

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



COMPARACION DE LOS RENDIMIENTOS DE AUTOLISIS DE LAS
LEVADURAS *Condida utilis* y *Saccharomyces cerevisiae*,
UTILIZADAS EN LA OBTENCION DE ADITIVOS
ALIMENTICIOS.

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
LAURA BEATRIZ MOLINA ZUÑIGA

GUADALAJARA, JALISCO, ENERO DE 1994



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Expediente
Número
Sección

C. LAURA B. MOLINA ZÚNIGA
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis "COMPARACION DE LOS RENDIMIENTOS DE AUTOANÁLISIS DE LAS LEVADURAS *Candida utilis* y *Saccharomyces cerevisiae*, UTILIZADAS EN LA OBTENCIÓN DE ADITIVOS ALIMENTICIOS" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el M. en C. Fernando Antonio Peraza Luna.

A T E N T A M E N T E

"PIENSA Y TRABAJA"

Guadalajara, Jal., 2 de Noviembre de 1993

EL DIRECTOR

DR. EULOGIO PIMENTEL BARRIOS



FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

EL SECRETARIO

M. EN C. MA. GEORGINA GUZMAN GODINEZ

c.c.p.- El M. en C. Fernando Antonio Peraza Luna, Director de Tesis.-pte.

c.c.p.- El expediente del alumno

Al contestar este oficio ctesee fecha y número

C. Dr. Eulogio Pimienta Barrios.

Director de la Facultad de Ciencias Biológicas
de la Universidad de Guadalajara

P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted
que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó la Pasante
Laura Beatriz Molina Zúñiga código número 084705411
con el título COMPARACION DE LOS RENDIMIENTOS DE AUTOLISIS DE LAS
LEVADURAS Candida utilis y Saccharomyces cerevisiae, UTILIZADAS EN LA
OBTENCION DE ADITIVOS ALIMENTICIOS.
consideramos que reúne los méritos necesarios para la impresión de la
misma y la realización de los exámenes profesionales respectivos.

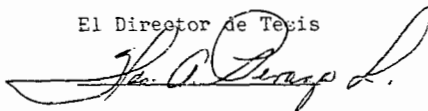
Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

A T E N T A M E N T E

Guadalajara, Jal. a 21 de Enero

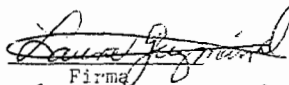
1994

El Director de Tesis

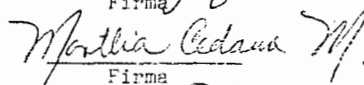


SINODALES

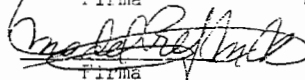
- 1.- Laura Guzman
Nombre completo
- 2.- Martha Cedano
Nombre completo
- 3.- Refugio Mora
Nombre completo



Firma



Firma



Firma

**COMPARACION DE LOS RENDIMIENTOS DE AUTOLISIS DE LAS LEVADURAS
Candida utilis y *Saccharomyces cerevisiae*, UTILIZADAS EN LA OBTENCION DE
ADITIVOS ALIMENTICIOS**

Pasante de Biología: LAURA BEATRIZ MOLINA ZUÑIGA

El presente trabajo fue realizado en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C. (CIATEJ), en el departamento de microbiología y Fermentaciones, de la División de Biotecnología, con la dirección del M. en C. Fernando A. Peraza Luna.

Asesores: (Asignados por la Facultad)

- 1.- Martha Cedano Maldonado.
- 2.- Laura Guzman
- 3.- Ma. Del Refugio Mora

AGRADECIMIENTOS

A Dios...

Por darme la vida y por estar siempre conmigo.

A mi abuelita y mi hermano...

Por su paciencia y amor.

A mis maestros...

A quienes hoy debo lo que soy.

A mis compañeros de la Facultad...

Con quienes compartí los mejores momentos de estudiante, en especial a Rosalba, Oiga y Sergio.

A mis amigos...

Con quienes he vivido lo mejor de la vida, por su amistad y su presencia cuando más los necesite en especial a Claudia, Lucero, Raquel, Nacho, Osbaldo y David.

A el M. en C. Fernando Peraza...

Por su dedicación y apoyo para la elaboración de este trabajo.

A la Técnica en alimentos Ma. Del Socorro Morales...

Por su valiosa ayuda en la realización de los análisis bromatológicos.

Al personal de el laboratorio de Microbiología y Fermentaciones...

En especial a Esther Leos por su amistad y ayuda en el fotocopiado.

A mis Sinodales...

Las Maestras Martha Cedano, Laura Guzman, y Refugio Mora por su ayuda en la readcción de la tesis.

A Coki...

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco...

Por todas las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mi mamá...

Por su gran sacrificio y esfuerzo para darme una profesión y así lograr una de mis metas. Sobre todo gracias por ser más que una madre, una gran amiga.

A ti...

Que eres algo tan importante en mi vida... y a quien debo los mejores momentos. Gracias por estar conmigo... Arturo Arana López.

INDICE

	Página.
I. INTRODUCCION.	1
II. ANTECEDENTES.	11
III. JUSTIFICACION.	15
IV. HIPOTESIS.	16
V. OBJETIVOS.	17
VI. MATERIALES Y METODOS.	18
VII. RESULTADOS.	31
VIII. DISCUSION.	37
IX. CONCLUSION.	44
X. RECOMENDACIONES.	45
XI. TABLAS.	46
XII. FIGURAS.	58
XIII. BIBLIOGRAFIA.	83

RESUMEN

El presente estudio especifica las condiciones en que se lleva a cabo la autólisis de la levadura, con los máximos rendimientos hidrolíticos, evaluando también la manera en que los autolizados pueden conservar sus propiedades funcionales de manera estable.

A nivel laboratorio, se comparó la velocidad de crecimiento de dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, BCGC L-026 y la BCGC L-024, presentó una mayor velocidad de crecimiento la BCGC L-026. Esta cepa se utilizó, junto con *Candida utilis*, en un proceso de autólisis bajo las siguientes condiciones: temperatura de 35° a 55°C con un tiempo de 14 a 18 horas. Se obtuvo como resultado mayor rendimiento con la levadura *S. cerevisiae* (BCGC L-026).

Se realizaron pruebas microbiológicas para verificar el buen manejo de la levadura durante el proceso, en las que no se observó la presencia de ningún microorganismo contaminante que pudiera alterar el producto.

I. INTRODUCCION.

La alimentación es considerada un factor clave para la sobrevivencia y desarrollo de los seres vivos. Dentro de este contexto tan general, cabe mencionar, que desde 1914 las levaduras, han sido utilizadas como fuente de proteínas y vitaminas, con lo cual han contribuido a satisfacer necesidades básicas de la alimentación humana.¹⁴ Sin embargo, dado que sus costos de producción no han podido competir con los de la soya, su atractivo como producto proteico ha decaído, aunque actualmente se continúan las investigaciones con otros fines.²⁶

Los alimentos de alta calidad para el hombre, son los de mayor demanda y también los más perecederos. Pero afortunadamente, los alimentos perecederos se pueden hacer estables y aceptables mediante la aplicación juiciosa de la tecnología actual. Un producto alimenticio además de estar en buen estado, debe cumplir con ciertas características que harán del alimento un producto de alta calidad. Estas características son constituidas por el sabor (olor y gusto), color, apariencia o textura. Dichos atributos juegan un papel importante en la aceptación o rechazo de un producto por el consumidor.²²

La sociedad actual utiliza extensamente los aditivos alimenticios para mejorar o incrementar la calidad de un alimento y el uso de los mismos se remonta hasta la época prehistórica, cuando la civilización de entonces añadía sustancias químicas a los alimentos, al ahumar o salar la carne. Estos **aditivos alimenticios**, son sustancias que añadidas al alimento se convierten en un componente del mismo o que transforma sus características.⁵ El **extracto de levadura** (término usado como sinónimo de autolizado),²³ es un importante ingrediente o aditivo alimenticio que contribuye a potenciar o realzar el sabor y aroma a sopas, salchichas, longanizas, carne, salsas, alimentos del mar, vegetales así como en

la fabricación de alimentos para perros, gatos, caballos, peces, crustáceos y rotíferos. En la industria alimentaria, el papel principal de un extracto de levadura es de dar "sabor" ^{12, 29} y desde este punto de vista, es bastante fácil percibir los efectos económicos de los extractos de levadura, dado que gradual y rápidamente llegaran a sustituir a los aditivos sintéticos o artificiales, principalmente porque se ha reconocido su valor como "nutrimentos."²⁶

Históricamente los saborizantes han sido y seguirán siendo el grupo más grande de aditivos agregados intencionalmente a los alimentos. Los saborizantes de levadura, por su alto valor agregado, se han planteado como una alternativa actual y futura para la utilización principal de levadura primaria. Desde luego que como saborizante natural, su disponibilidad estará limitada por las necesidades comerciales y posibles restricciones de normatividad.

Puede señalarse sin embargo, que los saborizantes continuarán con una tendencia futura ascendente. Estadísticas de consumo realizadas han indicado que la demanda anual de los sabores naturales sería duplicada para 1990, con respecto a la demanda de 1986. Entre sus múltiples facetas, el desarrollo biotecnológico actual permite prever cambios positivos hacia el fortalecimiento de la industria de los saborizantes de levadura.²⁶

I.A. AUTOLIZADOS DE LEVADURAS.

La hidrólisis de las proteínas se originó en el este de Asia, en países como Japón, China o Indonesia en donde por muchos siglos los procesos de fermentación se han usado para preservación y/o para modificación del sabor de pescado y carne. En Estados Unidos el interés industrial en hidrolizados de proteína crece después del descubrimiento en 1908 del "glutamato monosódico" (GMS), saborizante contenido

en los hidrolizados de proteína. En la industria europea la producción de hidrolizados de proteína se inició alrededor de 1886. La primera producción estuvo basada en la elaboración de una alternativa del extracto de carne. La mayor experiencia en la producción y uso de los hidrolizados de levadura ha sido principalmente con *Candida utilis*,²⁶ debido a que es capaz de crecer en hexosas, pentosas y en desechos o subproductos industriales como: licores sulfúricos y melazas.

La fabricación de autolizados de levadura se ha desarrollado debido a la rápida velocidad de propagación de los microorganismos, a la diversidad de substratos que se pueden emplear, a que su producción no depende de las condiciones climáticas, y a los mínimos requerimientos de terreno. Como aditivo de sabor los extractos de levadura son más económicos que los extractos de carne ó pescado usados comúnmente. Su disponibilidad en nuestro país es relativa, ya que sólo existe una empresa dedicada a su producción industrial a partir de levadura residual (levadura secundaria), proveniente de la industria cervecera ubicada en Irapuato, Guanajuato y otra más en el estado de Querétaro, la cual al parecer aún no se encuentra en operación.²⁹ En la tabla 1 se mencionan algunas empresas dedicadas a la producción de extractos de levadura a nivel mundial.

Los autolizados hacen dos cosas:

1) Aumentan la potencia del sabor (potenciador):

Su acción se debe a su contenido de algunos potenciadores del sabor, como el GMS (glutamato monosódico), nucleótidos y sustancias amplificadoras del sabor, que resaltan, intensifican y acentúan los tonos de sabor a carne además de aumentar el nivel de percepción de sabores imperceptibles en forma normal.

2) Proporciona un sabor y aroma característico (aditivo de sabor).

Los autolizados se obtienen preferentemente de levadura primaria (levadura de pan) o levadura de cerveza desamargada (*Saccharomyces cerevisiae*). En procesos autolíticos actualmente desarrollados en Cuba, de acuerdo a Michelena y Rodríguez,¹⁸ se utiliza *Candida utilis*. El precio y calidad de los autolizados depende tanto de la fuente de levadura como del grado de proteólisis y otras variables del proceso.²⁶

Las levaduras, particularmente *S. cerevisiae* son fuentes excelentes de enzimas, coenzimas y otros componentes biológicos usados en la investigación bioquímica y en medicina; siendo algunos de estos: enzimas de la ruta glucolítica y del ciclo del ácido cítrico, los citocromos, el dinucleótido de adenina nicotinamida (NAD) y su fosfato (NADP), los ésteres de ácido fosfórico de adenosina (AMP, ADP, ATP), el ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), adenina, guanina, citidina y uracilo, así como también vitaminas y aminoácidos. Gran parte de estos componentes están localizados en el citoplasma de las levaduras, por lo que al morir la célula y destruirse la membrana semipermeable, los compuestos solubles se difunden a través de la pared celular, pero las unidades de alto peso molecular quedan retenidas en el interior de la célula.²⁸

La obtención de buenos rendimientos de autólisis está en función de la capacidad de recuperar, mediante el rompimiento de la pared celular, la mayoría de los componentes celulares. La utilización de métodos mecánicos para tal fin resultan imprácticos, debido al costo elevado de operación a escala industrial. Para una producción comercial de extractos de levadura, se han aplicado otros métodos cuya aplicación se basa en la hidrólisis de los compuestos insolubles de alto peso molecular, que puedan difundir a través de la pared celular. En general estas

técnicas se clasifican como procesos autolíticos e hidrolíticos.²⁶

El proceso autolítico más utilizado consiste en llevar a cabo un calentamiento de las levaduras a una temperatura a la cual la célula es destruida por una alta actividad enzimática ó puede ser provocada por agentes plasmolíticos como: sal, cloroformo, etil-acetato, etc., que tienen efectos en la permeabilidad celular. La composición comercial del autolizado varía ampliamente dependiendo del aumento de sal, el grado de autólisis y la adición de glutamato monosódico y nucleótidos.²⁵

Los autolizados tienen mucho sabor por las propiedades organolépticas de los péptidos y aminoácidos formados; su eficacia nutritiva es excelente, debido a la predigestión de las proteínas, ya que este mecanismo respeta los aminoácidos incluso los más lábiles, como el triptofano.²⁰ Debe tomarse en cuenta que la obtención de autolizados deseables se inicia con el diseño de un proceso que permita a la levadura desarrollar un sistema enzimático proteolítico durante el crecimiento, para hidrolizar sus proteínas insolubles y ácidos nucleicos en materiales solubles. La fracción líquida (autolizado de levadura), obtenida después de la separación de los restos celulares, contiene materiales solubles como aminoácidos, derivados de los productos de hidrólisis, péptidos, nucleótidos (entre éstos, el 5'-guanósín monofosfato ó 5'-GMP, y el 5'-inosín monofosfato ó 5'IMP), azúcares (ribosa, glucosa, fructuosa, maltosa)^{1,6} y sus derivados (como el GMS) y otros compuestos no identificables, los cuales durante las etapas de evaporación y secado, interaccionan formando compuestos que imparten notas ricas en sabor a carne. Además, en los autolizados quedan retenidas vitaminas importantes del complejo B, tiamina (15 a 20 ppm), riboflavina (70 a 75 ppm), ácido nicotínico (300 ppm) y ácido pantoténico (100 ppm).⁵

Actualmente, la importancia económica de los autolizados como ingrediente alimenticio se ilustra con un volúmen de producción cada vez en mayor proporción, el cual, solamente en los países occidentales es alrededor de 55,000 toneladas al año. Más del 50% de este volúmen es producido en Europa y una parte sustancial es de uso cautivo por los productores internacionales de los cubitos Maggi y fabricantes de sopas.³¹

Por otra parte, desde el punto de vista nutricional, la levadura *S. cerevisiae* presenta un perfil y contenido de aminoácidos superior al de *C. utilis*, así como al de la soya (Tabla 2). Aunque la levadura *S. cerevisiae* presenta un aminograma de mejor calidad y comparativamente adecuado como producto proteico, su producción presenta como principal desventaja que posee un mecanismo de conversión de azúcares a proteína con una menor eficiencia que otras levaduras, *C. utilis* por ejemplo. No obstante, es posible contar con procesos de producción que eviten los bajos rendimientos, como los sistemas semicontinuos o continuos, y que permiten obtener un producto de calidad constante en todo tiempo.²⁵

Por otro lado, considerando que los costos de producción de la levadura son relativamente elevados, cabe destacar que en los últimos cinco años ha resurgido la atracción por los autolizados de levadura, con lo cual se logra dar un valor agregado al producto, de tal manera que hace económicamente atractiva su utilización en el mercado alimenticio. Esto debido a que los autolizados de levadura representan un aditivo de sabor de tipo natural y porque los aditivos sintéticos están siendo desplazados del mercado por razones básicas o aspectos de salud.²

I.B. ALGUNOS ASPECTOS BIOQUIMICOS DE LA AUTOLISIS.

Bibliográficamente se tienen muy pocas referencias sobre los procesos autolíticos y sus rendimientos; esto se debe a que la industria de los autólizados maneja con estricto control la información que obtiene de sus propias investigaciones. Sin embargo, es posible encontrar en la literatura científica estudios encaminados a determinar la fisiología celular, relacionada con los pasos metabólicos de la lisis de las levaduras utilizadas.^{2,7,26}

Durante la autólisis, y debido al incremento en la permeabilidad de la pared celular, la proteólisis ocurre tanto dentro como fuera de la célula. Es así como después de un tiempo entre 4 y 8 horas de iniciada la autólisis, es posible notar una disminución en la concentración de proteína extracelular y por consiguiente el aumento del nivel de aminoácidos.¹

Al aplicar las condiciones autolíticas adecuadas (temperatura, pH y presión), el material celular es liberado al medio, observándose un aumento en la concentración de los ácidos nucleicos en el extracto de levadura. En esas circunstancias, la levadura puede adaptar su metabolismo para utilizar ribosa, al parecer, más fácilmente que para desoxirribosa. Asimismo, en el caso de ARN, se activan nucleasas para degradarlo y producir nucleótidos, que a su vez son atacados por fosfomonoesterasas, obteniéndose nucleósidos y fosfato inorgánico. Los nucleósidos son degradados por nucleosidasas, dando ribosa y las propias purinas y pirimidinas. La ribosa puede ser metabolizada por la vía de la hexosa mono-fosfato. Al parecer, el ADN es degradado en forma semejante.⁶

La liberación de proteína y aminoácidos es el aspecto más importante de la autólisis de levaduras. La proteólisis es realizada principalmente en el

citoplasma, por una serie de enzimas, que actúan en forma diferente de acuerdo a las condiciones establecidas durante el proceso. Por otro lado, las condiciones en las que las levaduras fueron cultivadas influyen significativamente sobre la actividad proteolítica de estas enzimas. Las enzimas proteolíticas involucradas en la autólisis, han sido recientemente caracterizadas. En la tabla 3 se listan las seis diferentes proteasas intracelulares de levaduras, conocidas hasta ahora. Es probable que puedan coexistir una o dos aminopeptidasas adicionales. Al menos cinco de las enzimas listadas en la tabla, están localizadas en las vacuolas, y quizás cuatro de ellas son glicoproteínas.^{7,8}

I.C. CONSERVACION DE LOS AUTOLIZADOS DE LEVADURA.

Los autolizados de levadura representan un medio bastante rico en nutrimentos, por su contenido de vitaminas, proteínas, péptidos, aminoácidos, azúcares y otros elementos, de relativa facilidad de degradación (puede ser comparativamente semejante a las características de un alimento de consumo humano tradicional, como la leche). Por lo que se considera de suma importancia aplicar métodos de conservación que mantengan una calidad comprobada. Este método puede ser el de las bajas o altas temperaturas; las cuales son usadas para retardar o acelerar reacciones químicas, acción de enzimas y retrasar o inhibir el crecimiento o actividad de microorganismos presentes.²² Las bajas temperaturas tienen un efecto letal; en particular las inferiores a cero dañan el metabolismo de algunas bacterias por la desnaturalización de proteínas y floculación de proteínas celulares, por el aumento en la concentración de solutos en el agua que queda sin congelar ó por el daño físico causado por los cristales de hielo.⁵

Algunas características especiales e importantes en el crecimiento de bacterias en los alimentos, son las siguientes:⁵

1. Capacidad para crecer bien en numerosos sustratos y para utilizar como fuente de energía un gran número de carbohidratos y otros componentes orgánicos, utilizando como fuente de nitrógeno compuestos nitrogenados bastante sencillos.
2. Capacidad de sintetizar la mayoría de las vitaminas que necesitan.
3. Capacidad de producir considerables cantidades de ácido y gas a partir de azúcares.
4. Ocasionan sabores anormales.
5. Capacidad de producir mucosidad o viscosidad en los alimentos.

Asimismo, es fácil suponer que entre los microorganismos con mayor posibilidad de propagación se encuentran las bacterias, en especial las del tipo coliformes y *Staphylococcus aureus*.³² Los organismos coliformes son bacilos gram negativos, no esporulados, aerobios ó anaerobios facultativos, que fermentan la lactosa con producción de gas. Son perjudiciales para los alimentos, ya que su presencia se considera como indicador de contaminación por desperdicios cloacales, prácticas sanitarias poco eficaces o equipo antihigiénico. Su crecimiento inutiliza los alimentos.^{32, 33}

Por otro lado, la bacteria *S. aureus* es gram positiva, inmóvil, esférica, generalmente dispuesta en racimos irregulares. Es catalogada como anaerobia facultativa, forma colonias pequeñas, circulares y convexas, fermentan el manitol y varios azúcares formando ácido pero no gas. Crecen en un intervalo amplio de temperatura de 6.5 °C a 50 °C y a un pH de 4.2 a 9.3. Producen una enterotoxina que causa intoxicaciones alimenticias.⁹

Finalmente, vale la pena mencionar que un factor de considerable eficacia para conservar un alimento por mayor tiempo libre de bacterias, es el pH. A un pH ácido, las bacterias tienen problemas para su desarrollo y proliferación, lo cual podría servir como un método de preservación para aplicarse en el proceso de fabricación de los autolizados de levadura.

II. ANTECEDENTES

Es un hecho indiscutible, que actualmente existe una gran tendencia al cambio en los hábitos alimenticios de un número cada vez mayor de personas, debido a la creciente difusión de las cualidades nutricionales de los diferentes tipos de alimentos "naturales"; aplicando la palabra natural a los productos derivados de fuentes naturales.

Compañías e instituciones de investigación se han dedicado a cubrir la demanda de productos naturales y durante las dos últimas décadas, se han desarrollado varios procesos para la producción de microorganismos útiles como fuente de proteína para la alimentación humana y animal ó como ingrediente alimenticio. Por otra parte, la producción de saborizantes naturales juega un significativo papel en nuestra alimentación diaria, ya que actualmente se emplean más de 1,100 diferentes materiales saborizantes.

Los procesos de producción industrial de los autolizados de levadura prácticamente empezaron a desarrollarse a principios del presente siglo, dado que no existía una manera de aprovechar los residuos de levadura de cerveza. Su utilización como producto potenciador del sabor se inició en Alemania, pero fue la compañía Marmite Co., en Inglaterra la que desarrolló uno de los primeros procesos para la producción comercial de los autolizados de levadura.²⁸ Actualmente, la tecnología de la producción de autolizados de levadura ha llegado a alcanzar un elevado nivel de sofisticación e incluso a utilizar cepas de levadura seleccionadas, para lo cual las compañías productoras guardan celosamente los detalles del proceso empleado, siendo considerados como secretos industriales. Sin embargo, en forma general el método para la producción de autolizados de levaduras, se compone de las etapas básicas siguientes:¹

- 1) Recuperación de la levadura.
- 2) Selección y tratamiento inicial.
- 3) Solubilización de los contenidos celulares.
- 4) Eliminación de los cuerpos celulares.
- 5) Eliminación de constituyentes indeseables.
- 6) Modificación del sabor.
- 7) Técnicas de evaporación.

Por otra parte, existen pocos trabajos y por lo consiguiente poca bibliografía relacionada con este tema, sin embargo algunos de los experimentos elaborados son los siguientes:

Houg y Maddox en 1970⁸ trabajaron con la autólisis de *Saccharomyces carlsbergensis* que fue autolizada a una temperatura de 45°C, un pH de 6.5 con una agitación ocasional tomando muestras cada hora durante 14 horas. Se midió la cantidad de DNA perdida en las células y se observó que era aproximadamente igual a la que aumentó en el extracto, también notaron que el RNA no sigue este patrón, ya que la cantidad de RNA que se encontró en el extracto fue menor a la perdida por la levadura, debido a que las ribosomas son utilizadas rápidamente al no haber otra fuente de carbono. Además, observaron que durante la autólisis, la cantidad de carbohidratos de la célula en el extracto es pequeña comparada con las proteínas y los ácidos nucleicos. Investigaron las características de 4 enzimas que actúan durante la autólisis y describieron que parecían ser glicoproteínas que contenían residuos de glucosa y manosa, esto sugiere alguna conexión con la síntesis de paredes de la célula, ya que la pared esta formada substancialmente de glucanos, mananos y complejos proteínicos.

Reed y Peppler en 1973²⁸ proponen un método para la preparación de autolizados, que consiste en que a una crema de levadura conteniendo entre 15 y 18% de sólidos se plasmoliza con sal y gradualmente se eleva la temperatura por un período de tiempo entre 12 y 24 horas, o hasta obtener el grado de autólisis deseado. La mezcla de autolizado es pasteurizada posteriormente a una temperatura entre 80° y 90°C, enfriada y filtrada. Se concentra en un evaporador al vacío de película descendente, hasta obtener una pasta con un contenido aproximado del 70 al 80% de sólidos. Alternativamente el autolizado concentrado puede ser secado en un secador de tambor rotatorio o de aspersion. Debe tomarse en cuenta que la obtención de autolizados deseables, se inicia con el diseño de un proceso que permita a la levadura desarrollar un sistema enzimático proteolítico durante el crecimiento, para hidrolizar sus proteínas insolubles y ácidos nucleicos en materiales solubles.

Kelly en 1983¹² describió el proceso de producción de extractos de levadura en 5 etapas:

- 1.- Plasmólisis.- aumentar la temperatura lo suficiente para matar la levadura pero sin inactivar sus enzimas y usó sustancias químicas en particular sal ó solventes orgánicos.
- 2.- Autólisis.- durante esta etapa las enzimas catalizadoras para la hidrólisis se activan y aumentan su actividad con la adición de papaína. La autólisis se llevó a cabo en 20 horas y menciona que un proceso francés usó una temperatura de 55°C con un pH de 5.5 durante 20 horas, con una solubilización de sólo un 50 a 60%.
- 3.- Pasteurización.- para matar las bacterias.
- 4.- Clarificación.- remover paredes insolubles de las células y produce un extracto claro removiendo la bruma.
- 5.- Concentración.- durante esta etapa se promueve el desarrollo de sabores influenciados por el incremento en la concentración de componentes y por la temperatura.

Mermelstein en 1989²¹ durante el proceso para la producción de saborizantes manejo un pH de 3.5 a 4.5, ya que evitaba la contaminación por microorganismos patógenos y toxinas.

Kollar y colaboradores en 1992,¹³ durante el proceso de la autólisis de la levadura la levadura *S. cerevisiae*, observaron que la velocidad y eficiencia de la autólisis fue influenciada por NaCl, etanol y el incremento de la temperatura hasta 50°C. Obteniendo la máxima liberación de contenido citoplasmático a las 24 horas.

III. JUSTIFICACION

Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis*^{1,3,6,16} son utilizadas actualmente y consideradas como las específicas para la obtención de autolizados; siendo la primera de ellas la más empleada en los procesos industriales. Dado que no se cuenta con información específica sobre sus cinéticas de autólisis (proteólisis) en esos procesos, en el presente trabajo se propone manejar condiciones de tiempo, temperatura y pH, que permitan obtener los máximos rendimientos de hidrólisis proteica con cada una de ellas, a fin de compararlas y contar con un criterio para seleccionar la mejor.

Ya que los autolizados como aditivos naturales en la industria alimenticia, presentan un relativo bajo costo y la propiedad de proporcionar una amplia gama de notas de sabor, se considera valioso estudiar, desarrollar o adaptar un proceso de autólisis, mediante el cual se logren obtener buenos rendimientos de hidrólisis proteica, además de establecer las condiciones que desfavorezcan la proliferación o contaminación bacteriana, así como que se permita mantener las propiedades de sabor controlando sus características organolépticas y dado que los autolizados de levadura representan un medio bastante rico en nutrimentos, se considera de suma importancia determinar las condiciones de conservación que mantengan una calidad comprobada, como las bajas o altas temperaturas; las cuales son usadas para retardar reacciones químicas, acción de enzimas y retrasar o inhibir el crecimiento o actividad de microorganismos presentes.

IV. HIPOTESIS.

Empleando condiciones similares de autólisis para dos especies de levadura, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis*, cultivadas bajo condiciones semejantes, se podrá saber que:

- 1.- *S. cerevisiae* da mejores rendimientos de autólisis que *C. utilis*.
- 2.- *S. cerevisiae* tiene mejores características bromatológicas (humedad, proteínas, grasas, cenizas, carbohidratos) que *C. utilis*.
- 3.- La presencia de microorganismos contaminantes se desfavorece o elimina durante el proceso autólítico.

V. OBJETIVO GENERAL.

A partir de cremas de levadura obtenidas en el laboratorio, de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis*, se especificarán las condiciones en que se lleva a cabo la autólisis de la levadura con los máximos rendimientos hidrolíticos, evaluando también la manera en que los autolizados conservan sus propiedades funcionales de manera estable.

V.A. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Establecer los procedimientos para la preparación de la materia prima (crema de levadura al 18 % de sólidos), antes de aplicar las condiciones de autólisis a las mismas.
2. Probar condiciones definidas de pH, tiempo y temperatura, evaluando el grado de autólisis obtenida para cada cepa de levadura.
3. Realizar pruebas microbiológicas y bromatológicas para evaluar la calidad del autolizado.

VI. MATERIALES Y METODOS.

A. Microorganismos utilizados.

Se emplearon tres cepas de levaduras: dos de *Saccharomyces cerevisiae* (cepas L-024 y L-026) y una de *Candida utilis* (cepa L-045).

B. Medios.

Para la propagación de la levadura se utilizó un medio de melazas enriquecido con sales que proporcionaron los requerimientos nutricionales de nitrógeno y fósforo; para el medio sólido (medio 2) se adicionó agar al 2.5%. En todos los casos se esterilizó a 1 atmósfera de presión (15 psig) por 15 minutos.

Medio 1 (medio líquido)

- | | |
|--|---------|
| - Azúcares reductores por litro, ajustados con melaza diluida. | 60 g |
| - Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ | 1.8 g |
| - Fosfato de amonio $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ | 0.85 g |
| - Melaza | 200 ml |
| - Aforar con agua a: | 1000 ml |
| - Ajustar a un pH de 4.5 | |

Medio 2 (medio sólido)

- | | |
|---------------------------|--------|
| - Agar | 6 g |
| - Melaza | 200 ml |
| - Ajustar a un pH de 5.25 | |

C. Equipo y Material de Laboratorio.

- Autoclave Infra Mod. 0491.
- Espectrofotómetro Perkin - Elmer Mod. 0352.
- Orbital rotatorio New Brunswick G-25.
- Parrilla de calentamiento Corning Stirrer 260-0.
- Termómetro.
- Balanza analítica Chyo Jupiter SDT 200.
- Estufa de incubación Felisa Mod. 133.
- Potenciómetro Beckman 50 pH Meter.
- Microscopio compuesto One Ten American Optical Mod. 7388.
- Centrifuga Sol-bat J 12.
- Centrifuga Damon/ IEC División CU-5000.
- Termobañero Felisa Mod. 373.
- Agitador magnético Felisa Fisher brand 12-810.
- Campana de extracción (CIATEJ).
- Campana de flujo laminar Veco Mod. 17928.
- Cámara de Neubauer.
- Micropuntillas.
- Micropipetas Pipetman Mod. L 84 14227.
- Papel filtro Whattman No. 2
- Frascos ámbar.
- Gradillas.
- Material de vidrio en general.

D. Técnicas Analíticas. (Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico).

a) pH: Se empleó un potenciómetro digital, para medir las unidades potenciométricas que nos expresaron los valores de pH de la muestra.

b) Técnica para la cuantificación de nitrógeno amoniacal.

Los reactivos utilizados son:

a) Fenol analítico	25	g/l
b) Nitrocianuro de sodio	125	mg/l
c) Hidróxido de sodio	12.5	g/l
d) Blanqueador comercial (clorox)	20	ml/l
e) Sulfato de amonio	0.1414	g/l

PROCEDIMIENTO:

A 20 μ l de muestra (autolizado) se le agregó 1.0 ml de reactivo coloreado de fenol y 1.0 ml de reactivo de hipoclorito alcalino, mezclando después de la adición de cada reactivo (**es importante añadir estos reactivos en el orden mencionado**). Se dejó reaccionar por 10 minutos a temperatura ambiente y se añadieron 8 ml de agua destilada, se volvió a mezclar y se leyó absorbancia a 632 nm.¹⁷

c) Técnica para la cuantificación de proteína utilizando el principio de unión proteína-colorante.

Los reactivos utilizados son:

a) Albúmina sérica bovina, 96-98% pureza	20.2	mg/l
b) Azul brillante G-250 (solución colorante)	200	mg/l

- | | |
|---------------------------------|----------|
| c) Etanol grado reactivo al 95% | 100 ml/l |
| d) Acido fosfórico al 85% | 200 ml/l |

PROCEDIMIENTO:

Se tomó 1 ml de muestra (autolizado) ó su dilución 1:10 si es necesario y se agregó 5 ml de reactivo Bradford (solución colorante). Se leyó a 595 nm entre los 2 y 20 minutos después de añadido el reactivo.^{4,15,34}

d) Técnica para determinar azúcares reductores libres por el método DNS (ácido dinitrosalicílico).

Los reactivos utilizados son:

- | | |
|---|---------|
| a) Hidroxido de sodio (NaOH) | 10 g/l |
| b) Acido 3,5 Dinitrosalicílico (DNS) (C ₇ H ₄ N ₂ O ₇) | 10 g/l |
| c) Tartrato de Sodio y Potasio (C ₄ H ₄ KNaO ₆) | 200 g/l |
| d) Metabisulfito de Sodio (Na ₂ S ₂ O ₅) | 0.5 g/l |
| e) Fenol | 2 g/l |

Se mezclarán uno a uno en ese orden y posteriormente la solución se aforó a 1000 ml.

PROCEDIMIENTO:

A 0.5 ml de muestra (autolizado) se agregó 1.5 ml de solución de DNS, se agitó y se puso a baño maría a punto de ebullición durante 10 minutos. Después se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le añadió 8 ml de agua desionada. Se agitó y se leyó la absorbancia a 550 nm.¹⁹

e) Técnica para conteo celular por el método de azul de metileno.

Los reactivos utilizados son:

- a) Azul de metileno 10 g/l
- b) Citrato de sodio ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) 50 g/l

PROCEDIMIENTO:

En un matraz aforado de 50 ml, se agregarán 5 ml de muestra (autolizado), 2.5 de azul de metileno y se aforó con agua destilada. Se tomó una muestra con una micropipeta y se colocó en una cámara de Neubauer, realizando un conteo de la población al microscopio. Esta técnica nos permitió conocer la viabilidad, ya que la pared celular de las levaduras muertas absorbe el colorante distinguiéndose con facilidad las células vivas de las muertas.

E. Metodología.

Estandarización de técnicas analíticas.

- Curva de calibración para la determinación de nitrógeno amoniacal.

Se partió de la solución patrón (preparada con el sulfato de amonio), para hacer diluciones. Tomándose alícuotas de 1, 2, 3, 4...10 ml en tubos de ensayo debidamente identificados y posteriormente se adicionó agua destilada suficiente para completar a 10 ml en cada tubo, de esta manera se obtuvieron las siguientes concentraciones: 30, 60, 90... 300 mg de nitrógeno/l. A continuación se adicionaron 20 μ l de cada uno de los tubos anteriores en otra serie de tubos (por duplicado) y se determinó la concentración de nitrógeno. Los resultados de la curva de calibración se sometieron a un análisis de regresión lineal, con el fin de obtener una ecuación que permitió cuantificar la concentración de nitrógeno en

una muestra a partir de su absorbancia.

- Curva de calibración para la determinación de proteína.

A 10 tubos (por duplicado) se añadió con micropipeta 10, 20, 30... 100 μ l de solución patrón de albúmina a cada uno de ellos se les agregó agua hasta alcanzar un volumen de 1.0 ml; obteniéndose concentraciones de 0.01, 0.02,...0.1 mg/ml. Después se adicionaron 5 ml de reactivo de Bradford (solución colorante). Se leyó su absorbancia y se introdujeron los datos de las lecturas a un programa de regresión lineal simple, para obtener la ecuación de la forma $y = ax + b$, que permitió conocer la concentración de proteína de una muestra a partir de su absorbancia.

- Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores libres.

Se obtuvo una curva por medio de la técnica DNS, usando una solución patrón de dextrosa anhidra a una concentración de 1 g/l; el rango de concentración a probar fué 0.1 a 1 g/l. Se realizó el análisis de regresión lineal, obteniéndose la ecuación de la curva, usada para conocer la concentración de azúcares reductores libres en cada muestra.

a) **Cinética de crecimiento para la selección de la cepa** (ver diagrama de la metodología).

Una vez crecidas las cepas BCGC L-026 y BCGC L-024 en un tubo de ensaye (medio 2) se resembraron en 5 tubos que se incubaron por 24 horas, a una temperatura de 33° a 35°C. A cada tubo se le añadió 5 ml de NaCl (85% p/v) para obtener una suspensión; posteriormente se inocularon 2 matraces, que contenían 90 ml de medio líquido, con 10 ml de la suspensión. Dichos matraces se colocaron en el

orbital de 33° a 34° C, con 300 rpm durante 14 horas. Se tomó una muestra de 2 ml cada 2 horas, para determinar por cuenta microscópica la población total de células y de esta manera saber cuál de las 3 cepas presentaba una mejor cinética de crecimiento. Para cada una de las cepas se siguió el mismo procedimiento. La cepa seleccionada fué aquella que presentó una mayor velocidad de crecimiento.

b) Obtención de la crema de levadura.

Concluida la selección de las cepas y el estudio cinético de las mismas, se procedió a la elaboración de la materia prima. La propagación de la levadura se llevó a cabo en el medio 1 y en condiciones aeróbicas. Posteriormente de ahí se tomó para sembrar 10 cajas que contenían el medio 2 (de melaza sólido), incubándose por 24 horas a 35°C. Una vez crecida la cepa se le agregó agua destilada a cada caja para obtener una suspensión celular e inocular el matraz con 90 ml de melaza y 10 ml de la suspensión, se incubó durante 10 horas a 34°C. Después fueron inoculados otros 2 matraces; cada uno conteniendo 450 ml de melaza y 50 ml de inóculo (tomado de el matraz anterior), los cuales se incubaron por 10 horas a 34°C. Por último, se inóculó el fermentador de 14 litros que contenía 9 litros de medio, al cual se le adicionó 1 litro del inóculo. Las condiciones de operación fueron las siguientes: 400 rpm, 1.2 vvm, 34°C, por 12 horas.

Se realizó un ajuste de sólidos hasta un 18% (adecuado para la autólisis) de la siguiente manera: la cantidad del peso obtenido se multiplicó por el factor 1.7, agregándose agua para alcanzar el valor resultante en relación al peso inicial.

c) Condiciones de autólisis.

Ajustados los sólidos, cada una de las muestras experimentales se sometió a las

condiciones de autólisis. Se llevaron a cabo siete corridas de las cuáles, en las corridas 1, 2 y 3 se evaluó sólo tiempo y temperatura con *C. utilis*; en las corridas 4 y 5 se evaluaron los mismos parámetros pero con *S. cerevisiae* y en las corridas 6 y 7 se trabajó con cada cepa, evaluándose además tres variables de pH. Una vez terminada la autólisis las muestras fueron congeladas para evitar su contaminación. Para el proceso de autólisis la crema se colocó en matraces de vidrio de 500 ml, se llevaron a un agitador orbital con una agitación de 100 rpm, ajustando la temperatura a un valor inicial de 30 °C. Cada hora se fué elevando gradualmente la temperatura 5°C, hasta alcanzar una temperatura de 55°C, la cual se mantuvo durante 12 horas. Las primeras 6 horas se tomaron muestras de 10 ml, cada hora y durante las siguientes 12 horas se tomaron cada 2 horas. Por cada corrida experimental se tomaron un número mínimo de 12 muestras, de un volumen de 10 ml cada una. A cada muestra tomada durante el proceso se le hizo determinación de nitrógeno amoniacal, proteínas, azúcares reductores libres y presencia de contaminación por coliformes y *Staphylococcus aureus*.

d) Modificación de pH.

El pH en las dos últimas corridas fué modificado. Una vez ajustados los sólidos, la crema, se pesó y se dividió en tres partes, colocándose en matraces de 500 ml cada uno. Cada matraz se etiquetó de la siguiente manera: pHN, pH1, pH2, los cuales indicaban:

pHN = pH normal (el pH que tenía la muestra al iniciarse la autólisis)

pH1 = pH menor

pH2 = pH superior

Se midió el pH inicial de la crema y este fué el pH normal, se ajustaron dos valores de pH, en dos unidades potenciométricas por arriba (pH2) y por debajo (pH1), en relación al pHN de la materia prima.

e) Pruebas microbiológicas.

Se hicieron pruebas microbiológicas para la identificación de microorganismos contaminantes que pudieran adulterar el autolizado. Para su evaluación, se tomó la muestra del tiempo cero (T0) directa y diluida, así como la última muestra, tiempo final (TF), con el objeto de observar como variaba la cantidad de microorganismos presentes antes y después de la autólisis y de esta manera comprobar la influencia de las altas temperaturas sobre los mismos.

El autolizado se sometió a las siguientes pruebas:

OC: Organismos Coliformes Totales.^{9,11,24}

- a) Se transfirió un mililitro de la muestra ó sus diluciones a cajas de Petri.
- b) Se agregaron de 12 a 15 ml del medio que se mantuvo de 45° a 48°C.
- c) Se mezcló correctamente el medio con la muestra, se dejó solidificar sobre una superficie plana horizontal y se agregaron 4 ml del mismo medio para cubrir completamente la superficie.
- d) Se dejarón solidificar y se incubaron las cajas en posición invertida durante 24 horas a 35°C.
- e) Se contó el número de colonias y se registraron los resultados.

Determinación de *Staphylococcus aureus*^{9,11} (Método de Baird-Parker).

Preparación y dilución de la muestra: Se colocó 0.1 ml de cada dilución sobre una placa de agar Baird-Parker y se extendió con la varilla de vidrio en toda la superficie del medio, usando una varilla para cada dilución, se incubaron las placas invertidas de 35° a 37°C durante 24-48 horas. Después de 24 horas se seleccionaron las placas que mostraron de 50 a 150 colonias; se contaron y se

marcaron todas aquéllas que eran negras y brillantes con o sin ligero borde blanco y rodeadas por una zona clara en el fondo del medio ópaco ya que podrían tratarse de *S. aureus*. Se incubaron las placas 24 horas más y nuevamente se seleccionó la caja con un mínimo de 150 colonias típicas, para practicar la prueba de coagulasa.

f) Pruebas bromatológicas.

Las últimas muestras de cada corrida fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 15 minutos, una vez separadas, el precipitado fué sometido a las pruebas bromatológicas (humedad, proteínas, cenizas, grasas y carbohidratos), para evaluar la calidad de los autolizados.

Las pruebas bromatológicas que se realizaron fueron las siguientes: (según los métodos de AOAC)^{6,23}

Cenizas

Las cenizas de un alimento son un término analítico equivalente al residuo inorgánico que queda después de quemar la materia orgánica. Las cenizas, normalmente, no son las mismas sustancias inorgánicas presentes en el alimento original, debido a las pérdidas por volatilización ó a las interacciones químicas entre los constituyentes. El valor principal de la determinación de cenizas, supone un método sencillo para determinar la calidad de ciertos alimentos.

PROCEDIMIENTO:

Se calentó un crisol de porcelana en la flama de un mechero Bunsen durante un minuto, se pasó a un desecador, se enfrió y se pesó. En el crisol se agregó a cantidad de alimento adecuado (unos 5 g) y se calentó suavemente con mechero Bunsen bajo una vitrina; hasta que la masa carbonizada estuvo en condiciones de pesarla, se pasó a una mufla, continuando el calentamiento hasta quemar todo el

carbono, se pasó el crisol con las cenizas a un desecador, se dejó enfriar y se procedió a pesar, calculándose las cenizas totales en porcentaje a partir de la muestra original.

Proteínas

En el trabajo de rutina se determina mucho más frecuentemente la proteína total que las proteínas o aminoácidos individuales. Para esto se siguió el procedimiento de referencia Kjeldahl que determina la materia nitrogenada total, que incluye tanto las no proteínas como las proteínas verdaderas.

PROCEDIMIENTO:

En un matraz Kjeldahl de 800 o 500 ml se pesarán 3 g de muestra, agregándose 25 ml de H_2SO_4 concentrado y unas perlas de vidrio para evitar el chisporroteo. Se calentó lentamente durante 2 o 2:30 horas hasta que la muestra estuvo clara. Se dejó enfriar y se adicionaron 200 ml de agua, finalmente se le agregó granallas de zinc y 100 ml de NaOH al 40%.

Carbohidratos

La cantidad de carbohidratos se obtuvo por diferencia de peso (a 100 se le resta la suma de los porcentajes, de los análisis realizados).

Grasas

La grasa se determina normalmente: por extracción directa de un disolvente, por extracción indirecta después de un tratamiento con álcali ó ácido, o por medida de un tubo graduado del volumen de grasa separada, mezclando la muestra con ácido sulfúrico, con reactivos neutros o alcalinos y centrifugando la muestra.

PROCEDIMIENTO:

La muestra se pesó en los vasos de aluminio que tienen un peso constante y se

puso en el cartucho, se le agregó éter y se colocó en el aparato SOXTEC tecedor para extracción de grasas, durante una hora. Ya que se reflujo, la grasa que quedó en el vaso se pesó obteniéndose la concentración por diferencia de peso.

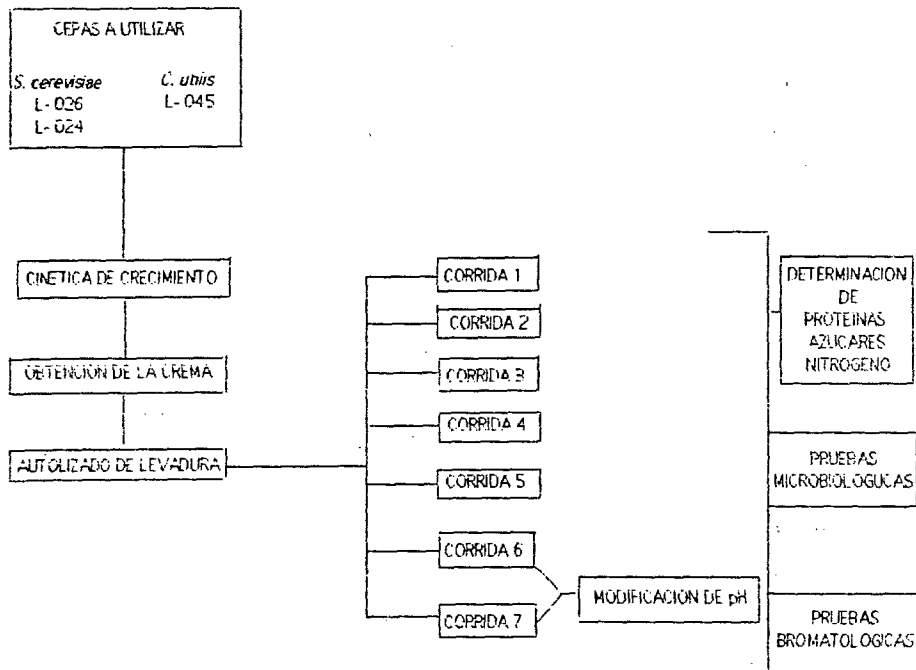
Humedad

En la mayoría de las industrias de alimentación la humedad se suele determinar a diario. Los niveles máximos se señalan frecuentemente en las especificaciones comerciales. La determinación del contenido de agua representa una vía sencilla para el control de la concentración en las distintas etapas de la fabricación de alimentos.

PROCEDIMIENTO:

Se colocó una cápsula metálica de fondo plano de aproximadamente 7 cm de diámetro, en una estufa controlada termostáticamente a la temperatura de secado elegida por un espacio de 20 minutos, después se enfrió en un desecador y se pesó. Se agregó la cantidad conveniente de muestra y se distribuyó bien sobre el fondo de la cápsula. Se transfirió directamente a la estufa la cápsula que contenía la muestra permaneciendo ahí el tiempo oportuno de secado (2 horas aproximadamente), después fué colocado en un desecador. Ya que se enfrió se peso inmediatamente la cápsula. Se volvió a colocar en la estufa por intervalos de 1 hora o 30 minutos hasta obtener una pesada constante.

DIAGRAMA DE LA METODOLOGIA



VII. RESULTADOS.

A. CINETICA DE CRECIMIENTO PARA LA SELECCION DE LA CEPA.

Entre las dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, se selecciono la BCGC L-026 por presentar una mayor velocidad de crecimiento (μ), en comparación con la cepa L-024. (figura 1).

Saccharomyces cerevisiae

BCGC L-026 cuya μ_1 fue de 0.47 h^{-1} con un tiempo de duplicación de una hora con veinte minutos, presentó un crecimiento celular máximo en un medio de melazas de 300×10^6 células / ml, que representa un peso aproximado de 3 gr de células/l (comunicación personal Peraza-Luna) (figura 2).

BCGC L-024 cuya μ_2 fue de 0.39 h^{-1} con un tiempo de duplicación de una hora con veintiocho minutos, su crecimiento celular máximo fué de 178×10^6 células / ml, que representa un peso aproximado de 2 gr de células/l (figura 3).

Candida utilis

L-045 cuya μ_3 fué de 0.46 h^{-1} con un tiempo de duplicación de una hora con treinta minutos, su crecimiento celular máximo fué de 485×10^6 células / ml, que representa un peso aproximado de 5 gr de células/l, observándose que *C. utilis* logra producir mayor cantidad de células que las dos cepas de *S. cerevisiae* (figura 4).

B. OBTENCION DE LA CREMA DE LEVADURA.

El mosto resultante de la fermentación aeróbica contenía una concentración aproximada de 5 a 10 g de levadura por litro. Inmediatamente, se procedió a la separación de las células mediante centrifugación, obteniéndose una pasta de

color café claro (30% de sólidos base húmeda), con un olor característico a fruta madura. La crema obtenida por medio de este procedimiento se empleó como materia prima en los experimentos de autólisis celular. El peso de la biomasa obtenida en cada corrida se muestra en la tabla 4.

C. CONDICIONES DE AUTOLISIS.

Corrida 1.- (tabla 5)

Condiciones: temperatura 30 a 55°C, 18 horas.

Cepa: *Candida utilis* (L-045)

Proteína: la hidrólisis de las proteínas fue parcial y a las 2 horas aproximadamente se nota un decremento hasta un 0.5 mg/ml (figura 5).

Azúcares: a partir de la tercera hora se nota un incremento de azúcares reductores en el extracto de levadura, obteniéndose un incremento lineal hasta las 16 horas y alcanzando una concentración de 6 g/l de azúcares reductores. A las 18 horas se observa un decremento drástico (figura 6).

Nitrógeno: no aparece en el medio durante las primeras cinco horas, después de las cinco y hasta las ocho horas se nota un incremento de hasta 1000 ppm (1 g /l de nitrógeno); sin embargo, en las siguientes dos horas hay una disminución drástica del nivel de nitrógeno hasta 300 ppm, manteniéndose este nivel constante hasta el final del experimento (figura 7).

Corrida 2.- (tabla 6)

Condiciones: temperatura 30 a 55°C, 18 horas.

Cepa: *Candida utilis* (L- 045)

Proteína: la concentración de proteína en el medio tuvo un ligero aumento de 0.15 a 0.33 mg/ml aproximadamente (figura 8).

Azúcares: En relación a la acumulación de azúcares reductores liberados, se observó que el aumento relativamente constante se logra a partir de las ocho

horas alcanzando concentraciones de 9 g/l (figuras 9).

Nitrógeno: tuvo un incremento relativo a partir de las catorce horas, antes de los tiempos mencionados la concentración de nitrógeno muestran un comportamiento inestable. La máxima concentración de nitrógeno fué de 260 mg/l en 20 horas aproximadamente (figura 10).

Corrida 3.- (tabla 7)

Condiciones: temperatura 30 a 55°C, 14 horas.

Cepa: *Candida utilis* (L-045)

Proteína: al igual que en la corrida 2 hubo un ligero incremento de 0.14 a 0.36 mg/ml (figura 11).

Azúcares: el aumento relativamente constante se logra a partir de las ocho horas alcanzando concentraciones de 3.5g/l (figura 12).

Nitrógeno: tuvo un incremento relativo a partir de las ocho horas, la máxima concentración obtenida fue de 950 mg/l en 18 horas aproximadamente (figura 13).

Corrida 4.- (tabla 8)

Condiciones: temperatura 30 a 55°C, 14 horas.

Cepa: *Saccharomyces cerevisiae* (BCGC L-026)

Proteína: se notó un comportamiento poco explicable por el aumento y disminución en la hidrólisis de la misma (figura 14).

Azúcares: alcanzaron una concentración de 20 gr/l en 1 hora aproximadamente, después pasan por un período variable, hasta que finalmente alcanzan casi la misma concentración que al principio (figuras 15).

Nitrógeno: presentó un incremento hasta 1500 mg/l a las 16 horas (figura 16).

Corrida 5.- (tabla 9)

Condiciones: temperatura 30 a 55°C, 14 horas

Cepa: *Saccharomyces cerevisiae* (BCGC L-026)

Proteína: al igual que en la corrida 4 se observó un aumento y disminución en la concentración de la misma, alcanzando hasta 15 mg/ml (figura 17).

Azúcares: de una concentración de 91 gr/l, disminuyó a 88 gr/l y después volvió a incrementarse hasta un 92.5 gr/l (figura 18).

Nitrógeno: a las 2 horas se observó la primera disminución de 15 hasta 13 mg/ml, después hay aumentos y disminuciones y finalmente a las 14 horas la concentración es de 13.5 mg/ml; notándose inclusive que se alcanza una concentración de nitrógeno mayor a la obtenida con *C. utilis* (figura 19).

Corrida 6.- (tabla 10)

Condiciones: temperatura 30 a 55°C, 16 horas, pHN 4.84, pH1 2.84 y pH2 6.84.

Cepa: *Saccharomyces cerevisiae* (BCGC L-026)

Proteína: con un pH de 4.84 y de 6.84, hay un mayor incremento en la concentración de proteína; mientras que con el pH 2.84 la concentración de proteína varía en el transcurso de la cinética, pero al final se observa casi la misma concentración que al principio. Sin embargo, en todos los casos anteriores se observó que no hubo diferencia significativa entre el tiempo cero y el final de la autólisis (figura 20).

Azúcares: es con el pH de 4.84 en donde se observó un mayor incremento de estos componentes (figura 21).

Nitrógeno: se observó que el pH de 4.84 fué el que favoreció una mayor liberación de éste, observando una concentración máxima de 350 mg/l (figura 22).

Corrida 7.- (tabla 11)

Condiciones: temperatura 30 a 55°C, 16 horas, pHN 6.37, pH1 4.37 y pH2 8.37.

Cepa: *Saccharomyces cerevisiae* (BCGC L-026)

Proteínas: puede considerarse que no hubo variación significativa en los tres pH probados; sin embargo, al trabajar con el pH 8.37 se observó una curva de disminución más aceptable (figura 23).

Azúcares: se observó que a un pH de 4.37 se logró una mayor liberación de azúcares en el medio (figura 24).

Nitrógeno: En la determinación de nitrógeno liberado al trabajar con diferentes valores de pH se observó que a un pH de 4.37 y 6.37 se lograron comportamientos deseables con un máximo en 4.37 (200 mg/l) (figura 25).

D. MODIFICACION DE pH.

El pH normal (pH que tenía la muestra al inicio de la autólisis) de *S. cerevisiae* fue de 4.84, por lo que al ajustarse las dos unidades potenciométricas por arriba (6.84) y por debajo (2.84) de este valor los pH con los que se trabajó esta cepa en el proceso de autólisis fueron ácidos.

El pH normal de *C. utilis* fue de 6.37. por lo que al hacerse el debido ajuste de las dos unidades potenciométricas por arriba (8.37) y por debajo (4.37), se trabajó con dos pH ácidos y un pH alcalinó. Los resultados se muestran en la tabla 12.

E. PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS.

Únicamente se observó la presencia de cinco colonias de organismos coliformes en la muestra cero de la corrida 1, pero en la última muestra no se detectó su presencia. En el resto de las corridas no se observó ningún organismo contaminante. Los resultados se muestran en la tabla 13.

F. PRUEBAS BROMATOLÓGICAS.

Los resultados nos muestran:

Candida utilis

Humedad varía de un 67% a 70%.

Proteínas varía de un 13% a 16%.

Cenizas varía de 1% a 2%.

Grasas varía de 0.08% a 0.75%.

Carbohidratos varía de un 13% a 30%.

Saccharomyces cerevisiae

Húmedad varía de 70% a 76%.

Proteínas varía de un 12% a 14%.

Cenizas varía de 1% a 2%.

Grasas varía de 0.08% a 0.27%.

Carbohidratos varía de 7% a 14%.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 14.

VIII. DISCUSION.

A. CINETICA DE CRECIMIENTO.

La selección de las levaduras para las pruebas de autólisis se basó prácticamente en el valor de sus constantes cinéticas, como la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación, debido a que estas constantes indican las características propias de los microorganismos a las condiciones fisicoquímicas empleadas.³⁵ Por otro lado, se realizaron los cultivos celulares en un medio complejo, como lo es el medio con melazas de caña, porque se ha considerado que las melazas de caña constituyen un sustrato adecuado, por contener una diversidad de sustancias nutritivas para los microorganismos utilizados.^{26,27,30} De las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de cerveza) probadas, se seleccionó aquella que mostró tener un tiempo de duplicación relativamente menor y en consecuencia mayor velocidad de crecimiento ($\mu = 0.47 \text{ h}^{-1}$), la L-026.

Por otra parte, para cumplir con los objetivos planteados, también se realizaron las correspondientes cinéticas de crecimiento con la levadura *Candida utilis* (levadura tórcula²⁶), en donde se observó una velocidad de crecimiento de 0.46 h^{-1} y un tiempo de duplicación de una hora con treinta minutos, observándose también que la levadura logró producir mayor cantidad de biomasa que cualquiera de las dos cepas de *S.cerevisiae* (figura 1).

Con respecto a la levadura de cerveza, Ramírez²⁷ registró que la velocidad de crecimiento para la cepa L-026 es de 0.35 h^{-1} y para la cepa L-024 es de 0.34 h^{-1} . Estos datos son menores comparados con los obtenidos en el presente trabajo, probablemente debido a que en este proceso se logró que la levadura tuviera una mejor adaptación a las condiciones fisicoquímicas y al medio de cultivo empleado.

Romo³⁰ registró una velocidad de crecimiento para la cepa L-024 de 0.43 h^{-1} , también menor a la obtenida en este trabajo. De estos resultados, también se puede hacer notar que la concentración de azúcar en el medio fue menor (30 g/l) en el presente trabajo que las registradas por Romo³⁰ y Ramírez²⁷ (110 a 120 g/l) y en estos dos casos la concentración de azúcares probablemente pudo haber ejercido un efecto inhibitorio en el desarrollo celular; por lo tanto, en los medios con menor concentración de azúcares las levaduras pueden realizar un metabolismo más eficiente para la formación de proteína y de ahí que se tenga un mejor crecimiento y mayor producción de biomasa.

Asimismo, la levadura tórula (según lo registra Peraza-Luna²⁶) tiene un metabolismo orientado hacia la formación de proteína o sea de tipo preferentemente aeróbico, a diferencia de la levadura de cerveza que es preferentemente anaeróbico. En este caso se observó que la velocidad de crecimiento de la levadura *C. utilis*, en el medio de melazas, es mayor a la citada por Peraza-Luna,²⁵ notándose inclusive que la levadura se ha adaptado a crecer en medios de melazas, lo cual puede ser tomado en cuenta para comparar el planteamiento anterior. Otra posible razón, por la cual se notan mejores características de crecimiento en las cepas, estaría dada por el tipo de inóculo empleado, esto es, que en todos los casos las levaduras posiblemente lograron adaptarse perfectamente al medio y a las condiciones empleadas.

B. OBTENCION DE LA CREMA.

A excepción de la corrida 1 en todas las corridas se observó un promedio de 228 gr de biomasa. La cantidad de la misma en cada corrida varía de 135 a 288 lo que indica que no hubo una variación notable en cuanto al peso de la biomasa, lo cual podría ser debido a que en todas las corridas se usaron las mismas condiciones

durante el proceso para la obtención de la crema.

C. AUTOLISIS DE LAS LEVADURAS.

De acuerdo a los objetivos planteados en este trabajo, las levaduras seleccionadas debían cumplir con dos requisitos esenciales: (a) Contribuir uniforme y óptimamente a proporcionar el complemento productor del sabor y (b) tener capacidad de autolizarse fácilmente bajo condiciones bastante moderadas. En este trabajo, los resultados se enfocaron hacia este último requisito.

Con respecto a la corrida 1 (*C. utilis*), se observó que la hidrólisis de las proteínas no se logró en su totalidad, o sea se obtuvo una hidrólisis parcial de estos componentes, considerándose una hidrólisis proteica en una proporción aproximadamente del 80%. Los azúcares se incrementan pero también sufren un decremento drástico a las 18 horas, debido quizás a su posible unión con los aminoácidos libres para la formación de complejos. En cuanto a la disminución también drástica, del nivel de nitrógeno, esto podría ser debido a que el nitrógeno una vez liberado tiene un corto periodo después del cual podría estar asociándose con otras sustancias ó entre moléculas del mismo tipo. Izzo y Chi-Tang (1991)¹⁰ en un trabajo desarrollado sobre el aislamiento e identificación de componentes volátiles extraídos en un autolizado de levadura, mostraron que algunos componentes son probablemente formados por la interacción entre aminoácidos y azúcares seguidos por la ciclización para exhibir ciertos sabores característicos.

En las corridas 2 y 3, el comportamiento de la proteína en cuanto a su concentración, en contraste con la corrida 1, fue muy diferente; un porcentaje de hidrólisis casi nulo y, por el contrario, se observó un incremento de este componente. Es probable que la cantidad de nitrógeno liberado en la hidrólisis de las proteínas estuviera siendo asimilado espontáneamente por las levaduras, que

en este caso pudieran tener una alta viabilidad, es decir la temperatura de autólisis no afectó la viabilidad del microorganismo, permitiendo que las células pudieran desarrollarse. En el caso de los azúcares reductores se obtuvieron concentraciones de 3.5 g/l (figura 12) a 8.5 g/l (figura 9). Si comparamos la corrida 3 con la 2, en el primer caso fue más baja y la concentración alcanzada pudo ser debida a que el tiempo de autólisis fue de 16 horas y no de 18 horas como en la corrida 2 (figuras 9 y 12). Debido a que no se nota una disminución en la cantidad de azúcares, es probable que la velocidad de asimilación de esta fuente de carbono sea muy lenta, mientras que la velocidad de liberación sea lo suficientemente alta para no observar un decremento. La concentración de nitrógeno en el medio es variable, lo cual se puede explicar posiblemente por la formación de complejos en el extracto de levadura. Sin embargo, se observa que éste tiene un relativo incremento a partir de las catorce horas en la segunda corrida y a partir de las ocho horas en la tercera corrida. Antes de los tiempos mencionados la concentración de nitrógeno muestra un comportamiento inestable. Se puede discutir que las condiciones de autólisis empleadas no fueron las adecuadas o hubo factores que requerirán una investigación más profunda.

En las corridas 4 y 5 se trabajó con *S. cerevisiae*. Con respecto a la proteína el comportamiento poco explicable podría deberse a que hay una rápida interacción de la proteína con algún componente del medio, esto es, se logra observar una hidrólisis y al mismo tiempo mediante algún mecanismo desconocido la proteína se asocia o se asimila como en el caso de las corridas 2 y 3. El aumento y disminución de los azúcares podría deberse como ya se había mencionado a la unión de estos con otros componentes para la formación de complejos. El nitrógeno en la corrida 4, tuvo un alto incremento hasta 1500 mg/l a las 14 horas, lo cual no se observó en la corrida 5. Esto pudo deberse a la formación de complejos, como ya se había mencionado anteriormente, lo cual impide una determinación correcta del mismo. De las corridas anteriores se considero que de

la máxima concentración de nitrógeno que se obtuvo, se puede inferir que la velocidad de autólisis (considerada como la máxima cantidad de nitrógeno liberada), es mayor para *S. cerevisiae* que para *C. utilis* (tabla 15).

Es probable que el sistema proteolítico, como lo especifican varios autores,¹⁶ funciona mejor en la levadura de cerveza que en la levadura tórula (o forrajera), por lo cual hasta la fecha se prefiere emplear la primera para la producción industrial de autolizados de levadura.

El efecto del pH sobre la capacidad de autólisis se considera de interés práctico, ya que un autolizado en sí constituye un medio nutritivo bastante rico y, por consiguiente, fácil de contaminarse. En la corrida 6, con *S. cerevisiae*, se observó que a un pH de 4.84 no hay una hidrólisis significativa de proteína; esto quizás debido a que la hidrólisis de las proteínas no se facilita con este pH, observándose algo similar con el pH 2.84, quizás debido como ya se mencionó a que hay una rápida interacción de la proteína con algún otro componente por lo que no se logra observar una considerable hidrólisis de la misma. Con el pH 2.84 y 6.84 los azúcares se mantienen casi constantes, quizás debido a que estos pH no afectan la hidrólisis de los mismos; el pH 4.84 favoreció un incremento en la liberación de azúcares al medio. En relación a la concentración de nitrógeno obtenida, a pesar de que los valores oscilaron en rangos bastante pequeños, se observó que el pH de 4.84 fué el que favoreció una mayor liberación de éste debido a que la actividad proteolítica de las enzimas se maximiza con este valor de pH. Lurton, Segain y Feuillat,¹⁶ mostraron que a un pH 5 el 60% de nitrógeno celular se desprende de la célula consecutivamente a la acción de las proteasas y que esta es mas débil a un pH 3 con un 40% de nitrógeno celular.

En la corrida 7 se trabajó con *C. utilis*. También se observó que el efecto del pH con respecto a la hidrólisis proteica puede considerarse poco significativo, en los

tres valores de pH probados. Posiblemente este resultado fue debido a que con estos valores de pH, intracelularmente el efecto regulatorio del pH es lo suficientemente eficiente para evitar que una variación drástica de este parámetro afecte la actividad proteolítica de las enzimas involucradas y no se logre inducir dicha actividad. Cabe hacer notar que la diferencia observada de pH sobre la liberación de nitrógeno en las corridas 6 y 7 se debe primordialmente a que las 2 cepas con las que se trabajó en cada corrida respectivamente son especies diferentes, adaptadas a distintas formas de vida. En lo que se refiere a azúcares reductores se observa una tendencia más clara; sin embargo, la alta concentración inicial de azúcares posiblemente evita obtener mejores resultados. De lo anterior, se puede deducir que a un pH de 4.37 y 5.37 se lograron comportamientos deseables de autólisis con *C. utilis*, con un resultado máximo en 4.37 (200 mg/l de nitrógeno).

C. PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS

Por otro lado, los resultados obtenidos con base en las pruebas de control microbiológico realizadas, indican que las muestras no están expuestas al medio ambiente, del cual pudieran adquirir algunos microorganismos contaminantes; ya que el proceso se llevó a cabo bajo condiciones de completa esterilidad, con una buena asepsia en el manejo de la levadura. Además de que la temperatura a la cual se somete la crema para que se lleve a cabo la autólisis, impide el crecimiento de organismos contaminantes que pudieran existir en la muestra ó provoca su muerte durante el proceso. En la corrida 1 se observó la presencia de cinco colonias de organismos coliformes en la muestra cero (T0), pero en la última muestra (TF) no se percibe su presencia, ésto puede indicar su muerte causada por el aumento en la temperatura. Por otra parte, *Staphylococcus aureus* es una bacteria que habita principalmente en el área respiratoria y que puede ser difundida por medio de la cavidad oral. No se encontró presente en las muestras, ya que durante el proceso

al manejar la crema se utilizó un cubrebocas para un mayor control sobre los posibles microorganismos que pudieran contaminar el extracto. Además esta bacteria crece en un intervalo amplio de pH, de 4.2 a 9.3, pero su crecimiento óptimo se encuentra en un pH de 7.0 a 7.5,⁹ es decir, por lo regular en un pH neutro; y el pH que las muestras presentaban al principio del proceso autólítico, independientemente de la modificación que se hizo del mismo, variaba entre 4 y 6.

D. PRUEBAS BROMATOLÓGICAS

En cuanto a las pruebas bromatológicas, los resultados los podemos observar en la tabla 10 y así comparar con otro estudio realizado anteriormente sobre el análisis de sólidos en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado Jalisco (CIATEJ), en donde se obtuvo una composición promedio del extracto de levadura para *C. utilis* la humedad fué de 69.2%, 14.8% de proteínas, 0.09% de grasas, 1.23% de cenizas y 14.8% de carbohidratos; y para *S. cerevisiae* la humedad fué de 72.3%, 15.1% de proteínas, 0.08% de grasas, 1.52% de cenizas y 11.02% de carbohidratos. Por lo que se observa, los resultados del presente trabajo no variaron en gran medida en comparación a los realizados anteriormente en el CIATEJ y debido a que no se cuenta con bibliografía que nos muestre datos reales sobre la composición de un extracto de levadura se considera que los resultados obtenidos son normales, ya que no difieren mucho de los trabajos obtenidos anteriormente.

IX. CONCLUSIONES

1.- Se seleccionó la cepa de *S. cerevisiae* L-026 presenta una mayor velocidad de crecimiento en comparación con la cepa L-024 debido a que la cepa L-026 esta mejor adaptada para crecer en un medio de melaza.

2.- El pH óptimo oscila entre 4 y 6, es decir un pH ácido, se obtienen mejores rendimientos en cuanto a la autólisis y se favorece a una mayor liberación de nitrógeno.

3.- La acidez del medio es un factor que impide el crecimiento de microorganismos.

4.- Se estima que manejar la levadura en condiciones estériles y con medidas de completa higiene, son requisitos importantes para evitar la contaminación de la crema o la propagación de algún microorganismo durante el proceso autolítico.

5.- El tiempo y temperatura óptimos para realizar la autólisis de levaduras es de 12 a 20 horas con una temperatura de 55°C.

6.- *Saccharomyces cerevisiae* presenta un mejor rendimiento en comparación con *Candida utilis* durante el proceso autolítico.

X. RECOMENDACIONES

- 1.- Se aconseja que en próximas investigaciones las determinaciones de proteínas, azúcares y nitrógeno se lleven a cabo inmediatamente después de terminado el proceso de autólisis, ya que un período de tiempo largo puede hacer que varíen los resultados.
- 2.- Realizar una determinación del contenido de aminoácidos y vitaminas en el autolizado, ya que en el presente trabajo no se realizó por falta de equipo necesario.
- 3.- Se sugiere realizar pruebas organolépticas a los extractos obtenidos de las 2 cepas: *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* con el fin de observar cual de las 2 muestra mejores características en cuanto al sabor.

TABLA 1.- ALGUNAS EMPRESAS DEDICADAS A LA PRODUCCION DE EXTRACTOS DE LEVADURA USADOS COMO SABORIZANTES NATURALES.

EMPRESAS	PRODUCTOS	MARCAS COMERCIALES
Universal Foods Corporation	Extractos de levadura de panadería	Flavor Mate 945 Tastone 940 Tastone 310 Tastone 300
	Extractos de levadura de cerveza	Amberex 69 Amberex 1003 Amberex 5000 Chedar Mate
	Levadura inactiva	Nutrex 370 Nutrex 55
Provesta Corporation	Extractos de levadura primaria	Natural Flavor Enhancer Beef Natural Flavor
Cardi Foods Inc	Extractos de levadura primaria	Cardi Yeast Extrac
Gist Brocades	Extractos de levadura primaria	Engevita MYE
	Levadura inactiva	RYE-C Gistex Powder
Champlain Industriales Inc.	Extractos de levadura de cerveza	Nova chef Nova-Flav
	Extractos de levadura primaria	Ardamine Veeprex Yeastal
	Levadura inactiva	
Proteinas y vitaminas de levadura, S.A.	Levadura Inactiva	Provicel
Arancia S.A. de C.V.	Levadura inactiva	Yeastal

Peraza-Luna 1992

TABLA 2.- AMINOGRAMA DE LEVADURAS EMPLEADAS EN LA PRODUCCION DE PROTEINA MICROBIANA.

Levadura	Sustrato	(g/100 g de Proteína)								
		LEU	LIS	SER	TREO	VAL	ILEU	TRI	MET/CIS	ALA/TIR
<i>Candida utilis</i>	Melaza	—	7.5	3.8	4.6	5.4	—	—	—	6.6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Melaza	7.9	8.2	—	4.8	5.5	5.5	1.2	4.1	9.5
Proteína de soya		4.9	3.8	—	2.7	3.2	3.0	1.0	1.9	5.5
Patron FAO/WHO (1973)		7.0	5.5	4.0	4.0	5.0	4.0	1.0	3.5	6.0

Litchfield (1979) 15

TABLA 3.- ENZIMAS PROTEOLITICAS INTRACELULARES DE S. CEREVISIAE.

ENZIMA	FUNCION	CARACTERISTICA
A	Aminopeptidasa	Acido endo-peptidasa
B	Proteinasa	Serina endo-peptidasa
C	Proteinasa	Serina exo-peptidasa
D	Carboxipeptidasa	Exo-peptidasa (Mg++)
Y	Carboxipeptidasa	Exo-peptidasa (Zn ++)
II	Aminopeptidasa	Exo-peptidasa (Mg ++)

Peraza-Luna (1992) 26

TABLA 4.- BIOMASA OBTENIDA EN CADA CORRIDA.

No. de corrida	Peso (g)
1	135.41
2	242.33
3	288.88
4	293.14
5	302.15
6	255.61
7	288.82

TABLA 5.- RESULTADOS CORRIDA NO. 1 con Candida utilis.

TIEMPO (Horas)	PROTEINAS mg/ml	AZUCARES g/l	NITROGENO mg/l
1	3.780	0.000	0.000
2	5.103	0.000	0.000
3	3.318	0.000	0.000
4	0.780	1.281	0.000
5	0.882	0.889	0.000
6	0.951	0.838	127.873
8	0.846	3.666	988.873
10	0.892	3.631	270.157
12	0.937	3.741	281.102
14	1.013	5.317	219.081
16	1.090	5.981	158.884
18	1.120	3.827	215.432

TABLA 6.- RESULTADOS CORRIDA NO. 2 con Candida utilis.

TIEMPO (Horas)	PROTEINAS mg/ml	AZUCARES g/l	NITROGENO mg/l
0	0.148	0.756	136.994
1	0.112	0.704	135.170
2	0.120	0.900	124.225
3	0.123	0.819	135.170
4	0.133	0.912	171.653
5	0.166	1.408	188.070
6	0.162	1.391	166.180
8	0.151	5.288	158.884
10	0.164	6.904	155.235
12	0.238	7.268	130.026
14	0.264	7.984	199.015
16	0.316	8.734	226.377
18	0.286	9.179	255.564

TABLA 7.- RESULTADOS CORRIDA NO. 3 con *Candida utilis*.

TIEMPO (Horas)	PROTEINAS mg/ml	AZUCARES g/l	NITROGENO mg/l
0	0.137	0.727	811.979
1	0.124	0.802	822.533
2	0.140	0.935	801.425
3	0.153	0.744	814.617
4	0.170	0.877	759.208
5	0.176	0.894	746.016
6	0.181	0.969	740.739
8	0.229	2.112	912.243
10	0.217	2.580	954.459
12	0.272	2.701	848.918
14	0.367	3.365	872.665

TABLA 8.- RESULTADOS CORRIDA NO. 4 con *Saccharomyces cerevisiae*.

TIEMPO (Horas)	PROTEINAS mg/ml	AZUCARES g/l	NITROGENO mg/l
0	7.344	18.528	1360.882
1	8.249	20.202	1264.463
2	9.543	19.278	1236.915
3	9.622	19.509	1305.785
4	6.373	16.565	1347.107
5	10.336	18.181	1374.656
6	8.117	17.720	1353.333
8	8.969	18.297	1388.430
10	10.943	16.854	1415.978
12	8.302	18.528	1498.623
14	10.633	19.798	1526.171

TABLA 9. RESULTADOS CORRIDA N0. 5 con *Saccharomyces cerevisiae*.

TIEMPO (Horas)	PROTEINAS mg/ml	AZUCARES g/l	NITROGENO mg/l
0	12.773	90.368	14.711
1	11.822	89.616	15.124
2	12.317	90.946	13.471
3	10.263	90.195	13.609
4	9.220	88.290	14.022
5	5.125	88.636	13.196
6	9.640	92.042	14.711
8	11.439	92.389	13.609
10	8.216	88.809	14.986
12	15.348	90.830	14.022
14	8.196	91.523	13.471

TABLA 10.- RESULTADOS CORRIDA NO. 6 con *Saccharomyces cerevisiae*.

TIEMPO (Horas)	PROTEINAS mg/ml			AZUCARES g/l			NITROGENO mg/l		
	pHN	pH1	pH2	pHN	pH1	pH2	pHN	pH1	pH2
0	0.093	0.106	0.099	11.429	11.415	11.423	169.500	162.125	0.334
1	0.091	0.091	0.091	11.427	11.415	11.426	140.000	105.000	0.140
2	0.091	0.091	0.096	11.127	11.417	11.423	141.667	103.333	0.150
3	0.090	0.095	0.100	11.431	11.409	11.428	153.333	81.667	0.190
4	0.095	0.097	0.100	11.448	11.407	11.445	158.333	108.333	0.210
5	0.093	0.096	0.100	11.444	11.427	11.426	193.333	150.000	0.260
6	0.097	0.091	0.107	11.433	11.429	11.429	216.667	168.333	0.380
8	0.101	0.100	0.107	11.168	11.428	11.457	235.000	205.000	0.400
10	0.104	0.111	0.107	11.466	11.430	11.457	268.333	253.333	0.565
12	0.103	0.104	0.108	11.492	11.440	11.490	286.667	278.333	0.720
14	0.103	0.106	0.108	11.000	11.431	11.473	325.000	301.667	0.785
16	0.102	0.106	0.109	12.032	11.439	11.481	358.000	325.000	0.830

TABLA 11.- RESULTADOS CORRIDA NO. 7 con Candida utilis.

TIEMPO (Horas)	PROTEINAS mg/ml			AZUCARES g/l			NITROGENO mg/l		
	pHN	pH1	pH2	pHN	pH1	pH2	pHN	pH1	pH2
0	0.106	0.101	0.141	11.423	11.442	11.413	141.844	165.818	169.500
1	0.102	0.095	0.115	11.429	11.440	11.410	146.667	150.000	118.330
2	0.113	0.101	0.113	11.428	11.444	11.401	126.667	141.667	125.000
3	0.103	0.097	0.119	11.441	11.432	11.392	146.667	170.000	109.167
4	0.110	0.098	0.116	11.442	11.431	11.408	146.667	165.000	125.000
5	0.103	0.097	0.112	11.425	11.450	11.408	121.667	178.333	121.667
6	0.104	0.096	0.112	11.572	11.626	11.441	131.667	178.333	138.333
8	0.100	0.106	0.113	11.828	11.925	11.588	166.000	196.667	136.667
10	0.102	0.202	0.113	11.972	12.005	11.638	158.333	195.000	140.000
12	0.104	0.101	0.118	11.898	11.974	11.635	158.333	171.667	145.000
14	0.103	0.104	0.121	11.954	12.010	11.640	160.000	188.333	156.667
16	0.117	0.105	0.120	11.956	11.996	11.638	166.667	198.333	133.333

TABLA 12.- AJUSTE DE VALORES DE pH PARA PRUEBA DE AUTOLISIS.

LEVADURAS	pHN	pH1	pH2
S. cerevisiae	4.84	2.84	6.84
C. utilis	6.37	4.37	8.37

TABLA 13.- PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS.

1a Corrida	<i>S. aureus</i>	<i>Coliformes</i>
T0 Directa	(-)	5
Dilución 1:10	(-)	(-)
TF Directa	(-)	(-)
Dilución 1:10	(-)	(-)
2a Corrida		
T0 Directa	(-)	(-)
Dilución 1:10	(-)	(-)
TF Directa	(-)	(-)
Dilución 1:10	(-)	(-)
3a Corrida		
T0 Directa	(-)	(-)
Dilución 1:10	(-)	(-)
TF Directa	(-)	(-)
Dilución 1:10	(-)	(-)
4a Corrida		
T0 Directa	(-)	(-)
Dilución 1:10	(-)	(-)
TF Directa	(-)	(-)
Dilución 1:10	(-)	(-)
5a Corrida		
T0 Directa	(-)	(-)
Dilución 1:10	(-)	(-)
TF Directa	(-)	(-)
Dilución 1:10	(-)	(-)
6a Corrida		
pHN, pH1, pH2		
T0 Directa	(-)	(-)
Dilución 1:10	(-)	(-)
TF Directa	(-)	(-)
Dilución 1:10	(-)	(-)
7a Corrida		
pHN, pH1, pH2		
T0 Directa	(-)	(-)
Dilución 1:10	(-)	(-)
TF Directa	(-)	(-)
Dilución 1:10	(-)	(-)

T0 = Tiempo cero

TF = Tiempo final

TABLA 14.- PRUEBAS BROMATOLOGICAS *

ANALISIS	NO. DE CORRIDA										
	1a	2a	3a	4a	5a	6a ***			7a**		
	**	**	**	***	***	pHN	pH1	pH2	pHN	pH1	pH2
HUMEDAD	68.07	68.10	70.20	70.24	76.68	72.93	74.85	74.00	69.22	69.42	67.29
PROTEINAS	13.10	15.97	13.61	14.05	14.09	14.62	12.27	12.97	13.41	13.51	13.20
CENIZAS	1.30	1.25	1.25	1.58	1.16	1.30	1.28	1.10	1.25	1.81	1.97
GRASAS	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08	0.19	0.09	0.27	0.10	0.75	0.28
CARBOHIDRATOS	14.70	14.59	14.91	14.05	7.99	10.86	11.51	10.86	13.76	23.02	30.46

* Los resultados son en porcentajes.

** C. utilis.

*** S. cerevisiae.

TABLA 15.- MAXIMAS CONCENTRACIONES DE NITROGENO

NO. DE CORRIDA	CONCENTRACION (mg/l)	TIEMPO(hrs)	VELOCIDAD DE AUTOLISIS (mg/l hrs)
1	988.837	8	123.60
2	255.564	18	14.19
3	954.459	10	95.44
4	1526.171	14	109.01
5	15.124	1	15.124
6 pHN	358.333	16	22.39
pH1	325.000	16	20.31
pH2	0.830	16	0.051
7 pHN	166.667	16	10.41
pH1	198.333	16	12.39
pH2	156.667	14	11.19

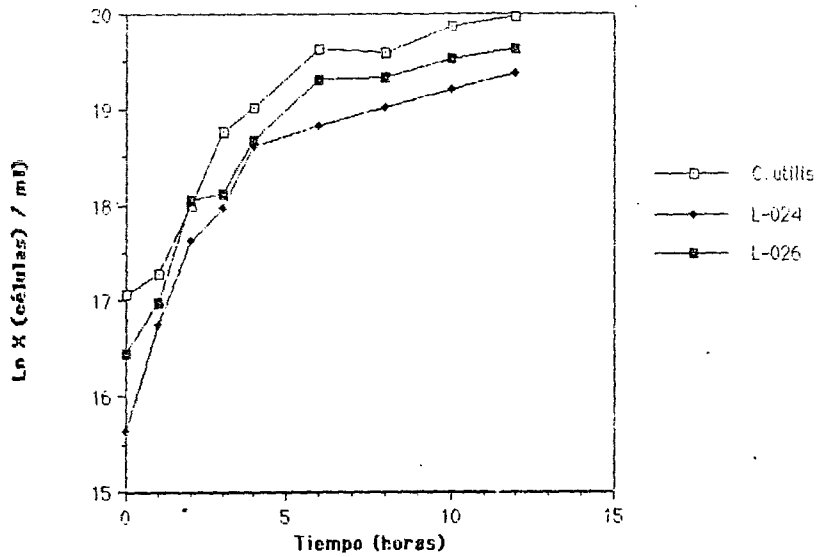


Figura 1.- CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Saccharomyces cerevisiae* BCGC L-026, L-024 y *Candida utilis*.
 En medio de melaza (20g/l) Condiciones: T=30°C agitación 200 rpm.

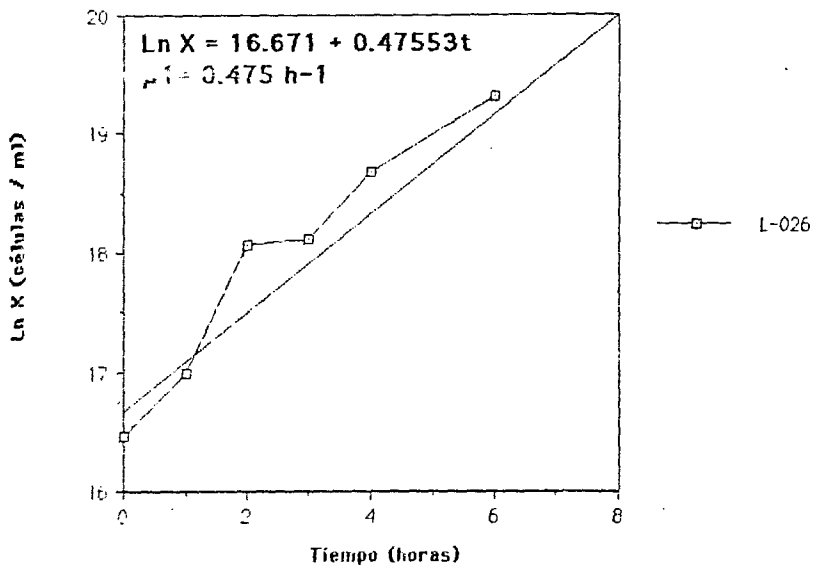


Figura 2.- ESTIMACION DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE *S. cerevisiae* BCGC L-026.

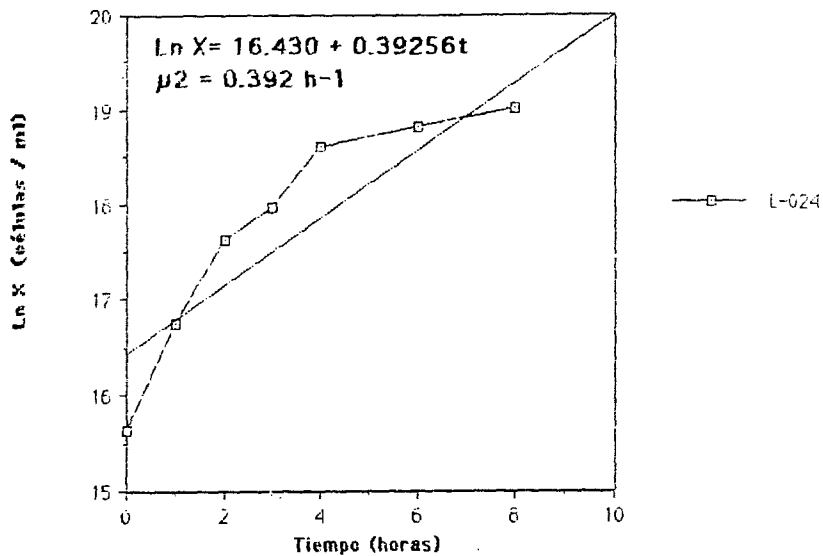


Figura 3.- ESTIMACION DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE *S. cerevisiae* BCGC L-024.

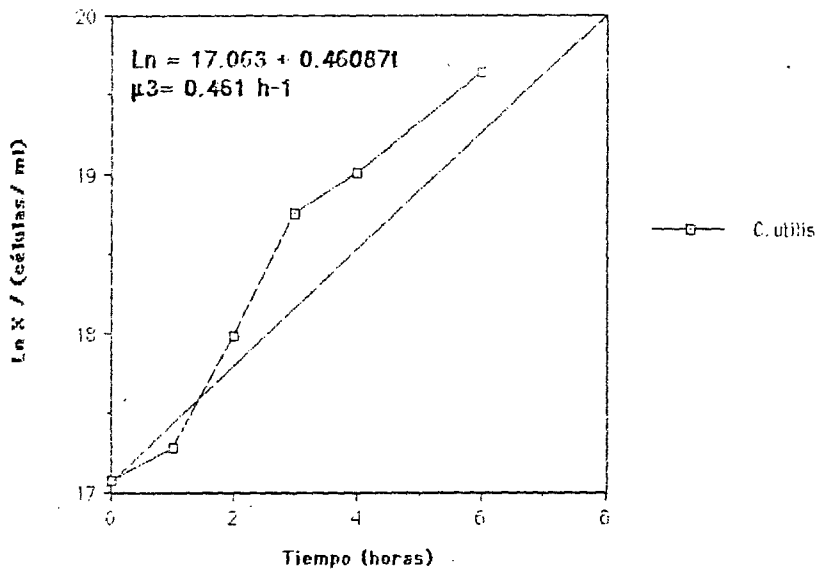


Figura 4.- ESTIMACION DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE C. utilis.

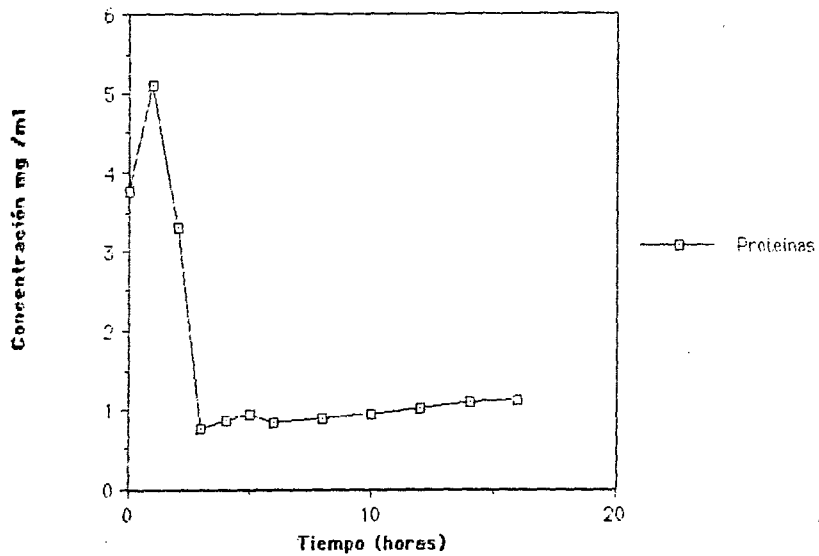


Figura 5.- CONCENTRACION DE PROTEINA C. utilis.
1a Corrida. Condiciones: T = 30 a 55°C, 18 hrs.

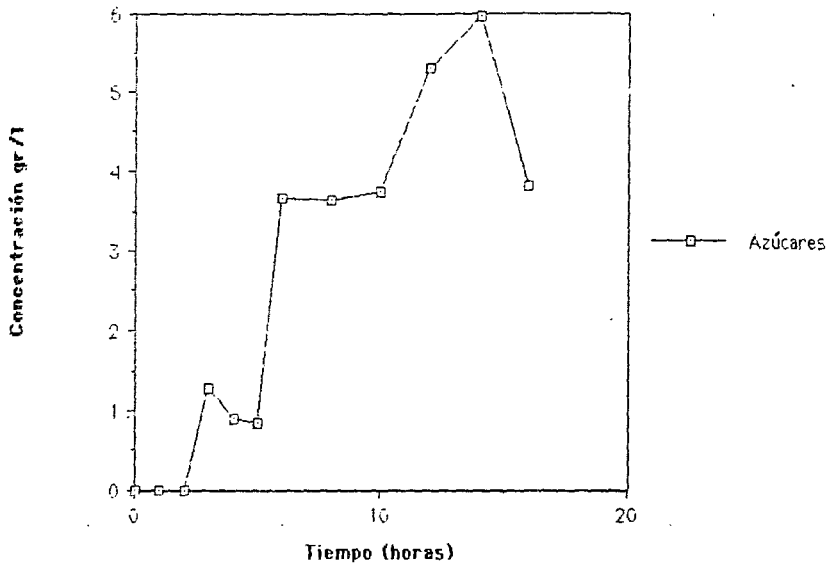


Figura 6.- CONCENTRACION DE AZUCARES REDUCTORES C. UTILIS
1a Corrida. Conbdiciones: T=30 a 55°C, 18 hrs.

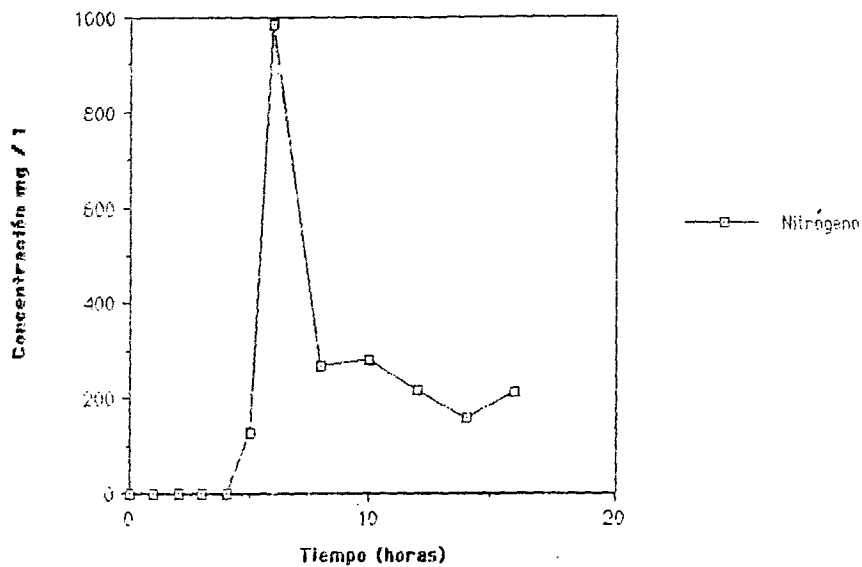


Figura 7.- CONCENTRACION DE NITOGENO. C. utilis.
1a Corrida. Condiciones: T= 30 a 55°C, 18 hrs.

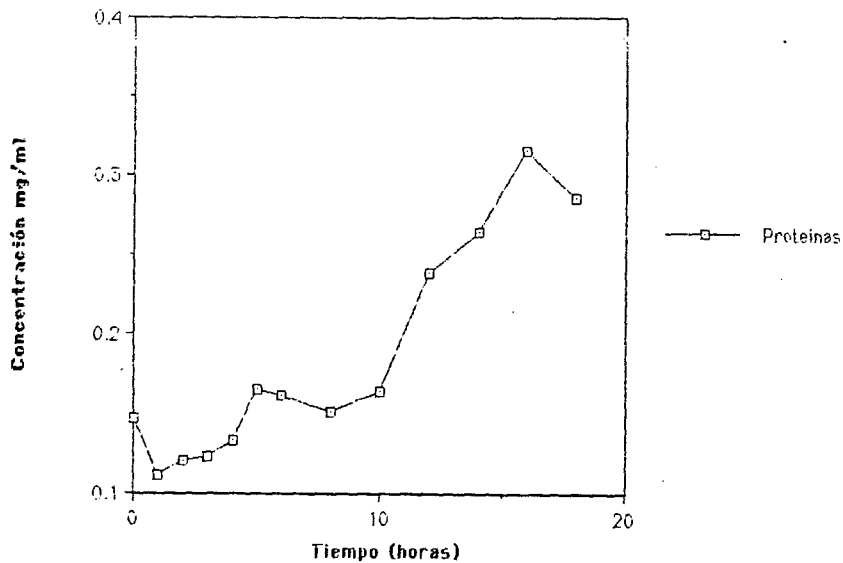


Figura 8.- CONCENTRACION DE PROTEINA C. utilis
2a Corrida. Condiciones: T= 30 a 55°C, 18 hrs.

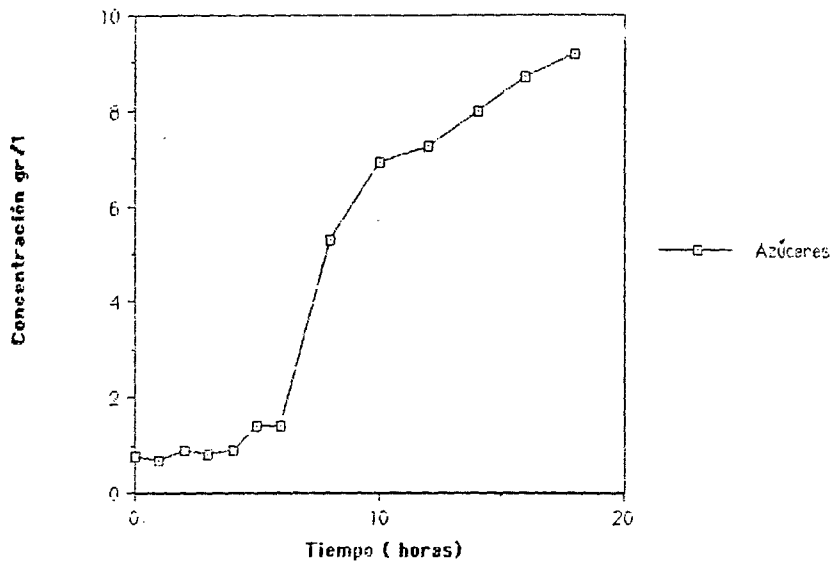


Figura 9.- CONCENTRACION DE AZUCARES REDUCTORES
C. utilis. 2a Corrida. Condiciones: T=30 a 55°C, 18 hrs.

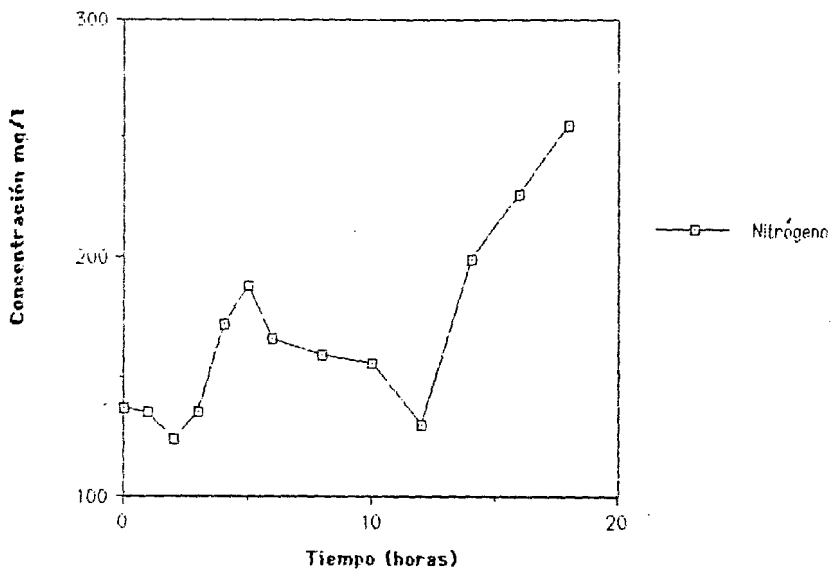


Figura 10.- CONCENTRACION DE NITROGENO C. utilis.
 2a Corrida. Condiciones: T= 30 a 55°C, 18 hrs.

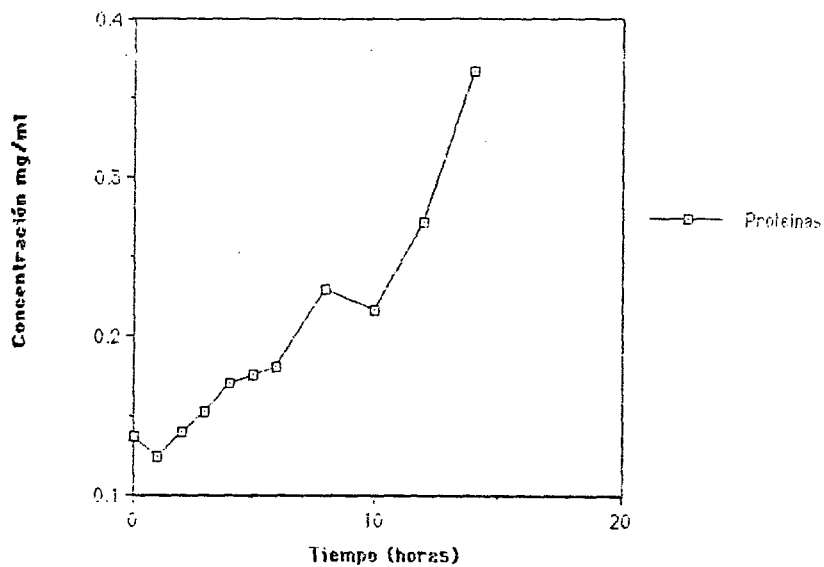


Figura 11.- CONCENTRACION DE PROTEINA C. utilis.
3a Corrida. Condiciones: T=30 a 55°C, 14 hrs.

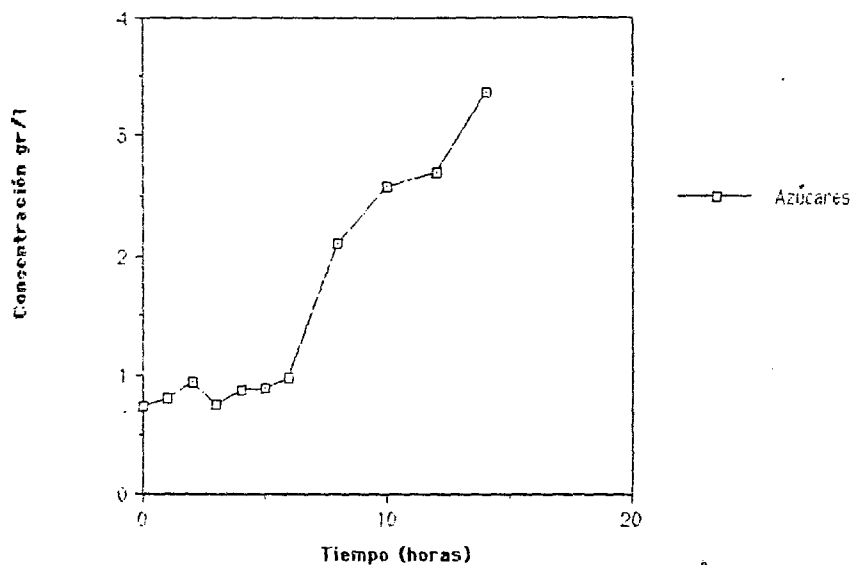


Figura 12.- CONCENTRACION DE AZUCARES REDUCTORES *C. utilis*
3a Corrida. Condiciones: T=30 a 55°C, 16 hrs.

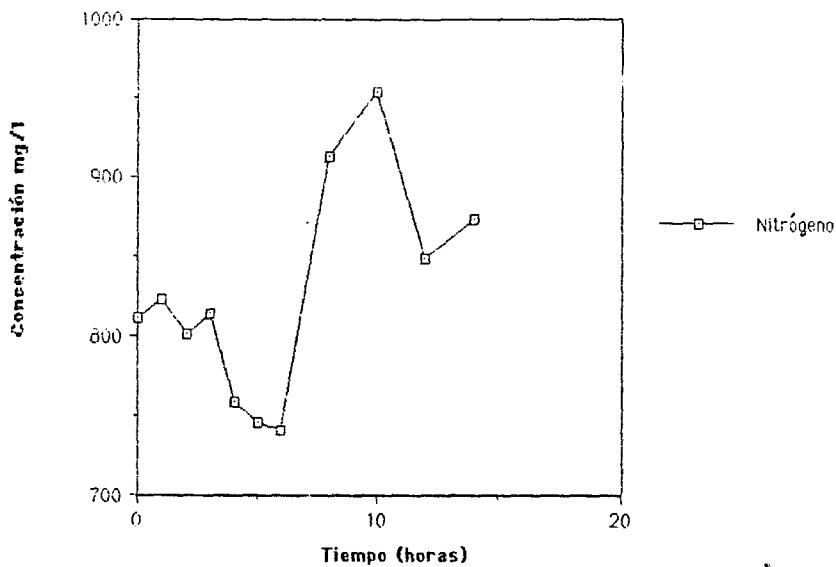


Figura 13.- CONCENTRACION DE NITROGENO

C. utilis. 3a Corrida. Condiciones T= 30 a 55°C, 14 hrs.

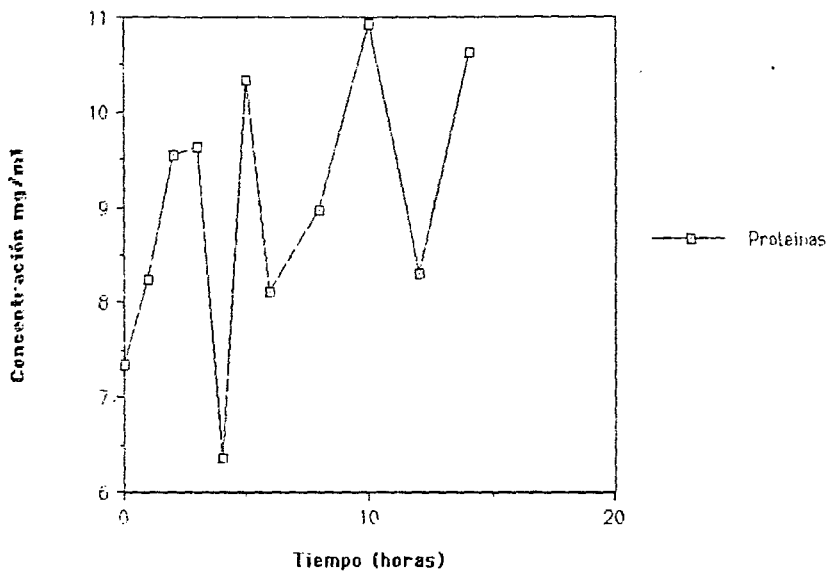


Figura 14.- CONCENTRACION DE PROTEINA *S. cerevisiae*.
4a Corrida. Condiciones: T=30 a 55°C, 14 hrs.

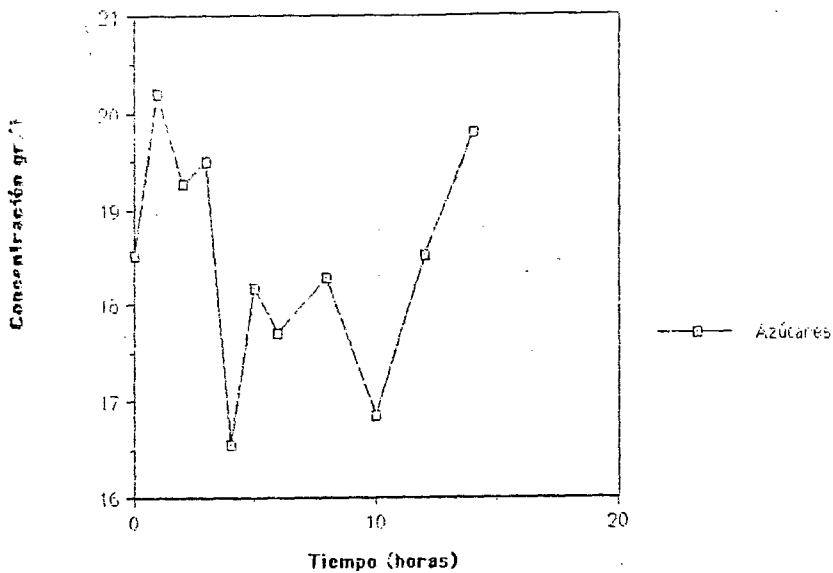


Figura 15.- CONCENTRACION DE AZUCARES REDUCTORES
S. cerevisiae 4a Corrida. Condiciones: T=30a 55°C, 14 hrs.

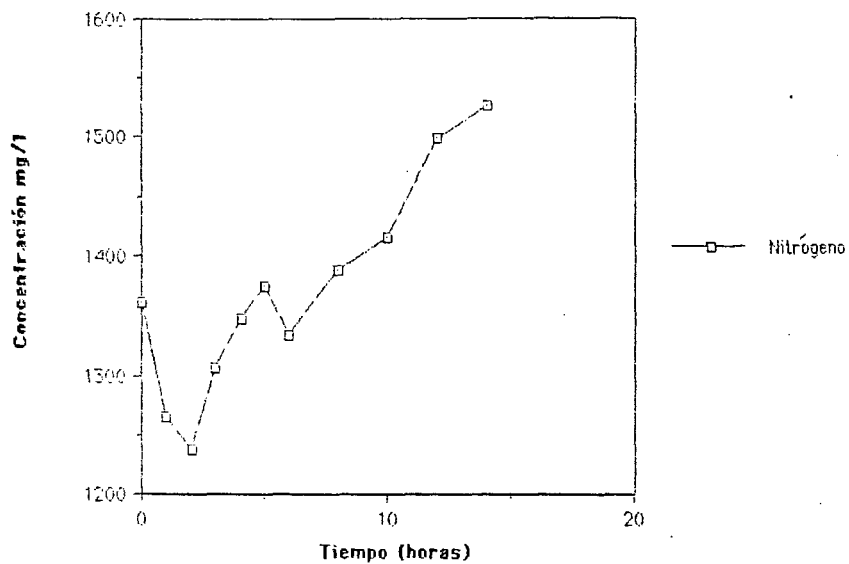


Figura 16.- CONCENTRACION DE NITROGENO *S. cerevisiae*.
4a Corrida. Condiciones: T=30 a 55°C, 14hrs.

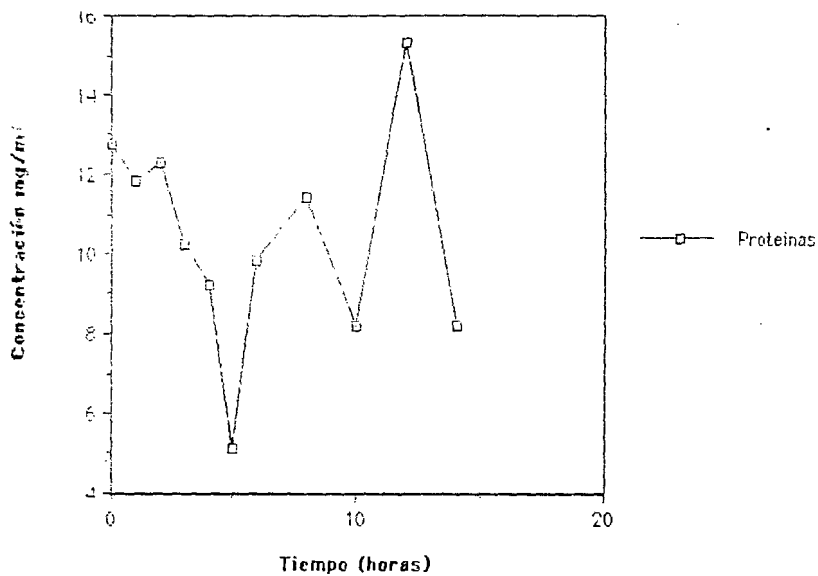


Figura 17.- CONCENTRACION DE PROTEINA *S. cerevisiae*.
5a Corrida. Condiciones: T=30 a 55°C, 14 hrs.

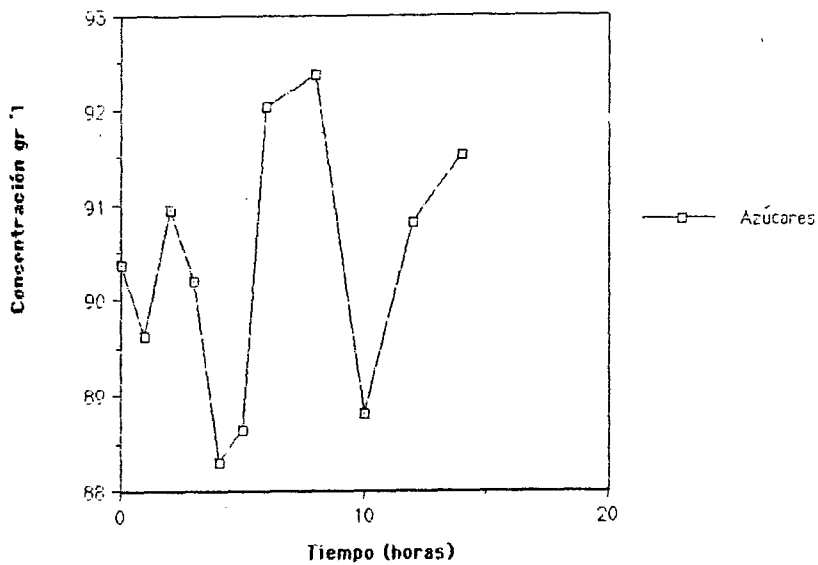


Figura 18.-CONCENTRACION DE AZUCARES REDUCTORES *S. cerevisiae*.
5a Corrida. Condiciones: T=30 a 55°C, 14 hrs.

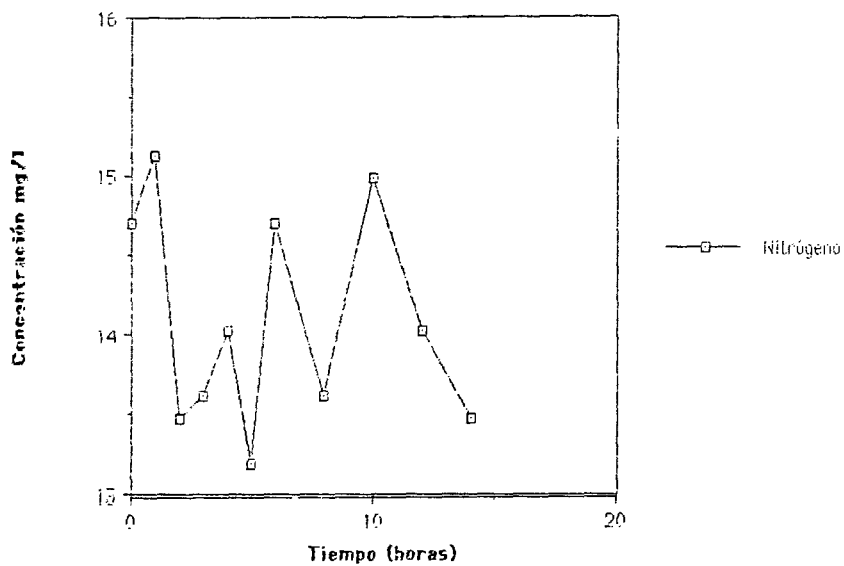


Figura 19.- CONCENTRACION DE NITROGENO *S. cerevisiae*.
5a Corrida. Condiciones: T=30 a 55°C, 14 hrs.

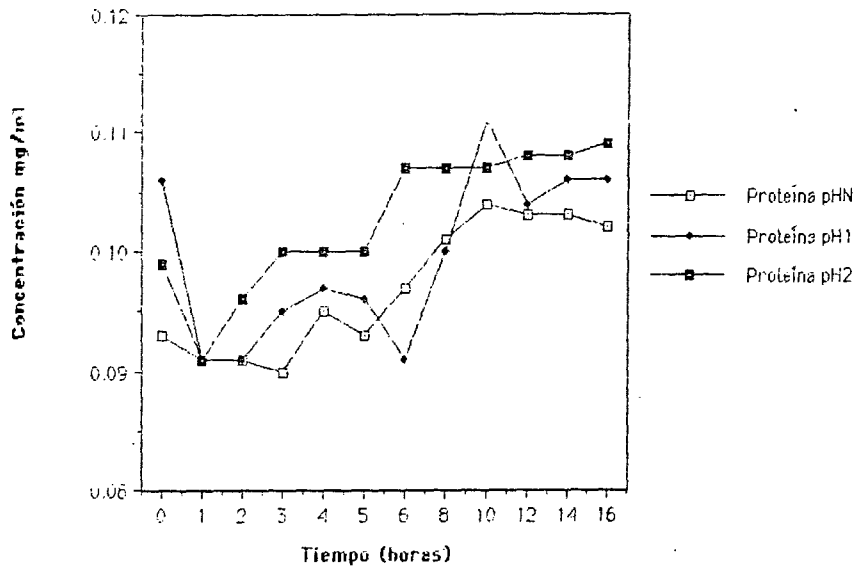


Figura 20.- CONCENTRACION DE PROTEINA *S. cerevisiae*, 6a Corrida.
 Condiciones: pHN 4.84, pH1 2.84 y pH2 6.84. T=30 a 55°C, 16 horas.

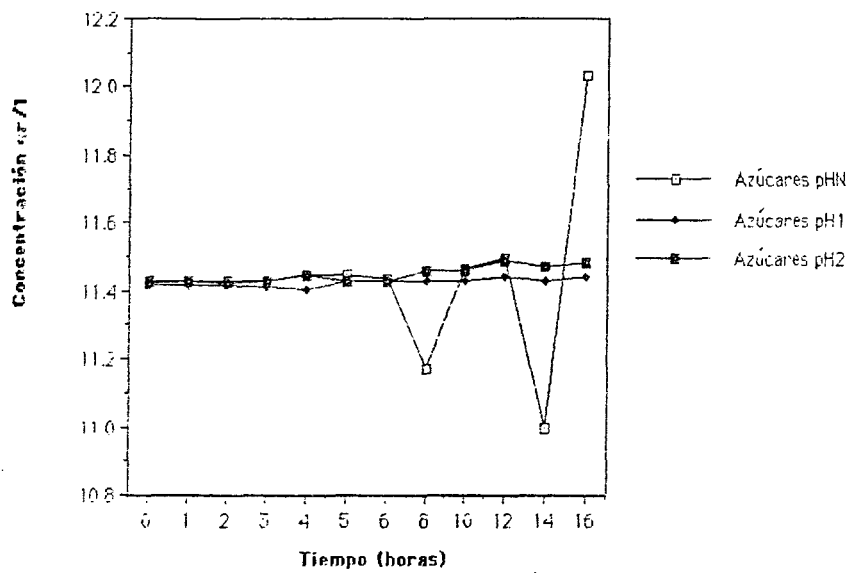


Figura 21.- CONCENTRACION DE AZUCARES REDUCTORES *S. cerevisiae*
6a Corrida. Condiciones: pHN 4.84, pH1 2.84 y pH2 6.84 . T= 30 a 55°C, 16 hrs

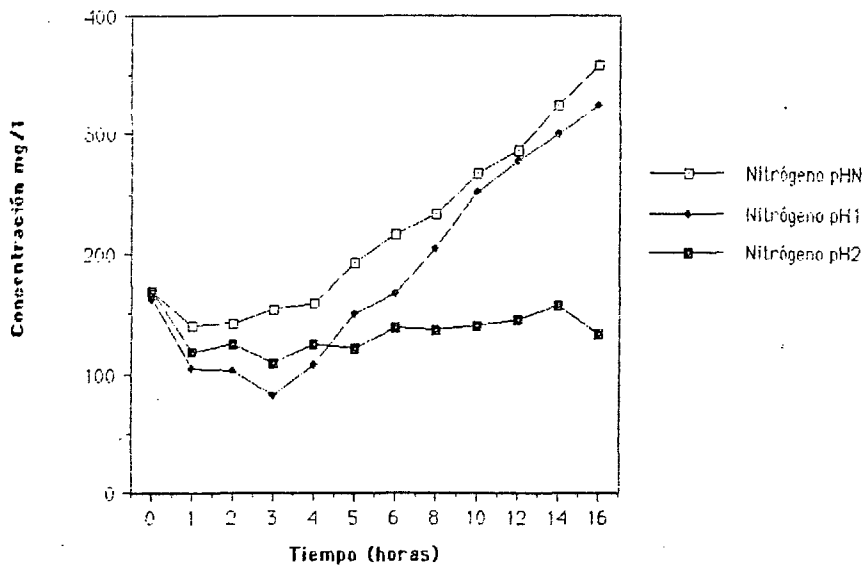


Figura 22.- CONCENTRACION DE NITROGENO *S. cerevisiae*. 6a Corrida.
 Condiciones: pHN 4.84, pH1 2.84 y pH2 6.84 .T= 30 a 55°C, 16 hrs.

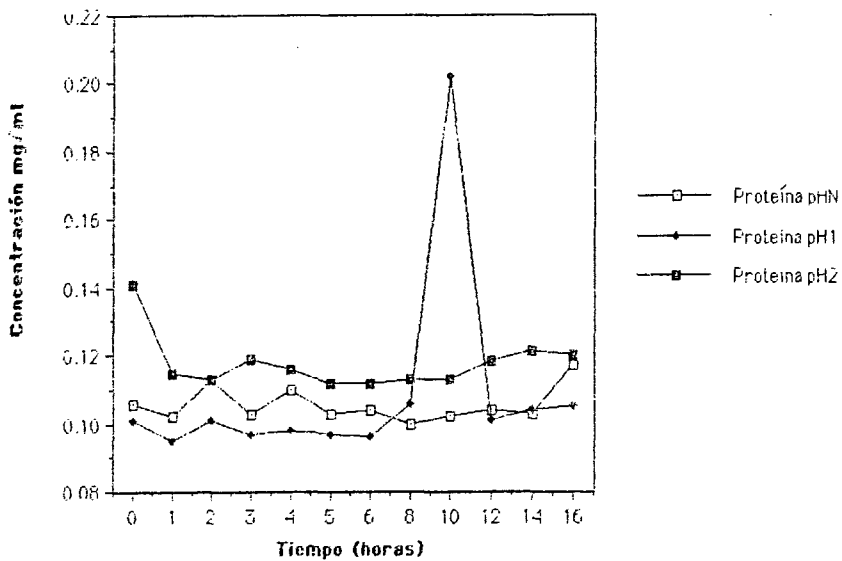


Figura 23.- CONCENTRACION DE PROTEINA C. utilis. 7a Corrida.
 Condiciones pHN 6.37, pH1 4.37 y pH2 8.37 T= 30 a 55°C, 16 hrs.

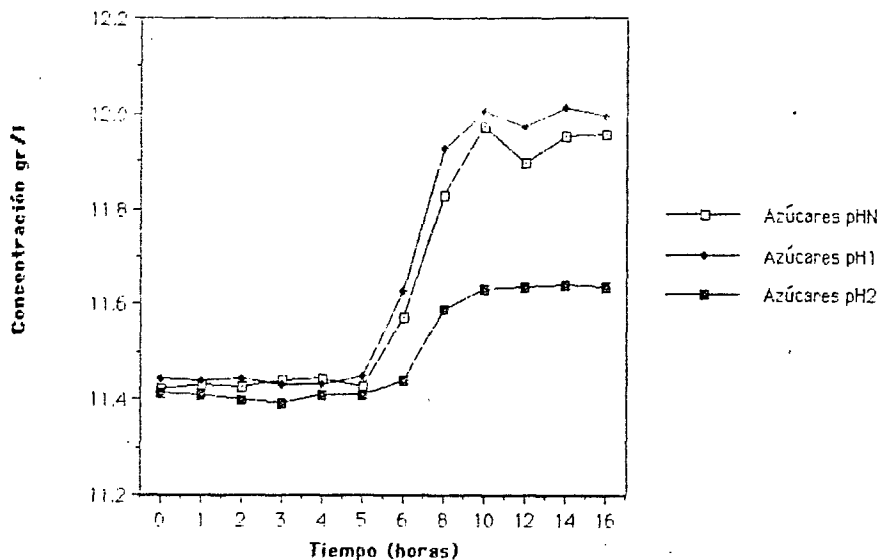


Figura 24.- CONCENTRACION DE AZUCARES REDUCTORES *S. cerevisiae*. 7a corrida.
 Condiciones: pHN 6.37, pH1 4.37 y pH2 .37 T= 30 a 55°C, 16 hrs.

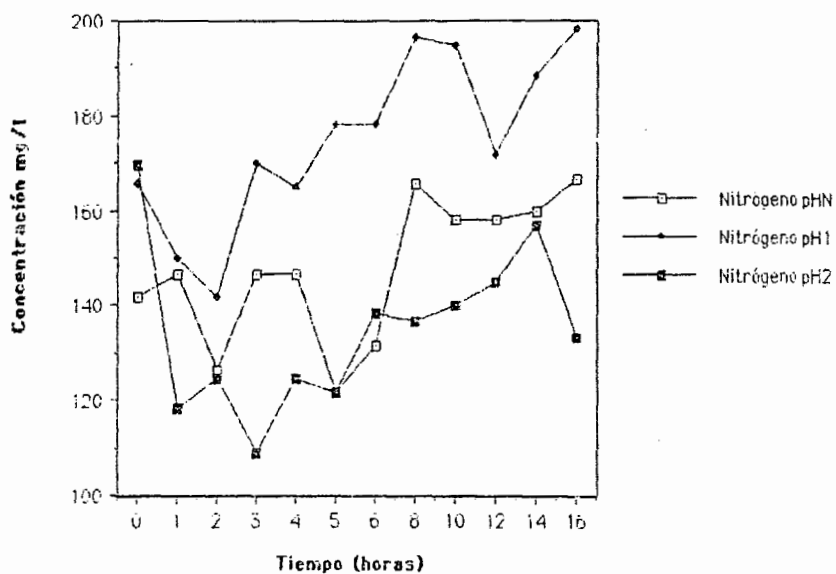


Figura 25.- CONCENTRACION DE NITROGENO *S. cerevisiae*. 7a corrida.
 Condiciones: pHN 6.37, pH1 4.37 y pH2 8.37 T= 30 a 55°C, 16 hrs.

XII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Acreman, A. R. 1966. Processing brewers yeast. *Process Biochemistry* 1 (9): 313-317.
- 2.- Adler, J. N. 1984. Control of the proteolytic reaction of the level of bitterness in protein hydrolysis processes. *Biotechnol. J. Chem. Tech.* 34 (3): 235-222.
- 3.- Albrecht, J.J., y F.H. Deindoerfer. 1966. Autolyzed yeast extracts make foods flavorful. *Food Engineering* 38 (10): 92-95.
- 4.- Bradford, M. 1976. A rapid y sensitive method for the quantitation of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72: 248-254.
- 5.- Frazier, W.C.1976. *Microbiología de los alimentos.* Ed. Acribia. Zaragoza. 81-126, 136, 466-482.
- 6.- Helrich, K. 1990. *Official Methodos of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.* 15 Edition. Arlington. 94-100.
- 7.- Holzer, H. 1978. The proteolytic system in yeast during growth and sporulation. *Biochemistry and genetics of yeast. Pure and applied aspects.* Bacila,M., B. L. Horecker y A. O. M. Stoppani (eds.). Academic Press.Alemania del Este. 229-240.
- 8.- Hough, J. S., y J. S. Maddox. 1970. Yeast autolysis. *Process Biochemistry.* 5 (5): 50-52.
- 9.- Instituto Politécnico Nacional. 1990. *Manual de prácticas de Laboratorio de Microbiología Sanitaria.* 2a. Edición. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México, D.F. 7-18, 74-114.
- 10.- Izzo, H.V. y Chi-Tang Ho. 1991. Isolation and identification of the volatile components of an extruded autolyzed yeast extract. *Journ. Agric. and Food Chemistry.* 39 (12): 2245-2248.
- 11.- Jean, A. y R. Fragne. 1990. *La Ciencia de los alimentos de la A a le Z.* Ed. Acribia. Zaragoza. 46, 60, 93.

- 12.- Kelly, M. 1983. Yeast Extract. In: Industrial Enzymology. Good Frey, T. y I. J. Reichert (eds.). The Nature Press. Cambridge 457-465.
- 13.- Kollar, R., E. SturdiK y J. Sajbidor. 1992. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. Food Biotechnology 6 (3): 225-237.
- 14.- Litchfield, J.H. 1979. Production of single-cell protein for use in food or feed. Microbial Technology. H. J. Pepler y D. Perlman (eds.). Nueva York. 93-155.
- 15.- Lowry, O.H. , N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. 1951. Protein measurement with folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 256-275.
- 16.- Lurton, L., J.P. Segain, y M. Feuillat. 1989. Etude de la protéolyse au cours de Autolyse de levures en milieu acide. Sciences Aliments 9: 111-124.
- 17.- Lynch, A. N. 1972. Métodos de laboratorio. 2a edición Interamericana. México, D.F. 118-119.
- 18.- Michelena, G., y J.F. Rodríguez. 1990. Fraccionamiento de autolizados de levadura por ultrafiltración. Segundo Seminario Internacional de Azúcar y Derivados de la Caña. La Habana, Cuba.
- 19.- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 3: 426-428.
- 20.- Miñoza, M. G. 1989. Sensory Evaluation Methods. Ed. College of home Economics. Dilman, Quezan City. 25-85.
- 21.- Mermelstein, N. 1989. Continuous fermentor produces natural flavor enhancers for foods and pet foods. Food Technology 43 (7): 50-53.
- 22.- Norman, W.D. 1988. Conservación de alimentos. Ed. CECSA. México, D.F. 38-39.
- 23.- Pearson, D. 1976. Técnicas de Laboratorio para el Análisis de Alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza. 41, 55, 62, 68.
- 24.- Pepler, A.J, y D. Perlman. 1979. Microbial Technology. 2a Edition. Academic Press. Nueva york. 1: 176-177 y 2: 138.

- 25.- Peraza-Luna, F.A. 1988. Producción de levadura forrajera a partir de una mezcla vinazas-melazas por fermentación continua. Tesis de Maestría. CINVESTAV-IPN. México, D.F.
- 26.- Peraza-Luna, F.A. 1992. Saborizantes de levaduras: alternativa biotecnológica potencial. En "Biotecnología Hoy". Alvarez De la Cuadra, J. (Coordinador) CONACYT. México. 29-42.
- 27.- Ramírez, R.E. 1993. Comparación de dos cepas de *S. cerevisiae*. En forma libre e inmovilizada para la producción de alcohol a partir de melazas de caña. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Guadaluajara.
- 28.- Reed, G. y H. J. Pepler : 1973, Yeast Technology. Ed. Company ING. Westport Connecticut. p.p. 15-23, 33-37, 356-358.
- 29.- Rodríguez-Palacio, F. 1990. Aditivos en la industria alimenticia. Kraft-General Foods de México. UNAM. México, D. F. 4-42.
- 30.- Romo, H.S.1992. Optimización de nutrientes en los medios de propagación y fermentación para la producción de alcohol a partir de melazas de caña. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Guadalajara.
- 31.- Sánchez, G. M. 1987. Potenciadores del sabor en la industria alimenticia. UNAM. México. 73.
- 32.-Secretaría de Salubridad y Asistencia. 1979. Técnicas generales para análisis microbiológico de alimentos. Dirección General de Laboratorios de Salud Pública. México, D.F. 36-41.
- 33.- Speck, L.M. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Acadmic Press. Londres. 254- 261.
- 34.- Stoscheck, ch. M. 1990. Quantitation of protein. In "Methods in Enzymology". M. P. Dutscher (ed.). Academic Press. Nueva York 182: 50-68.
- 35.- Wang, I. C. 1979. Fermentation and enzyme technology. Academic Press. Nueva York. 11 - 30.