*Rhodotorula* es una levadura que también ha sido estudiada por su capacidad de producir carotenoides del tipo toruleno, torularodina,  $\gamma$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno en varias proporciones (Perrier et al 1995). Durante la biosíntesis de pigmentos por *R. glutinis*,  $\gamma$ -caroteno por hidroxigenación produce  $\beta$ -caroteno finalmente por hidroxilación se forma toruleno y por carboxilación de  $\beta$ -caroteno se forma torularodina.

Sin embargo la cantidad de estos pigmentos producidos por *R. glutinis* es muy pequeña, por lo que se han comenzado hacer estudios para mejorar el nivel de producción. Se han realizados mutaciones y selección de cepas de *R. glutinis* con mayor capacidad de producción de pigmentos (Bhosale y Gadre 2001). Por otro lado Buzzini et al (2005) estudiaron el efecto de metales trazas en la producción de pigmentos por *R. glutinis*. Reportaron que la concentración de los metales trazas afecta la biosíntesis de carotenoides específicos en *R. glutinis*. Los mismos autores proponen que los iones de metales probablemente actúan como mecanismos inhibidores o activadores de las enzimas carotenogénicas específicas, en especial sobre la enzima carotenoide desaturasa.

## **MEJORAMIENTO GENÉTICO**

En los últimos años se han realizado estudios para mejorar la producción de astaxantina por *P. rhodozyma*. Los primeros estudios consistieron únicamente en obtener mutantes de *P. rhodozyma* con mayor capacidad de producción de astaxantina, basados en mutagénesis clásica y selección (An et al 1991; An 1997; Giraud et al 1994; Retamales et al 1998). Los estudios reciente de biología molecular y genómica han permitido avanzar en el conocimiento de las principales rutas de síntesis de carotenoides, ya se tiene información sobre la organización genómica de *P. rhodozyma* (Cifuentes et al 1997). Se han clonado más de 150 genes que codifican para enzimas que intervienen en la síntesis de 27 carotenoides. La mayoría de los genes y clustrers de genes han sido clonados en microorganismos que no producen carotenoides, como *E. coli*, sin embargo los niveles de producción de estos transformantes heterólogos están aún muy por debajo de los niveles de carotenoides sintetizados por los microorganismos productores como *P. rhodozyma*. Se requieren realizar muchos estudios para lograr incrementar la producción de carotenoides en microorganismos no productores. Entre estos estudios se propone optimizar la disponibilidad de los precursores de los isoprenoides, balancear la expresión de genes carotegénicos para tener transformaciones eficientes de los precursores al pigmento específico deseado y seleccionar huéspedes heterólogos con alta capacidad para almacenar carotenoides (Lee y Schmidt 2002).

Las continuas investigaciones han permitido desarrollar un sistema de transformación basado en las señales de expresión homóloga. Se han aislado genes que codifican a las enzimas biosintéticas de la astaxantina por complementación heteróloga en un huésped de *E. coli* que sintetiza carotenoides debido a la introducción de genes carotenogénicos de *Erwina uredovora*. Se ha identificado el gen *crtYB* y el producto del gen presenta ambas actividades, fitoena sintasa y lycopeno ciclasa. (Verdoes et al 2003).

Actualmente se conoce la regulación de las enzimas claves (isoprenil difosfata sintasa, carotenoide sintasa, carotenoide desaturasa y carotenoide ciclasa) que intervienen en la biosíntesis de carotenoides y algunos genes que codifican para



dichas enzimas. También se han estudiado los genes que codifican para las enzimas que catalizan las modificaciones de los carotenoides con lo cual es posible obtener mayor producción de un carotenoide específico. Todos estos estudios han permitido incrementar la producción de astaxantina por *P. rhodozyma*, para llegar a niveles aceptables industrialmente. También se ha logrado la producción de carotenoides por microorganismos no productores por transformación heteróloga (Umeneo et al., 2005).

## **BIBLIOGRAFÍA**

An, GH; Schuman, DB; Jonson, AE (1989) Isolation of *Phaffia rhodozyma* *J Basic Microbiol* **35**:147-155.

An, GH; Jonson, EA (1990) Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma* *Antonie Van Leeuwenhoek* **57**:191-203.

An, GH; Bielich, J; Aurerbach, R; Johnson, EA (1991) Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting *Biotechnology* **9**:70-73.

An, GH (1997) Photosensitization of the yeast *Phaffia rhodozyma* at a low temperature for screening carotenoid hyperproducing mutants *Appl Biochem Biotechnol* **66**: 263-268.

An GH and Choi ES (2003) Preparation of the red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, as a feed additive with increased availability of astaxanthin. *Biotechnol. Letters* **25**, 767-771.

Bertram J. (1999) Carotenoids and gene regulation. *Nutr Rev* **57**: 182-191.

Bhosale PB and RV Gadre (2002) Manipulation of temperature and illumination conditions for enhanced b-carotene production by mutant 32 of *Rhodotorula glutinis* *Lett Appl Microbiol* **34**,349-353.

Bhosale PB and RV Gadre (2001) Production of b-carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*, *Apl. Microbio, Biotechnol* **55**:423-427.

Boussiba S, L Fan, A Vonshak (1992) Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. Meth. Enzymol. 213:386-391.

Buzzini P (2000) An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 from substrates containing concentrated refined grape must as the sole carbohydrate source. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 24, 41-45.

Buzzini P (2001) Batch and feed-batch carotenoid production by *Rhodotorula glutinis*- *Debaryomyces castellii* co.cultured in corp syrup J Appl Microbiol 90, 843-847.

Buzzini P, A Martini, M Gaetani, B Turchetti, UM Pagnoni and P Davoli (2005) Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula graminis* BVVPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis Enzyme Microbial Technology 36, 687-692.

Cifuentes V, G hermosilla, C Martinez, R Leon, G Pincheira and A Jimenez (1997) Genetics and electrophoretic karyotyping of wild-type and astaxanthin mutant strains of *Phaffia rhodozyma*. Antonie Van Leeuwenhoek. 72, 117-117.

Davoli P and RWS Weber (2002) Carotenoid pigments from the red mirror yeast *Sporobolomyces roseus*. Mycologist. 16, 102-108.

Dominguez-Bcanegra AM (2003). Comparación de la producción de compuestos carotenoides por *Haematococcus pluvialis* y *Phaffia rhodozyma*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. UAM, México, D. F.

Fell JW and Blatt GM (1999) Separation of strains production of the yeast *Xantholomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA, IGS and ITS sequence analysis. J Ind. Microbiol. Biotechnol. 23, 677-681.

Florencio JA, CR Soccol, LF Furlanetto, TM Bonfim, N Krieger, M Baron, JD Fontana (1998) A factorial approach for a sugarcane juice-based low cost culture medium: increasing the astaxanthin production by the red yeast *Phaffia rhodozyma*. Bioprocess and Biosystem Engineering. 19, 161-164.

Fontana JD, MF Guimaraes, NT Martins, CA Fontana and M Baron (1996) Culture of the astaxanthinogenic yeast *Phaffia rhodozyma* in low-cost media. Appl Biochem Biotechnol. 57-58, 413-422.

Giraud P, B Falconnier, J Bricout and B. Vlaescu (1994)  $\beta$ -Carotene producing mutants of *Phaffia rhodozyma*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41, 183-191.

Golubev WI (1995) Perfetc satate of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) Yeast 11:101-110.

Goodwin TW (1980) The Biochemistry of the carotenoides, 2<sup>nd</sup> ed., Chapman and Hall, Lonon.

Hayman TG, MB Mannarelli, and TD Leathers (1995) Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* grown on media composed of cor wet-milling co-products J Ind Microbiol. 115, 173-183.

Johnson EA and WA Schroeder (1995) Microbial Carotenoids. Adv. Biochem Eng. 53:119-178.

Johnson EA (2003) *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey International Microbiology. 6, 196-174.

Kanmuri NT, M Sato and M Takeuchi (1999) Effect of sataxanthin rich red yeast (*Phaffia rhodozyma*) on oxidative stress in rainbow trout. Biochim Biophys Acta 1426, 119-125.

Kusdiantini E., P Gaudin, G Goma and PJ Blanc (1998) Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation Biotechnol Letters 20, 929-934.

Lee PC and C Schmidt-Dannert (2002) Metabolic engineering towards biotechnology production of carotenoids in microorganisms. Appl. Microbiol Biotechnol 60, 1-11.

Meyer PS and JC du Preez (1994) Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. World Journal Microbiology and Biotechnology 10-780-785.

Onogi N, M Okuno, R Matsushima-Nishiwaki, Y Fukutomi,, H Moriwaki, Y Muto et al. (1998) Antiproliferative effect of carotenoids on human colon cancer cells without conversion to retinoic acid. Nutr Cancer. 32,20-24.

Perrier V, E Dubreucq and P. Galzy (1995) Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. Arch Microbiol 164, 173-179.

Retamales P, R Leon, C Martinez, G Hermosilla, G Pincheira, V Cifuentes (1998) Complementation analysis with new genetic markers in *Phaffia rhodozyma*. Antonie Van Leeuwenhoek. 73, 229-236.

Reynders MB, DE Rawlings and STL Harrison (1996) Studies on the growth, modeling and pigment production by the yeast *Phafia rhodozyma* during fed-batch cultivation. Biotechnol Letters 18, 649-654.

Sanpietro DLM and MR Kula (1998) Studies of astaxanthin biosynthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*): Effect of inhibitors and low temperature. Yeast. 14, 1007-1016.

Schroeder WA and Johnson EA (1995) Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid Biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*, J. Biol. Chem. 270,18374-18379.

Singh D and S Lippman. (1998). Cancer chemoprevention. Part 1: Retinoids and carotenoids and other classic antioxidants. Oncology 12: 1643-1658.

Simova ED, GI Frengova and DM Beshkova (2004) Synthesis of carotenoids by *Rhodotorula rubra* GED8 co-cultured with yogurt starter cultures in whey ultrafiltrate J Industrial Microbiol and Biotechnol 31, 115-121.

Simpson KL, T Katayama, CO Chischester (1981). Carotenoids from microorganisms. In: Carotenoids as colorants and vitamin A precursor. JC Bauernfeld (Ed.), Academic Press, London pp. 463-480.

Smith TAD (1998) Carotenoids and cancer: prevention and potential therapy. Br. J Biomed Sci, 55: 268-275.

Umeneo D, AV Tobias, and FH Arnold (2005) Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by direct evolution. Microbiol. and Molecular Biol. Review. 69, 51-78.

Vázquez M (2001) Effect of the light on carotenoid profiles of *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains (formerly *Phaffia rhodozyma*). Food Technol Biotechnol 39, 123-128.

Vershimin A (1999) Biological functions of carotenoids – diversity and evolution. Biofactors 10:99-104.

Verdoes JC, G Sandmann, H Visser, M diaz, M van Mossel, and AJJ van Ooyen (2003) Metabolic engineering of the carotenoid biosynthesis pathway in the yeast *Xantophyllomyces dendrodhous* (*Phaffia rhodozyma*) Appl. Environ. Microbiol. 69, 3728-3738.

Vustin MM, EN Belykn and SA Kishilova (2004) Relationship between astaxanthin production and the intensity of anabolic process in the yeast *Phaffia rhodozyma*, Microbiology 73, 751-757.

Yamane Y., K Higashida, Y Nakahimada, T Kakizono and N Nishio (1997) Influence of oxygen and glucose on primary metabolism in batch and feed batch cultures: Kinetic and stoichiometric analysis. Appl Environ Microbiol. 63, 4471-4478.

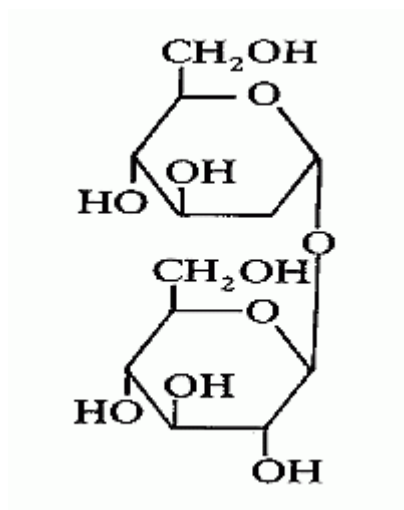
## CAP 11. TREHALOSA, UN ADITIVO ALIMENTARIO A PARTIR DE LEVADURA

Isabel Guerrero Legarreta

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

La trehalosa es un disacárido natural de alta estabilidad, cuyas propiedades la convierten en un promisorio agente estabilizante para la industria biotecnológica y alimenticia. Químicamente, es un disacárido no reductor formado por dos unidades de glucosa en una unión  $\alpha$ - $\alpha$ -1,1. Es muy abundante en la naturaleza; se encuentra comúnmente en insectos, miel, crustáceos, champiñones y en algunas otras plantas, y en alimentos elaborados por métodos fermentativos con levaduras ya que tanto estas como algunas bacterias la producen.

Se ha supuesto que este azúcar está fuertemente correlacionado con la presencia de vida, ya que protege a las moléculas biológicas del daño por frío o por falta de agua; y tiene un papel preponderante en el desarrollo de tolerancia al estrés. El contenido de trehalosa en algunas fuentes naturales es hasta de 20% en base seca.



## Estructura de la trehalosa ( $\alpha, \alpha$ -1,1-glucosilglucósido)

### PROPIEDADES

La trehalosa posee el 45% del poder edulcorante de la sacarosa (en una solución al 10%). Se han encontrado propiedades de importancia que la ubican como un aditivo alimentario multifuncional: incrementa la liberación de sabores, actúa como edulcorante nutricional, preserva la estructura celular, estabiliza a las proteínas, tiene características de humectación, mejora y mantiene la textura y el sabor de una gama de productos alimentarios, incluyendo productos de panadería, de confitería, bebidas, helados, postres y preparaciones de frutas. Es notable su capacidad como protector de moléculas biológicas contra la congelación y los procesos de secado.

**Tabla 1. Principales propiedades de la trehalosa en comparación con las de maltosa y sacarosa**

	<b>Trehalosa</b>	<b>Maltosa</b>	<b>Sacarosa</b>
Peso molecular	342.1	342.31	342.31
Punto de fusión	97°C	102.5°C	160-186°C
Temperatura de transición vítrea	79°C	43.5°C	52°C
Poder edulcorante (solución 10%)	45%	45%	100%
Higroscopicidad (aumento de masa a 25°C a 94% HR)	<1%	6%	75%
Poder reductor	no	si	no

Al ser un azúcar no reductor -los carbonos anoméricos están formando la unión glucosídica, no reacciona con aminoácidos o proteínas por lo que no produce

oscurecimiento no enzimático (reacción de Maillard), aún a temperaturas altas. El sabor, color y características nutricionales que se deterioraría de producirse la reacción de Maillard, se estabilizan.

El carácter no reductor la hace también estable a pH bajos, que produciría hidrólisis en otros disacáridos, además de no propiciar reacciones de caramelización y oscurecimiento característico de sistemas similares a pH ácido cuando se calientan. Esto da como resultado la retención de sabores y colores. Las soluciones de trehalosa son incoloras, lo que permite su adición a sistemas alimentarios sin cambiar el color.

Aunque tiene un poder edulcorante de 45% del de la sacarosa, mejora la liberación del sabor de preparados de frutas y de bebidas no alcohólicas. El perfil temporal de la trehalosa muestra un desarrollo rápido de dulzor y persistencia mayor que el de la sacarosa; el perfil de sabor está balanceado, y el dulzor leve de permite que otros sabores se potencien; se ha reportado también que inhibe las notas amargas o astringentes, sin dejar sabores residuales.

Posiblemente la principal propiedad de la trehalosa es como estabilizante en procesos de congelamiento-descongelamiento y de secado; protege la estructura celular de los compuestos en los alimentos, particularmente a fosfolípidos, proteínas, en procesos de congelamiento y descongelamiento, manteniendo la textura deseada. Esta característica se debe a varios factores combinados: la temperatura de transición vítrea de la trehalosa (79°C) es más alta que otros disacáridos (43.5°C maltosa y 52°C sacarosa) lo que permite que sea estable en temperaturas extremas, manteniendo la estructura de los sistemas cristalinos a los que se incorpora.

El dihidrato de trehalosa, la forma comercial, es estable hasta 94% de humedad relativa; la baja higroscopicidad da como resultado un producto seco fluido. Los cristales de trehalosa son más resistentes a la adsorción de agua que otros sistemas de azúcares similares. Por lo que, si en el sistema alimentario se encuentran otros azúcares, la adición de trehalosa disminuye la sensibilidad de



esta a la humedad y a la aglomeración. Esta propiedad, combinada con su estabilidad en procesos térmicos y durante el almacenamiento, así como su baja higroscopicidad, lo hace un protector de proteínas muy eficiente.

Al emplearse como aditivo en alimentos para regímenes especiales, las investigaciones preliminares sugieren que este edulcorante no elicitaba una alta respuesta a la insulina, por lo tanto puede ser digerido y absorbido lentamente y con velocidad más sostenida que otros azúcares, liberando energía que es fácilmente accesible para el organismo. La trehalosa tiene menor capacidad de producir caries que la sacarosa; no tiene el efecto laxante típico de otros edulcorantes no cariogénicos, como la fructosa.

Al ingerirse, la trehalosa se metaboliza como otros disacáridos (sacarosa, maltosa y lactosa) proporcionando 4 kcal/g; después de la ingestión se degrada enzimáticamente en el intestino delgado formando dos unidades de glucosa que se absorben y transportan igualmente que la glucosa monomérica.

## **USOS**

La trehalosa tiene una gama muy amplia de aplicaciones en productos alimentarios al emplear sus propiedades únicas de estabilidad al calor, ácido, congelamiento y propiedades no reductoras. El efecto preventivo de la trehalosa en la retrogradación del almidón prolonga la vida de anaquel de los productos alimentarios que contienen almidón, lo que la hace un aditivo ideal para productos de panadería y pastelería. Además, la trehalosa protege a los fosfolípidos, proteínas y geles frente a los daños por frío y durante los procesos de secado. Esta característica da excelentes resultados en la restitución de productos congelados y secados, tales como alimentos congelados o secos que contengan huevo, pescado o carne. La trehalosa suprime el sabor amargo/astringente a través de un efecto enmascarante, lo que ayuda a mejorar la calidad sensorial de productos. En goma de mascar, incrementa la persistencia del sabor.

En productos de confitería, como caramelos, chocolates, chiclosos controla el color evitando el oscurecimiento excesivo; no reacciona en condiciones de alta acidez

durante la fabricación de caramelos duros proporcionando características vítreas estables. En frutas y vegetales secos, no promueve oscurecimiento no enzimático durante el proceso de secado; proporciona un nivel muy bajo de dulzor y conservando el color del producto.

En los productos secados por aspersion actúa como acarreador de sabores debido a sus propiedades de formación de cristales. El reemplazo de azúcares reductores con trehalosa extiende la vida útil de los alimentos procesados cuando la principal reacción de deterioro es el oscurecimiento no enzimático. Además, conserva la textura de productos secos al proteger proteínas y lípidos. En lácteos y productos que contienen huevo evita los sabores producidos por caramelización y reacción de Maillard; evita aglomeración en productos lácteos secos, como los postres instantáneos.

Una patente americana describe a una bebida a base de trehalosa destinada a atletas o personas sujetas a regímenes altos de ejercicio físico, proporcionando el doble de glucosa que los alimentos glucosados (6,455,511). Por otro lado, una patente canadiense (2,089,241) y una americana (5,218,096) la describen para su uso en alimentos debido a su dulzor y rápida absorción por el intestino delgado.

Otro campo de procesamiento de alimentos en el que se argumenta el posible uso de la trehalosa es el de producción de cultivos iniciadores. Las bacterias ácido lácticas (BAL) se usan en la producción de quesos, yogurt, embutidos fermentados, masa agrias, coles agrias y otros productos. En muchos de estos procesos el cultivo, en forma seca o congelada, se añade directamente a la matriz alimentaria. El proceso empleado para secar BAL es el secado-congelado (liofilizado) un método costoso y lento. La levadura de panadería, por otra parte, se seca por lecho fluidizado. Se han empleado varios compuestos, entre otros la trehalosa, para aumentar la supervivencia de células sujetas a liofilización, pero no en lecho fluidizado. Champagne y Gardner (2001) evaluaron el efecto de trehalosa en la supervivencia de *Streptococcus thermophilus* secada por liofilización y por lecho fluidizado. La mayor supervivencia de esta bacteria secada en lecho fluidizado, tal

como se aplica en la producción comercial de *Saccharomyces cerevisiae*, sugiere que se puede usar también en cepas lácticas. Los autores sugieren la incorporación de trehalosa como una alternativa para la producción de iniciadores lácticos con alta viabilidad celular, o la selección de cepas iniciadoras con alta producción de este compuesto.

Se han desarrollado también aplicaciones de la trehalosa en los campos farmacéuticos y cosmético. En la industria cosmética, usando su propiedad para retener agua, se emplea en cremas. Se ha descrito también su posible uso en un sistema de diálisis peritoneal (patente americana 4,879,280) en el cual se menciona como uno de varios disacáridos que reemplazan a la glucosa; se argumenta que la trehalosa evita que se eleve la glucosa sanguínea. Una patente japonesa (6-70719) argumenta los beneficios de su uso como componente en formulaciones parenterales, principalmente por que se puede sujetar a temperaturas de autoclave sin sufrir oscurecimiento.

Se ha reportado que la trehalosa puede disminuir los síntomas de la enfermedad de Huntington en ratones. Esta enfermedad produce agregados de una proteína cerebral, la huntigtina, lo que produce falta de coordinación, pérdida de peso y muerte prematura. La acción de la trehalosa es reaccionando con esta proteína y evitando se agregación.

## **MECANISMO DE PROTECCIÓN DE ESTRUCTURAS BIOQUÍMICAS**

El efecto de la trehalosa como protector de membranas (liposomas, microorganismos, etcétera) y proteínas durante la congelación y el secado, ha sido objeto de un número considerable de publicaciones. En la célula de levadura, la trehalosa actúa como un osmoprotector. El mecanismo por el cual estabiliza a las moléculas a bajas humedades no ha sido dilucidado pero se sugieren dos hipótesis: la formación de puentes de hidrógeno entre el disacárido y las proteínas, reemplazando a las moléculas de agua y manteniendo la estructura terciaria; o la capacidad de la trehalosa de formar estructuras vítreas.

Pereira et al (2004) estudiaron el efecto de trehalosa en membranas, encontrando que minimiza el efecto destructor de las temperaturas elevadas, estabilizando la estructura de la bicapa en la membrana al interactuar con esta por puentes de hidrógeno. Sin embargo, las moléculas de agua en la superficie de la bicapa no se reemplazan completamente. El efecto protector se correlacionó con el aumento en el número de moléculas de trehalosa que se unen a tres o más moléculas lipídicas, manteniendo a estructura terciaria.

Otra causa de esta protección es la capacidad de la trehalosa de formar estructuras vítreas durante el secado, caracterizadas por su poca movilidad molecular. Cuando la cantidad de agua es suficientemente alta como para permitir que la trehalosa cristalice en un alto grado, tanto las enzimas como las levaduras son rápidamente inactivadas. Ya que la trehalosa cristaliza como dihidrato, se requieren 10.5% (base seca) de agua para que su cristalización sea completa.

## **PRODUCCIÓN INDUSTRIAL**

La trehalosa se produce a partir de almidones utilizando el proceso de conversión enzimático, denominado proceso Hayashibara, sujeto a la protección de una patente, (<http://www.cargill.com/sfi/tredesc.htm>) produciendo un polvo cristalino (dihidrato de trehalosa) con alta pureza.

Este aditivo ha tenido especial importancia para productores pequeños. En Europa, un grupo de compañías productoras de ingredientes menores ha promovido los beneficios potenciales del uso de trehalosa. En 2001 la Comisión Europea aprobó el uso de trehalosa en alimentos en la Unión Europea, seguido a esta aprobación ha sido la autorización por Estados Unidos, Taiwán y Corea en 2002. Los mayores productores de trehalosa son Cargill Foods<sup>MR</sup> (Estados Unidos), que comercializa Ascend<sup>MR</sup>, trehalosa a partir de almidón de maíz, y Amcan Ingredients<sup>MR</sup> (Francia). La trehalosa está considerado como sustancia GRAS (Generally Recognized as Safe); se puede aplicar en usos generales en alimentos como un aditivo de usos múltiples. El nivel de uso está limitado por las Buenas Prácticas de Manufactura (GMP).

## TREHALOSA DE ORIGEN MICROBIANO

A pesar de tener propiedades tan atractiva y ser producida por un gran número de microorganismos, como levaduras y bacterias, no se ha llevado a cabo la producción industrial de trehalosa a por métodos microbianos debido a su alto costo y al bajo rendimiento de producción. Sin embargo, la información reportada en la literatura indica que es altamente factible su producción por métodos biotecnológicos.

Las bacterias pueden usar trehalosa exógena como única fuente de carbono y energía, así como para sintetizar cantidades apreciables de este disacárido. La facilidad de acumular trehalosa es el resultado de un sistema genético complejo, que es regulado por la osmolaridad. Algunas micobacterias contienen trehalosa esterificada como componente estructural de la pared celular. En cambio, las levaduras y hongos no pueden crecer en trehalosa como única fuente de carbono, la cual parece jugar un papel doble: como reservorio almacenándose en células vegetativas y en estructuras reproductivas, y como metabolito del estrés (Argüelles, 2000). Varios autores han estudiado la producción de trehalosa de *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que Neves et al (1994) describieron la producción de trehalosa por *Humicola grisea* var. *thermoidea*.

Una propuesta interesante se expone en una tesis doctoral chilena (Padilla, 2004) en la que se describe una estrategia para la producción industrial de trehalosa, basada en cepas genéticamente mejoradas de *Corynebacteriu glutamicum*, una bacteria Gram-positiva capaz de sintetizar y excretar el disacárido. El programa de mejoramiento metabólico de dicha bacteria, descrito en esta tesis doctoral, se basó en dos enfoques de ingeniería metabólica: (1) la alteración de las rutas terminales de síntesis del disacárido a través de sobre-expresión de genes involucrados en su síntesis; y (2) el cambio del metabolismo central a través de modificaciones genéticas. Los enfoques descritos permitieron al autor aumentar significativamente la capacidad de síntesis de trehalosa por *Corynebacterium glutamicum*.

El metabolismo de la trehalosa se ha estudiado en varias cepas de levaduras. O'Connor et al (1996) estudiaron *Saccharomyces uvarum* durante la fermentación de mostos en un gradiente de gravedades específicas. La concentración máxima de trehalosa fue proporcional a la gravedad original del mosto; al incrementarse la gravedad del mosto se incrementó el contenido de trehalosa celular, lo que permitió concluir que es un osmoprotector. Este comportamiento fue el resultado de estrés osmótico.

Pataro et al (2002) estudiaron la acumulación de trehalosa en 86 cepas de levaduras aisladas de la producción de *cachaça*, aguardiente tradicional de Brasil. Todas las cepas (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *C. maltosa*, *Kloeckera japonica*, *S. exiguus* y *C. bombicola*) acumularon trehalosa, aunque las que mayor cantidad acumularon fueron *S. cerevisiae*. Los autores evidenciaron la relación a de estrés, en especial osmotolerancia, con la acumulación de trehalosa y viabilidad celular.

Hernández-López et al (2003) estudiaron la respuesta de *Saccharomyces cerevisiae* y la levadura criotolerante *Torulaspota delbrueckii* a estrés osmótico en postres y masas congeladas, así como su capacidad leudante (producción de dióxido de carbono). Las cepas de *T. delbrueckii* mostraron mejor capacidad leudante que las *Saccharomyces*, especialmente cuando se expusieron a choques hiperosmóticos en masas panaderas. *T. delbrueckii* no perdió su capacidad leudante durante los ciclos de congelado-descongelado. Esta característica se relacionó con la concentración y de trehalosa.

Los microorganismos que se encuentran naturalmente a temperaturas bajas desarrollan mecanismos de protección. Las levaduras presentan respuestas a choques térmicos cuando la temperatura de su medio disminuye, con un aumento dramático de la síntesis de trehalosa. Este hecho fue reportado por Pavlova et al (2001) quienes aislaron cinco cepas de la Antártica con alta producción de trehalosa: *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cryptococcus albidus* y *Cryptococcus laurentii* y *Candida oleophila*.



## CONCLUSIONES

Debido a sus capacidad funcional múltiple, la trehalosa se presenta como un aditivo alimentario interesante y factible de comercialización. Aunque el proceso industrial se basa en la conversión enzimática de almidones, los métodos biotecnológicos, estudiados hasta el momento a nivel experimental, son promisorios para ser escalado a nivel industrial.

## Bibliografía

Alves-Araujo, C; Almeida, MJ; Sousa, MJ; Leao, C (2004) Freeze tolerance of the yeast *Torulaspota delbrueckii*: cellular and biochemical basis. *FEMS Microbiology Letters* **240**(1):7-14

Argüelles, JC (2000) Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis *Arch Microbiol* **174**(4):217-24.

Cappaert, L; Larroche, C (2004) Behaviour of dehydrated baker's yeast during reduction reactions in a biphasic medium *Applied Microbiol Biotechnol* **64**(5):686-90.

Champagne, CP ; Gardner, NJ (2001) The effect of protective ingredients on the survival of immobilized cells of *Streptococcus thermophilus* to air and freeze-drying. *Electronic J Biotechnol* (online) **4** (3) <http://www.ejbiotechnology.info/content/VM4/issue3/full/4/bip/> accesado 10 el agosto de 2005.

Chi, Z; Liu, J; Ji, J; Meng, Z (2003) Enhanced conversion of soluble starch to trehalose by a mutant of *Saccharomycopsis fibuligera* sdu. *J Biotechnol* **102**(2):135-141.

D'Amore, T; Crumplen, R ; Stewart, GG (1991) The involvement of trehalose in yeast stress tolerance *J Ind Microbiol* **7**:191-196.

Gancedo, C; Flores, CL (2004) The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. *FEMS Yeast Research* **4**(4-5):351-359.



Gomes, FCO; Pataro, C; Guerra, JB; Neves, MJ; Correa, SR; Moreira ESA; Rosa, CA (2002) Physiological diversity and trehalose accumulation in *Schizosaccharomyces pombe* strains isolated from spontaneous fermentations during the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Can J Microbiol* **48**(5):399-406.

Guillou, V., Plourde-Owobi, L., Parrou, J.L., Goma, G., Francois, J. 2004. Role of reserve carbohydrates in the growth dynamics of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* **4**(8):773-87.

Hernández-López, MJ; Prieto, JA; Randez-Gi, F (2003) Osmotolerance and leavening ability in sweet and frozen sweet dough. Comparative analysis between *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast strains *Antonie Van Leeuwenhoek* **84**(2):125-34.

Hottiger, T; Schmutz, P ; Wiemken, A (1987) Heat induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae* *J Bacteriol* **169**:5518-5522.

Jules, M; Francois, J; Parrou, JL (2005) Autonomous oscillations in *Saccharomyces cerevisiae* during batch cultures on trehalose *FEBS J* **272**(6):1490-1500.

Kampinga, J; Colaco, C (2002) Composition for use in rehydration and nutrition during athletic exercise and methods of making same U.S. Patent 6 445 511.

O'Connor-Cox, ES; Axcell, BC (1996) Trehalose: as osmoprotectant and stress indicator compound in high and very high gravity brewing *J Amer Soc Brewery Chem* **54**(3): 149-154.

Padilla, L (2002) Aplicación de Técnicas de Ingeniería Metabólica al Mejoramiento de la Producción de Trehalosa por *Corynebacterium glutamicum*. Tesis doctoral. Pontificia Universidad Católica de Chile.

Parrou, JL; Jules, M; Beltran, G; Francois, J (2005) Acid trehalase in yeasts and filamentous fungi: localization, regulation and physiological function *FEMS Yeast Res* **5**(6-7):503-511.

Pataro, C; Guerra, JB; Gomes, F; Neves, MJ; Pimentel, PF; Rosa, CA (2002) Trehalose accumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeasts isolated from 24 h fermentative cycles during the production of artisanal Brazilian cachaça *Brazilian J Microbiol* **33**(3), Julio/Septiembre (versión

# **AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS Y OTROS COMPONENTES FUNCIONALES A PARTIR DE LEVADURA**

Jorge R. Wagner

Departamento de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes

Miguel A. Otero-Rambla

Dirección de Biotecnología, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)

## **INTRODUCCIÓN**

Partiendo de una suspensión de células de levadura, no es posible aislar productos de interés de forma individual, si no se elabora previamente un tratamiento adecuado de la biomasa. El tratamiento estará determinado en primera instancia, por la localización celular del componente de interés, es decir, si es un compuesto intracelular o por el contrario es un compuesto excretado de forma espontánea o inducida por la célula.

Los procesos básicos empleados en el aislamiento de un compuesto microbiano se muestran en el esquema de la Fig 1. Después de producida la biomasa, el fluido es procesado para facilitar las operaciones siguientes, esto es, se separan las células del medio fermentado.

Los métodos de separación más comunes son la centrifugación y la filtración.

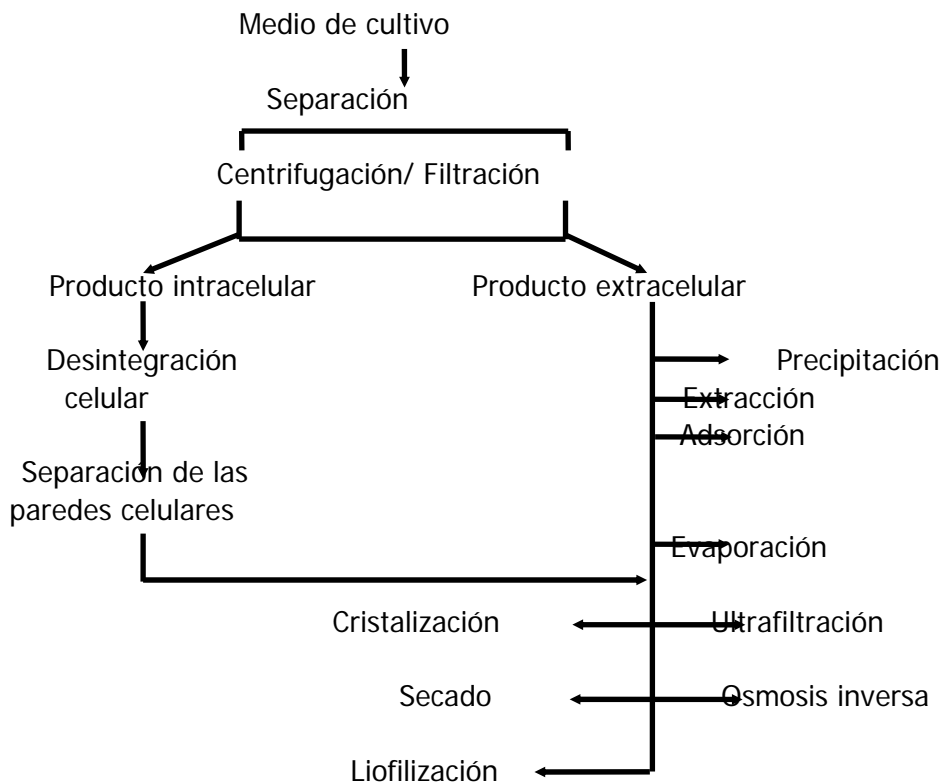
En el caso que nos ocupa, donde se pretende fraccionar una célula microbiana en la mayor cantidad de compuestos posibles, la etapa de desintegración celular deviene de singular importancia. Muchos productos tales como enzimas, proteínas recombinantes, lípidos etc, se obtienen por esta vía.

## **FRACCIONAMIENTO DE LEVADURAS**

Se han propuesto esquemas de fraccionamiento de levaduras a partir de autolizados frescos, sin embargo, la práctica común en la industria desarrolla procesos de obtención de los diferentes compuestos de forma aislada con una pobre eficiencia de utilización de la biomasa. En este tipo de procesos caen producciones de especialidades bioquímicas de alto valor agregado y elevadísimos precios como: glutatión, factor de tolerancia a la

glucosa, NADH, FMN, FADH<sub>2</sub>, enzimas como alcohol deshidrogenasa (ADH), glucosa isomerasa etc. Otras tendencias se encaminan a la obtención simultánea de aditivos para alimentos a partir de tecnologías más simples y sin implicar elevados grados de pureza como concentrados de proteínas, extractos de levadura y concentrados de polisacáridos de pared celular, y por último los esquemas diseñados para la obtención de tantos productos como sea posible obtener simultáneamente, por ejemplo invertasa, extracto de levadura, ergosterol, polisacáridos de pared, fosfolípidos de membrana, etc.

**Fig1 Esquema de operaciones empleadas en el aislamiento de productos microbianos**



### **OBTENCIÓN DE CONCENTRADOS O AISLADOS DE PROTEÍNAS DE LEVADURAS**

La pared celular de la levadura (ver capítulo 8) representa una resistente barrera que es preciso quebrar antes que los componentes intracelulares queden accesibles a su extracción y purificación. La reducción del contenido de ARN de los productos obtenidos

también es un objetivo a alcanzar. Para lograr por tanto la adecuada ruptura de la pared celular para permitir la extracción de proteínas y obtener estas proteínas en forma de aislados (contenido de proteínas cercano al 90%) o de concentrados (porcentaje de proteína aproximado al 70%) y con bajo nivel de ácidos nucleicos se han propuesto numerosos métodos.

La mayoría de los métodos descritos descartan el resto insoluble y proceden a precipitar las proteínas del sobrenadante. Estas proteínas son mayoritariamente nucleoproteínas (proteínas ligadas a proteínas ribosomales) por lo que su precipitación directa sin ningún tratamiento previo produce concentrados o aislados proteicos con alto contenido de nucleicos (superior al 10%). El insoluble resultante de la homogeneización-centrifugación posee una cantidad variable de manoproteínas dependientes de cual haya sido el pH de extracción. A partir de este insoluble es posible también obtener aislados por una solubilización a pH superiores a los empleados en la homogeneización inicial.

Robbins (1975) patentó un proceso de manufactura de proteína de levadura con un reducido contenido de ARN usando un medio alcalino y/o alta temperatura. Las células en suspensión son desintegradas en frío a 56 MPa, tratadas a pH 9.5 y 25-60 °C por un período de 20 minutos después del cual los restos de paredes celulares son eliminados por centrifugación. El extracto alcalino fue ajustado a pH 6-8 y calentado a temperaturas tan altas como 110-120 °C durante 2 a 60 minutos. Este tratamiento precipita las proteínas y la fracción intacta de ARN queda soluble en el sobrenadante alcalino. El tratamiento térmico también cumple la función de esterilizar el producto final el cual se somete posteriormente a un secado. El nivel de ARN final en el producto fue cerca del 2 %. El proceso de reducción de ARN puede también ser usado para recuperar un aislado proteico de levadura que contenga todo el ARN por haberse empleado pH 7, tratándola con el procedimiento alcalino descrito. En este caso el contenido final de ARN de los aislados fue del orden de 4 %.

Debe tenerse en cuenta que cuanto mayor es el pH del medio usado mayor es la posibilidad de que las proteínas sufran desnaturalización pero a su vez que más manoproteínas de la pared celular sean solubilizadas y pasen a formar parte del aislado

obtenido. Si lo que se desea es obtener un producto proteico que contenga las paredes celulares de las levaduras (glucanos, quitina y manoproteínas), el tratamiento alcalino es omitido. Los homogenatos de células rotas con aproximadamente 9 % de sólidos (se obvia la centrifugación) son tratados para reducir el contenido de ARN usando el mismo método alcalino descrito u otros enzimáticos o químicos.

Hedenskog y Ebbinghaus (1972) también usaron condiciones alcalinas para la remoción del ARN de *S. cerevisiae*. El tratamiento involucró la ruptura celular en presencia de perlas de vidrio a presión atmosférica después de lo cual el homogenato resultante se trata a pH 9. La eliminación de ARN se logró por tratamiento térmico del homogenato a 80 °C y enfriamiento posterior a 25 °C. Las proteínas precipitan y la fracción de ARN de alto PM queda en solución. El contenido final de ARN en el aislado obtenido resulta de 1-2 %. Cuando se adiciona NaCl al extracto alcalino se mejora la eliminación de ARN, pero se requieren temperaturas menores para lograr la precipitación eficiente de las proteínas.

Por su parte Newell (1975) empleó dos condiciones diferentes, alternando tratamientos con alto pH/baja temperatura y bajo pH/alta temperatura para reducir el contenido de ARN por debajo del 2%. Después de la ruptura celular a 0-10 °C y 56 MPa, el homogenato se trató a pH 9.5 a 60 °C por 60 minutos. Se eliminan las paredes celulares y los extractos resultantes son tratados a pH 10-10.5 y 75-85 °C por 1-4 horas o a pH 11.5-12.5 y 50-65 °C por 1-2h. La precipitación de proteínas en este método se logró por calentamiento pero a pH isoelectrico usando HCl o H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> para ajustar el pH. Las fracciones proteicas fueron lavadas y secas por spray.

Según los resultados de estudios más recientes (Otero y Cabello 1980, Otero et al 1996) sobre métodos de obtención de aislados, se los puede agrupar según las condiciones de operación en:

### ***Precipitación a pH alcalino y temperatura.***

Este método propone la desintegración previa de las células suspendidas (10 %) en agua por medio de un molino de bolas cargado con bolas de vidrio de 0.5-0.75 mm de diámetro. Una vez desintegradas las células, la suspensión se ajusta a pH 9 y se

adiciona NaCl hasta completar 5 %. La suspensión se calienta hasta 70 °C para precipitar la proteína, se diluye 5 veces y se centrifuga. La fase pesada contiene una pequeña cantidad de sustancia seca y el concentrado de proteínas posee 9 % de N (56 % proteína Kjeldahl) y 1.5 % de ARN. Este esquema posee varios inconvenientes relacionados con el producto el que queda impurificado con los desechos de paredes celulares que también sedimentan. Los rendimientos reportados son así mismo muy bajos. Por otra parte durante el molinado una parte pequeña de las bolas se quiebra y pasa al producto.

### ***Extracción alcalina en caliente***

El esquema propuesto consta de dos vertientes: pH bajo y alta temperatura (HTLA) y pH alto y baja temperatura (LTHA). En el proceso aplicado a *Candida utilis* las células se homogenizan a 54 MPa (homogenizador Manton-Gaulin) y temperaturas de 10°C. La homogenización se repite hasta tres veces. El medio se diluye y se ajusta pH a 9.5. El material se agita, calienta hasta 60°C y se centrifuga. El sobrenadante se utiliza para cualquiera de los dos tratamientos siguientes.

#### **■ LTHA**

El extracto alcalino se ajusta a pH 12 y se calienta por una hora a 60°C. Sin dejar enfriar, el pH se lleva a 4.5 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. La proteína precipitada, lavada y seca tiene 68.3% de proteína Kjeldahl, 1.9% de ácidos nucleicos, 12.2% de lípidos entre otros. El rendimiento es de 30%.

#### **■ HTLA**

El extracto se ajusta a pH 10-10.5 y se incuba por 4 horas a 80 °C. Se ajusta el pH a 4.5 y la proteína precipitada se lava y se seca. El producto final contiene 70 % de proteína, 1 % de ARN y 11 % de lípidos, siendo el rendimiento alcanzado de 19-20 %.

La suspensión de levadura (9 % de sólidos) se homogeniza tres veces a 54 MPa y el homogenato se diluye hasta 35 % de sólidos, se ajusta el pH a 9.5 y se calienta a 60 °C por 10 min. Se centrifuga y se obtiene un sedimento y un extracto alcalino. Este extracto, que contiene 92 % de las proteínas presentes, se neutraliza y se calienta a 120 °C por una hora y se separa en dos fracciones, la fracción proteica y el

sobrenadante rico en ARN. El precipitado contiene 85.1 % de proteína y 2.2 % de ARN, ambos expresados sobre peso seco.

Se debe ser cuidadoso con estos tratamientos pues si bien son efectivos para reducir el contenido de ácidos nucleicos, pueden tener efectos negativos sobre la funcionalidad y el valor nutricional de las proteínas aisladas de levadura. Es sabido que los tratamientos alcalinos provocan la formación de compuestos potencialmente tóxicos tales como la lisinoalanina y concomitantemente la disminución del contenido de lisina disponible; estos efectos son mayores cuanto mayor es el tiempo y al temperatura de tratamiento y cuanto mas alcalino es medio ( $\text{pH} > 9$ ). Por tal motivo algunos investigadores hay ensayado disminuir con éxito el contenido de ácidos nucleicos a través de modificaciones químicas en las proteínas de levadura tales como la succinilación, acetilación o citraconilación, lo cual trae aparejado también mejoras en algunas de sus propiedades funcionales (Kinsella y Shetty, 1979). Sin embargo, la seguridad nutricional, toxicológica y aceptabilidad de las proteínas modificadas no fue aun determinada. Dentro de las modificaciones químicas, una de las mas seguras es la fosforilación, la cual fue estudiada también por el grupo de investigación de Kinsella (Damodaran y Kinsella, 1984; Huang y Kinsella, 1986, 1987) y por Pacheco y Sgarbieri (1998) entre otros.

El método empleado por Damodaran y Kinsella (1984) para disociar las nucleoproteínas de levadura por fosforilación química fue aplicado sobre levadura de cervecera (*Saccharomyces ovarum*). Las células de levadura se lavaron 3 veces con agua destilada fría y se desintegraron con Dyno-Mill a 5 °C. El pH del homogenato se ajustó a 9 y se agitó la mezcla por 30 minutos a 5 °C. Se centrifugo a 15000 g por 30 minutos a 5 °C para remover los restos de pared celular y otros materiales insolubles. Las nucleoproteínas presentes en el sobrenadante se precipitaron a pH 4.2 y el precipitado (15000 g por 30 minutos) se dispersó en agua a pH 9 y se secó por atomización. La fosforilación de las nucleoproteínas aisladas de levadura se realizó sobre una dispersión acuosa 1 % usando oxiclورو de fósforo ( $\text{POCl}_3$ ) regulando el grado de fosforilación con la relación reactivo/proteína. Después de este tratamiento las proteínas se precipitan a pH 4.2 y se separan por centrifugación a 20000 g por 30 minutos; el precipitado es

lavado con agua a pH 4.2 y suspendido a pH 8.5. Con una relación  $\text{POCl}_3$ /proteína igual a 1 g/g, se logró reducir el contenido de ARN desde 21 % (nucleoproteínas iniciales) hasta aprox. 3-4 % con un rendimiento del 80 % sobre el total de proteínas.

## **MEJORAMIENTO DE LA FUNCIONALIDAD DE LAS PROTEÍNAS DE LEVADURA**

Las propiedades funcionales de las proteínas son aquellas propiedades fisicoquímicas que contribuyen con las características reológicas, de estabilidad y sensoriales de un alimento natural o que permite su utilización en la manufactura de alimentos formulados. Estas propiedades se pueden clasificar en propiedades de hidratación (dependientes de la interacción de la proteína con el agua: absorción y retención de agua, solubilidad, dispersibilidad), de estructuración (relacionadas con la interacción proteína-proteína, como son la gelificación, coagulación, formación de películas y fibras y dispersiones viscosas), de superficie (formación de emulsiones y espumas, retención de aromas, interacción con lípidos) y organolépticas (principalmente sabor, aroma, color y textura).

En contraste con la abundante literatura disponible sobre las propiedades funcionales de proteínas de otras fuentes (lácteas, cárnicas, vegetales) son relativamente pocos los estudios sobre las propiedades funcionales de proteínas de levadura. En estos estudios predominan los relacionados a proteínas de los géneros *Saccharomyces*, *Candida* y *Kluyveromyces* por ser estos organismos considerados de grado alimenticio.

La funcionalidad de las levaduras enteras está determinada por la superficie de la pared y de la membrana celular. La biomasa de levaduras enteras exhibe por lo tanto una pobre funcionalidad: son poco hidratables, presentan baja viscosidad, no forman geles, no exhiben capacidad de emulsionar ni espumar y en suma a esto tienen generalmente sabor y color no agradables. Estas características limita la utilización de las levaduras como ingrediente alimentario, excepto cuando la única finalidad es adicionarlas en baja concentración para la fortificación nutricional del alimento. No debe sorprender que la ruptura celular, que permite la liberación de las proteínas intracelulares, con o sin la separación de restos de pared celular, provea el principal material para obtener productos funcionales. Aun así, cuando las proteínas no son adecuadamente aisladas o



concentradas y sometidas a tratamientos para eliminar los ácidos nucleicos, sus propiedades no adquieren su máxima funcionalidad.

Los concentrados y aislados proteicos de levadura pueden adquirir propiedades funcionales comparables a las de preparados similares a partir de la soja cuando son adecuadamente modificadas (Gierhard y Potter, 1978, Guzmán-Juárez 1982).

La enorme variedad de especies proteicas en la biomasa de levadura hace difícil la predicción de los cambios estructurales o funcionales cuando son sometidas a diferentes procedimientos de extracción y purificación. El conocimiento de la relación existente entre esas propiedades estructurales y las funcionales (solubilidad, hidratación, gelación, emulsificación, espumado, etc.) son de importancia primaria en el diseño de diferentes tratamientos que promuevan la aparición de ciertas propiedades deseables.

En este sentido, la explotación más eficiente de la funcionalidad de los componentes de la levadura, pasa en primer lugar por la ruptura celular y a través de su separación eficiente del resto de la biomasa. Muchas de las proteínas citoplasmáticas son obtenidas en forma de nucleoproteínas (Kinsella 1986) por lo que se han desarrollado numerosos procesos para romper el complejo nucleoproteínico e incrementar así la funcionalidad proteica (Huang y Kinsella 1987, Otero et al 1996, Pacheco y Sgarbieri, 1998). Sin embargo, los procesos más eficientes para tal objetivo son térmicos, alcalinos o ambos, presentan a la vez el inconveniente de producir una desnaturalización muy acentuada que afecta la funcionalidad.

Según Kinsella (1986) la solubilidad de las proteínas se puede considerar una de las características funcionales más importantes, ya que muchas de las propiedades funcionales tales como gelación, emulsificación y formación de espuma depende de la solubilización inicial de la proteína en el medio. Comparativamente con otras proteínas tales como las de soja, suero lácteo, las proteínas de levadura son pobremente solubles en un rango de pH comúnmente usado en alimentos (pH 4-7). Como las proteínas de levadura para ser aisladas deben someterse a las células a una ruptura celular que consiste en un intenso trabajo mecánico acompañado con un cierto aumento de la temperatura; estas condiciones pueden inducir *per se* procesos de desnaturalización y

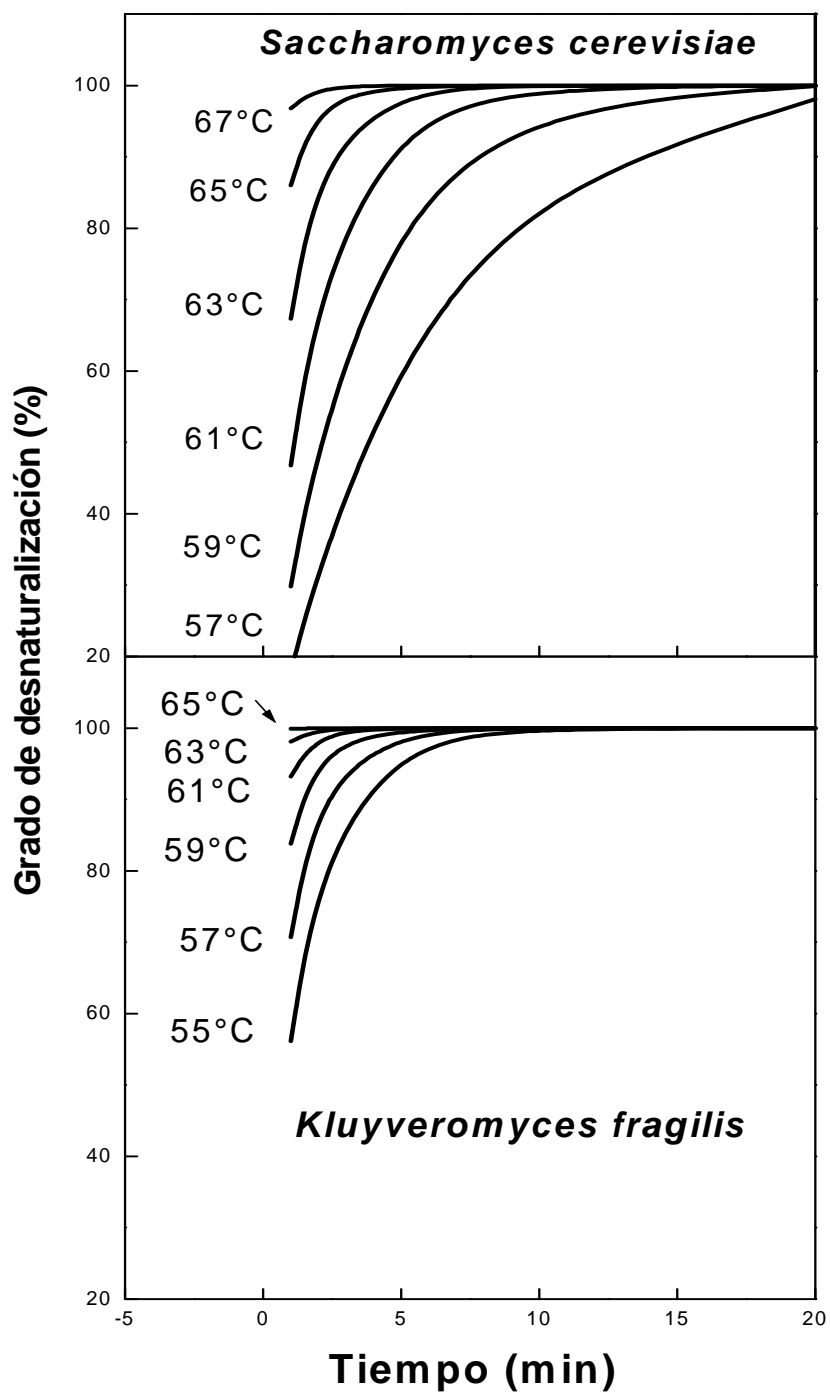
agregación dada la naturaleza hidrofóbica de las nucleoproteínas. Estos procesos se ven promovidos además por el aumento de temperatura durante el secado final.

Estudios realizados por Otero et al (2005) por calorimetría diferencial de barrido (DSC) permiten visualizar la baja estabilidad al calor que tienen las proteínas aisladas de levadura (*S. cerevisiae* y *K. fragilis*) comparativamente con las mismas proteínas en su medio celular.

Por el método de Ozawa (1970) se pudieron determinar parámetros termodinámicos y cinéticos de desnaturalización térmica de levaduras enteras (dispersión 30 % en agua). Para las proteínas en células enteras de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) la energía de activación de desnaturalización fue de  $63.8 \pm 1.25$  Kcal/mol, la cual es muy superior a las correspondientes a células enteras de *Kluyveromyces fragilis* (Kf),  $42.9 \pm 1.2$  Kcal/mol; lo mismo ocurre con el factor pre-exponencial de Arrhenius, que resultó ser  $3.23 \times 10^{41}$  y  $3.1 \times 10^{28} \text{ min}^{-1}$  para Sc y Kf respectivamente. Esto indica en principio una diferente estabilidad térmica de las proteínas constitutivas de ambas levaduras en su medio natural intracelular, que explicaría en principio la mayor labilidad térmica de las *K. fragilis*. Para estas últimas bastan sólo 5 minutos a 55 °C para provocar un grado de desnaturalización total en tanto que para provocar el mismo resultado en *S. cerevisiae* se necesitan 15 minutos a 59 °C. La Fig 2 muestra la variación del grado de desnaturalización de las proteínas de levadura en células enteras en función de la temperatura.

En la Tabla 1 se comparan las temperaturas y entalpías de desnaturalización de las proteínas de ambas especies, dentro de la célula entera y aisladas. Se hace evidente la diferencia ya mencionada entre Sc y Kf, pero además se puede ver que las proteínas aisladas de ambas levaduras presentan una temperatura de desnaturalización, en el orden de los 51-53 °C, mucho menor a la que exhiben las mismas en el medio celular. Dada la baja estabilidad de las proteínas Kf, durante su aislamiento se produce aprox. un 30 % de desnaturalización, reflejado por la disminución del  $\Delta H$ .

Fig 2 Labilidad térmica de las proteínas de diferentes especies de levadura



**Tabla 1 Entalpías de desnaturalización de proteínas de levadura en células enteras y aisladas de su medio natural**

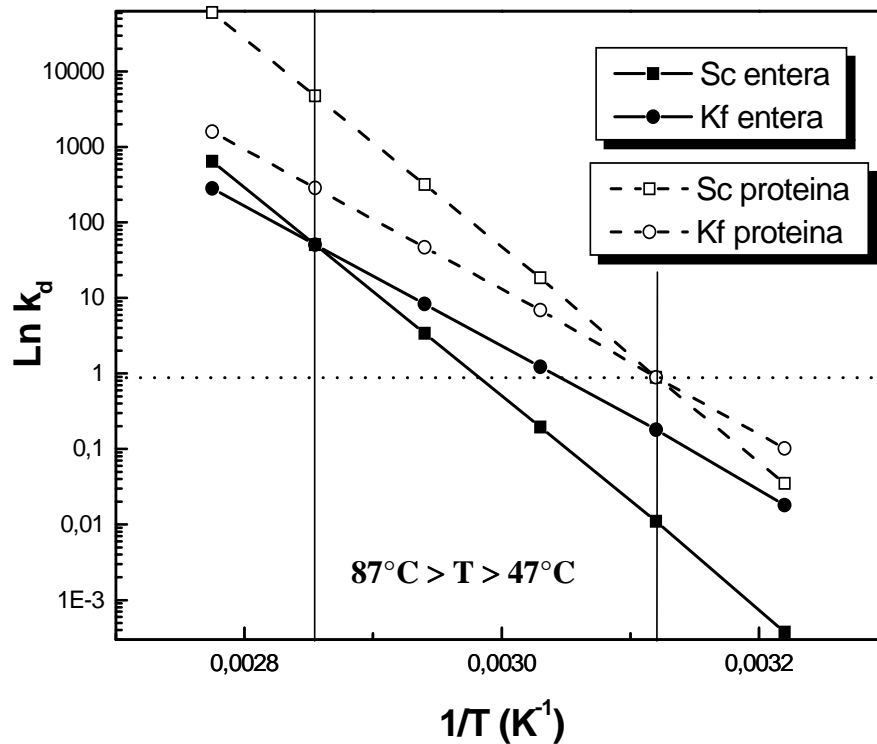
Levadura		$\Delta H$ (J/g proteína) <sup>b</sup>	T <sub>P</sub> (°C) <sup>a</sup>
Sc	Células enteras	16.8 ± 0.6	66.6 ± 0.1
	Proteínas aisladas <sup>c</sup>	17.0 ± 0.8	51.0 ± 0.3
Kf	Células enteras	13.6 ± 0.6	63.2 ± 0.3
	Proteínas aisladas <sup>c</sup>	10.05 ± 1.6	53.0 ± 1.6

a) Temperatura de pico endotérmico de desnaturalización a velocidad de calentamiento 10°C/min de dispersión acuosa al 30%; b) Energía de desnaturalización calculada como el área del pico endotérmico expresada en Joules respecto a la masa seca de proteína; c) Aisladas bajo condiciones que disminuyen su desnaturalización: control de temperatura durante la homogeneización, extracción pH 8-9, precipitación pH 4.5 y secado por liofilización.

Los parámetros termodinámicos de la desnaturalización de proteínas de Sc y Kf y las temperaturas de desnaturalización de las mismas se expresan en la Fig 3 que muestra las constantes cinéticas de desnaturalización térmica de las proteínas en células y aisladas.

Estos estudios nos señalan en principio que el solo hecho de aislar las proteínas de levadura de su medio celular, se les provoca una mayor sensibilidad térmica. Las proteínas aisladas de ambas levaduras tienen a 47 °C la misma constante de desnaturalización, la cual es equivalente a la que presentan las proteínas de Kf a 57 °C y las de Sc a 63 °C. Es interesante observar que temperaturas en el rango 50-65 °C son las empleadas para provocar la activación de nucleasas y/o proteasas celulares en procesos de autólisis, pueden resultar en bajos o altos grados de desnaturalización según sean el tiempo, condición del medio, tipo de levadura y grado de ruptura celular. Es sabido que las proteínas desnaturalizadas por incrementar su hidrofobicidad expuesta pueden aumentar su tendencia a la agregación y provocar una pérdida de solubilidad adicional.

**Fig 3 Determinación de las constantes cinéticas de la desnaturalización de las proteínas de levadura**



La necesaria reducción de ácidos nucleicos también puede resultar en desnaturalización proteica y modificaciones de la solubilidad y de otras propiedades funcionales dependiendo del método empleado para lograr tal fin. En un trabajo de Otero et al (2000) se estudió el efecto de tratamientos de incubación alternativos sobre homogenatos obtenidos a partir de Sc y Kf, las cuales contienen: % Proteína (Nx6.25) de  $41.3 \pm 1.5$  y  $50.76 \pm 1.8$  y % ARN de  $6.03 \pm 0.77$  y  $7.54 \pm 0.61$  respectivamente. Suspensiones de levaduras (150 g/l) se ajustaron a pH 9.5, homogeneizados a 50 MPa, diluidos a 100 g/l y centrifugados para remover restos de pared celular. El sobrenadante se sometió a diferentes tratamientos que se resumen en la Tabla 2, resultando aislados con los contenidos de proteínas y ARN mostrados en la Fig 4.

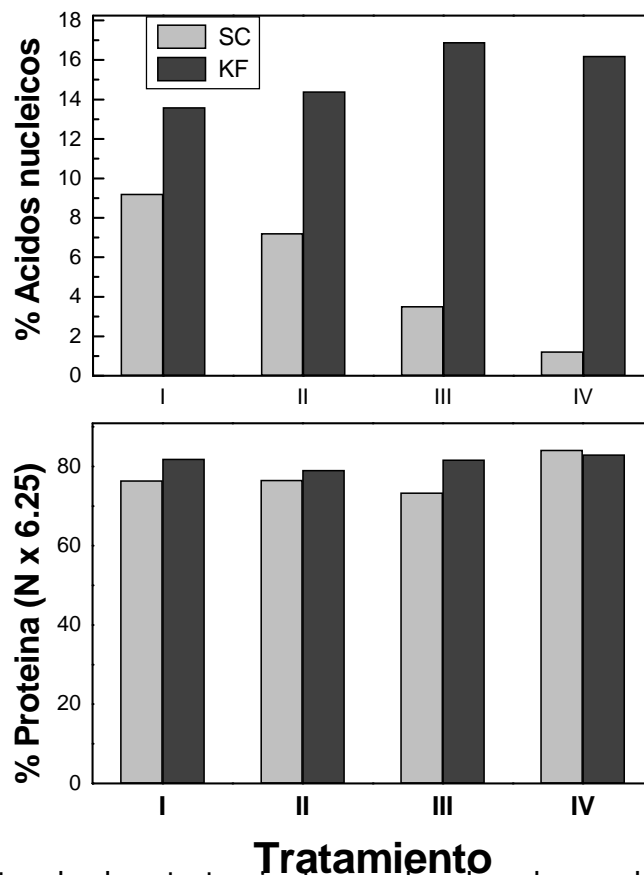
**Tabla 2 Tratamiento para evitar las pérdidas de proteína en la obtención de concentrados proteicos de levadura**

Muestra	Incubación	Precipitación
---------	------------	---------------

I	NO	pH 4,5 T amb
II	50°C, 1 h, EDTA	pH 4,5 T amb
III	50°C, 1h	pH 4,5 T amb
IV	50°C, 1h	pH 4,5 90°C 15 min

El empleo de EDTA es para inactivar proteasas (dependientes de iones divalentes).

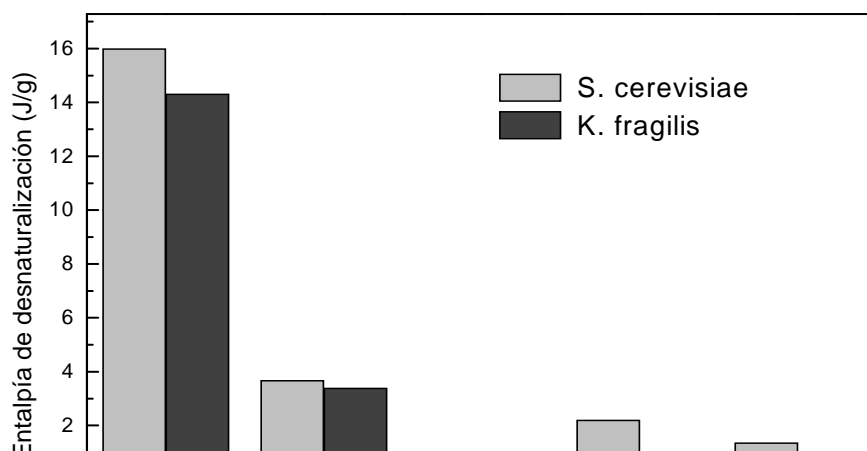
**Fig 4 Efectividad del EDTA en la preservación de proteínas durante la degradación enzimática de ARN**



Independientemente de los tratamientos y las levaduras de partida, los aislados obtenidos poseen un contenido de proteínas en el rango 75-83 %. Sin embargo, sólo en los aislados provenientes de Sc se ve reducido el contenido de ARN por efecto de la incubación a 50 °C (Fig 5). En Kf, posiblemente debido a una mayor sensibilidad térmica

específica de las nucleasas, estas fueron inactivadas durante la incubación, no observándose una disminución de ARN en los aislados. Los valores de temperatura y entalpía de desnaturalización de los aislados, como es esperable debido a la ruptura celular a que fueron expuestas las levaduras, se ven notablemente disminuidos, indicando un alto grado de desnaturalización, mas notable en Kf que en Sc. La solubilidad acuosa de los aislados rindió para Sc valores de 36.6, 24.2, 17.8 y 24.5% para los tratamientos I, II, III y IV respectivamente, en tanto que para los mismos tratamientos los derivados de Kf dieron 37.4, 27.9, 22.5 y 28.5% respectivamente; siendo todos ellos valores bajos de solubilidad. Las capacidades de retención de agua (WHC) y de absorción de agua (WIC) también dieron valores bajos para ambas levaduras (WHC=3.6-6.9 ml/g y WIC=1.6-3.9 ml/g) pero en el orden de los informados por otros autores para nucleoproteínas de levadura y aislados proteicos de soja, algodón y girasol. Los mismos autores realizaron un estudio sobre el efecto del pH y la presión ejercida durante la homogeneización para la ruptura celular (datos no publicados). Se pudo ver que variando el pH desde 5.5 (control) hasta 11.8 y la presión entre 44 y 56 Mpa, no se producían mejoras en las propiedades de hidratación de los aislados. Las capacidades de formar y estabilizar espuma eran en todos los casos inferiores a los valores informados para las mismas propiedades en aislados proteicos de soja (Sorgentini y Wagner, 2002; Wagner et al 1996), en tanto que la capacidad de estabilizar emulsiones (disminución de la coalescencia) se vio notablemente incrementada a pH altos (pH 10 y 11.8) y correlacionaba con altos valores de hidrofobicidad superficial.

**Fig 5 Temperaturas y entalpías de desnaturalización de proteínas de diferentes levaduras**



Un medio altamente alcalino puede promover tanto la ruptura de los complejos nucleoproteicos como provocar el desdoblamiento de las moléculas de proteínas permitiendo la exposición de grupos hidrofóbicos.

La modificación por fosforilación para disminuir el contenido de ARN de los aislados de proteínas de levadura, tiene también un efecto positivo sobre las propiedades funcionales. Una adecuada fosforilación de las nucleoproteínas de levadura con oxiclóruo de fósforo trae aparejado un incremento en la solubilidad, la capacidad de retención de agua y la viscosidad (Huang y Kinsella, 1986). Una fosforilación del 30 % de los residuos lisina de nucleoproteínas de levadura permite la preparación de fosfoproteínas de levadura (rendimiento 72 %, ARN 2.7 %) con más del doble de solubilidad en agua a pH 6-7 (respecto a las nucleoproteínas no fosforiladas) y un importante incremento de la capacidad de retención de agua desde 10 a 25 g agua/g proteína entre pH 6 y 7.7; contribuyendo esto último a incrementar la viscosidad. Según resultados de Pacheco y Sgarbieri (1998), es posible aumentar la solubilidad a pH 7 hasta más del 60 % si las proteínas de levadura son fosforiladas con trimetafosfato de sodio. En otro trabajo de Huang y Kinsella (1987) se informó que las proteínas



fosforiladas de levadura (con 30 % de fosforilación) tienen un índice de actividad emulsionante (EAI) bajo a pH 5, pero muy superior a las nucleoproteínas no fosforiladas entre pH 5.5 y 6.5, y que excede el exhibido por la seroalbúmina bovina (BSA) a pH 7. El valores de EAI a pH 6.5 fue de 109, en el el orden del obtenido con proteínas de suero de leche y muy superiores a los de aislados de soja. Las espumas elaboradas con las fosfoproteínas de levadura incrementan su estabilidad, dando un  $t_{1/2}$  de 9-13 minutos a pH 6.5-8.0, siendo estos muy superiores a los de las nucleoproteínas no fosforiladas y de la BSA (inferiores a 3 en el mismo rango de pH). En relación a la digestibilidad, esta no varió significativamente con la fosforilación, indicando ausencia de inhibición. Las proteínas fosforiladas fueron tan o más fácilmente digeridas por pepsina y pancreatina que la caseína.

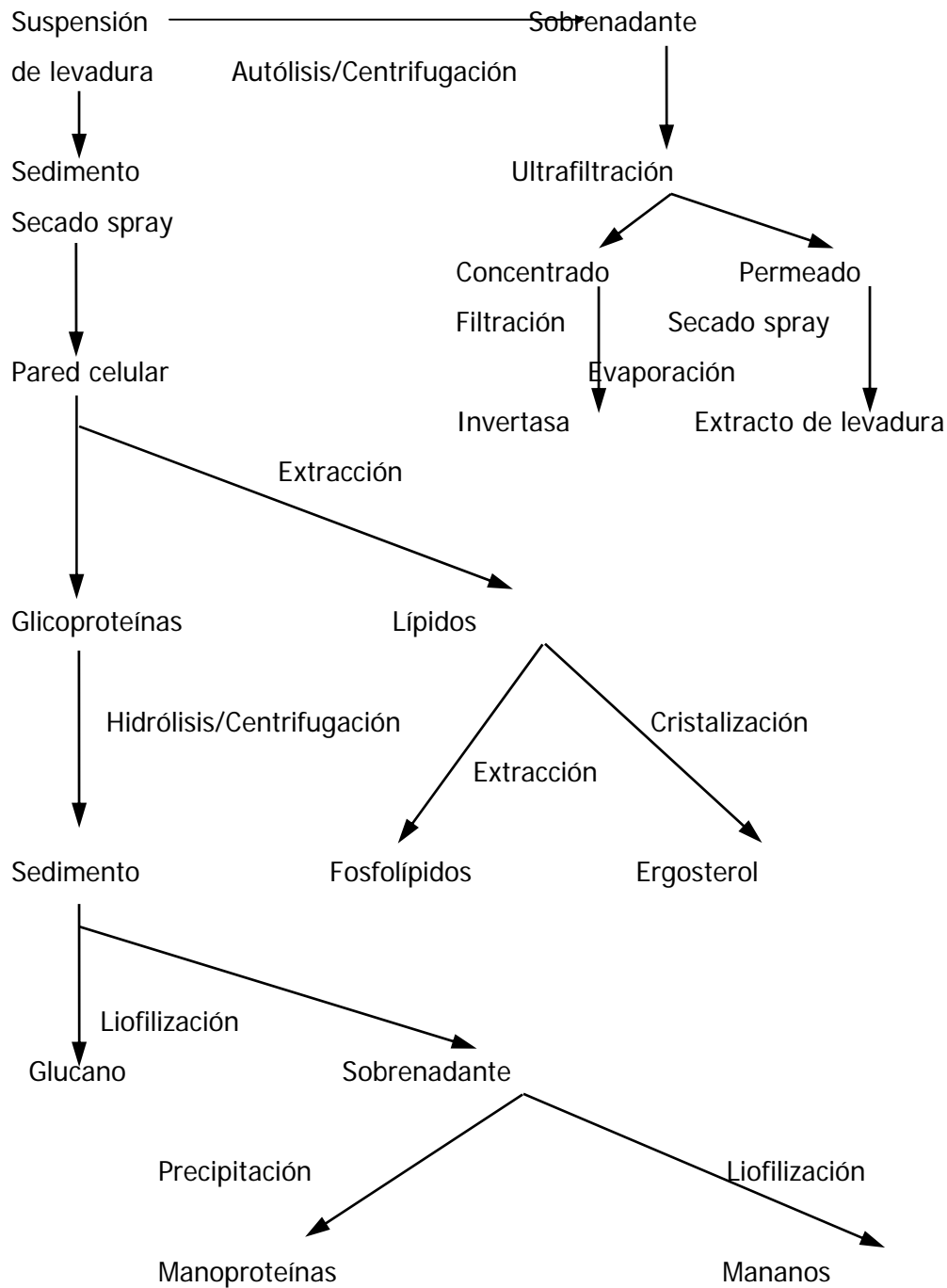
En el proceso de preparación de las aislados o concentrados proteicos de levadura en general, se descarta la fracción insoluble que contiene restos de las paredes celulares. La pared celular contiene además de los glucanos y quitina, proteínas glicosiladas, las denominadas manoproteínas. Freimund et al (2003) informó que la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* está compuesta por 39-56 % de polisacaridos (principalmente glucanos and mananos), 20-29 % proteínas (libres o como manoproteins) y 11-13 % de lípidos. La extracción ácida/alcalina de la pared celular de *S. cerevisiae* resulta en tres fracciones (Manner y Meyer, 1977). Una primera fracción soluble en álcali que contiene (1,3) $\beta$ -glucanos, algunos (1,6) $\beta$ -glucanos y mananos ligados a proteínas (manoproteínas); una segunda fracción insoluble en álcali e insoluble en ácido de (1,3) $\beta$ -glucanos ligados a quitina; y por último una fracción (1,6) $\beta$ -glucanos insoluble en álcali pero soluble en ácido. Trabajos recientes muestran que las manoproteínas de pared celular, ya sean obtenidas a partir de pared celular por solubilización alcalina (Otero et al 2005) o extraídas con sucesivas esterilizaciones de dispersiones de levaduras enteras, se comportan como excelentes bioemulsificantes (Cameron et al 1988; Barriga et al 1999) que pueden tener aplicaciones como aditivos en alimentos. Este emulsificante puede ser separado analíticamente por electrofóresis capilar en dos componentes mayoritarios denominados  $\alpha$  y  $\beta$  (Barriga et al 1999). El componente  $\alpha$  posee altos valores de actividad interfacial y capacidad emulsificante y fue identificado

como manoproteína de pared celular con una alta relación proteína-carbohidrato si se lo compara con el componente  $\beta$ . Este último en cambio, tiene una alta proporción de carbohidratos con un bajo contenido de proteína, es muy soluble en agua y exhibe una baja actividad superficial, pero puede contribuir a la estabilidad de las emulsiones.

### **FRACCIONAMIENTO DE LEVADURAS A PARTIR DE AUTOLIZADOS**

Un esquema general para el fraccionamiento multicomponente de extracto de levadura panadera se puede ver en la Fig 6.

**Figura 6 Fraccionamiento de levadura autolizada**



Después de autolizada la suspensión de levadura, proceso que se realiza a 50 °C en presencia de NaCl y etanol por 24 horas, la suspensión se centrifuga de inmediato. El sobrenadante se somete a un proceso de ultrafiltración y el concentrado, conteniendo la

enzima invertasa, se filtra a vacío y se evapora. El permeado, se seca directamente por atomización y se obtiene extracto de levadura en polvo.

El sedimento de la centrifugación se lava y se seca. Esta etapa de secado puede obviarse y proceder a las extracciones siguientes a partir de las células húmedas. La extracción con etanol al 95% rinde la fracción lipídica que se extrae 3-4 veces con n-hexano para obtener el ergosterol que se cristaliza a 2 °C después de la evaporación.

Los fosfolípidos se aíslan de residuo de la extracción de ergosterol. Los solventes se evaporan y el concentrado se diluye en una solución de 50 % de acetona en agua. La mezcla se agita mecánicamente y la espuma formada rinde una fracción que contiene 70 % de fosfolípidos. El sedimento remanente de la extracción de los lípidos es la fuente de  $\beta$ -glucanos, los que se aíslan por tratamientos sucesivos con álcali y ácido a 100 °C. Del extracto alcalino se pueden aislar las manoproteínas por precipitación a pH 4.5 y el líquido remanente se precipita con etanol rindiendo una fracción rica en mananos.

El fraccionamiento propuesto solo ha sido llevado hasta nivel de planta piloto, sin embargo, prospectivamente presenta aspectos muy interesantes en cuanto a producciones versátiles que pueden compensar los elevados costos de producción. La accesibilidad al mercado para la realización comercial de estos productos es el punto neurálgico de esta tecnología.

## BIBLIOGRAFÍA

Cameron, DR; Cooper, DG; Nufeld, RJ (1988) The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier *Appl Environ Microbiol* **54** (6):420-1425.

Damodaran, S; Kinsella, JE (1984) Dissociation of yeast nucleoprotein complexes by chemical phosphorylation *J Agric Food Chem* **32**:1030-1037.

Freimund, S; Sauter, M; Kappeli, O; Dutler, H (2003) A new non-degrading isolation process for 1,3-β-D.glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Carbohydr Polymers* **54**:159-171.

Gierhart, D.; Potter, NN (1978) Effect of ribonucleic acid removal methods on composition and functional properties of *Candida utilis* *J Food Chem* **43**: 1705-1713.

Guzmán-Juárez, M (1982) Yeast proteins. In: Development in Food Proteins-2. (Hudson, BJF ed) Applied Science Publishers, London, Chapter 7, pp. 263-291.

Hadenskog, G; Ebbinghaus, L (1972) *Biotechnol Bioeng* **14**:447.

Huang, YT; Kinsella, JE (1986) Functional properties of phosphorylated yeast protein: solubility, water holding capacity and viscosity *J Agric Food Chem* **34**:670-674.

Huang, YT; Kinsella, JE (1987) Effect of phosphorylation on emulsifying and foaming properties and digestibility of yeast proteins *J Food Sci* **52**:1684-1688

Kinsella, JE (1986) Functional properties from yeast nucleoprotein for uses. Methods for isolation. In *Food Biochemistry* (Knorr, D ed) pp. 363-391. Marcel Dekker, New York.

Kinsella, JE ; Shetty, KJ (1979) Chemical Modification for Improving Functional Properties of Plant and Yeast proteins. In "Functionality and Protein Structure" (Pour-el, A ed) ACS Sym. Sr. 92, p 37 Amer. Chem. Soc. Washington, DC

Kollar, R; Sturdik, E; Sajbidor, J (1992) Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass *Food Biotechnol* **6**:225-231

Manner, DJ; Meyer, MT (1977) The molecular structures of some glucans from the cell walls of *Schizosaccharomyces pombe*. *Carbohydrate Research*, **57**:189-203.

Newell, JA (1975) US Patent 3.991.215.

Otero, MA; Vasallo, MC; Verdecia, O; Fernández, VM; Betancourt, D (1996) A process for the complete fractionation of baker's yeast *J Chem Technol Biotechnol* **67**: 67-71

Otero, MA; Wagner, JR; Vasallo, MC; Añón, MC; Jiménez, JC; López, JC (2002) Thermal denaturation kinetics of yeast proteins in whole cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis* *Food Sci Technol Int* **8** (3):163-167.

Otero, MA; Wagner, JR; Vasallo, MC; García, L; Añón, MC (2000) Thermal behavior and hydration properties of yeast protein from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis* *Food Chem* **69**:161-165.

Otero, MA; Cabello, AJ (1980) SCP low in nucleic acids by alkaline treatment. *Biotechnol Letters* **2**:379-384.

Ozawa, T (1970) Kinetics analysis of derivative curves in thermal analysis. *J Thermal Analysis* **2**:301-324.

Pacheco, MTB; Sgarbieri, VC (1998) Hydrophilic and rheological properties of brewer's yeast protein concentrates *J Food Sci* **63** (2):238-243.

Robbins, EA (1975) US Patent 3887431.

Shay, LK (1981) Process for making SCP having a low nucleic acid content UK Pat Appl GB 2 078 754 A

Sorgentini, DA; Wagner, JR (2002) Comparative study of foaming properties of whey and isolate soybean proteins *Food Res Int* **35**:721-729

Torabizadeh, H; Shojaosadati, SA; Tehrani, HA (1996) Preparation and characterization of bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* and its application in food products *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* **29**: 734-737.

Vasallo, MC; Puppo, MC; Palazolo, GG; Otero, MA; Beress, L; Wagner, JR (2005) Cell wall proteins of *Kluyveromyces fragilis*. Surface and emulsifying properties. Manuscript YFSTL\_133. *J Food Sci Technol/Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. En prensa.

Wagner, JR; Sorgentini, DA; Añón, MC (1996) Thermal and electrophoretic behavior, hydrophobicity, and some functional properties of acid-treated soy isolates *J Agric Food Chem* **44**:1881-1889



electrónica).

Pavlova, K; Grigorova, D; Hristozova, T; Angelov, A (2001) Yeast strains from Livingston Island, Antarctica *Folia Microbiol* (Praga) **46**(5):397-401 (versión electrónica).

Pszczola, DE (2002) Exploring novel flavor and health *Food Technol* **56**(5):34-90.

Mansure, JJC; Panek, AD; Crowe, LM; Crowe, JH (1994) Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. *Biochim Biophys Acta* **1191**:309-316.

Neves, MJ; Francois, J (1992) On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **288**:859-864.

Neves, MJ; Terenzi, HF; Leone, FA; Jorge, JA (1994) Quantification of trehalose in biological samples with a conodial trehalase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. thermoidea *World. J Microbiol Biotechnol* **10**:17-19.

Nishida, O; Kuwazaki, S; Suzuki, C; Shima, J (2004) Superior molasses assimilation, stress tolerance, and trehalose accumulation of baker's yeast isolated from dried sweet potatoes (hoshi-imo) *Biosci Biotechnol Biochem* **68**(7):1442-1448.

Novo, MT; Beltrán, G; Rozes, N; Guillamon, JM; Mas, A (2005) Effect of nitrogen limitation and surplus upon trehalose metabolism in wine yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* **66**(5):560-566.

Ribeiro, MJS; Leao, LSC; Morais, PB; Rosa, CA; Panek, AD (1999) Trehalose accumulation by tropical yeast strains submitted to stress conditions *Antonie van Leeuwenhoek* **75**:245-25.

Rolim, MF; de Araujo, PS; Panek, AD; Paschoalin, VM; Silva, JT (2003) Shared control of maltose and trehalose utilization in *Candida utilis*. *Brazilian J Medical Biological Res* **36**(7):829-337 <http://membros.lycos.fr/amcaningredients/pages/trehalo1.htm>

accesado el 23 de Mayo de 2004

<http://www.rec.uba.ar/ubacyt/> accesado 25 de mayo de 2004

<http://www.cargill.com/sfi/tredesc.htm> accesado el 26 de Mayo de 2004