

300627
20
201



Universidad La Salle

ESCUELA DE QUIMICA
incorporada a la U. N. A. M.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

EVALUACION DE DIFERENTES METODOS PARA OBTENER CONCENTRADOS DE PROTEINA DE Kluyveromyces fragilis PARA UTILIZARSE POTENCIALMENTE EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS.

Tesis Profesional

Que para obtener el titulo de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a

MARIA DE JESUS RAMIREZ PALOMARES



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS
DIVISION DE INGENIERIA
FACULTAD DE QUIMICA
UNAM.

DIRECTORA DEL TEMA DE TESIS ULSA :

DRA. ARACELI SANCHEZ DE CORRAL

ASESORES ACADEMICOS DE LA UNAM :

M.C. AMANDA GALVEZ MARISCAL
M.C. MARIANO GARCIA GARIBAY

JURADO ASIGNADO :

PRESIDENTE	: Q.F.B. HUGO RUBEN CARREÑO ORTIZ
VOCAL	: DRA. ARACELI SANCHEZ DE CORRAL
SECRETARIO	: DRA. RUBY NICKEL DE CASTREJON
1er SUPLENTE	: Q. B. P. GUADALUPE MORALES
2o. SUPLENTE	: Q.F.B. MARTHA WESTRUP

INDICE

1 INTRODUCCION

1.1 Proteína Unicelular.....	1
1.2 Levaduras que utilizan la lactosa.....	3
1.3 Utilización del Subproducto Suero de Queso como sustrato para su propagación	4
1.4 Criterios Fundamentales.....	5
1.5 OBJETIVO.....	7

2 GENERALIDADES

2.1 Producción de Biomasa a partir de suero de queso... 2.1.1 Parámetros importantes en la fermentación	9
2.2 Procesos Industriales	9
2.3 Procesos de Extracción de la Proteína	11
2.4 Métodos de Extracción Proteínica con disminución de ácidos nucleicos	17
2.5 Ácidos Nucleicos	18
2.5.1 Nivel máximo de ingesta. Daños Fisiológicos.	
2.5.2 Contenido de Ácidos Nucleicos en <u>K. fragilis</u>	23
2.6 Utilización de la Proteína unicelular	25
2.7 Estudios realizados en la proteína de <u>K. fragilis</u>	27
2.7.1 Propiedades Funcionales	29
2.7.2 Calidad Nutricional y Seguridad	30
2.7.3 Composición de aminoácidos de <u>K. fragilis</u>	30
2.7.4 Productos Alimenticios en que se utiliza <u>K. fragilis</u>	35

3 MATERIALES Y METODOS.

3.1 Producción de la Biomasa	37
3.2 Técnicas de Ruptura Celular	38
3.3 Cuantificación de la Solubilización de la proteína liberada por el método Lowry	43
3.4 Condiciones de extracción de la proteína unicelular con disminución de ácidos nucleicos.	44
3.5 Análisis Proximal	45
3.6 Determinación de ácidos nucleicos	47
3.7 Determinación de Triptofano	50

4	RESULTADOS	54
5	DISCUSION DE RESULTADOS	60
6	CONCLUSIONES	69
7	RECOMENDACIONES	70
8	BIBLIOGRAFIA	71

1 INTRODUCCION.

1.1 Proteína Unicelular (P.U.C.)

Alrededor del mundo existen infinidad de personas que sufren de una deficiencia proteico-calórica en su alimentación. A medida que la población mundial continúa expandiéndose, la necesidad de fuentes de proteína se acentuará. Excluyendo la energía, los dos factores que determinan la disponibilidad de las fuentes alimenticias a nivel mundial son: una alta población y la existencia de tierras arables. Como la demanda real de proteínas aumenta directamente con la población y como se acentúa el cambio de la agricultura convencional, debido a la limitación de tierras, a formas más directas de consumo de proteínas provenientes de plantas y microorganismos, se crea la necesidad de nuevos procesos y de nuevos productos.

Es esencial buscar métodos diferentes para la producción y manufactura de materias primas y alimentos terminados, y no solo limitarse al mejoramiento y modificación de los métodos tradicionales. Debe hacerse un esfuerzo para

lograr la producción tecnológica de alimentos de acuerdo a las necesidades y especificaciones de la población. En esta búsqueda para la producción de alimentos, la proteína unicelular es una de las fuentes más adecuadas y con mayor posibilidad de implementación. Se denomina proteína unicelular a las fuentes de proteína cruda o refinada provenientes de organismos unicelulares.

El alto grado de producción y alto rendimiento proteico, la facilidad del control de producción y la posible producción de alimentos sin el uso de tierras agrícolas, hace a la proteína unicelular muy atractiva comparada con plantas y fuentes animales. Los microorganismos poseen tiempos cortos de duplicación, lo que asegura un aumento rápido para la producción de biomasa. Para obtener cepas adecuadas en términos de velocidad de crecimiento, composición de aminoácidos esenciales, etc., se puede aprovechar la flexibilidad de la genética a través de mutaciones inducidas, recombinación y selección de los microorganismos de interés (76,28,40).

Los microorganismos más utilizados en alimentos son las levaduras(80). Estas han sido usadas en ali

mentos como aditivos y agentes saborizantes, tienen altas concentraciones de proteína y son más fáciles de recuperar en las fermentaciones que las bacterias. Además son producidas en diversos sustratos provenientes de carbohidratos que son reconocidos por sí mismos como fuentes de alimento. Se consideran levaduras alimenticias a: Saccharomyces cerevisiae, Candida utilis, Kluyveromyces fragilis (anteriormente conocida como Saccharomyces fragilis) y Saccharomyces uvarum. Estas han sido aceptadas para consumo humano por las autoridades sanitarias de Estados Unidos y están incluidas en la lista GRAS (Generally Recognized as Safe for Human Consumption) (18, 61, 53) La posible limitación que existe en la utilización de estas levaduras se debe a un contenido elevado de ácidos nucleicos.

1.2 Levaduras que utilizan la lactosa.

La identificación de las levaduras que utilizan la lactosa fué realizado por Lodder en 1970. En sus estudios sobre diversos productos lácteos determinó como las mejores especies para asimilar lactosa a Kluyveromyces fragilis, Kluyveromyces bulgaricus y Candida intermedia. Sin lugar a dudas Kluyveromyces fragilis es el microorganismo más ampliamente reconocido para producir biomasa de levadura a partir de suero de queso, diversos investigadores coinciden en ello (62, 83). Esta levadura utiliza exclusivamente la lactosa como fuente de energía y da ren-

dimientos satisfactorios de proteína (73). Kluyveromyces fragilis no utiliza las proteínas del suero de queso (5, 72, 24). Otras especies que se han sugerido son: Candida krusei, Candida tropicalis, Candida utilis, Torula cremoris, Torulopsis utilis, Torula casei, Torulopsis sphaerica y Torula lactosa.

1.3 Utilización del Subproducto: Suero de Queso como sustrato para su propagación.

El suero de leche es el líquido residual después de remover la caseína y la grasa de la leche entera en la fabricación de queso. Para apreciar el aprovechamiento del suero como medio de cultivo o como sustrato para la fermentación, es necesario considerar su composición general. Los porcentajes típicos son: 93.1% de agua, 0.3% de grasa, 0.9% de proteína, 4.9% de lactosa, 0.6% de cenizas y 0.2% de ácido láctico (21). La composición del suero es variable de acuerdo al proceso de fabricación del queso y de la composición de la leche de la que proviene. Como la lactosa es la principal fuente de carbono del suero, su uso como sustrato para K. fragilis es adecuado (33).

La producción lechera en México en 1980 fué de 9416×10^6 litros en todo el país, de los cuales, 2995×10^6 litros se destinaron al consumo directo y 6423×10^6 litros a

la industria. Del volumen captado por la industria el 41% correspondió a las plantas de pasteurización, rehidratación y homogenización, el 21% a la fabricación de leche condensada, evaporada y en polvo y el 38% a la fabricación de queso, crema y mantequilla (25). Anualmente se puede estimar una producción de un millón de toneladas de suero si se considera un rendimiento del 12% en la fabricación de queso (29).

La proporción del suero que se utiliza en México, se limita a los siguientes usos: En la alimentación animal, sin ninguna transformación, en la producción de suero en polvo, en la elaboración de requesón que se realiza en queserías pequeñas (29). Una de las alternativas interesantes para la utilización de este subproducto sería en la utilización de la proteína unicelular de K. fragilis.

1.4 Criterios Fundamentales.

La indigestibilidad de la pared celular y la presencia de ácidos nucleicos son dos problemas que impiden la utilización a gran escala de la proteína unicelular en productos alimenticios. Para mejorar el valor nutricional, debe extraerse la proteína citoplasmática de las células y luego concentrarse (74).

Existen opiniones muy diversas acerca de posibles problemas gastrointestinales que se atribuyen a las células intactas y homogenizadas unicelulares(40). Sin embargo, no se han encontrado propiedades tóxicas de la pared celular de las levaduras (34,58). Lo que se sabe, es que el aislamiento de las proteínas mejora la digestibilidad en un 50% sobre las células que solamente se rompen mecánicamente. Esto se debe a que los fragmentos de la pared celular disminuyen la biodisponibilidad de las proteínas (74,33,40,59,35). Por otra parte la manipulación de las propiedades funcionales cuando se utilizan células completas, se limitan grandemente, ya que las células intactas, se comportan como partículas sólidas y se disminuyen las propiedades funcionales relacionadas con la superficie. La presencia de la pared celular causa, además, oscurecimiento en la biomasa(18).

Un problema relacionado con el consumo de biomasa es el contenido de ácidos nucleicos. La cantidad que se ingiera de ácidos nucleicos debe reducirse a dos gramos por día(76).

La proteína aislada de levadura debe tener color, sabor y textura aceptables y además de ser nutricionalmente adecuada y segura, debe poseer propiedades funcionales que la hagan aceptable a la industria y al consumidor.

Las propiedades funcionales deben conocerse para determinar y predecir el modo en que se comportarán las proteínas unicelulares al aplicarse en alimentos, verificar si pueden usarse en sustitución de proteínas más caras y determinar su capacidad para la fabricación de nuevos alimentos a base de proteínas (58).

Estos criterios son fundamentales y requieren el aislamiento de la proteína de las células de levadura antes de utilizarse en alimentos.

1.5 OBJETIVO.

El objetivo de este trabajo es por lo tanto: Evaluar los factores que se necesitan considerar para utilizar potencialmente la proteína de K. fragilis y evaluar la posibilidad técnica de obtener un concentrado proteico libre de fragmentos indeseables.

2 GENERALIDADES .

2.1 Producción de Biomasa a partir de suero de queso.

2.1.1 Parámetros importantes en la fermentación.

Las especies que se utilizan para la producción de biomasa a partir de suero de queso, requieren de un examen cuidadoso de todas las variables implícitas durante la fermentación, para lograr un crecimiento óptimo (62).

En 1975, Vananuvat y Kinsella realizaron varios estudios para determinar los requerimientos y productividad de K. fragilis, basados en los estudios de Amundson, Bechtie y Chyton, Knight y Wasserman(72,73). La biomasa de K. fragilis se produjo en un fermentador de 14 litros equipado con agitación, aireación y controles automáticos de temperatura y pH. Para el medio de cultivo utilizaron: 4.7% de lactosa a partir de suero desproteinizado por ultrafiltración, 0.5% de sulfato de amonio, 0.5% de fosfato monobásico de potasio, 0.1% de extracto de levadura. El inóculo se preparó en el mismo medio. Para determinar el número de células en el inóculo se midió la absorbancia a 500 nm. Las variables de la fermentación fueron:

nivel de aireación = 1 v.v.m.; pH = 5; Temperatura=30°C;
 Agitación= 400 rpm. La máxima concentración de levadura
 obtenida durante este cultivo fué de 11.0 g/l (72.73).

2.2 Procesos Industriales.

1) Proceso Bel Fromageries.

2) Proceso Amber.

3) Proceso Wheast.

2.2.1 Proceso Bel Fromageries.

Este proceso implementado en Francia, se basa en estudios de Blanchet, Biju-Duval y Vignaud y produce biomasas en escala comercial. El suero se pasteuriza, desproteíniza y suplementa con sulfato de amonio y con hidróxido de amonio y se alimenta en forma continua al fermentador. La fermentación se lleva a cabo a una temperatura de 38°C, pH de 3.5 y una aireación de 1.3 vvm. La biomasa se separa por centrifugación, se lava y se concentra en filtros rotatorios. El producto se somete a altas temperaturas (83-85°C) para inactivar las lipasas presentes y evitar el enranciamiento, se seca y se almacena (62).

2.2.2 Proceso Amber.

Este proceso se implementó en Estados Unidos, lo desarrollaron Bernstein y colaboradores. Utiliza un fermentador de 57000 litros de capacidad. El suero concentrado se diluye hasta un 15% de sólidos totales con agua o suero fresco; este

medio se suplementa con amoníaco, ácido fosfórico y extracto de levadura, el pH se ajusta a 4.5 con ácido clorhídrico. Con un inóculo del 10%, la lactosa es completamente utilizada en ocho horas, el caldo de fermentación se concentra y posteriormente se seca por aspersión. El producto que se obtiene (Amber YFS), se destina a la alimentación animal, sin embargo, si la levadura se separa por centrifugación y se lava, se pueda utilizar para alimentación humana (Amber Nutrex) (4).

2.2.3 Proceso Wheat.

Este proceso se basa en los trabajos de Wasserman y fué implementado en Estados Unidos. En estudios del laboratorio Wasserman estableció como medio óptimo: Suero suplementado con 0.5% de sulfato de amonio, 0.5% de fosfato monoácido de potasio y 0.1% de extracto de levadura y no encontró diferencias en el crecimiento que utiliza suero crudo o suero estéril desproteinizado. Con el uso de inóculos con 2×10^9 células / ml, la totalidad de la lactosa se consume en tres o cuatro horas. Wasserman reportó que K. fragilis utiliza el ácido láctico presente en el suero antes que la lactosa, comprobó que la asimilación es directa, es decir, sin hidrolizarla extracelularmente. Con respecto al metabolismo del nitrógeno, encontró que

esta levadura es incapaz de aprovechar el nitrógeno proteínico del suero; pero aprovecha un 25% del nitrógeno total no proteínico, proporción que se utiliza aún con la adición de sulfato de amonio, que se consume completamente y produce un aumento en el número de células que se obtienen. Para la producción en mayor escala se basa en sus trabajos previos, la capacidad del fermentador es de 6000 litros, con un volumen de trabajo de 3000 litros. El rendimiento obtenido es de 0.42 gramos de levadura por gramo de lactosa (81).

Entre otros de los autores que han trabajado en la obtención de biomasa de *K. fragilis* a partir de suero de queso están: Cater (1980), Smith (1977), Moulin (1977), Delaney (1975) Amundson (1967) (68, 10, 52, 21, 1).

2.3 Procesos de Extracción de la Proteína.

La indigestibilidad de la pared celular y la presencia de ácidos nucleicos son dos problemas que impiden la utilización a gran escala de la proteína unicelular en productos alimenticios (74).

2.3.1 Métodos principales de Ruptura de la Pared Celular.

Los principales métodos para romper las células de levadura son: ruptura mecánica y digestión enzimática de las paredes celulares. Este último método es más atractivo que el de ruptura mecánica, por su bajo requerimiento de energía y

alta eficiencia, aunque es un método costoso. La digestión enzimática de la pared celular puede llevarse a cabo por la acción de β -glucanasas endógenas o por medio de enzimas exógenas provenientes de otros microorganismos. Las levaduras contienen enzimas autolíticas que pueden digerir lentamente la pared celular una vez que son activadas. La autólisis puede estimularse por un choque térmico y la resuspensión de las células a 45°C (48, 74, 40). Generalmente, la autólisis y los tratamientos ácidos hidrolizan toda la célula y las proteínas, mientras que el tratamiento alcalino rompe solamente la pared celular y libera proteína relativamente menos degradada. La pared celular no se rompe en pedazos cuando se homogeniza a altas presiones sino que se fractura liberando así la proteína celular (18).

La hidrólisis de proteínas representa uno de los mayores problemas que la química de los alimentos tiene que confrontar al tratar de recuperar las proteínas de las células de la levadura, ya que, los tratamientos que facilitan la ruptura celular activan las proteasas endógenas que hidrolizan las proteínas, lo cual produce una reducción significativa de los porcentajes de la proteína que se extrae (40).

Por medio del uso de métodos mecánicos se logra una desintegración efectiva de las paredes celulares de las levaduras(40,22,74). Los métodos más efectivos son: Homogenización, molido, ruptura por congelamiento, presión sobre las células y sonda ultrasónica. Se ha comprobado la efectividad de estas técnicas en la liberación de protefna de las levaduras. (22,19,74,42).

Existe un sin número de aparatos interesantes entre los que se encuentran los siguientes: el homogenizador de alta presión, el molino de alta velocidad a base de esferas, el molino coloidal y el desmembrador ultrasónico. El molino coloidal y el desmembrador ultrasónico, sin embargo, se restringen a la ruptura a escala piloto(22,18,42).

El homogenizador Manton-Gaulin es ampliamente conocido para la desintegración a escala comercial(53). Para procesos comerciales se requiere eficiencia y ruptura completa para asegurar la máxima extractabilidad y recuperación de la protefna. Los métodos mecánicos requieren de altas cantidades de energía para asegurar la eficiencia de la ruptura de la pared celular. Durante esta ruptura es frecuente sin embargo, una desnaturalización de la protefna(40).

El molino de alta velocidad o base de esferas se ha utilizado para romper células de diferentes microorganismos(40). Se han investigado los efectos de temperatura, velocidad de agitación, tamaño de las esferas, concentración de la levadura y nivel máximo de trabajo(22,33,19,74,18).

El tratamiento con el homogenizador de alta presión se considera uno de los más eficientes. Dunhill y Lilly(1975)(17) observaron que la cantidad de proteína liberada se relacionaba con el número de veces que pasaba la biomasa a través del aparato y con la presión de homogenización. La presión óptima para la ruptura celular por kilowatt fué de 725 Kg/cm^2 en el caso de levaduras(40).

La eficiencia de la mayoría de los métodos de ruptura celular debe mejorarse para aplicaciones industriales. En la TABLA 1 se mencionan algunos métodos de liberación de componentes celulares.

Algunos métodos de extracción y de recuperación de las proteínas se encuentran en la TABLA 2. Los estudios subsiguientes reafirman que la combinación de los métodos mecánicos y químicos producen mayores rendimientos en la recuperación de la proteína.

TABLA 1
 METODOS EMPLEADOS EN LA LIBERACION
 DE LOS COMPONENTES CELULARES (16)

METODOS	DESVENTAJAS
Autólisis	Proceso lento. Bajos rendimientos (50-60%)
Plasmólisis	Poco eficiente
Hidrólisis Acida	Alta concentración de sales en el producto terminado (25%)
Enzimas Líticas	Costoso. Activación de enzimas proteolíticas. Disminución significativa en los rendimientos.
Tratamiento Alcalino	Es efectivo sólo en altas concentraciones. Requiere períodos largos . Desnaturalización y degradación de las proteínas.
Mecánicos	Costosos.
Ruptura por Congelamiento	Costosa e ineficiente.

TABLA 2
 RUPTURA CELULAR Y EXTRACCION DE LA PROTEINA
 UNICELULAR. (40)

MICROORGANISMO	METODO DE RUPTURA CELULAR	RECUPERACION DE LA PROTEINA.
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	Homogenización de tres ciclos(561 Kg/cm ²) Molino de alta velocidad con esferas de vidrio 1800, rpm. Homogenización (550·Kg/cm ²) Homogenización con esferas de vidrio y NaOH	Precipitación Isoeléctrica 70% N. Extracción 40% 62% proteína hidrosoluble. Precipitación 62%
<u>Candida tropicalis</u>	0.1 N NaOH	42%
<u>K. fragilis</u>	Esferas de vidrio	26-65%
<u>C. lipolytica</u>	Homogenización tres ciclos (632 Kg/cm ²) y NaOH	90% de extracción
<u>S. carlsbergensis</u>	Homogenización esferas de vidrio y NaCl	61% de precipitación

2.4 Métodos de Extracción Proteínica con Disminución del Contenido de Ácidos Nucléicos.

Como se mencionó anteriormente otro problema asociado con el consumo de biomasa es su contenido de ácidos nucleicos. Para que la proteína unicelular pueda utilizarse como una fuente de proteína para consumo humano, el contenido de ácidos nucleicos debe disminuirse(40).

Se han desarrollado diversos métodos diseñados específicamente para reducir el contenido de ácidos nucleicos (66, 49). Uno de los métodos consiste en disminuir la velocidad específica de crecimiento(62) ya que el nivel de ácidos nucleicos disminuye con el tiempo de cultivo y aumenta con la velocidad de agitación (73), esto sin embargo, no es práctico, ya que un crecimiento rápido es deseable en la mayoría de los procesos para una producción de biomasa por sus ventajas económicas(40). En la TABLA 3 con base en datos publicados por Sinskey y Tannenbaum(66) se discuten las ventajas y desventajas de los métodos que existen para disminuir los ácidos nucleicos.

La reducción de ácidos nucleicos generalmente se lleva a cabo en forma simultánea a la extracción de proteína. Los métodos de remoción de ácidos nucleicos fueron revisados con detalle en 1978 por Chen y Pepler(16). Un resumen de los

procesos que se utilizan aparecen en la TABLA 4.

Para lograr un máximo porcentaje de proteína y minimizar el contenido de ácidos nucleicos, una extracción alcalina a temperaturas elevadas es el procedimiento más práctico. (74, 53, 35)

El método más común para obtener concentrados de proteína con baja cantidad de ácidos nucleicos consiste en extraer la proteína de células rotas mecánicamente, en presencia de álcali y precipitación de la proteína por disminución del pH a 4.5 (43, 74) o por calentamiento a 80°C. (35, 74) TABLA 5.

2.5 Ácidos Nucleicos.

2.5.1 Nivel máximo de ingesta. Daños Fisiológicos.

Diversos estudios comprueban que la calidad nutricional de las proteínas de levaduras es razonable. La mayor limitación del uso de microorganismos como fuente de alimentos es su alto contenido de ácidos nucleicos (79, 58).

Los ácidos nucleicos ingeridos en la dieta son depolimerizados por las nucleasas del jugo pancreático y luego convertidas a nucleósidos por las enzimas intestinales antes de la absorción. La guanina y la adenina son metabolizadas a ácido úrico (66, 34). El ser humano carece de la enzima uricasa, la cual cataliza la oxidación del ácido úrico al metabolito alantoina, que es soluble y fácilmente excretado. (23). El consumo de un

T A B L A 3

METODOS DISPONIBLES PARA LA REDUCCION DE ACIDOS
NUCLEICOS EN LEVADURAS (66)

METODO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Control de Crecimiento por Limitación del sustrato	Método Simple no requiere adición de sustancias químicas.	Reducción Limitada Económicas.
Hidrólisis catalizada por bases	Simple y Rápido	Pérdida de proteína Adición de sales Efectos indeseables por el pH alto en algunos aminoácidos.
Extracción con sales inorgánicas y solventes orgánicos	Simple y rápido. Remueve RNA polimerizado	Residuos químicos, pérdida de peso y proteína. Económicas.
Ruptura Celular	Sólo si se desea aislar la proteína	Económicas, específicas al al proceso que se usa.
RNAse Exógena	Rápido y simple	Costo y disponibilidad de la enzima, pérdida de sustancia seca. Proteólisis.
RNAse Endógena Choque térmico Antiones.	Simple, células directas del fermentador.	Proteólisis. bajos rendimientos. Lento. Sólo ciertos microorganismos poseen RNA se endógena.

TABLA 4

REDUCCION DEL CONTENIDO DE ACIDOS NUCLEICOS EN
LA PROTEINA UNICELULAR. (16)

PROCESO DONDE SE APLICA	TRATAMIENTO
Fermentación	Cuidado del grado de crecimiento.
Suspensión Celular	Tratamiento con NaCl y acetato de sodio Tratamiento ácido Solución acuosa de amonio Choque térmico con RNAsa pancreática Choque térmico con fosfato ácido de sodio. Mezcla de Alcohol metílico y ácido clorhídrico. Tratamiento de Choque Térmico. Mezcla de Alcohol etílico y ácido clorhídrico. Choque térmico / pH 5-5.5 Choque térmico / anión carboxílico NaOH ó solución acuosa de amonio.
Homogenizado Celular	NaCl 3% /50° C , pH 5.6 Precipitado a pH 5 y 80° C Alta temperatura y baja concentración de álcali. Baja temperatura y tratamiento concentrado de álcali. 100° C , pH 6.8 RNAsa extracelular de <u>Candida sp.</u>

TABLA 5

MÉTODOS QUE SE UTILIZAN EN LA EXTRACCIÓN DE
PROTEÍNA CON REDUCCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

MÉTODOS	DESCRIPCIÓN	DESVENTAJAS	REFERENCIA
Condiciones Drásticas	Extracción Alcalina (0.2 N NaOH) y precipitación de la proteína a 80°C	Pérdida de peso y ni- trógeno. Degradación y desnaturalización de las proteínas. Formación de nuevas sustancias como: sulfonius, Lisinoalanina, etc. Efectos dañinos por el pH alcalino.	35 53 74 43
Condiciones Suaves	Extracción de la proteína de células rotas me- cánicamente con pH alcalino e in- cubación del extrac- to para reducir RNA por medio de RNAsa exógena y endógena.	Pérdida de proteína debido a la proteólisis durante la incuba- ción (más del 50%). Costoso	53 43 13

alimento con alta concentración de purinas produce un alto nivel de ácido úrico en el plasma y a su vez un aumento en la excreción por la orina. El ácido úrico es únicamente soluble en el pH fisiológico y si el contenido de ácido úrico es alto en la sangre puede producir una precipitación de urato en los tejidos. La cristalización de esta sal en el fluido sinovial alrededor de las articulaciones causa la enfermedad llamada gota y puede producir la formación de piedras en el tracto urinario(12, 79, 66, 80, 23). La ingestión de grandes cantidades de levadura, por lo tanto, eleva la concentración de ácido úrico en la sangre.

Se han sugerido también posibles efectos negativos de las pirimidinas. Algunos trabajos reportan que al ingerir grandes cantidades de ácido orótico se producen degeneraciones en el hígado.(66) Existen también evidencias de que el contenido de ácidos nucleicos de la proteína de levadura, reduce la utilización de la proteína en la dieta.

Varios estudios clínicos se han llevado a cabo para indicar la cantidad de ácidos nucleicos que no es dañina. El nivel normal promedio de ácido úrico en la sangre es de 7 mg/100 ml. Con una ingesta de 2 gramos de RNA por día proveniente de levadura, el nivel que se alcanza es de 6 mg/100 ml, esta cantidad por lo tanto se considera un límite seguro para alimen-

tar a la mayoría de los sujetos normales. Por otro lado, la mayoría de las personas normales con dietas ordinarias excretan 600 mg/ día de ácido úrico, dicha cantidad no se excede demasiado al ingerir 2 gramos por día de RNA, pues solo aumenta a 667 mg/día(23). Se establece por lo tanto que la cantidad que se ingiera de ácidos nucleicos, proveniente de levadura, debe restringirse a no más de dos gramos por día (49).

2.5.2 Contenido de ácidos nucleicos en K. fragilis.

El contenido de ácidos nucleicos de K. fragilis es particularmente bajo en relación al de otros microorganismos: 12 a 15 gramos de ácidos nucleicos por cien gramos de proteína. Sin embargo, este contenido puede variar de acuerdo a la cepa utilizada, las condiciones de crecimiento, el método de cultivo y la forma de recuperación de la biomasa; además se ha informado que aumenta de acuerdo a la velocidad de aireación(62,4,61,72) La TABLA 6 muestra el contenido de ácidos nucleicos reportados por varios autores.

TABLA 6

CONTENIDO DE ACIDOS NUCLEICOS REPORTADOS PARA

K. fragilis.

	A	B	C	D	E	F
%AN	6.3	5.7	8.6	10	5.7	1.4

- A Producto Bel; en suero desproteinizado en cultivo continuo (21) .
- B Delaney: en suero desproteinizado por ultrafiltración; cultivo intermitente (21).
- C Vananuvat y Kinsella: suero desproteinizado por ultrafiltración ; cultivo intermitente (73).
- D Vananuvat y Kinsella: suero desproteinizado por ultrafiltración; cultivo continuo (72).
- E Proteína aislada extracción con NaOH y precipitación con HCl; Vananuvat y Kinsella (74).
- F Proteína aislada extracción con NaOH y precipitación con calor 80°C. Vananuvat y Kinsella (74).
- AN Acidos nucleicos .

2.6 Utilización de la Proteína Unicelular.

La forma ideal para utilizar la proteína unicelular sería a través de su consumo directo.

Para el caso de la alimentación animal con proteína unicelular para la producción de carne, la conversión de proteína unicelular a proteína muscular, resulta un proceso lento y de baja eficiencia.

Naturalmente existen otros problemas cuando queremos utilizar la proteína unicelular como alimento para humanos. Por un lado los consumidores no aceptan normalmente un producto con base en sus necesidades nutricionales, sino que les resulta más importante que el producto sea organolépticamente adecuado.

Una utilización exitosa de la proteína unicelular en alimentos se apreciará mejor si consideramos los beneficios económicos junto con algunas consideraciones sociales. Aún cuando la proteína unicelular, inicialmente se use en combinación con otras proteínas, debe informarse al consumidor de su presencia para establecer un entendimiento entre él y el productor. De esta manera se va educando al consumidor sobre el nuevo producto, incluyendo su seguridad y sus beneficios(70, 60)

2.6.1. Pruebas necesarias para evaluar la calidad nutricional y la seguridad de la proteína unicelular.

Para que pueda considerarse la proteína unicelular aceptable para alimentación humana y animal, se requiere de cierta información. Los requerimientos mínimos se basan en la composición química, calidad proteínica y las pruebas de seguridad en animales de laboratorio.

2.6.2. Propiedades Funcionales.

Bajo el término de propiedades funcionales se designan las propiedades físicoquímicas de las proteínas que rigen su comportamiento en los alimentos durante la manufactura, proceso, almacenamiento y consumo. Las propiedades funcionales reflejan las propiedades de la proteína que son influenciadas por la composición, conformación e interacciones con otros componentes alimenticios y que además son afectadas por el medio ambiente(58,40)

2.6.3. Costos de Ingeniería.

La producción de proteína unicelular se lleva a cabo a través de procesos de alta tecnología que permiten altos niveles en la producción de proteína y que son independientes de las variaciones de clima y del medio ambiente. Sin embargo, estos procesos requieren de un alto capital de inversión por lo que deben operarse con máxima eficiencia(59).

Un exámen de las condiciones económicas es útil para identificar las áreas de mayor problema. De acuerdo a numerosos análisis económicos, la fuente de carbono puede representar de 40 a 50% de los costos de manufactura, de allí el interés en el aprovechamiento de sustratos con fuentes de carbono de bajo costo(56, 18). En segundo lugar esta la inversión de capital, la cual junto con impuestos, seguros y mantenimiento representan de un 20 a 30% del costo de manufactura. El tercer costo significativo lo constituyen los servicios que llegan a representar hasta un 20% del costo de la proteína unicelular y que incluyen la energía eléctrica principalmente, la cual se requiere para aireación, eliminación de calor, así como el calor que se requiere para secar el producto. Estas tres áreas se relacionan directamente a un parámetro común: el rendimiento celular en la biomasa(g células / g de C de sustrato) ya que un aumento en el rendimiento automáticamente disminuye el costo de la fuente de carbono, así como el costo de servicios e inversión del capital (18).

2.7 Estudios realizados en la proteína de K. fragilis.

2.7.1 Propiedades Funcionales.

Vannauvat y Kinsella determinaron las propiedades funcionales de los concentrados de proteína de K. fragilis. Ellos evaluaron la extracción con agua y NaOH, así como la precipitación de la proteína por acidificación y por calor, llevando a cabo las determinaciones de solubilidad, estabilidad y expansión de la espuma, actividad emulsificante y tensión superficial.

Solubilidad. Los diferentes tipos de extractantes afectan la solubilidad ya que causan un cambio en el punto isoeléctrico de las proteínas. Los perfiles de solubilidad de la proteína preparada por los métodos de extracción con NaOH y H₂O resultaron muy similares. Un aumento en la solubilidad ocurre entre pH 6 y 8 (85% de la proteína se solubiliza). El intervalo de menor solubilidad se presenta entre pH 4 - 4.5 para la extracción con álcali, mientras que para la extracción con agua es entre pH 4.5-5. El intervalo de solubilidad de estas proteínas limita su uso, no obstante podría mejorarse mediante la formación de proteínatos de calcio y sodio. A pesar de esta limitación puede utilizarse en sistemas sólidos alimenticios.

Espumado. La expansión de la espuma de los concentrados de proteína preparados por agua y precipitación por acidificación, resulta ser la más alta y comparable a la de los concentrados de soya, pero, la estabilidad de la espuma decrece rápidamente. La mejor estabilidad de la espuma se presenta con la extracción con NaOH y precipitación con calor; sin embargo

ésta resulta menor que la de la soya. La espuma de los concentrados de proteína de K. fragilis se asemejan a la de los concentrados de soya en su apariencia física y textura.

Formación de Emulsiones Estables. En cuanto a su acción estabilizante, el factor limitante es el calor y la extracción alcalina. En todos los casos, salvo en la extracción con NaOH y precipitación por calor, se obtiene una estabilidad mayor que en los concentrados de soya. De acuerdo a estas propiedades, los concentrados de proteína de K. fragilis tienen en potencia aplicaciones comerciales en emulsiones cárnicas, panadería, en aderezos y en pudines (76).

Tensión Superficial. Todas las soluciones de proteína de K. fragilis presentaron una tensión superficial menor a la del agua y superior a la de los concentrados de soya. El valor más bajo fué el de la extracción con agua y precipitación por acidificación. Las proteínas de levadura disminuyeron la tensión superficial de las soluciones acuosas. Sin embargo, no fueron tan efectivas como el aislado de proteína de soya en este aspecto. Esta propiedad se refleja en la baja estabilidad del espumado de los concentrados de proteína de K. fragilis comparados con los de la soya (76).

2.7.2 Calidad Nutricional y Seguridad .

En la TABLA 7 aparecen algunas pruebas de calidad proteica reportadas para K. fragilis . Se afirma que el aminoácido limitante es metionina.

K. fragilis ha sido estudiado en la alimentación de diversas especies animales. En la alimentación de cerdos y becerros se tienen resultados satisfactorios en términos del grado de ganancia de peso y de salud(78). En codornices, aves de corral y pavos se han estudiado los niveles de adición para lograr un aumento favorable en el desarrollo del crecimiento del plumaje, del porcentaje de carne y de su suavidad(7,8,9) . Al alimentar minks durante 18 semanas se vió que llegaban a su máximo crecimiento un mes antes que los animales con una dieta control(1) . Otros experimentos comprueban que al alimentar gallinas con biomasa aumenta la producción de huevos y su peso(32) . En alimentos humanos existen varios productos que utilizan la biomasa de K. fragilis (62,4,10,78,69) .

2.7.3 Composición de Aminoácidos de K. fragilis .

La determinación del valor biológico de las proteínas es importante pero en el caso de las proteínas de levadura tiene una limitada significancia práctica ya que no se espera que éstas se utilicen como fuente principal o única de proteína,

sino más bien como complemento o suplemento de otras. El conocimiento de la composición de aminoácidos es útil, como un índice de su valor nutricional y de su utilización óptima en combinación con otros alimentos(21).

De acuerdo a varios estudios realizados, el contenido de aminoácidos azufrados, es la primera limitante en la calidad proteínica de las levaduras (75, 77, 21, 12, 72). Nelson et al(1960) estudiaron el contenido de metionina de 271 géneros de levadura y encontraron valores de 0.4-1.7 gramos de metionina/16gramos de nitrógeno. Este aminoácido es limitante también en K. fragilis (21, 83) TABLA 8.

El contenido de lisina es alto, por lo que la proteína de K. fragilis puede utilizarse como complemento para las proteínas de los cereales(26, 83, 44). Las diferentes condiciones de cultivo no alteran la proporción de los aminoácidos, lo que si afecta es el proceso de extracción que se utiliza(75).

TABLA 7
PARAMETROS NUTRICIONALES

	NPU	PER			
		A °	A	B	C
<u>K. fragilis</u>	67	2.26	1.8	1.8	2.2
<u>K. fragilis</u> + DL					
metionina	84.4	-	2.2	2.2	-
Caseína	75.3	2.5	2.5	2.5	2.5
Huevo	98.4				

A° Delaney (21).

A Producto Amber Nutrex (4).

B Producto Wheat (83).

C Feldheim (26).

D Vaughan (77).

TABLA 8
 COMPOSICION DE AMINOACIDOS REPORTADOS
 PARA PRODUCTOS DE K. fragilis .

g/ 16 g N	Huevo(13)	Patrón	A	B	C	D	E
Isoleucina	5.6	4.2	4.8	4.5	4.7	5.9	4.0
Leucina	8.3	7.0	8.1	7.4	8.1	10.6	7.0
Lisina	6.2	5.1	8.0	7.3	7.4	9.4	6.9
Fenilalanina	5.1	7.0*	4.2	3.8	3.8	4.2	3.4
Tirosina	4.0	-	3.9	3.6	-	3.5	2.5
Treonina	5.1	3.5	5.3	5.9	4.5	5.9	5.8
Triptofano	1.8	1.1	1.7	1.4	1.1	1.6	1.4
Valina	7.5	4.8	5.6	5.3	5.9	7.1	5.4
Metionina	3.2	-	1.5	1.2	1.3	1.7	1.6
Cisteína	1.8	-	1.7	1.0	-	1.1	-
Met + Cis	5.0	2.6	3.2	2.2	-	2.8	-
Arginina	6.1	-	4.9	4.8	4.8	5.2	-
Histidina	2.4	1.7	2.0	1.9	1.9	2.6	2.1
Ac. Aspartico	10.7	-	9.4	9.1	-	-	-
Serina	7.8	-	4.7	5.4	-	4.4	-
Ac. Glutámico	12.0	-	13.8	14.7	15.7	18.0	-
Glicina	3.0	-	3.7	4.1	-	-	-
Alanina	5.4	-	5.8	5.5	-	-	-
Prolina	3.8	-	4.2	4.2	-	-	-

A Delaney ; biomasa (21)

B Producto Bel (21)

C Producto Wheat ; biomasa (83)

D Producto Wheat ; biomasa más suero (83)

E Amber Nutrex ; biomasa (4)

Patrón Establecido en 1973 por la FAO y la OMS (55).

* Fenilalanina + Tirosina

TABLA 8 (continuación)

g / 16 g N	F	G	H	I	J	K	L	M
Ile	6.0	6.1	5.1	6.0	4.3	4.4	3.8	5.2
Leu	9.6	11.0	-	9.6	7.2	7.3	8.5	3.8
Lis	11.1	10.4	11.1	10.2	8.5	8.3	8.3	8.1
Phe	5.1	4.4	5.1	5.4	3.6	3.7	3.6	2.4
Tyr	3.4	4.1	4.6	3.4	4.5	4.5	-	-
Thr	6.5	7.5	5.6	6.5	4.1	4.4	4.5	-
Trp	-	2.4	-	-	0.9	0.9	0.4	0.7
Val	7.8	7.4	5.7	7.8	5.6	6.1	5.1	-
Met	1.6	2.0	1.6	1.2	1.5	1.5	1.4	0.5
Cys	-	3.8	-	-	1.9	1.6	1.2	0.9
Met + Cys	-	5.8	-	-	3.4	3.1	2.6	1.4
His	4.0	3	4	2	4	4	0.7	0.9
Arg	7.4	5.7	7.4	7.1	5.6	5.9	4.3	2.4
Asp	-	-	10.4	11.2	9.6	9.9	11.5	4.4
Ser	7.0	6.8	5.2	7.0	4.7	4.8	5.8	2.2
Glu	-	-	15.2	13.3	16.5	14.6	11.6	4.9
Gly	-	-	4.2	4.6	5.1	5.0	4.6	2.3
Ala	-	-	7.2	8.2	6.4	8.0	6.3	3.1
Pro	-	-	-	4.3	3.7	3.8	3.7	1.5

- F Amundson ; biomasa sola (1)
 G Amundson ; biomasa más suero (1)
 H Wasserman ; biomasa (82)
 I Wasserman ; concentrado de proteína (82)
 J Vananuvat y Kinsella ; biomasa de cultivo intermitente (75)
 K Vananuvat y Kinsella ; biomasa de cultivo continuo (75)
 L Vananuvat y Kinsella ; concentrado de proteínas de levadura(75)
 M Vaughan ; biomasa colección del Departamento de Ciencia y Tecnología Universidad de California (77)

2.7.4 Productos Alimenticios en que se utiliza K. fragilis.

Las ventajas que presenta K. fragilis son: su ausencia de toxicidad, bajo contenido de ácidos nucleicos, alta concentración de proteínas, además de tener el promedio de aminoácidos ligeramente superior al de otras levaduras y una relación de eficiencia proteica favorable, así como la inocuidad del suero de leche que se emplea como sustrato, lo cual permite su uso en diversos productos alimenticios para humanos.

El uso de la proteína unicelular en alimentos, en la actualidad, se limita a su incorporación en procesos y productos tradicionales (18). Las experiencias que se tienen en cuanto al uso de K. fragilis lo confirman. A continuación aparecen algunas aplicaciones:

a. En la elaboración de galletas de vainilla y chocolate complementadas con K. fragilis hasta un 15% de proteína. En frituras de queso complementadas hasta un 30% con K. fragilis. En galletas de avena con una complementación del 20%. Estos productos presentaron apariencia aceptable y el aroma y sabor no se vieron alterados por la presencia de la levadura (10, 39).

b. K. fragilis y suero seco se adicionaron a la harina para elaborar panes. Esta adición mejoró el sabor y apariencia externa del pan. La frescura del pan se mantuvo por mayor tiempo (38).

- c. En bisquets, helados, chocolate (11).
- d. En la preparación de bebidas especiales que contengan galactosa(52).
- e. Como suplemento para alimentos animales y humanos(30).
- f. En la elaboración de alimentos proteínicos tipo queso a base de soya (39).
- g. En la maduración de quesos blandos(14,15).

3 MATERIALES Y METODOS.

3.1 Producción de la Biomasa.

3.1.1 Microorganismos. Se utilizó la cepa K. fragilis NRRLY 1109, la cual fué proporcionada por el Cepario de la Facultad de Química y el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología UNAM.

3.1.2 Medio de Suero de Queso. La formulación que se utilizó de acuerdo a un trabajo previo de García y Gómez (29) fué: 6.5g de suero de queso en polvo (Cremaria La Fronteriza S.A.), 0.5 g de sulfato de amonio (Bayer), 0.5 g de fosfato monoácido de potasio (Merck), 0.1 g de extracto de levadura (Bioxon)(73), disueltos en 100 ml de agua destilada y desionizada. El pH se ajustó a 5.0. La esterilización del medio se realizó en autoclave a 121 ° C durante quince minutos.

3.1.3 Condiciones de Cultivo. Inóculo. Se preparó en matraces erlenmeyer tipo baffle de 250 ml que se incubaron a 30°C y 200 rpm, con un medio similar al de la fermentación. La inoculación es al 10%. Para el pie de cuba se inoculó un litro de medio a 30°C con una agitación de 200 rpm en el agitador incubador Psicotherm (New Brunswick Scientific, N. J. USA). El tiempo de incubación fué de 24 horas (29).

Fermentador. Se utilizó el Microferm Fermentar (New Brunswick Scientific Co. New Jersey, USA) El volúmen de trabajo fué de once litros. Las condiciones de la fermentación fueron: Temperatura = 30°C; Flujo de aire = 1 v.v.m.; Agitación=400 rpm; pH = 5.0; Tiempo de la Fermentación = 18 horas

Para controlar la espuma se agregaron 0.1 ml de antiespumante de silición. Estas condiciones son las que favorecen un máximo crecimiento de la biomasa (72).

3.1.4 Recuperación de la Biomasa. El contenido del fermentador se recuperó mediante centrifugación en una centrifuga refrigerada, a 3200 g durante 20 minutos.

3.2 Técnicas de Ruptura Celular.

Para establecer un método práctico y adecuado en la fractura celular, se llevaron a cabo diferentes métodos, los cuales, se enumeran a continuación:

- a) Utilización del Mortero a Temperatura Ambiente con arena para moler biomasa. Se detectó una disminución de protefna liberada a partir de 15 minutos de molido, razón por la que se utilizó la biomasa congelada con el fin de detener un poco la autólisis aparente por las proteasas liberadas.
- b) Congelación de la biomasa en el congelador (Temperatura -10°C) y molienda con Mortero.
- c) Congelación de la biomasa en hielo seco y alcohol etílico y molienda en el mortero. El Mortero se mantuvo sobre hielo seco.

d) Utilización del Homogenizador Potter (Braun Model MSK, USA) en hielo.

e) Utilización de Solución de NaCl. Se suspendió la biomasa en una solución salina al 1%, para estudiar su efecto en las células.

f) Utilización de un Molino Homogenizador. Se utilizó el homogenizador POLITRON PCU-2 (Steinhardt, Germany) en los siguientes tiempos y velocidades, manteniendo la muestra sobre hielo.

Tiempo	Velocidad
0	
0.5 min	#10
1 min.	#5
2 min.	#5
3 min	#5
5 min.	#5

La cantidad de biomasa de K. fragilis que se utilizó en cada uno de estos métodos fué de 0.5 g en 50 ml de agua desionizada. En los casos: a, b, c y d, se emplearon tiempos de ruptura de 0 hasta 25 minutos.

g) Utilización de la Licuadora. Se utilizó una licuadora Osterizer de dos velocidades. Se evaluaron dos soluciones de extracción:

i) Solución de Biomasa al 2% en agua.

ii) Solución de Biomasa al 2% y al 5% en una solución de NaOH al 0.4%(p/v).

Se buscó el tiempo de permanencia más adecuada para romper la biomasa.

h) Biomasa Secada por aspersión. (Proporcionada por el Departamento de Alimentos, División Ingeniería, Facultad de Química UNAM) K. fragilis fué crecida en medio de lactosa en las mismas condiciones que las de K. fragilis en suero de leche: Tempera-

tura - 30°C; Flujo de Aire- 1 vvm; Agitación - 400 rpm; pH - 5 y tiempo de la fermentación 18 horas. (72) Posteriormente se secó por aspersión en el Secador de Espreas (Swenson Evaporator Co) de la Planta Piloto del Laboratorio de Ingeniería Química de la Facultad de Química, UNAM. Se utilizaron las siguientes condiciones: Flujo - 4 l/hr. Presión de Atomización - 30 lb/ pulg²; Presión de Alimentación - 25 lb/ pulg²; Temperatura de Entrada - 150°C ; Temperatura de Salida - 80°C .

Del producto seco nos proporcionaron 20 g para estudiar el efecto del secado en la ruptura celular y verificar si existía algún efecto en el contenido del aminoácido triptofano.

Para la determinación de la ruptura celular se suspendieron 0.11 g de levadura seca por aspersión en 50 ml de agua.

De las soluciones que se obtuvieron en cada caso se separaron por centrifugación a 5000 g durante 15 minutos, dos fracciones:

- a) Sobrenadante: Se cuantificó la ruptura celular por el método Lowry (46) y el Método Kjeldahl(3).
- b) Precipitado. Se llevó a cabo la observación microscópica para cuantificar el grado de ruptura celular(53) (Método semicuantitativo)

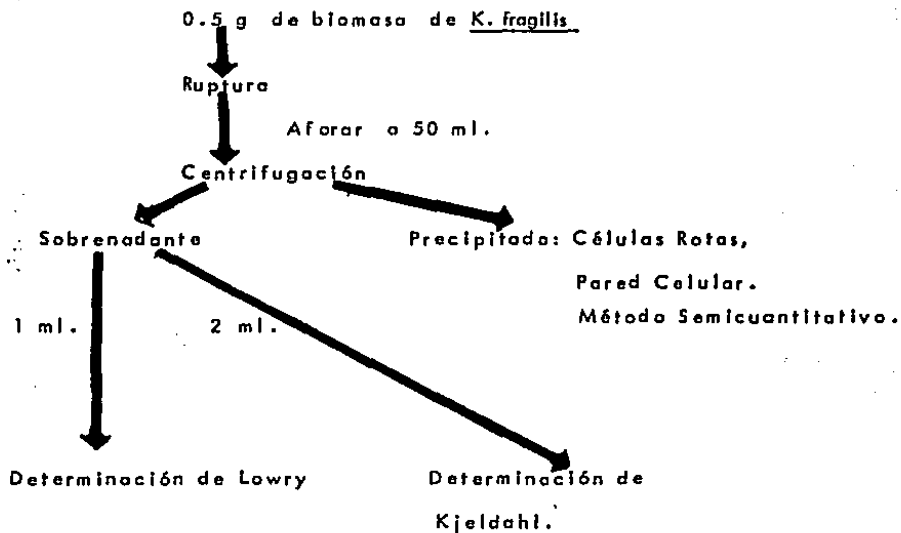
A continuación se indican los métodos experimentales de ruptura celular y las condiciones que se utilizaron:

TABLA 9*

METODOS EXPERIMENTALES DE RUPTURA CELULAR.

Tipo de Homogenización.	Tiempo de Homogenizado	Solución de Extracción.	Otras Condiciones.
Licuadora	3'	NaOH 0.4%	Incubación 40°C durante 1 hr; Agitación 200 rpm.
Licuadora	3'	NaOH 0.4%	40°C - 1 hr - 250 rpm
	3'	NaOH 0.4%	40°C - 1 hr - 50 rpm
	3.5'	NaOH 0.4%	40°C - 1 hr - 200 rpm
	0'	NaOH 0.4%	40°C - 1 hr - 200 rpm
Licuadora	3'	Agua	40°C - 1 hr - 200 rpm
	3.5'	Agua	40°C - 1 hr - 200 rpm
	0'	Agua	40°C - 1 hr - 200 rpm
Homogenizador Potter	0'	NaOH 0.4%	
Mortero sobre hielo seco	0'	Agua	
Biomasa Congelada (hielo seco- alcohol etílico)	15'	Agua	
Homogenizador POLITRON PCU-2	30'	Agua	
	0.5'	Agua	Velocidad # 10
	1'	Agua	Velocidad # 5
	2'	Agua	Velocidad # 5
	3'	Agua	Velocidad # 5
Homogenizador POTTER	10'-25'	Agua	
Se sumergió en hielo.			
Mortero Biomasa Congelada (Congelador -10°C)	0'-20'	Agua	
Mortero Biomasa sin congelar	0'- 20'	Agua	
		NaCl 0.1%	
			Biomasa Crecida en lactoso y secada por aspersión.

DIAGRAMA 1
CUANTIFICACION DE LA RUPTURA
DE LA PARED CELULAR.



3.3 Cuantificación de la Solubilización de Proteína o Proteína Liberada por el Método Lowry(46) , por el Método Kjeldahl(3) y semicuantitativamente(53) Ver DIAGRAMA 1 .

Método Lowry. Se seleccionó una concentración adecuada de la biomasa de K. fragilis para leer en el espectrofotómetro PYE UNICAM SP 30(England), la proteína que se liberaba de acuerdo al método de Lowry et al(46). Para la determinación de la proteína verdadera se hizo una curva patrón con concentraciones de 0 hasta 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de albúmina sérica bovina. Los datos de esta determinación aparecen en la TABLA 9.

Método Kjeldahl. Se utilizaron 2 ml. de sobrenadante y se calculó el porcentaje de proteína.

Método Semicuantitativo. Observación al microscopio (Objetivo 100 X). Se utilizaron los colorantes de la técnica de Gram.

TABLA 9

Curva Patrón para la Determinación de Proteína por el Método Lowry.

μg de proteína /ml	A _{750 nm.}	Ec. y coef. de correlación
20	0.142	y=0.0035 x + 0.075 r=0.9996
40	0.225	
60	0.289	
80	0.348	
100	0.429	

Promedio de tres réplicas.

3.4 Condiciones de Extracción de la Proteína Unicelular con Disminución de Ácidos Nucléicos.

Para lograr la extracción de la proteína y a la vez disminuir el contenido de los ácidos nucleicos, se utilizaron las siguientes condiciones (74):

- a) Una solución de biomasa al 5% que se sometió a fractura celular en una licuadora Osterizer durante 3 minutos.
- b) Como solución de extracción NaOH al 0.4%
- c) Incubación a 40 ° C durante una hora y agitación a 200 rpm en el agitador- Incubador New Brunswick G-24 (New Brunswick Sci. Co., N.J. USA)
- d) Precipitación de la proteína por adición de HCl, pH = 4.2

VER DIAGRAMA 2

Dichas condiciones fueron evaluadas para la biomasa de K. fragilis por Vonanuvat y Kinsella (74) con los siguientes resultados:

Temperatura. Con 40°C logran 52.5% de proteína total extraída de K. fragilis. Con temperaturas superiores la cantidad de Nitrógeno que precipita decrece y a Temperaturas superiores a 70°C la lisina disponible decrece (73)

Concentración de NaOH. La extracción fué en aumento hasta una concentración de 0.4% donde se logró la mayor extracción: 77.21%

de proteína total. La extracción decrece al exceder esa cantidad.

Tiempo de la Extracción. La extracción con agua creció continuamente con el tiempo mientras que con NaOH resultó mínimo el aumento. Al utilizar el tiempo de una hora para la extracción y 0.4% NaOH como extractante, se obtuvo un 80% de proteína total extraída; con tiempos mayores el incremento fue mínimo.

Efecto de la Concentración de la Biomasa. La extractabilidad de la proteína disminuyó un 20% con suspensiones al 10% de biomasa de K. fragilis en comparación con suspensiones al 5%.

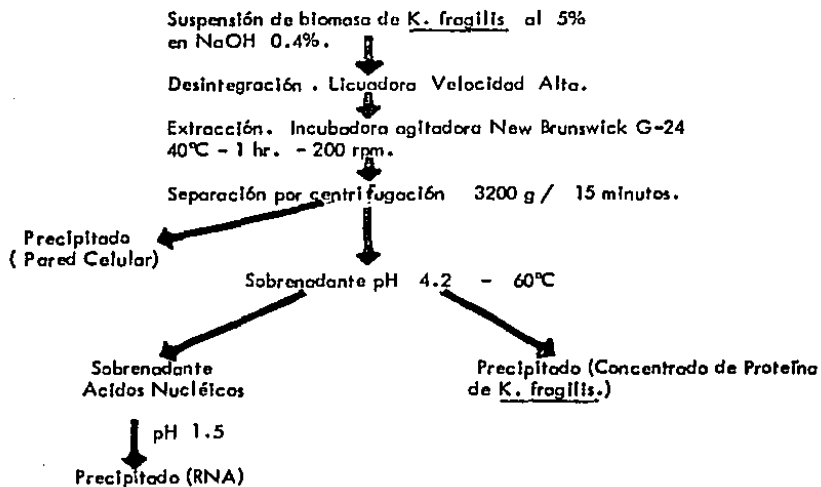
Precipitación de la Proteína. Vananuvat y Kinsella observaron mayor recuperación al utilizar NaOH. El pH de precipitación afectó de manera significativa el rendimiento de la proteína. El más alto rendimiento lo obtuvieron al precipitarla en un rango de pH de 4 a 4.5.

3.5 Análisis Proximal de:

- a) Pasta Secada por aspersión de la biomasa de K. fragilis crecida en medio de lactosa (Proporcionada por el Departamento de Alimentos. Div. Ingeniería, Fac. Quím. UNAM)
- b) Biomasa de K. fragilis crecida en suero de queso.
- c) Concentrado de proteína de K. fragilis. Extracción con NaOH (74)

DIAGRAMA 2

METODO DE EXTRACCION DE LA PROTEINA DE K. fragilis
CON DISMINUCION DE ACIDOS NUCLEICOS.



Se incluyeron las determinaciones de : Humedad por estufa de vacío (Método 14.004 AOAC) ; cenizas por calcinación (Método 7.010 AOAC); proteína cruda por el Método Kjeldahl (Método 2.049 AOAC); extracto etéreo por el método Galfish (Método 7.045 AOAC) y carbohidratos totales calculados por diferencia (3).

3.6 Determinación de Ácidos Nucléicos.

Se utilizó el método de Schmidt-Thannhauser modificado (41) para cuantificar la disminución de ácidos nucleicos durante el proceso de extracción de la proteína según los métodos de Vananuvat y Kinsella (74) y Hedenskog (34).

El método utilizado fué:

- 1) Selección de la Concentración de células de K. fragilis. El intervalo óptimo para medir la absorbancia en ultravioleta de los ácidos nucleicos corresponde a una cantidad de células de $4 \text{ a } 12 \times 10^6$ unidades formadoras de colonias (u.f.c.) Para utilizar la cantidad correcta de biomasa, se hicieron cuentas totales en cajas petri, utilizando el medio de papa-dextrosa agar (Bioxon)
- 2) Extracción y Determinación de Ácidos Nucleicos (RNA y DNA)

De acuerdo a la técnica modificada de Schmidt-Thannhauser(41) se necesitan separar las proteínas y los polímeros de los ácidos nucleicos, para lo cual se libera el contenido celular. Se utilizó el método de Vananuvat y Kinsella(74) para precipitar la pared celular y dejar en solución la proteína y los ácidos nucleicos. A esta porción se le asignó el nombre de FRACCION 1. La extracción de RNA y DNA se llevó a cabo en base a las diferencias estructurales entre ribosa y desoxirribosa(41) ya que RNA es susceptible a la hidrólisis alcalina (1 hr -40°C) por la presencia de sus grupos OH en 2' dando lugar a mezclas de nucleótidos 2' y 3', los cuales no precipitan en medio ácido. DNA no se afecta por la hidrólisis alcalina pero al hidrolizar en ácido caliente el DNA queda en forma ácido soluble. Es por esta razón que se asignó como FRACCION 2 al sobrenadante después de precipitar la proteína (pH = 4.2). Se cuantificó el contenido de ácidos nucleicos en la proteína a esto le llamamos FRACCION 3. Schmidt y Thannhauser (41), determinaron los coeficientes de extinción (Absorción por mol de fosfato), de los ácidos nucleicos y la posible contribución en las absorbancias de las proteínas en el hidrolizado. En su estudio seleccionaron la máxima

y mínima longitud de onda de la absorción de los ácidos nucleicos y la turbidez de las muestras a analizar. La fórmula que establecieron con base en estos criterios y que se utilizó en este trabajo es la siguiente:

$$C_{\text{RNA}} = 33.76 (A_{261} - A_{320}) - 3.18 (A_{230} - A_{320})$$

$$C_{\text{DNA}} = 33.76 (A_{264} - A_{320}) - 2.99 (A_{228} - A_{320})$$

Donde:

C = Concentración de Acido Ribonucleico $\mu\text{g}/\text{ml}$.

C_{RNA} = Concentración de Acido Desoxirribonucleico $\mu\text{g}/\text{ml}$.

A₂₆₁ = Máxima longitud de onda de la absorción del RNA (8).

A₂₃₀ = Mínima longitud de onda de la absorción del RNA(48).

A₂₆₄ = Máxima longitud de onda de la absorción del DNA.

A₂₂₈ = Mínima longitud de onda de la absorción del DNA ..

Se llevó a cabo la extracción de la proteína de K. fragilis por medio de la técnica reportada anteriormente Sección 3.4(Diagrama 2) y se determinó para cada fracción la concentración existente de los ácidos nucleicos. Dichas concentraciones se determinaron en las siguientes concentraciones celulares: 4×10^6 , 8×10^6 y 12×10^6 unidades formadoras de colonias (u.f.c.). Se graficaron las concentraciones de ácidos nucleicos en $\mu\text{g}/\text{ml}$ (A), contra concentración celular (N) GRAFICA 1.

3.7 Determinación de Triptofano.

Se siguió el método de Opienska - Blauth, modificado por Hernández y Bates (37). La técnica consta de :

Hidrólisis de la Proteína y Determinación de Triptofano.

3.7.1 Hidrólisis de la Proteína. La hidrólisis de proteínas por métodos enzimáticos es un camino que se puede seguir para la determinación de aminoácidos, evitándose la destrucción y modificación del triptofano y otros aminoácidos (67) El método para determinar triptofano puede ser usado para determinar triptofano libre y ligado a proteínas solubles (54).

De acuerdo a la técnica que se siguió se pesó la cantidad de muestra desgrasada con un contenido de 0.5 a 30 μg de triptofano. Las muestras pulverizadas se pusieron en matraces erlenmeyer y se les añadieron 12 ml de la solución enzimática al 0.4% en solución reguladora de acetato de sodio 0.1 N, pH 7.

Para la hidrólisis se utilizaron las siguientes enzimas:

- a) Papaina grado bioquímico hidrosoluble Merck, 3.5 m Anson-Emg
- b) Mezcla de Papaina y HT-Proteolytic-200 (Enmex S.A.).

Las muestras se incubaron a 65°C durante 16 horas con agitación de 50 rpm. Se efectuó un blanco enzimático para conocer la cantidad de triptofano liberado por autohidrólisis de las enzimas. Después de 16 horas se enfriaron los hidrolizados a temperatura ambiente, después de lo cual el sobrenadante debía estar claro.

3.7.2 Determinación de Triptofano. Se llevó a cabo de acuerdo a la técnica que siguieron Opienska-Blauth(54). La TABLA 10 muestra la curva patrón que se utilizó en la determinación de triptofano (Resultado de tres réplicas)

TABLA 10		
Curva Patrón para la Determinación de Triptofano por el Método Opienska-Blauth.		
$\mu\text{g Trp} / 0.5 \text{ ml.}$	$A_{575} \text{ nm.}$	Ec. y coef. de correlación
0	0.0	
8	0.203	
16	0.404	$y = 0.02484 x + 0.003729$
24	0.617	
32	0.792	$r = 0.9989$
40	1.001	

Para optimizar los resultados de la determinación de triptofano se realizó la técnica utilizando albúmina sérica bovina, que contiene una cantidad conocida de triptofano: 0.58 g Trp/ 100 g de proteína(68) y se estudiaron distintas cantidades de la referencia interna, la enzima más adecuado para la hidrólisis de la proteína y la cantidad de la muestra a utilizar (Ver TABLA 11)

TABLA 11
Determinación de Triptofano.

g A.S.B.	Sol. Trp ml.	Agua ml.	Enzima Sol 0.4%	Trp esperado en 0.5 ml	Trp añadido
0.06	0.5	0.5	11 ml	19.1375 μ g	5 μ g
0.06	1.0	-	11	24.1375	10
0.12	1.0	-	11	38.275	10
0.06	-	1.0	11	14.1375	-
0.12	-	1.0	11	28.275	-

En el caso de utilizar para la hidrólisis exclusivamente papaína los resultados presentaron muchas variaciones, por lo que se trabajó con una mezcla de papaína y HT-Proteolítico -200. Las muestras que se utilizaron para la determinación se agitaron en el Vortex Mixer K-500-J (USA) y se colocaron en baño de agua a 60°C durante 15 minutos. Se escogió una cantidad de 0.06 g y una referencia interna de 5 μ g, en base a la consistencia de los resultados en dos determinaciones que aparecen en la TABLA 12. Los valores de absorbancia son el resultado de cuatro réplicas.

Las cantidades de muestras desgrasadas que se utilizaron fueron:

Concentrado de la proteína de K. fragilis = 0.06 g

Albúmina Sérica Bovina = 0.06 g

Pasta de la Biomasa de K. fragilis en suero de queso = 0.03 g

Levadura secada por aspersión en lactosa (K. fragilis) = 0.12 g

TABLA 12

Determinación de Triptofano en Albúmina Sérica Bovina.

Muestra + Referencia Interna ⁹	A 575 nm	Concentración $\mu\text{g}/\text{ml}$ 0.5	Concentración gTrp/ 100 g prot.	Trp Teórico + Referencia Int. μg	%Recuperación
0.06+10 g	0.499	19.9585	0.8188	24.1375	82.68
0.06 + 5 g	0.469	18.7508	0.7684	19.1375	97.97
0.12 + 10g	0.852	34.1719	0.7009	38.275	89.28
0.06	0.347	13.8192	0.5658	14.1375	97.75
0.12	0.669	26.7822	0.5493	28.275	94.7

Nota: Enzimas en la hidrólisis de la muestra:
Papaína y HT-Proteolytic-200 (1:1)

4. RESULTADOS .

La TABLA 13 presenta los diferentes métodos de ruptura que se llevaron a cabo. El porcentaje de proteína que se midió en el sobrenadante por medio de los métodos de Kjeldahl y Lowry se expresa de acuerdo a la siguiente fórmula:

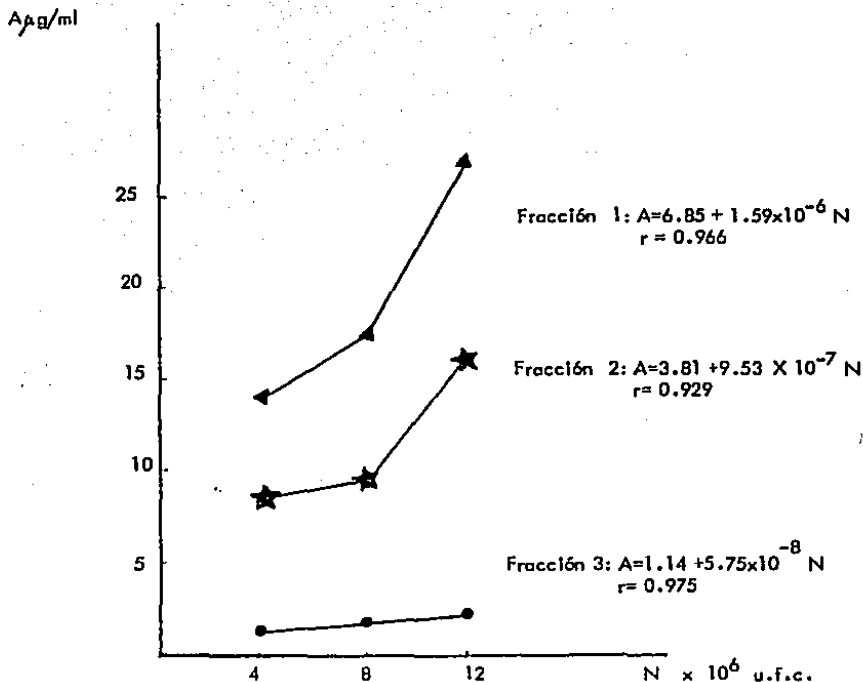
$$\% \text{proteína en el extracto} = \frac{\text{mg de proteína en el sobrenadante después de centrifugar}}{\text{mg de proteína en el sobrenadante antes de centrifugar}} \times 100$$

Inicialmente se cuantificó la proteína verdadera por el método Lowry(46), sin embargo, conforme aumentaba el tiempo de la extracción, los resultados presentaron muchas variaciones, por lo que fué necesario considerar el contenido total de proteína por el método Kjeldahl(3).

La biomasa teñida por Gram, sin ningún tratamiento de ruptura celular presentó una coloración violeta. Con respecto a la eficiencia de los métodos que se aplicaron, para lograr la ruptura, se observó que a mayor porcentaje de proteína en el extracto menor número de células de color violeta aparecían en el precipitado de pared celular.

Se llevó a cabo la extracción de la proteína de K. fragilis por medio de la técnica reportada anteriormente en la sección 3.4 (Diagrama 2). Se hicieron determinaciones del contenido de ácidos nucleicos en tres pasos de la extracción proteínica: a) Después de precipitar la pared celular b) En el sobrenadante después de precipitar la proteína c) En la proteína concentrada (Concentrado de Proteína) (VER GRÁFICA 1.)

GRAFICA 1
Concentración de Acidos Nucléicos cuantificados en unidades formadoras de colonias.



Donde:

- ▲ Fracción
- ★ Fracción,
- Fracción

A=Concentración de Acidos Nucléicos $\mu\text{g} / \text{ml}$.
N=Número de unidades formadoras de colonias (u.f.c.)
1= Después de precipitar la pared celular.
2= En el sobrenadante después de precipitar la proteína.
3= En el concentrado de proteína.

TABLA 13

Métodos Experimentales de Ruptura Celular

Método	% de Proteína en el Extracto.	
	Kjeldahl	Lowry
NaOH 3 min-200 rpm-5%-40°C-1 hr.	80.054	-
NaOH 3 min-250 rpm-2%-40°C-1 hr.	75.765	-
NaOH 3 min-200rpm-2%-40°C-1hr.	74.42	84.91
NaOH 3 min-50 rpm-2%-40°C-1 hr	68.275	-
NaOH 3.5 min-200 rpm-2%-40°C-1 hr	63.604	55.59
H ₂ O 3.5 min-200 rpm-40°C-1 hr	49.9016	16.342
NaOH 0 min-200 rpm-40°C-1 hr	49.56	18.681
H ₂ O 3 min-200 rpm-40°C-1 hr	34.39	15.818
NaOH en homogenizador Potter	-	28.69
H ₂ O 0 min-200rpm-40°C-1 hr.	27.39	12.549
Congelación en hielo seco 30 min.	18.923	15.038
Homogenizador Politrón 3 min #5	14.20	9.59
H. Politrón 0.5 min #10	13.75	9.33
Congelación hielo seco 15 min.	12.803	10.08
H. Politrón 2 min #5	10.933	9.24
Congelación Hielo seco 0 min.	9.822	6.93
H. Politrón 1 min #5	7.675	8.48
H. Potter en hielo 10-25 min	-	8-8.8
Mortero. Biomasa congelada 0-20 min	-	5.9-8.1
Mortero. Biomasa sin congelar 0-20 min	-	3.3-7.7
Solución salina	-	5.03
Biomasa seca por aspersión (medio lactosa)	-	10.87

(-) No se determinó. Inicialmente se buscaba cuantificar solo la proteína verdadera.

Las determinaciones del contenido de ácidos nucleicos se llevaron a cabo dos veces por triplicado. Los resultados obtenidos aparecen en la TABLA 14 y se encuentran expresados en gramos de Ácidos Nucleicos por gramo de biomasa y en gramos de Ácidos Nucleicos por unidades formadoras de colonias.

En la TABLA 15 aparecen los resultados de dos determinaciones (Promedio de 6 evaluaciones cada una) para evaluar la cantidad de triptofano presente en:

- a) Biomasa de K. fragilis en suero de queso.
- b) Biomasa de K. fragilis secada por aspersión en lactosa.
- c) Concentrado de proteína de K. fragilis que se obtuvo siguiendo las condiciones de extracción. (DIAGRAMA 2)

En la TABLA 16 aparece el análisis proximal de las muestras ya mencionadas.

TABLA 14									
Determinación de Ácidos Nucleicos									
	FRACCION 1			FRACCION 2			FRACCION 3		
	RNA	DNA	AN	RNA	DNA	AN	RNA	DNA	AN
$\frac{g \times 10^{-3}}{g \text{ biomasa}}$	8.57	7.78	16.4	6.42	6.04	12.5	0.76	0.65	1.42
$\frac{g \times 10^{-13}}{u f c .}$	1.46	1.33	2.8	1.1	1.03	2.13	0.13	0.11	0.24

FRACCION 1 Después de precipitar la pared celular.

FRACCION 2 En el sobrenadante después de precipitar el concentrado de proteína.

FRACCION 3 En el concentrado de proteína de K. fragilis.

RNA Acido Ribonucleico

DNA Acido Desoxirribonucleico.

AN Acidos Nucleicos Totales . Suma de RNA y DNA .

TABLA 15			
Determinación de Triptofano			
Muestras	Cantidad g	% Proteína	g Trp/ 100 g proteína
Biomasa de <u>K. fragilis</u>	0.03	59.85	2.31
Concentrado de proteína	0.06	70.33	1.53
<u>K. fragilis</u> seco por aspersión	0.12	61.71	0.415
Albumina Sérica Bovina(ASB)	0.06	77.5	0.576

TABLA 16

Análisis Proximal.

	Biomasa de <u>K. fragilis</u> %	Concentrado de proteína de <u>K. fragilis</u> .	<u>K. fragilis</u> seca por aspersión %
Humedad	78.6	7	6
Grasa	5	17.63	4.22
Cenizas	2.11	4.68	23.24
Proteína	12.54	70.328	61.71
Carbohidratos por diferencia	1.75	0.34	4.82

5 DISCUSION DE RESULTADOS .

Por medio de la fermentación del suero de queso con K. fragilis , en once litros de medio, durante 18 horas, se obtuvieron 618.6 gramos de precipitado de biomasa (promedio de dos fermentaciones). La máxima concentración es de 12.03 g/l de biomasa en base seca.

Las proteínas del suero de queso se recuperaron en el precipitado ya que K. fragilis es incapaz de degradar las proteínas séricas (81). El porcentaje de proteína cruda (b.h.) del suero líquido es de 0.9%, sin embargo hay que considerar que este contenido puede variar dependiendo del tipo de suero que se trate, aunque esta variación sea mínima de acuerdo a lo que reportan diferentes autores (29,21, 83,4,1) Ver tabla 7 y 8 .

Vananuvat y Kinsella (73) reportan una máxima concentración de 11 gramos por litro de biomasa para K. fragilis crecida en lactosa en iguales condiciones de temperatura, flujo de aire, pH, tiempo de la fermentación que las que se siguieron utilizando como medio de cultivo el suero de queso.

En el presente estudio, se pretendió que el contenido inicial de los ácidos nucleicos en las células fuera bajo. Por medio de los parámetros que se cuidaron durante la fermentación , los cuales fueron evaluados por Vananuvat y Kinsella(73), se logran niveles aceptables (10%) de ácidos nucleicos y rendimientos buenos (58.8%) de proteína. Es conveniente tener presente que el contenido de ácidos nucleicos aumenta con la velocidad de agitación y disminuye de acuerdo al tiempo de cultivo.

Para lograr la máxima extracción de la proteína se buscó un método adecuado para la ruptura celular y

al mismo tiempo que permitiera la disminución del contenido de ácidos nucleicos. Se probaron diferentes métodos con el fin de encontrar el mejor en términos de simplicidad, eficiencia y disponibilidad. La máxima extracción de proteína se alcanzó con un paso de ruptura de tres minutos de duración en la licuadora, utilizando como solución de extracción NaOH al 0.4% y agitación de 200 rpm durante una hora a 40°C. El tratamiento de las células con álcali logra debilitar las paredes celulares y facilita la ruptura por medio de métodos mecánicos de acuerdo a lo reportado por diferentes autores(74, 18, 34)

Para poder entender el mecanismo por el cual se debilita la pared celular es necesario hacer referencia de su composición. Las paredes celulares en varias especies de levaduras incluyendo a K. fragilis, representan de 15 a 20% de la materia celular(35, 18) y presentan una composición química donde las regiones exteriores se componen de complejos de mananos (30-40%) y proteínas(5-10%), a continuación sigue la estructura laminar de glucanos(30-60%) y la última capa de quitina(1%)(18, 47, 53) Los polisacáridos, componentes del 90% de la pared celular forman un retículo organizado en forma de microfibrillas que le confieren rigidez(31). En estas capas se encuentran atrapados varias enzimas, cationes y aniones dependiendo de las condiciones de crecimiento y subsecuente tratamiento. El contenido de lípidos parece ser muy variable (40, 35).

Las mananas se han aislado por esterilización a pH 7 ó al calentar en álcali fuerte dando mananas solubles (18). Es por esto que en presencia de álcali y temperatura controlada se disuelven las mananas dejando un esqueleto de glucanas(71). La pared celular no se rompe en pedazos durante la homogenización pero se fractura conservando la forma de la célula y promueve la liberación de la proteína celular. Esta liberación, sin embargo no es completa ya que se tienden a acumular carbohidratos alrededor y dentro de la estructura de la pared, lo que interfiere con la salida de la proteína celular a través de los canales que se forman con la fractura (71,42). El tratamiento alcalino de la pared celular, antes de la homogenización aumenta la liberación de la proteína en comparación con la adición de álcali después de la homogenización (18) Podemos decir entonces, que el tratamiento con álcali tiene dos efectos: a) El aflojamiento de la pared celular para facilitar su desintegración durante la homogenización y b) La remoción de la barrera hidrofóbica alrededor de la estructura de la pared, la cual interfiere con la liberación de las proteínas.

Las observaciones realizadas por Vananuvat y Kinsella Hedenskog y los resultados obtenidos en este trabajo confirman lo anterior. Vananuvat y Kinsella(74) utilizaron en la ruptura celular, un homogenizador de perlas de vidrio en una solución de

biomasa al 5% de K. fragilis y obtuvieron 38.78% de proteína liberada cuantificada por el método Kjeldahl y Hedenskog en iguales condiciones para S. cerevisiae obtuvo un 50% de extracción(34). En cuanto a los métodos de ruptura que aquí se evaluaron, el máximo porcentaje que se logró alcanzar en ausencia de álcali con diferentes métodos de ruptura fue de 49.4% cuantificado por el método Kjeldahl. Por tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos se puede decir que la homogenización por sí sola no libera el total de la proteína.

La concentración de las suspensiones que se someten a ruptura varían, el nivel que se ha utilizado preferentemente va de 5 a 10%, Con base en ésta se utilizó una concentración de biomasa al 5% en NaOH.

Un problema asociado con la ruptura de las levaduras y la extracción proteica es la proteólisis. Las levaduras contienen enzimas proteolíticas intracelulares que pueden ser liberadas después de que las células se rompen, ya sea por autólisis o por métodos mecánicos(43, 58). La autólisis se favorece principalmente con temperaturas de 45°C (49). Al evaluar los métodos de ruptura en este trabajo este problema fue notorio, sobretodo al utilizar como solución de extracción agua y exceder de 20 minutos el tiempo de ruptura con mortero, por esta razón se determinó proteína total por el método Kjeldahl.

Al evaluar el porcentaje de proteína extraída por el método de Lowry (46), el color obtenido se atribuye al contenido de tirosina y triptofano en las proteínas, sin embargo el método no es específico para aminoácidos libres. En el caso de existir una hidrólisis excesiva el método ya no resulta cuantitativo. Por esta razón se prefirió utilizar el método Kjeldahl, ya que de esta forma se cuantifica el total de la proteína en la biomasa.

Tomando en cuenta las experiencias de Vananuvat y Kinsella y de acuerdo a la TABLA 13: (Métodos Experimentales de ruptura Celular) se logró llegar a un porcentaje de extracción similar al reportado de 80.9% de proteína total. Las condiciones fueron: NaOH al 0.4% como solución de extracción, Temperatura 40 °C y una hora de agitación para lograr la extracción.

Para cuantificar la disminución de ácidos nucleicos en este mismo proceso, se utilizó el método de Schmidt-Thannhausser modificado(41). De acuerdo a varios autores(44,34) el efecto alcalino parece ser el método más adecuado y aplicable a grandes escalas para la reducción del contenido de ácidos nucleicos.

La técnica que se siguió para la recuperación máxima de proteína, al mismo tiempo pretendía una disminución del contenido de ácidos nucleicos. Por esta razón, fué necesario evaluar su contenido en tres fracciones para corroborar si la técnica cumplía con ese fin. Así, de acuerdo a la TABLA 14, el contenido de ácidos nucleicos en el concentrado de proteína de K. fragilis fué de 8.7% en relación a la cantidad total (FRACCION 1), esto correspondió a una reducción de 91.3%. Considerando el peso total de la biomasa húmeda, la cantidad de ácidos nucleicos presente es de 0.14% y con respecto al nitrógeno total en la biomasa es de 7.1%.

Si se toma en cuenta la restricción que existe en cuanto a que la ingesta de ácidos nucleicos provenientes de levadura no debe exceder de 2 g/ día (23), la cantidad que se puede utilizar en alimentos es de : 251.45 g de concentrado de proteína de K. fragilis , tomando en cuenta que posee : 7.95×10^{-3} g de ácidos nucleicos por gramo de proteína (Contenido total de proteína 70.32%)

En la determinación de triptofano en albúmina sérica bovina, se obtuvo un resultado que concuerda con el valor reportado de 0.58 g Trp/100 g de proteína(68).

Los resultados de la determinación de Triptofano para las tres muestras obtenidas son los siguientes:
 Para la biomasa de K. fragilis , fué de 2.31 g Trp/ 100 g de proteína y es muy similar al de Amundson(2.4 g Trp/100 g proteína) (1). El valor del contenido de triptofano es mayor que el que reporta la proteína del huevo(1.8 g Trp/100 g proteína)(TABLA 8) .
 El concentrado de proteína de K. fragilis , mostró una concentración de 1.53 g Trp/100 g proteína obteniendo un resultado superior al de Vananuvat y Kinsella (0.4 g Trp/100 g proteína) (75), que se atribuye a la presencia de proteínas del suero de leche que quedan con la biomasa de K. fragilis después

de la fermentación, K. fragilis seca por aspersión y crecida en lactosa, si presentó un valor similar al reportado por Vananuvat y Kinsella, la causa principal parece ser que se cultivó en un medio similar. Sin embargo, hay que considerar también el posible efecto del calor al secar la biomasa en el contenido de este aminoácido.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el posible daño al triptófano ocasionado por el tratamiento, en el concentrado de proteínas de K. fragilis (1.53 g Trp/100 g proteína) no resulta serio y su valor es superior al patrón FAO (1.1 g Trp/100 g de proteína) e inferior al del huevo (1.8 g Trp/100 g proteína).

Se sabe que los procesos alcalinos y térmicos afectan la calidad de las proteínas(6). A este respecto Hedenskog(34), evaluó la precipitación por calentamiento a 80°C y extracción alcalina a pH menor de 12 durante 2 horas y encontró que estas condiciones no parecen afectar el contenido de lisina en levaduras, ya que se recobraron 80% de lisina y de 85 a 90% de los aminoácidos restantes. El porcentaje de lisina sólo decae cuando se excede de pH 12 y de temperaturas mayores a 80°C.

En relación al efecto del álcali utilizado durante el método de extracción de la proteína, sobre el aminoácido triptófano, se puede asegurar que no causa racemización del triptófano ya que se requirieron temperaturas de 85°C ó más durante cuatro

horas como mínimo para encontrar D-isómeros.

Es bien sabido y se ha comprobado que la primera limitación en la calidad proteica de K. fragilis son los aminoácidos metionina y cisteína (75,83,77,21,72). Esta limitación, sin embargo, es inherente a la naturaleza de la levadura.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se logró una adecuada extracción de proteína con disminución de ácidos nucleicos y se verificó que el triptófano no es limitante en el concentrado de proteína de K. fragilis. Todo esto aunado a los reportes de la literatura sobre las propiedades funcionales de los concentrados de proteína en K. fragilis (76) aseguran su utilización potencial en diferentes alimentos.

Para facilitar la utilización de los concentrados de proteína en la industria alimentaria, se requieren en primer término estudios sobre la relación de las propiedades funcionales con las características químicas y físicas de las proteínas, así como de los sistemas que contengan dichos concentrados y en segundo término la investigación de procesos simples que tomen en cuenta la naturaleza de los concentrados de proteína para evitar que se pierdan sus características particulares.

Con la consideración de estos puntos y un esfuerzo bien planeado es técnicamente factible convertir a la proteína unicelular en una fuente competitiva de proteína.

6 CONCLUSIONES .

Por medio del presente trabajo se estableció una metodología para la obtención del concentrado de proteínas de K. fragilis, la cual permite la extracción de la proteína y al mismo tiempo disminuye el contenido de los ácidos nucleicos.

El proceso óptimo de dicha metodología consistió en extraer la proteína con álcali al 0.4% en el agitador-incubador New Brunswick G-24 con agitación de 200 rpm durante una hora a 40°C, un paso de fractura celular de 3 minutos en la licuadora Osterizer y la precipitación de la proteína a pH 4.2 a 60°C. Se logró así una extracción del 80.9% de proteína total y una disminución del contenido de ácidos nucleicos de 91.31%.

Se evaluó la cantidad de triptofano presente después de seguir el método descrito y se obtuvo un resultado de 1.53 gramos de triptofano por cien gramos de proteína para el concentrado de proteínas de K. fragilis. De acuerdo a estos resultados y a la información que se tiene de que los aminoácidos azufrados son la primera limitación en las levaduras y en K. fragilis (75,83) se puede decir que la calidad nutricional de K. fragilis no se afecta mayormente por el tratamiento aplicado.

7 RECOMENDACIONES .

En base a los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo, se recomienda utilizar los concentrados de proteína de K. fragilis como complemento de otras proteínas. De esta manera se cubren las deficiencias nutricionales por los aminoácidos azufrados, y se asegura una ingesta con bajo contenido de ácidos nucleicos.

Para una utilización adecuada de los concentrados de proteína de K. fragilis se recomienda tener presente lo siguiente:

- a) El nivel de utilización de la levadura en un producto alimenticio debe considerar el contenido de los ácidos nucleicos.
- b) Las propiedades funcionales, valor nutricional y las características organolépticas de los concentrados de proteína deberán evaluarse en relación a aplicaciones específicas en productos específicos.

Por otra parte, después de extraer la proteína, se sugiere la transformación de los componentes restantes en nuevos productos ya que de esta forma se tienen además beneficios económicos.

8 BIBLIOGRAFIA

1. Amundson, C.H., 1967. "Increasing Protein Content of Whey" Am. Dairy Rev. 29(7), 22-23. 96-99 .
2. Andrews, G.H., 1975. Introductory Nutrition : 3a. Ed The C.V. Mosby Co.: New York .
3. A.O.A.C. 1975. "Official Methods of Analysis . 12 Ed; Washington D.C.
4. Bernstein, S., Izeng, C.H., 1977. "The Commercial Fermentation of Cheese Whey for the production of protein and/or alcohol ." Biotech. Bioeng. Symp. No. 7. 1-9 .
5. Beusejour, D., Leddy, A., 1981. "Batch Cultivation of K. fragilis in cheese whey". Can J Chem. Eng. 58(4) 522-526 . Chem Abs.: 95. 166100f.
6. Bodwell, C.E. 1977 . Evaluation of Proteins for Humans; The Avi Pub. Co. Inc. Westport .
7. Bonomi, A., Vassia G., 1978. "Observations and remarks on the use of S. cerevisiae and K. fragilis on the production of broilers." Arch. Vet. Ital. 29(1-2)3-15. Chem. Abs.: 88, 168814j .
8. Bonomi, A., Vassia G., 1978 "Observations and remarks on the use of S. cerevisiae and K. fragilis in the form of living yeast, in the feed of Guinea fowl for slaughter. Its sparing effects on animal protein." Arch. Vet. Ital. 29(1-2 Suppl.) 16-25 . Chem. Abs. 88, 168815 k.
9. Bonomi, A., Vassia G., 1978. "Observations and remarks on the use of S. cerevisiae and K. fragilis in the form of living yeast, in the feed of turkeys for slaughter." Arch. Vet. Ital: 29(1-2) 26-33 .Chem Abs 88 , 168816 m .
10. Boston W., Smith, W., and Gilliland, S.E., 1978. "Snack food provide natural target for supplementation with yeast-whey protein." Food Prod. Dev. 12(9)68-70.
11. Botazzo, V., 1975 . "Conversion of lactose to proteins" Sci. Tec. Latt-Casearia 26(338-54) Chem. Abs. 86, 154152 p.
12. Calloway, D.H. 1974. "The place of SCP in man's diet" Department of Nutritional Science. California U.S.A. 129-146 .
13. Canepa, A., Pieber, M., Romero, C., 1972. "A method for large Reduction of the Nucleic Acid Content of Yeast." Biotech. Bioeng. 14:173-177 .

14. Chang J.E., 1972. "Cheese ripened mainly with yeast. V. Changes of flavor components in cheese during ripening." Nip. Chik. Gakk. 43(10), 561-6 . Chem. Abs. 78. 14599 z.
15. Chang, J.E., Yoshino, U., 1972: "Cheese ripened mainly with yeast . II Proteolytic Activity of S. fragilis." Nippon Chik. Gakk. : 43(4) 193-7. Chem Abs. 7732934 p.
16. Chen S.L., and Peppler , H.J., 1978. "Single Cell Proteins in Food Applications" In Developments in Industrial Microbiology. V 19: Michigan 79-94 .
17. Chereisinoff, N., Nicholas P., 1980 . Biomass Technology and Production; Marcel Dekker, Inc: New York, USA. 56-83 .
18. Cooney, C.L., Tannenbaum, S.R., Rha C. 1980. "Single Cell Protein Engineering, Economics and Utilization in foods". Adv .Fd. Res. 26: 1-52 .
19. Currie, J.A., Dunhill, P. and Lilly , M.D. 1972. "Release of protein from Bakers Yeast (S. cerevisiae) by Disruption in an Industrial Agitator Mill." Biotech. Bioeng. 14:725-736 .
20. Dalby, A., Chia Yin Tsai., 1975. "Acetic Anhydride Requirement in the Colorimetric Determination of Tryptophan." Anal. Biochem. 63: 283-285 .
21. Delaney R., Kennedy R., Walley B.D., 1975. "Composition of S. fragilis biomass grown on lactose permeate." J. Sci. Food Agric. 26(8): 1177-1186 .
22. Dunhill, P. and Lilly, M.D. 1975. Protein Extraction and recovery from Microbial Cells. In Single Cell Proteins II.: M.I.T. Press: Cambridge Mass. 175 .
23. Edozien, J.C. Udo, U.U., Young V.R. 1970. "Effects of high levels of yeast feeding on Uric Acid Metabolism of Young Men." Nature: 228: 180.
24. El Akher, M.A., Allan, A.M., 1974. "Production of high protein feed additives from fermented whey. I. Physical Studies on cultivation of yeast in whey." Chem. Mikrobiol Tech. Lebensm. 3(3), 81-4. Chem. Abs.: 81. 89769 a.
25. Escenarios Económicos de México. Perspectivas de Desarrollo para Ramos Seleccionadas. 1981-1985. Dirección de Estadísticas Demográficas y Sociales S.P.P.
26. Foldheim, W., 1975. "Evaluation of the protein efficiency ratio of the processed yeast S. fragilis ." Lebensm.-Wiss. Tech: 8(6) 282-5. Chem. Abs. 84, 104202 t.
27. Friedman Mendel., 1975. Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds. Marcel Dekker Inc. New York: 423-452 .

28. Garattini, S., Paglialugi, S., 1979. *Single Cell Protein Safety for Animal and Human Feeding*. Pergamon Press Ltd .
29. Garcia J.M., Gómez Ruiz L. 1987. "Studies on the simultaneous Production of Single Cell Protein and Polygalacturonase from K. fragilis " *Biotechnology Letters* Vol 9(6): 411 -416 .
30. Gilliland, S.E., and Stewart, Ch., 1980. "Amount of yeast and whey protein recovered from cottage cheese whey cultured with K. fragilis." *J. Dairy Sci.* 63(6), 989-90.
31. Gómez. H.J. y Vinfegro G.G. 1977. " Extracción del Acido Ribonucleico (ARN) de S. cerevisiae en condiciones alcalinas suaves". *Rv.Soc. Quim. Mex.* 21(3):97-102.
32. Groot, A.P., 1975. "Minimal Test Necessary to evaluate the Nutritional Qualities and the Safety of SCP." *Central Institute of Nutrition and Food Research. Academic Press, N. York.*
33. Hedenskog, G., 1970 . "A Method for obtaining Protein Concentrates from Microorganisms." *Biotech. Bioeng.* 12: 947-959 .
34. Hedenskog, G., Ebbingous. L., 1972, "Reduction of the Nucleic Acid Content of Single Cell Protein Concentrates." *Biotech. Bioeng.* 14: 447-457 .
35. Hedenskog G., 1973. "Some Methods for Processing of Single Cell Protein" *Biotech. Bioeng.* 15:129-142 .
36. Herbert, D., Phillips P.J., Strange R.E., 1971 "Determination of Nucleic Acids" *Met. Microb.* 5B: 308-344.
37. Hernández H. and Bates L.S., 1969. "Modified Method for Rapid Tryptophan Analysis of Maize." *Research Bull. No. 13 CIMMYT.*
38. Hober, T., Jakubezyk, T., 1971. "Effect of powdered dry whey on some organoleptic properties and nutritional value of bread." *Zesz. Nauk. Szk. Gł. Gosp. Wiejsk. No. 7, 71-85. V. Chem. Abs. 77, 3971 t.*
39. Kawaguchi, Y., Matsuoka, H., 1980. " Manufacturing of cheese like soy protein food with S. fragilis as a starter." *Nipp. Shok. Kag. Gakk.*:28(1), 1-7. *Chem Abs.* 94, 119638v.
40. Kinsella. J.E. and Shetty K.J., 1981. "Yeast Proteins: Recovery Nutritional and Functional Properties." *Dept. of Food Sci. Cornell University Ithaca. New York.*
41. Langer, R.S. and Thilly W.G., 1984. *Analytical Practices in Biochemistry . M.I.T. Department of Nutrition and Food Science.* 20.111: 131-148 .

42. Lee, C.H. and Tsong, S.K., 1979. "Desintegration of the Dried Yeast Cell and its effect on protein extractability, sedimentation properties and viscosity of cell suspension." *Biotech. Bioeng.* 21:1-17 .
43. Lindblom, M., Mogren H., 1974. "Enzymatic RNA Reduction in Desintegrated Cell of S. cerevisiae." *Biotech. Bioeng.* 16:1123-1133.
44. Lodder J., 1970. *The Yeast. A Taxonomic Study*; North Holland Publ. Co. : Amsterdam.
45. Lindblom M., 1974. "The Influence of Alkali and Heat Treatment on Yeast Protein" *Biotech. Bioeng.* 16: 1495-1506.
46. Lawry , O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent" *J. Biol. Chem.* 193:265-275 .
47. Manners, D.J., Masson, A.J.. 1974 "Heterogeneity of glucan preparations from the walls of various yeast" *J. Gen. Microb.* 80. Pt. 2; 411-417 . *Chem. Abs.* 80, 117987 v.
48. Maul, S.B., Sinskey, A.J. and Tannenbaum. S.R., 1970 ." New Process for Reducing the Nucleic Acid Content of Yeast. " *Nature* 228(10):181 .
49. Mc. Nairney, J., 1984. "Modification of a Novel Protein Product." *J. Chem. Tech. Biotech.* 34B: 206-214 .
50. Miller, E.L., 1967. "Determination of the Tryptophan Content of Feed in Stuffs with particular reference to cereals " *J. Sci. Fd. Agric.* 18:381-386 .
51. Moresi, M. 1981. "Scale up of whey fermentation in a pilot Scale fermenter ." *Eur . J. Appl. Microb. Biotech.* 12: 171-178.
52. Moulin, C., Varchon, P., Galzy P. 1977."A new possible use of whey" *Ind. Alim. Agric.* 94(1), 29-34. *Chem. Abs.* 86, 154152 p.
53. Noyes Data Corporation. 1977. *Yeast for food and other puposes . Library of Congress Catalog Card Number 77, 85669. New Jersey .*
54. Opienska-Blauth, J., Charenzinski, M., 1963" A New rapid Method of Determining Tryptophan." *Anal. Biochem.* 6: 69-76 .
55. Paul, A., and South gate D.A., 1978. *The Composition of Foods.* 4th. Ed. Elsevier Mc. Cance, Widdowson's North Holland Biomedical Press.

56. Pearlman, D. y Pepler, H.J. 1979. *Microbial Technology*.; Academic Press: New York. 93-155 .
57. Peshard -Mariscal, E. and Vintegra González. G. 1977. Cost Analysis of Yeast Protein and RNA Production by Aerobic Fermentation of Cane Mollases. *Biotech. Bioeng. Symp. No. 7* , 119-128.
58. Pour-El Akiva. 1979. *Functionality and Protein Structure*. A.C.S. Washington D.C.: 37-63 .
59. Raccotta V. 1979. "Posibilidades para el aprovechamiento del Suero Lácteo." *Rev. Tech. Alim. Nov.-Dic. , 6-14 .*
60. Rho, O.K. 1975. "Utilization of Single Cell Protein for Human Food." In *Single Cell Protein II*; MIT Press: Cambridge Mass.
61. Reed, G., 1982. *Industrial Microbiology*. Prescott and Dunn's 4 th Ed.; The Avi Publ. Co.: Westport.
62. Rose, A.H., 1979. *Microbial Biomass . Economic Microbiology*. Vol 4 . Academic Press: N. Y.
63. Schmidt, G. and Thannhauser, S.J., 1945. "A Method for the Determination of Desoxyribonucleic Acid, Ribonucleic Acid, and Phosphoproteins in animal tissues." *J. Biol. Chem.* 161:292-303.
64. Schneider, W.C., 1945. "Extraction and Estimation of Desoxypentose Nucleic Acid and of pentose Nucleic Acid." *J. Biol. Chem.* 161:292-303.
65. Schoen, H.M., 1977. "Functional Properties and their measurements." In, *Food Proteins*; Avi Publ. Co.: Westport, Conn. Ed. Whitaker. 387- 00.
66. Sinskey, A.J. and Tannenbaum. S.R., 1975. Removal of nucleic acid in Single Cell Protein. *Single Cell Protein II* Tannenbaum Wang; Eds. Mit. Press:Cambridge. 158.
67. Soriano S.T., Gutierrez O.J.L. 1984. "Efecto del Alkali sobre la disponibilidad del Triptofano en Coseña y en concentrado de proteínas de pescada." *Tesis Fac. Guim. UNAM*
68. Stein W.H., Moore S., 1949. "Aminoacid composition of β -lactoglobulin and bovine serum albumin." *J. Biol. Chem.* 178-79.
69. Stewart, Ch. F., Gilliland, S.E., 1979. "Utilizing yeast-whey proteins." *American Dairy Rev.* 41(4), 30A-30B .

70. Stone H. and Sidel J. 1975. The Use of SCP In Food and Plant Sci. Dept. Stanford Res. Inst. Menlo Park. Cal. USA. 147-160.
71. Tsang, S., Lee, C.H. and Rha, C.K. 1979. "Desintegration of Cell Walls and Extraction of Protein from C. lipolytica." J. Food Sci. 44(1) 97.
72. Vananuvat, P. and Kinsella J.E.. 1975. "Protein Production from Crude lactose by S. fragilis .Continuous Culture Studies." J. Food Sci. 40(2),823-825 .
73. Vananuvat P and Kinsella J.E. 1975. "Protein of yeast protein from crude lactose by S. fragilis. Batch culture studies." J. Food Sci 40(2) :336-341 .
74. Vananuvat P., Kinsella J.E., 1975. "Extraction of protein low in Nucleic Acid from Saccharomyces fragilis grown continuously on crude lactose." J Agric.Food Chem. 23(2):216-221.
75. Vananuvat P. and Kinsella J.E., 1975. "Aminoacid Composition of Protein Isolates from S. fragilis." J. Agric. Food Chem. 23(3): 595-597 .
76. Vananuvat P. and Kinsella J.E., 1975. "Functional Properties of Protein Isolates from Yeast S. fragilis ." J. Agric. Food Chem. 23(4); 613-616.
77. Vaughman M., 1979. "Aminoacid Composition of whole cells of Different Yeast." J. Agric. Food Chem. 27(5); 982-984.
78. Vri gnoud, Y ., 1971. Lactic Yeast. Rev. Inst. Pasteur Lyori: 4(2) :147-65. Chem. Abs. 76, 125389 j.
79. Waslien C.I. and Colloway , D.H. 1970. "Uric Acid Levels in men fed algae and yeast as protein sources." J. Food Sci. 35: 294-298 .
80. Waslien, C.I. 1975." Unusual sources of protein for man. " Crit. Rev.Food Sc. Nutr. : 6, 77-151 .
81. Wasserman, A.E., 1960. Whey Utilization IV. Availability of whey Nitrogen for the growth of S. fragilis . J. Dairy Sci. 43, 1231-1234 .
82. Wasserman , A.E., 1961. "Aminoacid and Vitamin Composition of S. fragilis grown in whey." J. Dairy Sci. 44, 379-86.
83. Webb, B.H. and Whittier. Byproducts from milk . 2nd. Ed. The Avi Pub. Co.: Westport. 43-82 .