

15  
25



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**"APUNTES DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS IV,  
FERMENTACIONES INDUSTRIALES"**  
(Revisión Bibliográfica)

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**INGENIERA EN ALIMENTOS**  
**P R E S E N T A :**  
**ELIZABETH SORIANO FIGUEROA**

ASESOR: O.F.B. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO.

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO.

1999

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

270145



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES DE CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO**  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

AN'T: Q. Ma del Carmen Garcia Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlan.

Con base en el artículo 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS: "Apuntes de Tecnología de Alimentos IV, Fermentaciones Industriales". (Revisión Bibliográfica), que presenta la pasante Elizabeth Soriano Figueroa, con número de cuenta 9156189-3 para obtener el TITULO de:

**INGENIERA EN ALIMENTOS.**

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlan Izcalli, Edo. De Méx. , a 11 de Agosto de 1998

PRESIDENTE	I B.Q. Francisco Montiel Sosa
VOCAL	M. en C. Clara Ines Alvarez Manrique
SECRETARIO	Q.F.B. Susana Patricia Miranda Castro
1er SUPLENTE	Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda
2do SUPLENTE	Q.F.B. Guadalupe Amaya León

*[Handwritten signatures and marks on lines corresponding to the list of names]*

# GRACIAS

**DIOS** Por el amor que has derramado en mi, por las oportunidades que me has dado y por el conocimiento que has compartido conmigo, Lo que es de Dios es luz; y el que recibe luz y persevera en Dios, recibe más luz, y es luz aumenta más y más en resplandor hasta el día perfecto D y C 50:24.

**Mamá**

**Ma. Elena Figueroa Ortiz**

Por que me diste la vida y me has enseñado como vivirla. Tu amor es mi tesoro y tu esfuerzo mi guía.

**Papá**

**Ruben Soriano Aparicio**

Por estar siempre conmigo y me das tu mano amiga.

**Ruben Soriano Figueroa**

No solo como hermano, sino como buen amigo, siempre puedo contar contigo.

**Lilia Lara Ortiz**

Me has enseñado que con perseverancia se hacen las cosas y con excelencia las grandes cosas.

**J. Antonio Santoyo Miranda**

Por tu interés y ayuda en todos aspectos

**Samuel Santoyo Lara**

Por tu paciencia, sonrisas, amor, solidaridad y ánimo para terminar.

**Lily Santoyo Lara**

Por tu sonrisa, amor y momentos alegres que me ayudan a ser mejor.

**Fam Medina Escudero**

Por su comprensión y ayuda.

**Mtra. Patricia Miranda**

Maestras como Ud., valen mucho su apoyo dedicación y paciencia vienen del amor a su trabajo.

**Mis Sinodales**

**I.B.Q. Francisco Montiel Sosa**

**M. en C Clara Inés Alvarez Manriquez**

**Q.F.B. Susana Patricia Miranda Castro**

**Q.F.B. Ma Esther Revuelta Miranda**

**Q.F.B. Guadalupe Amaya León**

Por su dirección y ayuda en la realización de este trabajo

---

# INDICE

1. PROTEÍNA UNICELULAR	1
1.1. Introducción	1
1.1.1 Definición de biomasa o proteína unicelular	2
1.1.2 Ventajas y desventajas	2
1.2 Características de la proteína unicelular	3
1.2.1 Composición química	3
1.2.2 Microorganismos utilizados	4
1.2.3 Velocidad de crecimiento para un sustrato determinado	4
1.2.4 Toxicidad	4
1.2.5 Digestibilidad	5
1.2.6 Seguridad del producto	6
1.3 Factores que afectan el crecimiento de los microorganismos	6
1.3.1 Tiempo-sustratos empleados	7
1.3.2 Clasificación de sustratos	8
1.3.1.1 Precio	8
1.3.1.2 Disponibilidad y abundancia	8
1.3.1.3 Pretratamiento del sustrato	8
1.3.1.3.1 Hidrólisis ácida	9
1.3.1.3.2 Hidrólisis enzimática	9
1.4 Condiciones de fermentación	10
1.4.1 Temperatura	10
1.4.2 pH	10
1.4.3 Productividad	11
1.5 Proceso de producción de proteína unicelular	11
1.5.1 Fermentación aeróbica típica	11
1.6 Obtención de Biomasa microbiana	12
1.6.1 Obtención a partir de petróleo y sus derivados	12
1.6.2 Obtención a partir de recursos renovables	13
1.6.3 Obtención a partir de carbohidratos	13
1.6.4 Obtención a partir del tratamiento biológico de aguas residuales industriales	13
1.6.5 Obtención a partir de levaduras	14
1.6.6 Obtención a partir de algas	14
1.7 Principales microorganismos utilizados en la producción de proteína	15
1.8 Consideraciones finales	15
2 PRODUCCIÓN DE ALCOHOL	17
2.1 Introducción	17
2.2 Materia primas	18
2.3 Características de las levaduras para la producción de alcohol	19
2.4 Sustratos	20
2.5 Condiciones de la fermentación	21
2.6 Posibles contaminantes	21
2.7 Tipos de fermentación	22
2.7.1 Por cortes	22

---

2.7.2	Por decantación	22
2.7.3	Por cultivo Puro	23
2.7.4	Proceso de Melle-Boinot	23
2.7.5	Procesos continuos	24
2.8	Producción de vino	26
2.8.1	Operaciones de la vinificación	27
2.8.2	Microorganismos empleados	28
2.8.3	Bioquímica de la fermentación del mosto de uva	28
2.9	Licores	29
2.9.1	Operaciones de la elaboración de licores	29
2.9.2	Microorganismos presentes	30
2.9.3	Elaboración de Champang y jerez	31
2.9.3.1	Champang	31
2.9.3.1	Jerez	31
2.10	Producción de cerveza	31
2.10.1	Materias primas	32
2.10.2	Proceso de malteo	33
2.10.3	Cambios durante el malteo	34
2.10.4	Proceso de elaboración del mosto	35
2.10.5	Elaboración de Cerveza	35
2.10.6	Diferentes tipos de cerveza	37
3.	PRODUCCIÓN DE ANTIBIOTICOS POR VÍA MICROBIANA	37
3.1.	Introducción	38
3.1.1.	Definición	38
3.2.	Clasificación de los antibióticos	40
3.3.	Propiedades de un antibiótico ideal	42
3.3.1.	Biosíntesis de antibióticos	42
3.3.2.	Precursores en la alimentación	42
3.3.3.	Inhibición metabólica	42
3.3.4.	Biosíntesis híbrida	43
3.3.5.	Mutasíntesis	43
3.3.6.	Manipulación Genética	44
3.3.7.	Biotransformaciones	44
3.4.	Biosíntesis de Penicilina	45
3.4.1.	Proceso de manufactura	48
3.5.	Compañías Productoras de antibióticos	49
4.	PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS ORGANICOS	49
4.1.	Introducción	49
4.2.	Ácido Cítrico	49
4.2.1.	Generalidades	50
4.2.2.	Mecanismos bioquímicos	51
4.2.3.	Microorganismos utilizados	51
4.2.3.1.	Cultivo Superficial	51
4.2.3.1.1.	Tipos de producción	53
4.2.3.2.	Cultivo Sumergido	55
4.2.3.2.1.	Tipos de producción	56
4.2.4.	Usos	57

4.3. Ácido Acético	57
4.3.1. Generalidades	57
4.3.2. Microorganismos usados	58
4.3.3. Producción	59
4.3.4. Rendimientos	60
4.3.5. Usos	60
4.4. Ácido Láctico	61
4.4.1. Generalidades	61
4.4.2. Microorganismos utilizados	61
4.4.3. Medios de cultivo	62
4.4.4. Proceso general de producción	62
4.4.5. Aislamiento	63
4.4.5.1. Producción a partir de azúcar de maíz	64
4.4.5.2. Producción a partir de suero de leche	64
4.4.5.3. Producción por mohos	65
4.4.6. Usos	65
4.5. Ácido Gluconico	66
4.5.1. Generalidades	66
4.5.2. Producción	66
4.5.3. Recuperación del producto	67
4.5.4. Usos	68
4.6. Ácido Giberilico	68
4.6.1. Generalidades	68
4.6.2. Producción	68
4.6.3. Aplicaciones	69
4.7. Ácido Propionico	69
4.7.1. Generalidades	69
4.7.2. Producción	70
4.7.3. Aplicaciones	70
4.8. Ácido Itaconico	71
4.8.1. Producción	71
4.8.2. Recuperación	71
4.8.3. Aplicaciones	72
4.9. Ácido Tartarico	72
4.9.1. Producción	72
4.9.2. Recuperación	73
4.9.3. Aplicaciones	73
4.10. Ácido Fumárico	73
4.11. Ácido Málico	74
4.12. Otros Ácidos	74
5. PRODUCCIÓN DE VITAMINAS POR MICROORGANISMOS	75
5.1. Introducción	75
5.1.1. Necesidades de vitaminas	76
5.1.2. Tipos de coenzimas	77
5.1.3. Tipos de vitaminas	78
5.2. Vitamina B12	79
5.2.1. Fuentes	79

## INDICE

---

5.2.2. Producción	79
5.3. Vitamina B2	81
5.3.1. Fuentes	81
5.3.2. Producción	81
5.4. Vitamina C	83
5.4.1. Fuentes	83
5.4.2. Producción	83
5.5. Provitamina A ( <i>B-caroteno</i> )	83
5.5.1. Producción	84
5.6. Vitaminas B8 (Biotina)	84
5.6.1. Fuentes	85
5.6.2. Producción	85
5.7. Provitamina D2 (Ergoterol)	86
5.7.1. Producción	86
5.8. Resumen de producción	87
6. PRODUCTOS DERIVADOS DE LA HIDROLISIS DE ALMIDÓN	89
6.1. Introducción	89
6.2. Enzimas utilizadas en la producción de jarabes	90
6.2.1. Enzimas productoras de maltodextrosa	90
6.2.2. Enzimas productoras de jarabes de glucosa	90
6.2.2.1. Glucoamilasa	91
6.2.2.2. Amilasa fúngica	91
6.2.2.3. Transglucosidasa	91
6.2.2.4. Isoamilasa	92
6.2.2.5. Pululanasa	92
6.2.2.6. Alfa-amilasa bacteriana	92
6.2.3. Enzimas productoras de jarabes de maltosa	92
6.2.3.1. Amilasa de <i>A. oryzae</i>	93
6.2.3.2. Beta amilasa	93
6.2.4. Enzimas usadas en la producción de jarabes de alta fructosa	93
6.2.4.1. Glucosa isomerasa	93
6.2.5. Otras enzimas	94
6.3. Materias primas	94
6.3.1. Proceso de Producción	95
6.3.1.1. Licuefacción	95
6.3.1.1.1. Equipo	97
6.3.1.1.2. Calentamiento	97
6.3.1.2. Sacarificación	97
6.3.1.2.1. Proceso de sacarificación	98
6.3.1.3. Inmovilización	98
6.4. Dextrosa cristalina y líquida	
6.4.1. Producción	100
6.4.2. Aplicaciones	100
6.4.2.1.1. Industria alimentaria	102
6.4.2.1.2. Aplicaciones industriales	102
6.5. Jarabes de fructosa	103
6.5.1. Producción	103



6.5.2. Aplicaciones	105
6.6. Fructosa Cristalina	105
6.6.1. Producción	106
6.6.2. Propiedades funcionales	106
6.6.3. Aplicaciones	108
6.7. Maltodextrina	108
6.7.1. Producción	109
6.7.2. Propiedades	109
6.7.3. Aplicaciones	110
6.8. Jarabe de glucosa	110
6.8.1. Producción	111
6.8.2. Propiedades	111
6.8.3. Aplicaciones	112
6.9. Ciclodextrinas	113
6.9.1. Producción	113
6.9.2. Aplicaciones	114
7. APROVECHAMIENTO DE DESPERDICIOS AGROINDUSTRIALES	115
7.1. Introducción	115
7.2. Producción de biogas a partir de desechos agrindustriales	116
7.2.1. Características	116
7.2.2. Producción	117
7.2.2.1. Capacidad de producción	121
7.2.3. Compresión del gas	121
7.2.4. Poder calorífico	122
7.2.5. Usos	123
7.2.6. Seguridad	124
7.3. Composteo, fermentación al aire libre de materia orgánica	125
7.3.1. Factores importantes en el composteo	125
7.3.2. Cambios durante el composteo	126
7.3.3. Microorganismos presentes	127
7.4. Producción de hongos	127
7.4.1. Producción	129
7.4.1.1. Fase I	
7.4.1.1.1. Reacciones químicas que se producen en el interior de la pila	129
7.4.1.2. Fase II	129
7.4.1.2.1. Cambios en el sustrato durante la fermentación	131
7.5. Tratamiento y eliminación de las vertidos industriales	132
7.5.1. Lechos bacterianos	132
7.5.2. Lodos activados	134
8. PRODUCCIÓN DE ENZIMAS MICROBIANAS	135
8.1. Introducción	137
8.2. Definición	137
8.3. Clasificación	139
8.4. Procedencia de las enzimas	140
8.5. Enzimas extracelulares	141
8.5.1. Secreción de enzimas	142
	143

## INDICE

---

8.6. Producción	144
8.6.1. Fermentación sumergida	144
8.6.2. Fermentación en sustrato sólido	144
8.7. Control de la producción de enzimas en microorganismos	146
8.7.1. Inducción	147
8.7.2. Inducción gratuita	148
8.7.3. Operon Lac	148
8.8. Extracción de enzimas	149
8.8.1. Métodos físicos	149
8.8.2. Métodos químicos	152
8.9. Purificación de enzimas	152
8.9.1. Solubilidad	153
8.9.2. Carga eléctrica	155
8.10. Tamaño peso molecular y forma	156
8.10.1. Tipos de inmovilización	159
8.11. Ingeniería enzimática	162
8.12. Legislación en el empleo de las enzimas	162
8.13. Usos de las enzimas en la industria	164
8.13.1. Disponibilidad	
8.13.2. Principales usos en la industria alimentaria	165
8.13.3. Fabricantes de enzimas	173
9. AMINOÁCIDOS	174
9.1. Introducción	174
9.2. Microorganismos utilizados	176
9.2.1. Cepas silvestres	176
9.2.2. Mutantes Auxotróficos	177
9.2.3. Mutantes regulatorios	179
9.2.4. Producción por precursores biosintéticos	181
9.3. Producción	181
9.3.1. Factores a controlar en la producción de aminoácidos	182
9.4. Aminoácidos producidos	183
9.4.1. Ácido L-glutámico	183
9.4.2. L-Triptófano	184
9.4.3. L-Fenilalanina	185
9.4.4. L-Lisina	185
9.4.5. L-Leucina	185
10. PRODUCCIÓN DE GOMAS MICROBIANAS	186
10.1. Introducción	186
10.2. Propiedades funcionales de los polisacáridos	188
10.2.1. Características generales	188
10.3. Propósito de los polisacáridos microbianos	190
10.4. Principales polisacáridos microbianos	190
10.4.1. Scleroglucan	
10.4.2. Zanflo	191
10.4.3. Pullulan	191
10.4.4. Fosfomanan	192
10.4.5. Polisacárido Y-1401	192

10.4.6. Curdian	193
10.4.7. Polisacárido de <i>Arthobacter</i>	193
10.4.8. Alginato bacteriano	194
10.4.9. Levan	194
10.4.10. Polisacárido de <i>Beijerinchia indica</i>	194
10.4.11. Dextrano	195
10.4.12. Xantana	196
10.5. Producción de microorganismos productores de polisacáridos	199
10.5.1. Microorganismo productor	199
10.5.2. Características del medio de cultivo	200
10.5.3. Condiciones de incubación	201
10.5.4. Selección de la cepa adecuada	202
10.5.4.1. Conservación de cepas seleccionadas	202
10.6. Producción	203
10.6.1. Características reológicas	203
10.6.2. Mezclado	203
10.6.3. Transferencia de calor	203
10.6.4. Recuperación de polisacáridos	204
10.6.5. Tratamientos prefermentativos	204
11. ADITIVOS ALIMENTARIOS	206
11.1. Introducción	206
11.2. Conservadores	206
11.3. Edulcorantes	207
11.3.1. Aspartame	208
11.3.2. Estevióside	208
11.3.3. Taumatina	209
11.4. Reforzadores del sabor	209
11.4.1. Taumatina	209
11.4.2. Monoglutamato monosódico	209
11.4.3. Ácidos orgánicos	210
11.4.4. Glucin-delta-lactona	210
11.5. Colorantes	210
11.6. Aromatizantes	211
11.7. Gomas	212
12. RECOMBINANTES GENÉTICOS	214
12.1. Introducción	214
12.2. Definiciones	215
12.3. Código Genético	215
12.3.1. Transcripción del código genético	217
12.4. Modificaciones genéticas	218
12.4.1. Obtención del gen	218
12.4.2. Introducción del gen en el microorganismo	219
12.4.3. Obtención de la cepa con el gen	220
12.5. Formas de recombinación	221
12.5.1. Transposición	221
12.5.2. Transformación	222
12.5.3. Conjugación	222

## INDICE

---

12.5.4. Trasducción	223
12.5.5. Clonación de genes	224
12.5.6. Aplicaciones	224
12.6. Microorganismos utilizados en la modificación genética	226
12.6.1. <i>E.coli</i>	226
12.6.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	227
12.6.2.1. Cruzamiento	227
12.6.2.2. Citoducción	228
12.6.2.3. Fusión de protoplastos	229
12.6.2.4. Conservación de la cepa	230
12.6.3. Casos prácticos	232
12.6.4. Expresión de proteínas modificadas	232
13. TEJIDOS VEGETALES	236
13.1. Introducción	236
13.2. Definición	237
13.3. Cultivos vegetales	237
13.4. Transplantes	238
13.5. Selección de cepas	239
13.6. Metabolitos que se pueden obtener de plantas	240
13.7. Modificaciones genéticas	242
13.8. Producción a nivel industrial	244
14. ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES	246
14.1. Producción de pan	246
14.1.1. Introducción	246
14.1.2. Proceso general	247
14.1.3. Agentes leudantes	247
14.1.4. Producción	249
14.1.5. Procesos industriales de producción de masa	250
14.1.5.1. Cambios físico-químicos durante el horneado	253
14.2. Producción de quesos	254
14.2.1. Introducción	254
14.2.2. Definición	255
14.2.3. Principios de preservación que se usan en la producción de queso	255
14.2.4. Enzimas usadas en la producción de queso	257
14.2.5. Microorganismos usados	258
14.2.6. Clasificación de quesos	259
14.2.7. Producción de queso parmesano	262
14.3. Productos lácteos fermentados	263
14.3.1. Introducción	263
14.3.2. Tipos de productos fermentados	264
14.3.2.1. Productos muy ácidos	264
14.3.2.2. Productos ligeramente ácidos	265
14.3.2.3. Productos ácido-alcohólicos	266
14.3.3. Productos que se pueden mantener por largo tiempo	266
14.3.4. Microorganismos utilizados	267
14.3.5. Producción	268

14.3.6. Contaminación	272
14.3.7. Productos del metabolismo	273
14.3.8. Cambios bioquímicos	274
14.4. Fermentación láctica de hortalizas	274
14.4.1. Introducción	274
14.5. Col fermentada	275
14.5.1. Producción	276
14.6. Fermentación de aceitunas	277
14.6.1. Introducción	277
14.6.2. Producción	278
14.6.3. Cambios bioquímicos	279
14.7. Producción de embutidos	279
14.7.1. Introducción	279
14.7.2. Características	280
14.7.3. Métodos de producción	280
14.7.4. Efectos de la fermentación de embutidos	281
14.7.5. Microorganismos involucrados y reacciones	282
14.8. Productos tradicionales fermentados	284
14.8.1. Introducción	284
14.8.2. Productos fermentados	284
14.9. Fermentación de cocoa	296
14.9.1. Introducción	296
14.9.2. Producción	297
14.9.3. Métodos de fermentación	297
14.9.4. Enzimas usadas	298
14.9.5. Cambios durante la fermentación	299
14.10. Fermentación de té	300
14.10.1. Introducción	300
14.10.2. Manufactura del té	300
14.11. Fermentación de café	302
14.11.1. Introducción	302
14.11.2. Proceso de fermentación	303
15. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	305
15.1. Composición de los medios de cultivo	305
15.2. Formulación del medio de cultivo	306
15.2.1. Fuente de carbono	306
15.2.2. Fuente de nitrógeno	307
15.2.3. Fuente de minerales	307
16. CRECIMIENTO MICROBIANO	309
16.1. Introducción	309
16.2. Curva de crecimiento	310
16.2.1. Efectos de la temperatura	312
16.2.2. Efectos del pH	313
16.2.3. Efecto de los nutrientes	313
16.3. Clasificación	314
17. EQUIPO PARA LAS FERMENTACIONES INDUSTRIALES	316
17.1. Tanques de fermentación	316

## *INDICE*

---

17.1.1. Tamaño	316
17.1.2. Buenas practicas de diseño	316
17.1.3. Tipos de fermentadores	317
17.2. Motores	318
17.3. Agitadores.	318
17.4. Tuberías y válvulas	318
17.5. Sensores	319

**INDICE DE CUADROS Y FIGURAS****CUADROS**

Cuadro 1.1 Clasificación de sustratos empleados	7
Cuadro 5.1 Vitaminas y coenzimas	78
Cuadro 5.2 Resumen de producción de vitaminas	87
Cuadro 6.1 Condiciones de licuefacción de almidón	95
Cuadro 6.2 Propiedades de los jarabes de glucosa	112
Cuadro 7.1 Poder calorífico de diferentes combustibles	122
Cuadro 8.1 Comparación entre cultivo sumergido y sólido	146
Cuadro 8.2 Utilización de enzimas inmovilizadas	160
Cuadro 8.3 Principales usos de enzimas en la Industria alimentaria	165
Cuadro 9.1 Producción mundial de aminoácidos	175
Cuadro 9.2 Aminoácidos producidos por mutantes auxotróficos	178
Cuadro 9.3 Aminoácidos producidos por mutantes regulatorios y auxotrofos regulatorios	179
Cuadro 9.4 Aminoácidos producidos por precursores biosintéticos	181
Cuadro 10.1 Ventajas y desventajas en el uso de gomas microbianas	187
Cuadro 10.2 Aplicaciones de la goma Xantana	198
Cuadro 10.3 Biopolímeros en la industria alimentaria	199
Cuadro 10.4 Efecto del nutriente limitante	201
Cuadro 12.1 Acontecimientos importantes de la recombinación genética	214
Cuadro 13.1 Metabolitos producidos por cultivos vegetales	240
Cuadro 14.1 Cambios importantes en la producción de yogurt	270
Cuadro 14.2 Alimentos y bebidas fermentados tradicionales	284a
Cuadro 15.1 Composición de microorganismos	305
Cuadro 15.2 Concentración de elementos en microorganismos	308
Cuadro 16.1 Clasificación según Deindoerfer	314

**FIGURAS**

Figura 1.1 Proceso general de producción de proteína unicelular	12
Figura 2.1 Proceso de producción de etanol por fermentación continua	25
Figura 2.2 Proceso de producción de cerveza	36
Figura 3.1 Proceso general de producción de antibióticos	46
Figura 4.1 Proceso de producción de ácido cítrico utilizando melazas	54
Figura 6.1 Proceso general de hidrólisis de almidón	99
Figura 7.1 Proceso general de tratamiento de agua	136
Figura 8.1 Modelo de Jacob y Monod del sistema inducible	147
Figura 8.2 Equipo usado para la extracción de enzimas	150
Figura 8.3 Centrifugas más comunes	158
Figura 8.4 Métodos empleados para la inmovilización de enzimas	161
Figura 10.1 Proceso de producción de gomas	204
Figura 12.1 Proceso de clonación	251
Figura 14.1 Proceso de masa esponjosa	310
Figura 16.1 Fases de crecimiento microbiano	311
Figura 17.1 Diferentes tipos de tanques de fermentación	317
Figura 17.2 Representación de una típica planta de fermentaciones	321

## OBJETIVOS

Objetivo General: Hacer una recopilación de la información básica sobre fermentaciones industriales

Objetivo Particular 1: Conocer los diversos campos de aplicación de las fermentaciones industriales

Objetivo Particular 2: Describir los procesos básicos en las diversas áreas de las fermentaciones industriales.

Objetivo Particular 3: Presentar las aplicaciones de los productos obtenidos por fermentaciones industriales en el área de los alimentos.



## INTRODUCCIÓN

Las fermentaciones industriales tienen un desarrollo reciente a pesar de sus comienzos tan remotos en los alimentos tradicionales fermentados, al que cada vez se suman más áreas de investigación con un gran potencial.

Los microorganismos son capaces de desarrollarse en una gran cantidad de medios y de producir una multitud de sustancias útiles, es esta la capacidad que se aprovecha para el beneficio del hombre.

Entre los procesos que en la actualidad se han desarrollado se encuentran la utilización de desechos agroindustriales, el desarrollo de sustancias útiles al ser humano, como biomasa, alcohol, antibióticos, gomas, aminoácidos, enzimas, aditivos, jarabes, tejidos vegetales, etc. de una manera más segura y económica.

Las técnicas actuales permiten manejar a las células para obtener de los microorganismos una mayor capacidad de producción, por medio de la recombinación genética se puede mejorar la producción o bien el desarrollo de microorganismos que puedan producir lo que deseamos en cantidades por encima de lo normal.

Las fermentaciones industriales se pueden contar como recurso tanto para la sustitución de productos como los que actualmente se cuenta y que provienen de una fuente no renovable, como para el desarrollo de nuevos productos que en el futuro podrían representar una fuente de soluciones a los problemas que en la actualidad tenemos, como el daño al ecosistema, la producción de alimento y otras sustancias deseables.

Además de que las fermentaciones industriales son una parte importante de la industria alimentaria debido al gran uso de productos que pueden ser clasificados como "naturales" o sin toxicidad, debido a su fuente y también al uso de las enzimas para obtenerlos.

Siendo tan extensa la aplicación de las fermentaciones industriales en la actualidad, se divide este trabajo en capítulos donde se presentan algunas de las ramas de las fermentaciones industriales, en cada capítulo se dan datos generales de los productos y de los procesos para obtener una idea general de la aplicación en cuestión.

---

# 1 PROTEÍNA UNICELULAR

## 1.1 INTRODUCCIÓN

La relación que presentan los alimentos y microorganismos se da en dos sentidos. Por un lado, en gran medida, el trabajo científico y tecnológico en el área de alimentos, está dirigido a impedir la descomposición microbiológica de los productos, aumentando así su conservación y durabilidad. Aún en nuestros días para mucha gente, los hongos implican únicamente descomposición, las bacterias son sinónimo de enfermedad y las algas verdes implican la contaminación de aguas estancadas. Por otro lado, muchos alimentos tradicionales consumidos por el hombre durante milenios, dependen de la intervención de poblaciones microbianas selectas que les imparten textura, sabor y estabilidad.

Estos conceptos se ven ahora modificados por la gran diversidad y uso que se les puede dar y ser fuente de soluciones a la creciente demanda de alimentos mediante el estudio de las contribuciones que el cultivo de microorganismos ofrece en este sentido. Si bien la modificación microbiológica de muchos alimentos aumenta su aceptación por el consumidor y su resistencia a la descomposición, quizá la mejora nutricional representa la característica más importante. Parte de este cambio es debido a la contribución proteica que los microorganismos presentan en términos de calidad y cantidad. Cuando se descubrió que el material celular de los microorganismos contiene de un 45-65% de proteína en base seca y estos duplican su masa en un intervalo promedio de 2 a 6 horas, se abrió un nuevo horizonte en la producción de alimentos: la conversión a escala industrial de fuentes baratas de carbono y nitrógeno en materia celular microbiana, o biomasa, con un alto contenido proteico.

En 1967 se acuñó el nombre de Proteína Unicelular (PUC) como expresión genérica para designar fuentes proteicas crudas o refinadas, que tienen su origen en organismos celulares o multicelulares sencillos, tales como bacterias, hongos, y algas. Esta propuesta encontraba su mayor aplicación en regiones con dificultades para producir proteínas

---

## 1. BIOMASA

tradicionales de origen agrícola o animal. Dos líneas pueden señalarse para estos procesos. Una tendencia a la producción de alimentos para animales, mientras que la otra apunta al consumo humano.

### 1.1.1 Definición de biomasa o "proteína unicelular"

Se define como biomasa o "proteína unicelular" (PUC), al material celular obtenido de una fermentación aeróbica, siempre sometido a operaciones de separación mecánica, lavado homogeneización y secado. El término proteína unicelular significa o identifica a alimentos proteicos derivados de microorganismos unicelulares crecidos en cultivos sumergidos de diversas fuentes, también se le conoce como proteína microbiana, biomasa o PUC.

### 1.1.2 Ventajas y desventajas

Algunas de las ventajas y desventajas que presenta la producción de proteína unicelular son:

La ventaja de la producción de microorganismos sobre la producción de plantas y animales se debe a que:

- ❖ La tasa de crecimiento de la proteína unicelular es a menudo quinientas veces más rápida que las fuentes de proteína vegetal y mil veces mayor que las fuentes de proteína animal.
- ❖ Los microorganismos tienen un tiempo de generación corto y un incremento de masa rápida. Bajo las mejores condiciones, las bacterias y las levaduras tienen un tiempo de generación entre 2-6 horas y 4- 12 horas respectivamente.
- ❖ Los microorganismos pueden ser modificados genéticamente induciendo la mutación por medios químicos, físicos o enzimáticos, pudiendo así cambiar la temperatura de crecimiento o la composición de sus aminoácidos.
- ❖ El contenido de proteína es alto.
- ❖ La producción de proteína microbiana es independiente de los cambios climatológicos,

ocupa una área relativamente pequeña y los requerimientos de agua son bajos.

- ❖ Los problemas son pequeños comparados con los que se deben enfrentar en otros procesos para la producción de alimentos.

Los mayores problemas que se presentan con el uso de proteína unicelular son:

- a) Los procesos para la obtención de proteína unicelular son nuevos y se requiere un periodo de 3 a 5 años para la construcción de plantas a escala industrial. Un periodo mayor (10 a 20 años) se requerirá antes de que una porción significativa de la proteína sea cubierta por la proteína unicelular.
- b) La composición del producto, proteína unicelular, debe ser analizada cuidadosamente para asegurar la ausencia de impurezas que podrían causar daños a la salud.
- c) La necesidad de desarrollar diferentes medios para introducir la proteína unicelular dentro de la dieta convencional.

## 1.2 CARACTERISTICAS DE LA PROTEINA UNICELULAR

### 1.2.1 Composición química.

La composición química de las células microbianas es generalmente afectada por cambios en el medio (concentración de sustrato y condiciones de cultivo), la principal aportación es el de la proteína que llega hasta 45-50% en base seca, además de que su contenido de aminoácidos es diferente para cada microorganismo, en general la tiene una deficiencia en metionina. Otro factor que afecta la síntesis de proteína es la velocidad de crecimiento, ya que cuando ésta se incrementa ocurre una mayor producción de ácidos nucleicos lo cual no es conveniente pues puede producir problemas de toxicidad.

Este factor muy importante, pues por el momento actual la producción de proteína unicelular está orientada a la sustitución de fuentes de proteína para animales monogástricos en el futuro también deberá producirse para consumo del hombre.

## 1. BIOMASA

---

### 1.2.2 Microorganismos Utilizados.

Las bacterias de los géneros *Methylomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Aerobacter* son las mejores fuentes, debido a su alto contenido de proteínas y a su periodo de duplicación que es de 20 a 30 minutos. El número de microorganismos que se utilizan para la producción de proteína unicelular aumentan día con día. Los criterios para la selección de un microorganismo destinado a la producción de PUC son variados entre ellos:

- a) Contenido proteico de células.
- b) Perfil de aminoácidos.
- c) Velocidad de crecimiento para un sustrato determinado.
- d) Toxicidad.
- e) Valor calórico.
- f) Eficiencia de conversión del sustrato.
- g) Digestibilidad.
- h) Seguridad del producto.

### 1.2.3 Velocidad de crecimiento para un sustrato determinado.

Es uno de los factores que determina la productividad del sistema. La velocidad de crecimiento es de 1 a 0.5 horas, las bacterias estarán en el límite superior y los hongos en el límite inferior.

### 1.2.4 Toxicidad.

Las pruebas para determinar la toxicidad deben ser llevadas a cabo en forma exhaustiva y aplicadas a diferentes especies durante periodos largos. Las pruebas de toxicidad en animales deben incluir una evaluación de la toxicidad aguda (alimentación de ratas con un 40% de PUC en la dieta por 6 semanas), toxicidad subcrónica (3 meses), toxicidad crónica (2 años) y pruebas multigeneracionales (15 generaciones de ratas). Los alimentos tradicionalmente ricos en proteínas deben pasar por pruebas de inocuidad realizados en animales de laboratorio y, si

es posible de granja. Esto se debe que en la materia prima o en algún paso del proceso de elaboración hasta la obtención del producto final, es posible la presencia de alguna sustancia tóxica.

La toxicidad de los diferentes tipos de biomasa microbiana depende de su origen. Así se tiene que para la biomasa obtenida del crecimiento en petróleo y derivados es común encontrar compuestos aromáticos policíclicos, que son conocidos como agentes carcinogénicos. Por otra parte la presencia de pequeñas cantidades de D- aminoácidos pueden tener implicaciones negativas, debido a la posibilidad de estar incluidos en antibióticos polipeptídicos, causando problemas sobre el animal que ingiere esta biomasa, por la eliminación de la flora bacteriana intestinal con la consecuente improductividad de algunas vitaminas.

Tal vez el mayor riesgo de toxicidad en la biomasa se debe a la presencia de altas concentraciones de ácidos nucleicos. El problema se presenta por que los ácidos nucleicos son despolimerizados por el jugo pancreático y convertido a nucleósidos por las enzimas intestinales durante la absorción, las bases púricas guanina y adenina son metabolizadas a ácido úrico con lo que se incrementa el contenido en el plasma y orina. La alta concentración de plasma (dada a su baja solubilidad) hace que se precipite ureato predisponiendo al animal a la enfermedad llamada "gota".

### 1.2.5 Digestibilidad

Es necesario evaluar el porcentaje de utilización de la proteína. Los valores característicos son:

$$\text{Digestibilidad (D)} \quad D = 100 * ((Y / F) Y)$$

$$\text{Valor Biológico ( VB )} \quad VB = 100 * ((Y - ( F \text{ Ó } U )) / Y * F)$$

Donde:

Y es la cantidad de nitrógeno ingerida en forma de biomasa

F es el nitrógeno en el excremento

## 1. BIOMASA

U es el nitrógeno en la orina

Para las levaduras la Digestibilidad varia entre 80 y 90 %, y el valor biológico entre 30 y 90 %. El valor biológico puede estimarse en el aminograma, sin embargo, la relación cuantitativa de los aminoácidos no refleja con precisión su disponibilidad fisiológica. La Digestibilidad del producto final puede mejorarse notablemente al extraer los constituyentes, intracelulares, incluida la proteína y separar los residuos de la pared celular producida. Esto se conoce como degradación celular y los métodos utilizados se pueden clasificar de la siguiente forma:

- A. Métodos Físicos Molino húmedo, Cambios de presión, Termólisis, Congelamiento, Choque osmótico, Ultrasonido, Extracción de solventes, Secado.
- B. Métodos Químicos ácidos o bases
- C. Métodos Biológicos Degradación enzimática (lisozima)

Al aplicar cualquiera de éstos métodos es necesario centrifugar el producto, para separar los constituyentes celulares una vez que ésta ha sido degradada. Otro parámetro de evaluación nutricional de la proteína son el coeficiente de Digestibilidad y la utilización neta de la proteína o la relación de eficiencia proteica ( PER ) indistintamente en los animales.

### 1.2.6 Seguridad del producto

Su estimación no es sencilla, pues no se tiene experiencia en el campo y en la mayoría de los casos es necesario hacer pruebas con ratas y pollos para determinar la toxicidad, el efecto en la reproducción, en los tejidos y en lo posible asociación del producto con el cáncer.

## *1.3 FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS*

Para que se lleve a cabo un crecimiento satisfactorio, es necesario cumplir con dos factores determinantes: respiración y asimilación de nitrógeno; el primero se satisface mediante la aireación del cultivo y el segundo adicionando nitrógeno, que se va transformado en sustancias que lo contienen: proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, purinas y vitaminas, etc.

El papel que desempeña el agua es fundamental para éste proceso bioquímico: como agente disociador en la función enzimática celular, como fluido de suspensión para las células del microorganismo, como matriz para la distribución uniforme de los nutrientes y el oxígeno, además de que es un medio conveniente para la regulación de la temperatura.

También se requiere de otros elementos como sales minerales, fósforo, azufre, calcio, potasio, magnesio, sodio y cloro. Algunos, que aunque minoritarios, no menos importantes, son: magnesio, zinc, cobalto, etc. Los nutrientes son sustancias químicas que deben obtenerse del medio ambiente para provocar el crecimiento de las células.

En general deben proporcionarse las siguientes sustancias: Aceptores y donadores de hidrógeno, Fuente de carbono, Fuente de nitrógeno, Minerales, Factores de crecimiento. Los demás constituyentes básicos los proporcionan los carbohidratos, utilizados como fuente de energía: carbono, hidrógeno y oxígeno. Para que éstos puedan asimilarse es necesario que se encuentren en forma de azúcares sencillos. A la mezcla de todos estos componentes se le denomina sustrato.

El medio debe contener los medios necesarios y deben controlarse cuidadosamente factores tales como el pH, temperatura, aireación y agitación.

### 1.3.1 Tiempo-substratos empleados

Se puede establecer una clasificación de los substratos, de naturaleza renovable y no renovable. La producción de proteína unicelular, obtenida a partir de diferentes substratos.

Cuadro 1.1 Tipos de sustratos

RECURSOS NO RENOVABLES	RECURSOS RENOVABLES
METANO	MELAZAS
SUERO DE LECHE	ETANOL
METANOL	ALMIDON
LICOR DE SULFITO	CELULOSA
N-PARAFINAS	MADERA, PAPEL
AZÚCAR	



### 1.3.2 Clasificación de los sustratos

Los parámetros de selección para un sustrato son:

Precio

Disponibilidad y abundancia

Toxicidad

Eficiencia de conversión

Pretratamiento del sustrato

#### 1.3.2.1 PRECIO

Es un factor importante pues de él depende el costo de la proteína. Cuando se considera el precio es necesario tener en perspectiva los otros usos que tiene el sustrato. La materia prima o sustrato representa de 30 a 50 % del costo total de la producción en casos industriales reportados.

#### 1.3.2.2 DISPONIBILIDAD Y ABUNDANCIA

La cantidad y localización del sustrato es de importancia primordial, pues afecta al precio de la materia prima (transportación, almacenamiento), también se debe tomar en cuenta la frecuencia con la que se dispone del sustrato y si esta se puede o no disponer por temporadas, y a la vez puede determinar el tamaño máximo de la planta.

#### 1.3.2.3 PRETRATAMIENTO DEL SUSTRATO

El pretratamiento determina parte del costo del sustrato, pero además pueden requerirse soluciones tecnológicas difíciles de aplicar. Se puede decir que el uso de los sustratos a partir de los recursos renovables depende de:

- Naturaleza

- Disponibilidad

-Otros requerimientos para el proceso

Dentro de los más importantes se encuentran:

- ✓ Celulosa - Es el material más abundante, disponible a partir de desechos de papel, bagazo, pulpa de madera, etc. Desde el punto de vista económico, el paso crucial, es la conversión a azúcares metabolizables.
- ✓ Almidón.- Se hidroliza más rápidamente que la celulosa y puede ser usado directamente por un hongo aminolítico en un proceso continuo. También pueden emplearse en cultivos mixtos.
- ✓ Azúcares.- Tales como las melazas son sustratos similares a los ya mencionados, sólo que se ven limitados a las zonas tropicales o semitropicales. Esto sugiere la necesidad de plantas pequeñas.
- ✓ Suero de queso - Ha sido usado exitosamente como sustrato combinado con la levadura *fragilis* y producción de etanol por *Kluyveromices fragilis*. Suficientes cantidades de suero de queso son disponibles, lo que lo hacen que sea un proceso económicamente muy atractivo. Los demás procesos se encuentran en las etapas de laboratorio o de planta piloto. Entre las alternativas tecnológicas de pretratamiento para acondicionar un sustrato se encuentran:

1.3.2.3.1 *Hidrólisis ácida*

Se somete el desperdicio a altas presiones y temperaturas, en un medio acuoso a baja concentración de ácido. Las condiciones en que se producen estos azúcares también favorecen su descomposición, lo cual puede inhibir el crecimiento de los microorganismos.

1.3.2.3.2 *Hidrólisis enzimática*

Se basa en la utilización de enzima para efectúan la hidrólisis de la celulosa. El proceso consiste en la producción de la celulosa, su purificación al desperdicio celulósico. El estudio de este sistema requiere separar en dos fases la hidrólisis, primero la producción de la

## 1. BIOMASA

celulosa y sus purificación y, después, su utilización como agente sacarificador. Además de los problemas asociados a la inhibición por los productos, este procedimiento presenta la necesidad de un pretratamiento para la mejor utilización del desperdicio celulósico. Los métodos de pretratamiento incluyen:

- a) Reducción de tamaño por diferentes procesos.
- b) Pretratamiento químico (álcali para eliminar lignina y abrir la estructura, o ácido para producir azúcares.
- c) Oxidación por diferentes métodos
- d) Combinaciones de los métodos anteriores

### *1.4 CONDICIONES DE FERMENTACIÓN*

Una vez que un microorganismo y un sustrato han sido seleccionados es necesario encontrar las condiciones de operación que hagan óptimo el sistema, estas variables deberán asociarse con los costos del producto, equipo, y control del proceso. Las siguientes variables son las más importantes para el control de la fermentación:

- a) Temperatura
- b) pH
- c) Productividad

#### *1.4.1 Temperatura*

La mayoría de los procesos operan a 30°C y solo unos a 40°C. Los microorganismos termófilos parecen constituir la respuesta al problema de la temperatura a la vez que hacen la más difícil la contaminación con otros microorganismos, sin embargo cuando se utiliza un microorganismo especial la temperatura debe ser la mejor para su desarrollo.

#### *1.4.2 pH*

El tener una cepa que se desarrolle a un pH bajo puede hacer innecesario que las condiciones de operación sean estériles el pH afecta la velocidad de producción por que cada

---

microorganismo tiene un valor de pH óptimo.

#### 1.4.3 Productividad

La productividad fluctúa entre 10 y 3 g de células / L, ésta amplia fluctuación se debe a los rendimientos de oxígeno que dependen del sustrato y a que, además, el diseño del fermentador afecta a la transferencia de oxígeno.

#### 1.5 PROCESO DE PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR

Además de considerar los factores ya mencionados el diseño de reactores es uno de los factores más importantes en el desarrollo del proceso. Dentro de las áreas importantes para la investigación se encuentran la estequiometría de la reacción, búsqueda de microorganismos que proveen altos valores de proteína, cinética de la fermentación, entendimiento y control de las velocidades de las reacciones biológicas, transferencia de calor, correlaciones significativas para el escalamiento y optimización, transferencia de masa (de nutrientes gaseosos y productos), correlaciones significativas para los sistemas reales. Todos estos factores se deben considerar dentro del diseño o construcción de un reactor óptimo para la producción de proteína unicelular.

#### 1.5.1 Fermentación aeróbica típica

El cultivo continuo de microorganismos se puede ver en la figura 1.1 e incluye el crecimiento del cultivo seleccionado en un tanque o recipiente bien agitado de volumen constante, la solución nutriente se alimenta al reactor a flujo constante y la suspensión de microorganismos es removida del reactor a un flujo igualmente constante, bajo velocidades de flujo apropiadamente escogidas, los microorganismos en el cultivo se producen a la misma velocidad que son retiradas de la dilución continua. La densidad de los microorganismos en el reactor alcanza un valor constante característico a la velocidad de dilución; lo que produce una velocidad estacionaria. Debido a que existen diferentes concentraciones de sustrato que corresponden a una velocidad de crecimiento específica dada, existen también dos estados

## 1. BIOMASA

estacionarios para una velocidad de flujo dada, el estado estacionario correspondiente a la concentración más alta del sustrato es inestable en el reactor, por lo que se usa la más baja. Durante la experimentación en un cultivo batch, la concentración del sustrato no cambia significativamente de la fase inicial de crecimiento, mientras se supone que se encuentran las concentraciones lo suficientemente altas para que no sean limitantes durante el curso del crecimiento.

### 1.6 OBTENCIÓN DE BIOMASA MICROBIANA

#### 1.6.1 Obtención a partir de petróleo y sus derivados

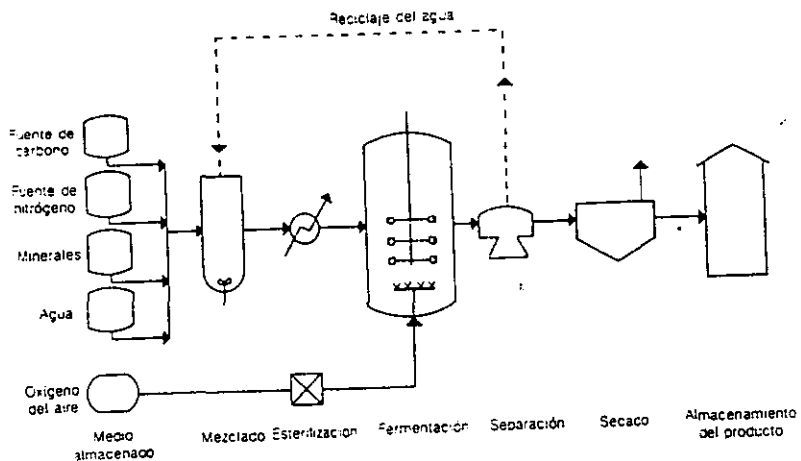


Figura 1.1 Proceso general de producción de proteína unicelular fuente

El cultivo de *Micrococcus cerificans* en un medio con N-Hexadecano ha presentado buen crecimiento, encontrándose un contenido de proteína entre 65 - 75 %, su contenido de aminoácidos es bueno comparado con el estándar de la FAO. El metano, es usado por bacterias y también con hongos por cultivos mixtos de los géneros (*Graphium Trichoderma*) para la producción de biomasa gracias a la oxidación de gas. Bacterias como la *Pseudomona*

---

*methanica* producen alrededor del 71 % de proteína

Figura 1.1 Proceso general de producción de proteína unicelular fuente

#### 1.6.2 Obtención de proteína unicelular a partir de recursos renovables

El factor de mayor importancia en los costos de producción de Proteína Unicelular es el carbono como fuente de energía, es la cantidad de masa celular. Las bacterias comparadas con las levaduras, tienen una ventaja inherente ya que contienen de 60 a 70 % de proteína contra 45 a 55 % de las segundas. Generalmente las bacterias tienen un contenido alto y mejor balance de aminoácidos esenciales (lisina, metionina y treonina).

#### 1.6.3 Obtención de proteína a partir de carbohidratos

Almidones de tapioca, desechos de papas, desechos de la industria azucarera, etc. pueden ser fermentados por *Candida utilis*, después de ser hidrolizados. El almidón puede ser fermentado directamente por los hongos aminolíticos. Para utilizar los recursos celulíticos se pueden seguir dos caminos:

- 1.- Mediante hidrólisis de la celulosa ( proceso ácido o enzimático ) para producir azúcar y su posterior fermentación.

- 2.- Por fermentación directa. Se emplea un cultivo de bacterias (*Celullomonas* spp) y levaduras, obteniéndose una biomasa de alta calidad y no tóxica. La producción de biomasa con melazas se efectúa con *Candida utilis*. Esta proteína se utiliza como complemento alimenticio para animales.

#### 1.6.4 Obtención de proteína a partir del tratamiento biológico de aguas residuales industriales

En el tratamiento de aguas residuales de la industria del papel se usa *Termonospora fusca* (actinomiceto termófilo celulolítico). La fermentación desarrollada degrada la celulosa y además se obtiene un 30 % de proteína microbiana, la cual presenta una buena calidad nutritiva y además no presenta sustancias tóxicas

## 1. BIOMASA

### 1.6.5 Obtención de proteína a partir de levaduras

El alto contenido de ácidos nucleicos en levaduras ( 6 - 12 % ) limita mucho la ingesta diaria a menos de 20 – 30g. A ingestas más elevadas, el nivel de ácido úrico en la sangre se incrementa a valores anormales. Si se va a utilizar proteína unicelular para consumo humano esta debe tener bajo contenido de ácidos nucleicos. Se ha reportado un método par la producción de proteína microbiana con un bajo contenido de ácidos nucleicos, en este método primeramente se desintegra la célula y después de la extracción de los ácidos nucleicos y proteína, la proteína es precipitada selectivamente a un pH alcalino.

### 1.6.6 Obtención de proteína a partir de algas

Las microalgas, están comprendidas por proteínas, carbohidratos, lípidos, fibra y minerales, pero son especialmente ricas en proteínas. Un contenido de proteína cruda comúnmente excede el 50%. Las microalgas pueden transformar el amonio y los nitratos a aminoácidos a velocidades substancialmente grandes comparadas con plantas autrópicas, pueden fijar el nitrógeno a velocidades diez veces mayor que las legumbres.

Los requerimientos básicos para la producción de algas son agua, luz solar y nutrientes esenciales, la productividad de las algas es primeramente una función de la energía solar y eficiencia fotosintética, esta última es dependiente de la temperatura, balance de nutrientes y optimización de la iluminación.

La cosecha, concentración y secado son el problema en cuanto a costo de producción. La espirulina en nuestro país llamada "Tlacuitlatl" es una alga verde-azul de la clase de las cianofíceas que se presenta en forma de filamento helicoidal de 200 micras de longitud, en aguas fuertemente alcalinas. Es un organismo multicelular, que vive en cultivos acuáticos de elevada concentración de sales inorgánicas y con el efecto de los rayos solares, desarrolla su protoplasma con un alto contenido de proteínas de excelente calidad, con un aminograma muy similar al del huevo y a la leche; también produce una cantidad importante de vitaminas

como el complejo B, la vitamina A y la vitamina E. Además su protoplasma contiene una cantidad moderada de lípidos, predominando los ácidos grasos esenciales para la dieta humana. Por cultivarse en soluciones fuertemente alcalinas, se reduce el riesgo de contaminación con organismos patógenos o productos de desecho de otros organismos vivos. Crece en ausencia de productos químicos tóxicos, obteniéndose así un alimento natural y muy puro.

### 1.7 PRINCIPALES MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR

*Candida utilis*

*Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces carlsbergensis*

*Spirulina máxima*

*Chlorella pyreïnoidosa*

*Methylophilus methylotropus*

*Bacillus sereus*

### 1.8 CONSIDERACIONES FINALES

Se supone que el problema de la deficiencia nacional y mundial de proteína se está tratando de resolver para lo cual se sugieren las siguientes opciones:

- a) Ampliar la capacidad agrícola.
- b) Aprovechar eficientemente todas las proteínas existentes
- c) Intensificar la pesca
- d) Explorar las fuentes de proteína no convencionales
- e) Regenerar y utilizar los materiales de desecho
- f) Incrementar la recirculación de nitrógeno ecológico
- g) Desarrollar la producción de Proteína unicelular

La expresión proteína unicelular ha sido aceptada de forma general como el producto final del crecimiento primario y posterior recogida de células microbianas para la utilización en



## 1. BIOMASA

la alimentación humana y animal de valor por disponer de altos valores nutritivos y disponibilidad en cualquier época. Las propiedades funcionales de la Proteína Unicelular tendrán que competir en valor funcional con los ingredientes funcionales ya existentes tales como aislados y concentrados de proteína de soya, albumen de huevo y caseína.

---

## 2 PRODUCCION DE ALCOHOL

### 2.1 INTRODUCCIÓN

Las fermentaciones alcohólicas desde la antigüedad han sido motivo de interés para muchas poblaciones. Las bebidas fermentadas que desde hace cientos de años se elaboraban de manera artesanal por muchas culturas antiguas son una prueba de ello.

En la antigüedad las fermentaciones ocurrían por casualidad y se debían a la presencia de la microflora nativa de los substratos fermentables. Entre los múltiples microorganismos que se encontraban presentes en los substratos utilizados para la fermentación, se contaban las levaduras responsables de la primera etapa fermentativa que se presenta en la producción de alcohol, así como también las bacterias que realizan una segunda fermentación.

Durante todos estos años en que la humanidad ha acumulado las experiencias valiosas que han permitido industrializar los procesos fermentativos, se han visto avances gigantescos, tal es la aplicación de diversas ciencias en este objetivo que han surgido disciplinas específicas para estos estudios. Las fermentaciones alcohólicas y la producción de vinos y licores son tan sólo una muestra de la gran aplicabilidad tecnológica que pueden tener los materiales biotransformadores, tal como es el caso de los fermentadores alcohólicos.

En Brasil se ha utilizado el etanol como combustible desde 1920, se han hecho mezclas de gasolina y etanol llamado Gasol.

El etanol es un producto bastante común y sus efectos sobre el hombre son bien conocidos. A altas concentraciones en la atmósfera, 1000 ppm, el organismo humano lo llega a tolerar dos veces más que si fuera gasolina, es decir la posibilidad de que cause problemas a la salud humana es pequeña.

En Brasil la forma clásica de preparar el etanol es a partir de caña de azúcar aún cuando existen otras materias primas como el sorgo, la papa dulce y las oleaginosas, y debido a que los

---

## 2. PRODUCCIÓN DE ALCOHOL

---

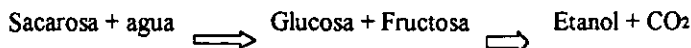
brasileños tiene muy desarrollada la industria azucarera se escogió la caña de azúcar.

### 2.2 MATERIAS PRIMAS

Potencialmente toda la materia que encierra en su composición el elemento carbono es apta para ser convertida en alcohol, existen materias primas directamente fermentables (con monosacáridos) y las indirectamente fermentables (con disacáridos y polisacáridos).

Las materias primas directamente fermentables tiene en su composición azúcares del tipo de monosacáridos como la glucosa y la fructosa, las cuales, al entrar en contacto directo con las levaduras, se desdoblán en alcohol y gas carbónico. De las materias primas indirectamente fermentables, existen dos subgrupos: disacáridos (sacarosa) y polisacáridos (celulosa y almidón).

La caña de azúcar se destaca por ser una materia prima de fácil transformación y cuyos aspectos agroeconómicos no presentan limitaciones, además de ser económicamente más representativa. El azúcar más importante para la producción de alcohol a partir de la caña de azúcar es la sacarosa que representa el 16% de la caña de azúcar. Esta se descompone en dos moléculas de azúcar reductor o monosacáridos (glucosa y fructosa). A través de la acción biológica los monosacáridos se transforman en etanol y dióxido de carbono cuya reacción es:



Además de la sacarosa, la caña de azúcar tiene pequeñas cantidades de glucosa libre la que se transformará en etanol de acuerdo a la siguiente proporción:

92g Etanol por 180 g de glucosa

Gay-Lussac propuso una reacción estequiométrica para describir la fermentación.



Una vez que la caña de azúcar se recoge del campo y se transporta a las destilerías se lava para remover el barro y las piedras, se corta y se tritura para pasar a la unidad de

molienda durante la molienda se va agregando agua hasta que el caldo obtenido posea un 10% del jugo de caña y 90% de agua, este caldo se almacena en tanques donde se agregan las bacterias para iniciar la fermentación, los tanques se mantienen a una temperatura aproximada de 30 a 35°C. La reacción que ocurre dentro de ellos es exotérmica es decir se genera calor por lo cual existe la necesidad de refrigerarlos ya que a medida que la temperatura rebasa los 40°C. el microorganismo deja de transformar eficientemente la sacarosa bajando así su rendimiento. El alcohol que se obtiene de la fermentación es sometido a una centrifugación para recuperar las bacterias agregadas, una vez separadas, la mezcla de alcohol fuertemente hidratada se somete a una destilación para separar el alcohol del resto del líquido. Para ello se aplica una corriente de vapor al recipiente que lo contiene de tal manera que se concentra una cantidad de alcohol casi puro, el resto de líquido llamado vinasas junto con microorganismos y algunas otras partículas se desecha.

El alcohol separado se puede someter nuevamente a una corriente de vapor que se ha denominado rectificación. En este se agrega cal viva que al separar el agua del alcohol ayuda a obtener un alcohol 100% puro y es precisamente el que se almacena.

En la producción de alcohol industrial se presenta otra ventaja después de la molienda se obtiene el bagazo de la caña de azúcar que se utiliza para abastecer de energía al proceso como combustible para la producción de calor dentro de una caldera. De la caldera pasa a un generador eléctrico que da energía a toda la fermentación.

### *2.3 CARACTERISITICAS DE LAS LEVADRAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL*

Las levaduras empleadas en la producción de alcohol deben presentar algunas características entre las que figuran:

\* Buena Productividad.- Es la formación de alcohol en unidad de tiempo, que además de propiciar una fermentación rápida, reduce el riesgo de contaminaciones.

\* Tolerancia al alcohol.- La tolerancia a los contenidos más elevados, y consecuentemente la actividad en mostos de más azúcar, permite la obtención de mayor

## 2. PRODUCCIÓN DE ALCOHOL

---

alcohol.

\* Resistencia a la Inestabilidad.- La resistencia a la acidez más elevada es importante en la prevención y combate de las infecciones.

Las levaduras que se emplean en la Industria son Microorganismos Mésofilos, siendo la temperatura ideal de desarrollo, dependiendo de la especie entre 28-35°C.

### 2.4 SUSTRATOS

El mosto del jugo de caña, es la primera fuente de materia prima utilizable para la producción de alcohol.

Primero se debe obtener jarabe de caña, ya que el jugo de caña produce un producto alcohólico de baja concentración, este se pasa por tamices y luego es enviado a evaporación hasta llegar a aproximadamente 60° Brix, el almacenamiento de este tipo de jarabes no puede ser prolongado ya que se produce cristalización dificultando su manejo. Una alternativa a este problema es la utilización de jarabes invertidos, en este caso el contenido de azúcar reductores es mayor, el proceso de inversión puede realizarse por vía ácida o enzimática siendo la enzimática la que se emplea con mayor frecuencia, esto se realiza agregado crema de levadura al jarabe, todavía caliente, en la proporción de 5 partes por 100 partes de jarabe a 55° Brix para obtener aproximadamente el 70% de inversión en 10 horas, de esta forma, las levaduras se mueren y liberan en el medio diastasas que provocarán la inversión biológica de la sacarosa. Después de la inversión del jarabe, se vuelve a concentrar hasta los 85 °Brix, el cual posteriormente se enfria hasta 40-45 °C para su almacenamiento.

Otra alternativa de uso son las melazas, tienen una composición variable, alta viscosidad, denso, rico en azúcares reductores y con un pequeño contenido de agua. Por tratarse de un líquido altamente concentrado, presenta elevado poder osmótico necesitando adecuar su concentración, a través de diluciones, al agente fermentativo para que el proceso se desarrolle.

## 2.5 CONDICIONES DE LA FERMENTACIÓN

- ✓ °Brix y azúcares reductores totales La utilización de mosto de baja concentración de azúcar favorece el crecimiento celular, debido a la mayor transferencia de oxígeno en el medio, disminuye el tiempo de fermentación, pero exige un mayor volumen, aumenta el consumo de agua y vapor, disminuye el rendimiento del aparato de destilación debido al menor grado alcohólico alcanzado en el producto, sin embargo el uso de altas concentraciones puede provocar la inhibición de la fermentación debido a que sobrepasa los límites de tolerancia para la levadura.
- ✓ Acidez y pH: Las levaduras son microorganismos acidófilos, se necesitan entre 2.0 a 2.5 g. de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por litro de mosto para lograr un pH de 4.5
- ✓ En algunas ocasiones habrá necesidad de complementar el medio con vitamina y minerales para que las levaduras se puedan desarrollar.

## 2.6 POSIBLES CONTAMINACIONES

A lo largo del proceso fermentativo se pueden presentar diversas fermentaciones entre las que se pueden destacar las siguientes:

\*FERMENTACION ACETICA: Por bacterias del género *Acetobacter*, presentan un fuerte olor a vinagre.

\*FERMENTACION LACTICA: *Lactobacillus* y *Streptococcus*, y disminuyen la espuma y acidez del mosto.

\*FERMENTACION BUTIRICA: Por *Clostridium*, aumenta la acidez y genera un fuerte olor a rancio.

\*FERMENTACION DEXTRANICA: Por bacterias o *Leuconostoc mesenteroides* y aumentan la viscosidad del medio.

\* FERMENTACION LEVANICA: Por *Bacillus*, *Aerobacter* y *Streptococcus*, y aumenta la viscosidad del medio y generan grandes burbujas en la espuma.

### 2.7 DIVERSOS TIPOS DE FERMENTACIÓN

#### 2.7.1 Por cortes:

Es un proceso discontinuo simple, presenta un rendimiento bajo en comparación con otros métodos, el mosto es inoculado con una carga inicial de levaduras, a la cual se le añaden poco a poco nuevas cargas de mosto al fermentador, hasta completar el volumen del mismo, cuando se llega a este punto el volumen fermentado es repartido con otro y ambos son alimentados con nuevas porciones de mosto hasta completar su volumen, la realización de este corte se lleva a cabo cuando los grados Brix del mosto en la cuba es igual a la mitad de los grados Brix iniciales. Al completarse el volumen de los dos fermentadores se deja que el primero termine de fermentar y se reparte el volumen del segundo fermentador todavía en plena actividad, con un tercero y así sucesivamente, esta manera de fermentar se denomina por cortes y se ejecuta cuando la actividad microbiana es elevada y el grado de contaminación es bajo. Cuando decae la actividad del medio se debe dejar de realizar los cortes, terminando con la fermentación e inoculando una nueva carga de levaduras sanas y corre el riesgo de una fácil contaminación.

#### 2.7.2 Por decantación

Es un proceso de fermentación intermitente en el que la recuperación del agente fermentador se realiza por gravedad, es un proceso simple que presenta buenos rendimientos.

La cuba de fermentación recibe la inoculación de la levadura y el mosto y se deja fermentar, al llegar hasta este punto se aumenta el enfriamiento para detener la fermentación y la producción de CO<sub>2</sub> facilitando de este modo la decantación.

El periodo para la recuperación de las células de levaduras a través del proceso es de aproximadamente 8 horas para que la eficiencia sea económicamente aceptable, pasado el

periodo de decantación el alcohol sobrenadante, que representa aproximadamente el 70% del volumen útil de la cuba se envía a destilación y el material decantado entonces, se trata para su empleo en un nuevo ciclo de fermento.

La levadura recuperada se trata diluyendo con agua de buena calidad y sin agitación se agrega una solución de ácido sulfúrico a un pH de 2.8 por dos horas, después de lo cual se alimenta la cuba nuevamente para iniciar un nuevo ciclo de fermentación.

### 2.7.3 Por cultivo puro

Se utiliza principalmente cuando la materia prima presenta características que dificultan el empleo de un medio de recuperación de los agentes de la fermentación.

En este proceso de fermentación se necesita trabajar con medios altamente estériles, en los que el producto final son las propias levaduras. Como no hay recuperación de las levaduras, en cada nueva fermentación hay consumo de azúcares para formación de células de levaduras en detrimento del rendimiento de la producción de alcohol, se requiere de un gran control de contaminaciones pues en caso de presentarse el proceso se volvería antieconómico.

### 2.7.4 Proceso de Melle-Boinot

Es un procedimiento que tienen excelentes rendimientos, alcanzando parámetros del orden del 92% estequimétrico definido por Gay-Lussac ó sea casi el 100% de lo estipulado por Pasteur, es un proceso fácil y de gran flexibilidad.

Se empieza inicialmente con el proceso de cortes hasta que todas las cubas estén en su volumen útil lleno, una vez llegado a este punto se inicia el proceso secuencial y continuo de centrifugación del alcohol a través de máquinas separadoras centrifugas, donde se divide el alcohol en dos fracciones que son:

- 1.- El alcohol deslevadurizado que se envía al sector de destilación para su recuperación y
- 2.- Crema de levadura., es una fracción líquida densa rica en levadura que va a las cubas de tratamiento, donde sufre un proceso de purificación microbiana y de revigorizamiento.



## 2. PRODUCCIÓN DE ALCOHOL

Este proceso tiende a eliminar las impurezas bacterianas, para reiniciar las actividades de fermentación, se suspenden las células de levadura mediante agitación o inyección de aire comprimido, se centrifuga nuevamente el pie-de-cuba el cual es diluido con agua y enviado a la cuba respectiva, sin adición de ácido, este se alimenta con una carga de mosto a 40-50 °C para iniciar la actividad de fermentación de las levaduras

Cuando el medio esta nuevamente en actividad, se continua con el proceso de alimentación del mosto, ahora con temperaturas entre 28 a 30°C. Terminada esta fermentación, el proceso se sigue realizando normalmente, efectuando el tratamiento ácido.

### 2.7.5 Procesos continuos

Este tipo de procesos son de dos tipos:

1. Dispone de una serie de cubas, en donde se procura realizar un desvío en el paso de un fermentador a otro para ser centrifugado.

Con la centrifugación del alcohol por las centrifugas, surgen dos fracciones, una de ellas rica en fermento, que se devuelve al fermentador anterior y a la otra fracción, que es el alcohol deslevadurizado, sigue su camino para la cuba de fermentación para la continuidad del proceso.

Esto se realiza en los fermentadores secuenciales de forma que realimenten el fermentador con levadura, evitando el arrastre excesivo de microorganismos, dejando pasar solamente parte para mantener el proceso de fermentación activo.

En la última cuba de fermentación todo el alcohol agotado prácticamente de azúcares fermentables se centrifuga para la recuperación de las levaduras, la cual regresa a la primera cuba pudiendo, o no sufrir un tratamiento para revigorizalo, como se muestra en la figura 2.1.

2. El segundo proceso de fermentación continua con recuperación de la levadura es aquel en el que la fermentación ocurre solamente en la misma cuba.

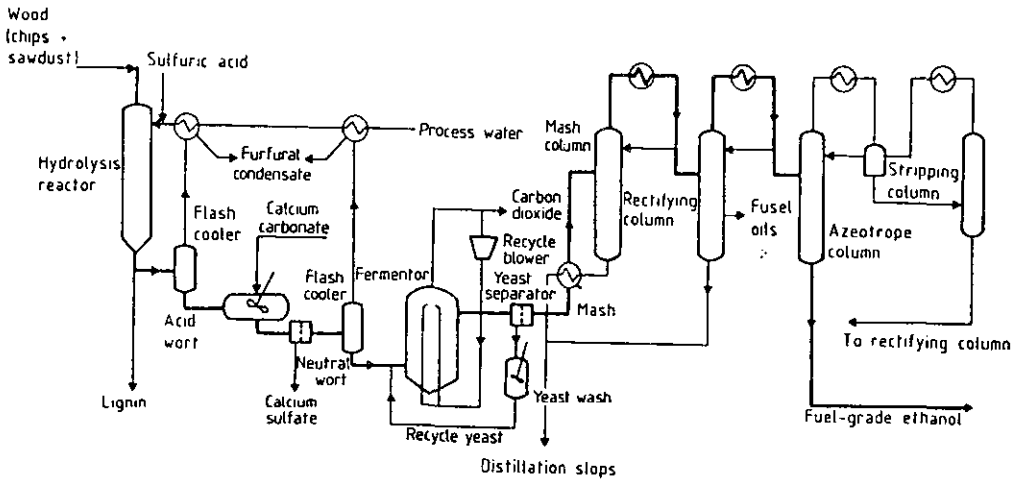


Figura 2 1 Proceso de producción de etanol por fermentación continua

- |                                  |                            |                      |                        |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------|------------------------|
| 1 - Materia Prima                | 2.-Reactor de Hidrólisis   | 3.-Impurezas         | 4.-Ácido Sulfúrico     |
| 5 -Enfriador                     | 6.-Condensados             | 7.-Carbonato de Ca   | 8 -Sulfato de calcio   |
| 9.-Fermentador                   | 10.-Levadura reciclada     | 11 -CO2              | 12 - Crema de levadura |
| 13.-Rectificación                | 14.- Separador de levadura | 15 -C Azeotrópica    | 16 -a rectificación    |
| 17.-Alcohol de grado combustible |                            | 18 - Agua de proceso |                        |

### 2.8 PRODUCCION DE VINO

El vino es uno de los tantos productos obtenidos mediante fermentación, el tipo de fermentación que denomina en estos procesos es la fermentación alcohólica.

Se le llama vino al zumo fermentado de frutas o vegetales que contienen azúcares monosacáridos o disacáridos, existen vinos de diferentes frutas como son uva, naranja, melocotón, cereza, moras, grosella, pasas, manzana etc.

Los vinos se pueden clasificar de diferentes maneras por ejemplo según el lugar de producción, color, contenido de alcohol, método de producción, variedad del fruto. Por ejemplo en base al contenido de alcohol tenemos

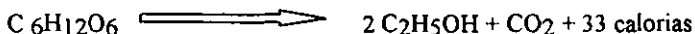
Vino de mesa            14% de Alcohol

Vino aperitivo        más de 14%

El vino se elabora a partir de uvas de diferentes tipos, los constituyentes del mosto son:







Agua	65-80%
La piel o película	6-12 %
Azúcares reductores	15-30%
Pepitas	2-5%
Acidos mosto o pulpa	83-92%
Materiales minerales	1 -2%
materias nitrogenadas	5 -6%

El componente más importante es el azúcar ya que es el precursor del alcohol en el vino según la reacción:



Se tiene que de cada 15g de azúcar se produce 0.55% de alcohol en volumen. Otros componentes son los ácidos orgánicos tales como ácido málico y tartárico en uvas, el ácido tartárico es el más abundante en el vino y tiene un papel importante en el desarrollo del sabor. En las uvas se encuentran pequeñas cantidades de materia nitrogenada, que tienen gran importancia para la nutrición de la levadura y estabilidad bacteriana.

## 2.8.1 Operaciones de la vinificación

TRANSPORTE Y ESTRUJADO DE UVAS	Acido Tartárico 4-4 5g/l
	
SULFITADO Y ACIDIFICACION	SO <sub>2</sub> por 15 a 20 g/h mosto apagado: 120 a 200 g/h
	
SIEMBRA DE LEVADURAS	Refrigeración 25-30°C
	
FERMENTACION	Remontados
	
DESENCUBADO	
	
TRASIEGO DE VINOS	
	
DEPOSITO DE ACABADO	

- ✓ **ESTRUJADO:** Tanto las uvas blancas como las negras, son estrujadas, tienen como finalidad aplastar, reventar el grano de uva por presión o choque con objeto de deshacerlo y liberar la mayor parte del zumo:
- ✓ **SULFITADO:** Es una acción antiséptica para sanear el medio fermentativo, tiene la acción clarificante retardando más o menos el arranque de la fermentación.
- ✓ **ACIDIFICACION:** Si el mosto de uva es insuficientemente ácido, otros microorganismos compiten con las levaduras, el vino obtenido será soso, de color turbio. Estas dos operaciones tienen por objeto frenar el desarrollo de los diferentes fermentos aportados por la vendimia, que son indeseables.
- ✓ **FERMENTACIÓN:** Conviene airear un poco el mosto, con el objeto de favorecer el desarrollo de las levaduras, además de controlar la temperatura y las condiciones de la fermentación.
- ✓ **REFRIGERACION:** El método más eficaz para enfriar los mostos se encuentra en el empleo de refrigerantes tubulares, se utiliza para frenar la fermentación.

## 2. PRODUCCIÓN DE ALCOHOL

✓ PRENSADO DE ORUJOS: Se debe extraer por presión el mosto o el vino retenido por la brisa.

### 2.8.2 Microorganismos empleados

Las características del propio mosto, principalmente su contenido de azúcares y su acidez, provocan un desarrollo selectivo de los microorganismos más aptos para la fermentación alcohólica. Los M.O. más importantes son:

\**Saccharomyces cerevisiae*

\**Saccharomyces elipsoideus*

\**Kloeckera apiculata*

\**Hanseniaspora Uvarum*

\**Candida stellata*

\**Candida pulcherrima*

Pero sin lugar a dudas el más destacado es la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*, puesto que es el microorganismo que mejores rendimientos y propiedades brinda en el proceso de vinificación.

### 2.8.3 Bioquímica de la fermentación del mosto de uva

La fermentación de la glucosa y fructosa por levaduras puede seguir dos rutas, las cuales son esquematizadas por la siguiente ecuación,

a) Fermentación alcohólica:  $\text{Glucosa} + 2 \text{ADP} \rightleftharpoons 2 \text{etanol} + 2 \text{CO}_2 + 2\text{ATP}$

b) Fermentación glicerol piruvica:  $2 \text{Glucosa} \rightleftharpoons 2 \text{glicerol} + 2 \text{CO}_2 + \text{etanol} + \text{acetato}$

La fermentación del acetato es atribuida a la disminución hidrolítica del acetaldehído.



Los azúcares se transforman en un 95% en alcohol y anhídrido carbónico por levaduras. El alcohol y pequeñas cantidades de anhídrido carbónico se disuelven en el líquido de fermentación; el anhídrido en su mayoría desaparece (forma de gas) si no produce intoxicación.

Las levaduras no sólo transforman el azúcar en alcohol, también ocurren fermentaciones secundarias de la glicerina y de las proteínas, estos productos dan sabor y olor

característico.

## 2.9 LICORES

Un licor se puede definir como una bebida alcohólica que lleva azúcar y productos aromáticos, tales como extractos de plantas y frutas. Los destilados de estos zumos de frutas y aceites esenciales.

El grado alcohólico oscila de 20 a 58%. Lo normal es de 25% en volumen. El contenido de extracto (azúcar, componentes de frutas y plantas) deben alcanzar los 220 g/L.

Diversos licores que gozan de prestigio Internacional son elaborados con frutas, cereales y tubérculos. Todos ellos tienen en común una fermentación alcohólica muy similar, pero sus propiedades y características las adquieren mediante la variación de alguno de los pasos posteriores a la fermentación.

### 2.9.1 Operaciones de la elaboración de licores

EXPRIMIDO



PRENSADO



MACERADO



MADURACION

➤ **EXPRIMIDO.**- Lo más usual es utilizar una prensa para el exprimido. En primer lugar se tritura la fruta. Hoy en día se usa la denominada centrifuga de zumos. En este paso debemos conocer la graduación de alcohol, la cual se conoce por una regla empírica que dice que 20 grs de azúcar proceden 1% en volumen de alcohol. Los vinos de frutas en consideración se hacen a 10-11% en volumen de alcohol, siendo estos agradables ligeros y digestivos. Otro parámetro es el contenido de ácido.

➤ **PRENSADO.**- Se puede llevar a las frutas que las presen en un lagar o prensa de

## 2. PRODUCCIÓN DE ALCOHOL

rusillo, centrifuga, etc. La separación de la pulpa y el zumo es un proceso importante.

➤ **MACERADO.**- Si se somete la fruta a un premacerado el prensado será mucho más completo. El premacerado consiste en trocear la fruta y someterla a una fermentación. La masa así obtenida, el macerado, se introduce a un recipiente de maduración y se le añade levaduras puras, así como una cantidad de agua. Lo que se pretende con el premacerado es provocar la rotura de las células que no han sido rotas al triturar la fruta. La fermentación que tiene lugar, abre las células provocando la destrucción de las pectinas y otras sustancias mucosas.

### 2.9.2 Microorganismos presentes

Las levaduras son hongos blastomicetos que se reproducen mediante brotes; la misión de las levaduras de vino es desdoblar el azúcar y producir alcohol y anhídrido carbónico, el alcohol en grandes cantidades es nocivo para ellas, así la concentración máxima es de 14-14.5% másico (17.5-18% volumen.) Las levaduras utilizadas son: *Saccharomyces Cerevisiae* denominadas levaduras de cerveza. Otras son las denominadas "salvajes" pequeñas y de rendimientos bajos de alcohol. Existen licores donde los microorganismos realizan una fermentación alcohólica secundaria durante la maduración. Algunos de estos licores preparados que involucran este tipo de fermentación son el Champan y el Jerez.

Entre las levaduras en crecimiento que se usan pueden ser:

\**Saccharomyces cerevisiae*

\**Torulaspota Fermentatii*

\**Saccharomyces rouxii*

Estas levaduras son capaces de crecer en altas concentraciones de -OH, además no sólo producen alcohol, sino también acetaldehído y glicerol. La película de levadura impide el contacto del vino con el aire y por lo tanto permanece sin oxidar el color claro.

2.9.3 Elaboración de Champang y Jerez

2.9.3.1 CHAMPANG

Se disuelve CO<sub>2</sub> para la fermentación en la botella. El vino base debe contener azúcares no fermentados. La levadura que queda en el vino continúa la fermentación en la botella. La botella gradualmente se va rotando hasta que quede el cuello hacia abajo y el asiento hacia arriba. En el cuello se van depositando todos los depósitos sólidos de la fermentación secundaria.

Estos sólidos se eliminan con una especie de trasiego, este tipo de vino resulta específicamente caro por esta operación. En algunos lugares este tipo de vino se elabora en tanques de acero inoxidable, y después se embotella a contrapresión con CO<sub>2</sub>.

2.9.3.2 JEREZ

En la elaboración de jerez se almacena en bodegas de tipo solera, que es un sistema de barriles superpuestos en donde el más inferior es el vino a embotellar, de los barriles solo se toma la mitad y esta es sustituida por los toneles superiores inmediatos y así sucesivamente, de modo que el vino más joven es el que se coloca en la parte superior.

2.10 PRODUCCION DE CERVEZA

Es la bebida que se obtiene mediante la fermentación alcohólica de un cereal germinado, por lo regular malta de cebada al que se le ha incorporado otro material harinoso y lúpulo.

La cerveza es en esencia una solución acuosa carbónica con cantidades variables de alcohol, azúcares no fermentados y dextrinas, sustancias proteicas y componentes aromáticos derivados de la malta, el lúpulo y la levadura. Como componentes secundarios, contiene sales inorgánicas, subproductos metabólicos de la levadura, vitaminas, indicios de hierro, cobre y materias vegetales.



## 2. PRODUCCIÓN DE ALCOHOL

---

### 2.10.1 Materias primas.

La cerveza esta elaborada con cuatro materias primas básicas: Agua, Malta, Lúpulo y Adjuntos

- ❖ AGUA.- El agua utilizada para la elaboración ejerce influencia decisiva en el proceso y en la calidad, debe estar libre de cualquier contaminante.
- ❖ MALTA.- La malta proviene de la germinación controlada de la cebada, cuya planta tiene un ciclo vegetativo de 110 a 115 días. La producción de malta se divide en tres etapas Remojo, Germinación y Secado.
- CEBADA: Es un cereal que contiene cascarilla, aunque algunos son granos desnudos. Es un cereal que no requiere cuidados especiales para su cultivo a diferencia de la avena o del trigo; madura más rápidamente que todos los demás cereales.

Su composición es la siguiente:

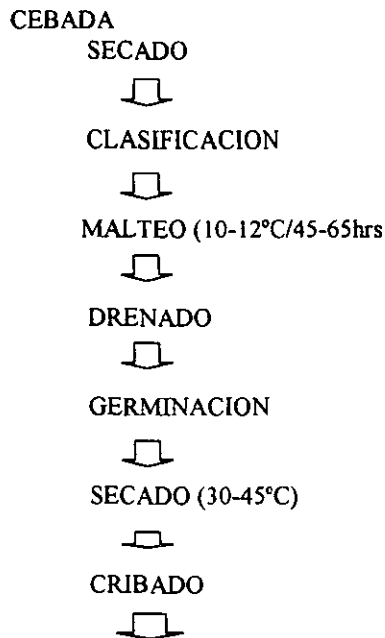
Cascarilla	13%
Pericarpio	2.9%
Aleurona	4.7%
Endospermo	76.2%
Germen	1.7%
Escutelo	1.3%

- CASCARRILLA.- Esta involucrada en la síntesis de compuestos fenolicos en la cerveza, un exceso de estos no es adecuado porque provoca turbidez roja y una baja concentración de compuestos fenolicos provoca un sabor insípido.
- ALEURONA.- Durante el malteo secreta enzimas, las cuales son necesarias para la hidrólisis de los azúcares de alto peso molecular
- ENDOSPERMO.- Es el mayor componente y provee de azúcares el germen durante la germinación.
- GERMEN.- Genera hormonas, lo que implica la generación de complejos

enzimáticos durante el malteo

- **MALTEO.**- La manufactura de la malta es el proceso que consiste en controlar la germinación de la cebada durante la cual son formadas enzimas y las reservas alimenticias son suficientemente modificadas y así puedan ser hidrolizadas en el proceso de sacarificación.
  - **REMOJO.**- En el proceso de remojo, la humedad de la cebada se aumenta hasta la germinación.
  - **GERMINACION.**- Aquí nacen las primeras raicillas y las sustancias del interior sufren cambios, transformándose en lo que conocemos como malta.
  - **SECADO.**- La temperatura a que se seque determinara el color de la malta y posteriormente de la cerveza.

### 2.10.2 Proceso de Malteo



- ❖ LÚPULO.- Es un planta que se le agrega a la cerveza y es el responsable de la formación de espuma y del sabor amargo de la cerveza.
- ❖ ADJUNTOS.- Los adjuntos son materiales utilizados en la preparación del mosto, además de la malta y se aplica por el alto contenido de proteínas y al pasar por el proceso de malteo generan una gran cantidad de enzimas.

### 2.10.3 Cambios durante el malteo

MORFOLOGICOS.- Crecimiento de raicillas

HISTOLOGICOS.- Rompimiento de las paredes celulares del endospermo, que es donde se encuentra el almidón.

QUIMICOS.- Degradación de proteínas y almidones a componentes de bajo peso molecular.

BIOQUIMICOS.- Secreción de enzimas.

### 2.10.4 Proceso de elaboración del mosto

De los silos, la malta es conducida por elevadores o transportadores a cribas en las que le separa toda impureza, pasando después a molinos en que se la tritura quedando transformada en harina gruesa, con algo de su propia cascarilla.

El medio que se fermenta para producir cerveza se llama mosto. Este proceso se divide en tres pasos:

1.- Maceración

2.- Separación

3.- Operaciones de Cocimiento

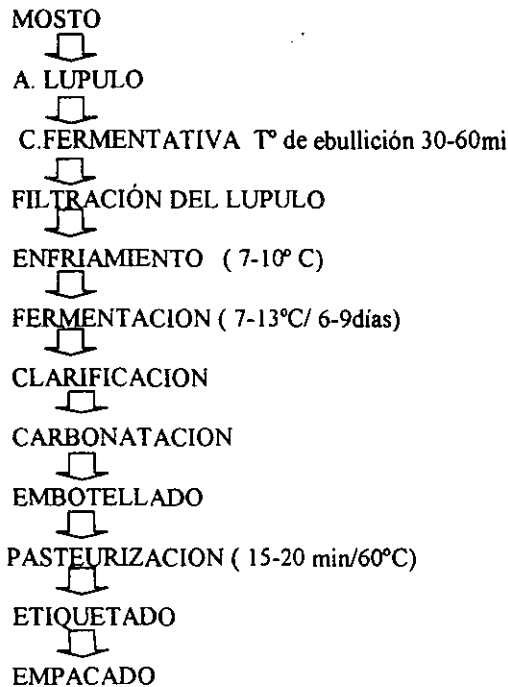
✓ MACERACION.- La maceración de la malta se hace a temperaturas y tiempos perfectamente definidos, cuyo objeto es convertir el almidón en azúcares fermentables.

✓ SEPARACION.- Se filtra la mezcla, a fin de separar materia soluble o mosto del

residuo o bagazo, los residuos del mosto y granos pueden separarse mediante el uso de filtro prensa, centrifuga o tanques de filtración.

✓ **COCIMIENTO.**- Enseguida el mosto ingresa a las calderas de cocción donde hierve generalmente de dos a dos horas y media, sirve para que las proteínas se hidrolicen, en este paso se le agrega en pequeñas cantidades el lúpulo.

### 2.10.5 Elaboración de Cerveza



Estas operaciones se pueden ver en la figura 2.2

### 2.10.6 DIFERENTES TIPOS DE CERVEZAS

Se distinguen dos clases de cervezas, las fermentadas en superficie y las fermentadas en el fondo.

#### 9 CERVEZAS FERMENTADAS EN SUPERFICIE

Cerveza fabricadas en Alemania por fermentación a altas temperaturas, por ejemplo la cerveza

## 2. PRODUCCIÓN DE ALCOHOL

blanca, con un 7 a 8% de extracto seco en el jugo original elaborada a través de malta de cebada y de trigo con levaduras y bacterias ácidolácticas

### 3 CERVEZAS FERMENTADAS EN EL FONDO

Tienen un plazo de conservación considerablemente mayor, fabricándose como cerveza clara, de coloración intermedia o como cerveza oscura.

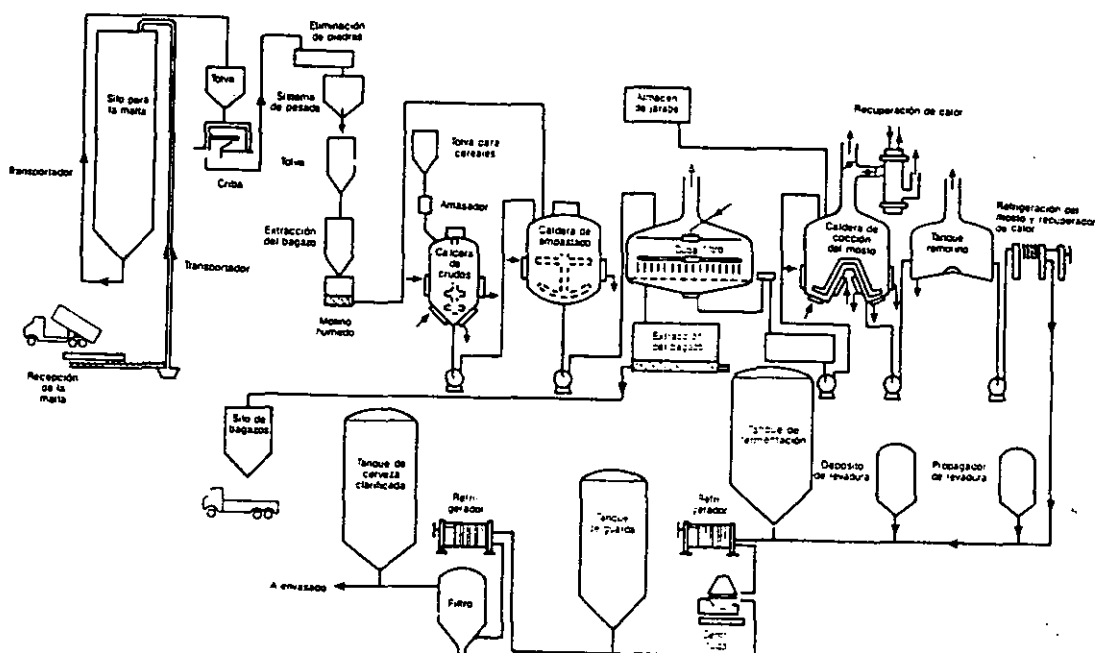


Figura 2.2 Proceso de producción de cerveza Hough, 1990

### 3 PRODUCCIÓN DE ANTIBIOTICOS VÍA MICROBIANA

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

Los microorganismos producen un sin número de sustancias durante su crecimiento, y estas pueden ser aprovechadas para nuestro beneficio, de los primeros productos que se utilizaron en beneficio de la humanidad producto de los microorganismos fueron los antibióticos.

En el año de 1886, Ernesto A. Clement Duchensen demostró nítidamente la acción antibacteriana del hongo denominado *Penicillium*.

En 1887 Pasteur observó que el bacilo del carbunco se inhibía en presencia de contaminantes del aire. Después observó que la *Pseudomona aeruginosa* antagonizaba al *Bacillus anthracis* y de aquella bacteria elaboró la pirocinasa que tenía un efecto lítico sobre varias bacterias.

Más tarde dicho hongo volvió a llamar la atención, en 1928 Alexander Fleming cultivó el hongo e hizo un extracto de él, al que llamó penicilina.

En 1889 Vuillemin en un trabajo titulado "Antibiose et symbiose", propone el término "antibiosis", para describir la lucha entre seres vivos por la supervivencia. Más tarde Ward adopta esta palabra para describir el antagonismo microbiano.

Alexander Fleming describió posteriormente el efecto letal y antagónico de la penicilina sobre las bacterias gram negativas al advertir que un moho contaminante causaba lisis en un cultivo de *estafilococos*, aisló y cultivó al hongo y comprobó que el caldo donde había crecido tenía las mismas propiedades antibacterianas, y aunque se dio cuenta de las posibilidades médicas de ella, el estímulo de su producción a gran escala fue la guerra mundial de 1939-1945. Para entonces se disponía de la mayor parte de la experiencia tecnológica necesaria, especialmente a partir de fermentaciones de la levadura de panificación y de la acetona-butanol, pero aun así, el rápido desarrollo de la fermentación de la penicilina, su

### 3. ANTIBIOTICOS

extracción y purificación a gran escala fué uno de los logros más impresionantes de las fermentaciones industriales y es sin duda una de las contribuciones más importantes a la salud humana y animal, por lo que representa, por que fue el primer producto en obtenerse a gran escala y a precios económicos la mayoría de lo antibióticos.

Es importante señalar que en nuestros días el término antibiótico abarca una amplia variedad de medicamentos, sin ahondar sobre su exacto origen, es decir si son obtenidos por microorganismos o sintetizados en el laboratorio. Aunque Waksman en la década de los cuarenta propusiera dicho termino para definir aquella sustancia producida por varias especies bacterianas, dotada de actividad antimicrobiana producidas por síntesis en el laboratorio.

Su manufactura se ha incrementado y en el volumen de producción la penicilina se encuentra en primer lugar (aprox. 4.3 millones de Kg), seguida por 3.2 millones de tetraciclinas 5000,000 Kg de cefalosporinas y 6.7 millones de Kg de otros antibióticos, actualmente se han encontrado más de 6,000 antibióticos, producidos de diversos modos, los antibióticos más efectivos han sido producidos basándose en una modificación realizada por una variedad de microorganismo, por control de la fermentación, adición de precursores específicos, inhibidores metabólicos, uso de cepas seleccionadas o mutantes y más recientemente por la aplicación de genética molecular.

#### 3.1.1 Definición

Por antibiótico se entiende a las sustancias producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos o actinomicetos) o sintetizados químicamente, que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y pueden incluso llegar a destruirlos.

#### 3.2 CLASIFICACION DE LOS ANTIBIOTICOS

El antibiótico introducido en el organismo por vía oral, parental o aplicado en la superficie cutaneo mucosa despliega una actividad contra las bacterias o microorganismos sensibles, cuyo efecto se expresa en dos alternativas 1) destruye el microbio 2) lo inhibe en su

crecimiento o reproducción,

Ambas consecuencias de la acción antibiótica son útiles para el tratamiento de enfermedades infecciosas pero existen diferencias; este modo genérico de acción ha servido para diferenciar o diluir a los antibióticos en dos grandes grupos: bactericidas y bacteriostáticos, también tienen diversos mecanismos de acción en el interior de la bacteria y con esto se propone clasificar a los antibióticos en varios grupos de acuerdo con su mecanismo de acción:

□ Antibióticos que actúan en la pared microbiana: (Penicilina, Cefalosporinas, Bacitracina etc.). La pared celular protege a la célula contra cambios en el medio ambiente. La composición química de la pared (mucopéptidos) lo constituye una unión tridimensional de péptidos, acetilglucosamina y acetilmurámico. Los microorganismos gram-positivos contienen de un 40 a 90 % de muramipéptidos, mientras que los gram-negativos sólo de un 4 a 10%. El proceso formativo de la pared bacteriana está integrado por numerosos pasos sucesivos en cada uno de los cuales pueden actuar un antibiótico, por ejemplo la penicilina actúan impidiendo la unión de las diversas estructuras del mucopéptidos, base o sostén de la pared bacteriana, como consecuencia de esta interferencia la célula bacteriana sin pared no resiste los cambios osmóticos, se hincha y estalla. Por eso se denominan bactericida y los microorganismos gram-positivos son lo más susceptibles, por que tienen un alto contenido de muramipéptido.

□ Antibióticos que actúan en la membrana celular (polimixinas, colistinas, anfotericinas, nistatina etc.) La membrana celular ubicada debajo de la pared cumple funciones importantes para la vitalidad de la bacteria, los antibióticos alteran la permeabilidad actuando como detergentes catiónicos y provocando la salida de sustancias del interior de la célula. La polimixina y colistina tienen una gran afinidad por los radicales fosfato de la membrana lo que altera la osmolaridad celular.

□ Antibióticos que interfieren la síntesis protéica: (Clorafenicol, Tetraciclinas, Eritromicinas, Oleandomicina, Aminoglicosidos, Estreptomina, Gentamicina, etc.). La



### 3. ANTIBIOTICOS

La síntesis de proteínas es vital para la vida bacteriana, los antibióticos de este tipo inhiben esta síntesis actuando en los ribosomas e impidiendo la síntesis de las cadenas de péptidos, y los tres últimos actúan produciendo anomalías en la lectura del código genético, originando proteínas erróneas.

□ Antibióticos que impiden la síntesis de ácidos nucleicos (Novobiocina, Griseofulvina, Ac. Nalidixico.) La replicación es necesario para transmitir los caracteres hereditarios y se efectúa por medio de una ADN Polimerasa, mientras que la transcripción se efectúa por medio de una ARN Polimerasa, la replicación y transcripción pueden ser afectados por varios antibióticos. El ac. nalidixico, la novobiocina y la griseofulvina bloquean la síntesis de ADN mientras que la rifampicina interfiere la síntesis del ARN bloqueando la transcripción del mensaje genético.

También se pueden clasificar sobre la base de su espectro bacteriano, se considera de amplio espectro los que actúan sobre bacterias gram positivas y gram negativas y organismos más inferiores, como hongos y reckettisias.

Los antibióticos de espectro intermedio tienen acción contra gran variedad de bacterias pero sin abarcar la mayor parte de los gram positivos o gram negativos a la vez, los antibióticos de espectro reducido actúan sobre unos cuantos gérmenes de manera muy específica ya sean gram positivos o negativos pero con gran eficiencia.

#### *3.3 PROPIEDADES DE UN ANTIBIOTICO IDEAL.*

- 1.- El agente debe tener una actividad antibacteriana eficaz y selectiva y deberá ser bactericida más que bacteriostático.
- 2.- Su eficacia antimicrobiana no debe ser reducida por los fluidos corporales, exudados, proteína plásmaticas o enzimas proteolíticas.
- 3.- Las características de absorción distribución y excreción deberán ser tales que los niveles bactericidas en la sangre, tejidos y fluidos corporales incluyendo el fluido cerebrospinal, sean rápidamente alcanzados y mantenidos durante períodos largos.

- 4.- Especificidad de acción
- 5.- Ser de baja toxicidad
- 6.- Que no sea destruido por enzimas de los tejidos
- 7.- Que sea estable, no lábil
- 8.- Que no se elimine rápidamente por vía renal
- 9.- Que no produzca resistencia bacteriana
- 10.- Que sea de alta penetrabilidad
- 11.- Que sea eficaz por vía local, oral o parental
- 12.- Que se pueda producir en gran cantidad y sea barato
- 13.- La excreción del fármaco en la orina en concentraciones bactericidas es de gran valor en las infecciones del tracto urinario.

El tiempo de vida media de un antibiótico es el tiempo en que el antibiótico permanece en el organismo y un 50% es eliminado, para cada antibiótico es diferente por ejemplo para:

Clortetraciclina es de	5.5 horas
Oxitetraciclina es de	9.5 horas
Tetraciclina es de	8.5 horas
Metaciclina es de	15 horas
Minociclina es de	17.5 horas
Ampicilina e de	1.7 horas
Amoxicilina es de	1.6 horas
Oxaciclina	0.3 horas

Es importante tomar en cuenta este tiempo para el tipo de enfermedad que se desea tratar, las posibles reacciones pues es posible que haya modificaciones inherentes a la fisiopatología de la enfermedad que alteran la cinética de la eliminación de los residuos del fármaco en cuestión.

### 3. ANTIBIOTICOS

---

#### 3.4 BIOSISTESIS DE ANTIBIOTICOS

##### 3.4.1 Precursores en la alimentación

Una característica común de la producción de antibióticos por vía microbiana es su habilidad para la síntesis de grupos antibióticos estructuralmente relacionados.

Esto ocurre debido a la difusión específica de sistemas de síntesis de antibióticos y que ha sido demostrada en muchos casos, así cuando un precursor de un antibiótico es adicionado a el organismo, el cual normalmente produce una mezcla de antibióticos, en la cual un compuesto exógenicamente añadido, compite con los o el antibiótico endógenicamente sintetizado a partir del precursor y es preferencialmente incorporado dentro del correspondiente antibiótico, resulta en un incremento en la síntesis del último, y en la supresión de otros antibióticos. Entre los que así se pueden producir se encuentran la penicilina G, X, F, y K

##### 3.4.2 Inhibición Metabólica

La modificación de antibióticos ha sido obtenida también cuando se adicionan al medio inhibidores metabólicos. Así un número de compuestos seleccionados inhiben el paso de la cloración en la síntesis de clortetraciclina por *Streptomyces aureofaciens*, donde la tetraciclina es el producto formado que predomina.

Los análogos de L-metionina (D-metionina, Metionina y Sulfonamidas, aminopterina derivados de hemocisteína y metoximina) inhiben la metilación por la misma clortetraciclina producida y resulta en lugar de eso en la formación de 6-dimetilclortetraciclina.

##### 3.4.3 Biosíntesis Híbrida

Este método ha sido usado como una alternativa de la mutasíntesis para generar nuevos derivados de antibióticos macrólidos, tales como pricromicina, tilosina, platenomicina, etc. que se componen de un anillo macrocíclico de lactona unido glucosídicamente a una amina y/o desoxiazúcar. A partir de que la aglicona es sintetizada de precursores lípidos como grupos

acetil, propionil, butiril CoA, vía intermediarios polipetida, su formación se bloquea por cerulelina, un inhibidor de biosíntesis de ácidos grasos, mientras la formación de la porción de azúcar permanece infectada. El último grupo que se combina con la aglicona de otros antibióticos macrolidos adicionados externamente, resulta en la formación de una nueva estructura antibiótica modificada.

#### 3.4.4 Mutasíntesis

Los mutantes de productores antibióticos han sido valorados en la preparación de nuevos derivados antibióticos. Así algunos de estos bloqueadores en la síntesis de antibióticos (idiotropos) acumula precursores los cuales sí son antibioticamente activos.

El bloque de antibióticos vía mutantes también ha sido usado en la preparación de nuevos antibióticos derivados, por un aprovechamiento que se propuso originalmente por Birch en 1963; el bloqueo de mutantes no puede completar la síntesis del antibiótico, debajo del precursor que ha sido suplido.

#### 3.4.5 Manipulación Genética

Esta metodología incluye la clásica mutación de productores de antibióticos y una recombinación intra e interespecífica. El rápido avance de la técnica de fusión de protoplasto, han sido usado en la producción de rifamicina, tiloin, epiramicina y cirramicina, en donde la productividad de antibiótico, fué dramáticamente cambiada.

Esta técnica ha incrementado la importancia de la transferencia de los genes deseados entre tipos divergente de microorganismo y en la construcción de nueva cadenas recombinantes. La mutación y la recombinación intraespecífica ha sido usada sucesivamente para la modificación de antibióticos conocidos.

De este modo la recombinación entre otros 2 mutantes fué usada con resultados similares, lo que muestra una capacidad disponible de tecnología para incrementar la producción de antibióticos.

### 3. ANTIBIOTICOS

---

#### 3.4.6 Biotransformaciones

Una larga serie de antibióticos ha sido modificados por varios microorganismos y muchos de estos cambios se deben a reacciones definidas químicamente. Aunque muchas de estas reacciones tienen un interés académico solamente, tienen una importancia clínica para el desarrollo de la resistencia de los antibióticos como los B-lactamas y antibióticos aminoglucosídicos, además de la preparación de nuevas drogas semisintéticas superiores a los compuestos como las penicilinas semisintéticas, cefalosporinas, rifamicinas y otros.

La transformación ha sido llevada a cabo en cultivos batch y más recientemente por células inmovilizadas, al igual que enzimas utilizando la tecnología más adecuada y reciente.

Las reacciones de transformación se han dividido en 11 tipos:

- \* Hidrólisis y deacilación
- \* Acilación
- \* Fosforilación
- \* Nucleotidización
- \* Oxidación
- \* Reducción
- \* Aminación y deaminación
- \* Glucosidación
- \* Metilación y demetilación
- \* Isomerización
- \* Hidratación

Todas estas manipulaciones han ido muy importantes en la producción de antibióticos por vía microbiana ya que han podido permitir tener a la mano a precios accesibles los medios de defensa y profilaxis para la salud humana.

#### 3.5 BIOSÍNTESIS DE PENICILINA

La penicilina es un metabolito secundario producido tras el periodo de crecimiento logarítmico rápido del organismo, esta asociada al metabolismo del nitrógeno y los

aminoácidos de cisteína y valanina son incorporados a la molécula de la penicilina

El mecanismo de producción de penicilina se lleva a cabo de la siguiente forma:

- A. En el citoplasma del microorganismo se encuentran presentes 3 aminoácidos el ácido alfa-aminoadípico; que es un intermediario en la biosíntesis fungica de lisina; la cisteína y la Valina, estos aminoácidos son activados por molécula de ATP y un complejo enzimático, siendo enlazados, para formar un tripéptido llamada alfa-aminoadípil-cisteinil-valina, precursor de la penicilina
- B. Por medio de dos cofactores que son NADP<sup>+</sup> y FAD, así como algunas enzimas, se da la conversión de alfa-aminoadípil hacia ácido n-fenilacético o fenoxiacético, que son los precursores de la penicilina G o V respectivamente.
- C. Esta conversión permite obtener isopenicilina N, una vez sintetizada la isopenicilina N, se realiza la conversión hacia penicilina G o V, por medio de 2 enzimas, que son: 1.- Acido fenilacético-CoA ligasa y 2.- Fenoxiacético y penilicina aciltransferasa. El ácido fenilacético y el fenoxiacético, son lo precursores de la penicilina G o V, respectivamente, pudiendo ser tóxico a la célula

### 3.5.1 Proceso de manufactura de penicilina

En la figura 3.1 se puede ver un proceso típico de producción de antibióticos por fermentación

1)Desarrollo del inóculo: Consiste en incrementar la concentración de micelios fúngicos. El medio contiene suficientes carbohidratos fermentables, fuentes de hidrogeno, carbonato de calcio como buffer y algunos compuestos inorgánicos, se inocula con esporas. La cantidad y calidad de inóculo tiene un efecto importante en la producción de penicilina.

2)Fermentación: Es importante mencionar que el microorganismo productor de penicilina requiere de lactosa como fuente de carbono para lograr una buena producción y en el caso de únicamente crecer el micelio se requiere de glucosa que se lleva a cabo en un tiempo aproximado de entre 7 y 8 días para un rendimiento máximo.

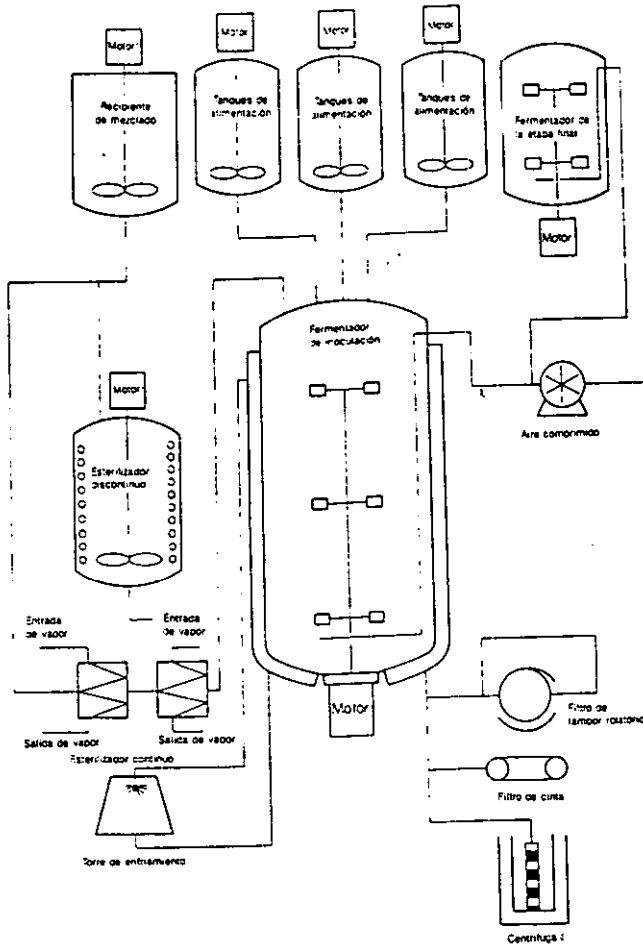


Figura 3.1 Producción de antibióticos por fermentación Fuente Bo'lock 1987

3) Filtración a vacío: Una vez expulsada la penicilina al medio, es necesario realizar una filtración, separando así los micelios de la penicilina.

4) Extracción: La penicilina es extraída en forma ácida, por medio de solventes.

5) Tratamiento al carbón: Esta operación es con la finalidad de remover pigmentos y

otras impurezas contenidas en la penicilina.

6)Cristalización: En esta operación se adiciona acetato de potasio o sodio, una vez obtenida la penicilina cristalizada esta es filtrada, se le realiza un lavado, un secado y una purificación para posteriormente acondicionarla en forma de cápsulas, suspensiones, etc.

7) Acondicionamiento: Una vez obtenido el antibiótico se realizan a este una serie de operaciones de acondicionamiento para de esta forma obtener las presentaciones farmacéuticas que conocemos comercialmente, la primera de esta operaciones es la reducción de tamaño para obtener el polvo, que se puede integrar fácilmente a otras formas posológicas sólidas, tanto en cápsulas como en comprimidos, y también pueden ingresar a soluciones líquidas como suspensiones, solución e inyectables.

Una de las características más importantes es el tipo de partícula en donde la forma cristalina es la más importante debido a la estabilidad que este hecho le confiere al fármaco en cuestión; así las penicilinas amorfas son inestables y no soportan por ejemplo el calentamiento en seco a 100 °C, que es un ensayo de farmacopea que debe pasar, y en cambio la penicilina cristalina resulta intacta a esta prueba.

Otro caso es el del palmitato de clorafenicol (CAF-P), este antibiótico bajo su forma corriente de alcohol libre es muy amargo y por lo tanto no apto para su administración, especialmente en las formas líquidas en las que particularmente no es muy estable. Estas dos características de sabor y estabilidad se han resuelto administrándolo en suspensión, en la cual es insípido e insoluble sin embargo el CAF-P no tiene actividad antibiótica en el intestino ya que las hidrolasas ahí presentes la desdoblan , por tal motivo el CAF-P se presenta en varios polimorfos ( sólidos con más de una forma cristalina) y posteriormente se elaboran las suspensiones.

Por lo general para llegar a un polvo farmacéutico, la secuencia de operaciones es: reducción de tamaño, mezclado, tipificación, acondicionamiento, ensayos, controles y finalmente reposición o envasado



### 3. ANTIBIOTICOS

---

#### 3.6 COMPAÑIAS PRODUCTORAS DE ANTIBIÓTICOS

Existen en el mundo 161 compañías, la mayor parte de ellas se encuentra distribuidas en tres países que son: Japón (36), U.S.A. (22) e Italia (16), entre las compañías más importantes podemos encontrar:

Asahi Chemical Industri Co. Osaka Japón,

Bayer AG, West Germany,

Bristol-Myers, Syracuse New York,

Hoeschst AG, Frankfurt, West Germany,

Kanebo Ltd., Osaka Japón

Ciba-Geigy, Basel Switzerland

Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana

Laboratoire Pfizer S.A.R.L., Orsay, France.

Merk and Company Inc. Rahway New Jersey

Suminoto Chemical Industries Company Ltd., Kitahama Osaka Japón.

Takara Shuzo Company Ltd., Shijodori, Kyoto, Japón

Takeda Chemical Industries Higashi-ku, Osaka, Japón

Tanabe Seiyaku, Ltd. Higashi-Ku Osaka, Japón

Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan

Wyeth Laboratories, Philadelphia, Pennsylvania

En México existen 5 industrias dedicada a la producción de antibióticos que son las siguientes:

Beneficiadora e industrializadora, S.A. de C.V., Carretera México-Laredo.

Fermentaciones y síntesis, S.A.

Fermic, S.A. de C.V. Ixtapalapa, México

Orsabe, S.A. Cuernavaca, México

Quinonas de México, Cd. de México.

## 4 PRODUCCION DE ÁCIDOS ORGÁNICOS

### 4.1 INTRODUCCIÓN

Los ácidos orgánicos son ácidos producidos por la fermentación de microorganismos debido a su metabolismo.

En términos de producción mundial los ácidos orgánicos más importantes son el ácido cítrico y el ácido láctico que en 1980 tuvieron una producción de 300,000 toneladas y 40, 000 toneladas respectivamente.

Todos los ácidos orgánicos con excepción del ácido giberelico y el láctico pueden ser clasificados dentro de dos grupos:

- 1.- Compuestos que se encuentran relacionados con el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. es decir pueden ser producidos a partir de una gran variedad de productos
- 2.- Compuestos contenidos directamente por oxidación de la glucosa.

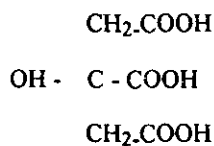
Entre los ácidos más importantes encontramos a los siguientes:

Acido acético	Ácido cítrico	Acido láctico	Ácido gluconico
Acido itacónico	Ácido fumárico	Acido propionico	Ácido giberilico
Acido málico	Ácido tartárico		

### 4.2 ÁCIDO CÍTRICO

#### 4.2.1 Generalidades

El ácido cítrico tiene la siguiente fórmula:



Fue aislado por Scheele en 1784 del zumo de limón, en forma de sólido cristalizado.

#### 4. ÁCIDOS ORGÁNICOS

---

En forma natural se encuentra en los cítricos, piña, pera, melocoton, higo y otros, antiguamente el ácido cítrico se obtenía por extracción, en 1922 Italia, el principal productor acaparó la producción con el 90%, pero a partir de 1927, la obtención por este método bajo debido en parte a la producción de ácido por fermentación.

En 1823 en Nueva York se instaló la primera planta para la producción de ácido cítrico a nivel industrial.

Whelmer en 1893 fué el primero en describir al ácido cítrico como un producto de la fermentación de mohos. Dos de estos, que él designó como *Citromyces pfefferligus* y *Citromyces glaber*, producían el ácido a partir de soluciones nutritivas de sacarosa que contenían carbonato de calcio más tarde Whelmer dio a conocer la formación de ácido cítrico por *Penicillium luteum* y *Mucor piriformis*; pero es interesante observar que él creía que los aspergilos negros solo producían ácido oxálico

En 1917, Currie, del Departamento de Agricultura de Estados Unidos, publicó los resultados de una importante investigación sobre la producción de ácido cítrico por una variedad de *Aspergillus niger*.

##### 4.2.2 Mecanismos Bioquímicos

El ácido cítrico se forma por condensación de ácido oxalacético con acetil-coenzima A, ambos derivados del piruvato, para obtener altos rendimientos a partir de azúcar se requiere de la carboxilación con  $\text{CO}_2$  de una molécula de piruvato, liberada por la decarboxilación de otra molécula de piruvato, para formar acetil-CoA.

Existen dos mecanismos de control por producto final, a) al formarse el ácido cítrico este inhibe la enzima fosfofructoquinasa que produce dos moléculas de piruvato e interrumpe el proceso y b) la producción de aspartato inhibe la piruvato carboxilasa que produce oxalacetato y finalmente el ácido cítrico.

Debido a que el ácido cítrico se acumula solamente cuando las concentraciones de

manganeso y hierro son bajas, es necesario pretratar los medios a menos que sean utilizados materiales muy puros, los jarabes de glucosa se pueden tratar por intercambio iónico, mientras que las melazas de caña y remolacha se tratan con ferrocianuro para precipitar los metales pesados

#### 4.2.3 Microorganismos dependiendo de la materia prima

*Aspergillus niger*, *A. wentii*: Melazas de caña, sacarosa

*Aspergillus niger*: Melazas de remolacha con carbonato cálcico, pulpa de caña o remolacha con solución de azúcar, sacarosa, melaza, fructosa, glucosa, melazas purificadas, jarabe de azúcar de maíz.

*Aspergillus mucor*: Solución de melaza.

#### 4.2.4 Procesos de producción

##### 4.2.4.1 CULTIVO SUPERFICIAL

Existen varios factores importantes en la producción por fermentación de ácido cítrico como son: el pH, temperatura volumen, oxígeno, sales inorgánicas:

- Organismos: Como ya se especificó anteriormente, los hongos de *Aspergillus* son capaces de producir ácido cítrico, y aunque son los más utilizados algunos dan pequeños rendimientos, otros producen también sustancias indeseables, otros a causa de sus características inestables, no resultan satisfactorios para el empleo a escala comercial

Se han empleado con buenos resultados: *Aspergillus niger*, *A. clavatus*, *Penicillium luteum*, *P. citricum*, *Paecilomyces divicicatum*, *Mucor piriformis*, sin embargo solo las razas de *A. niger* dan los mejores resultados

- Azúcares: Por lo general los mejores resultados se han obtenido con sacarosa y fructosa, prefiriéndose para fermentaciones industriales y en segundo término la maltosa y las melazas, la concentración óptima de azúcares son de concentraciones de 14 al 20 %.

#### 4. ÁCIDOS ORGÁNICOS

- Sales minerales: Las sales que son necesarias poner en el medio de cultivo son: nitrógeno, potasio, fósforo, azufre, magnesio. El nitrato de amonio en concentraciones mayores de 2.50g por litro causa la formación de una capa gruesa en la superficie del líquido. El sulfato de magnesio en cantidades superiores a 30g por litro favorece la esporulación. En general se obtienen mayores rendimientos en ácido cítrico cuando las capas de hongos son finas y la esporulación es muy ligera, estos resultados se logran con una cantidad mínima de sales inorgánicas, la restricción en el abastecimiento de nitrógeno tiende a aumentar la producción de ácido cítrico
- pH: Los mohos crecen mejor en valores de pH bajos, a través del proceso de producción es importante mantener el pH en los valores bajos, que van desde 1.60 a 2.20, al principio de la fermentación las sales tienen una influencia importante en la regulación y a medida que el proceso avanza también se controla en base a su producción de ácido, por lo general los valores bajos de pH inhiben la producción de ácido oxálico, en realidad cuando se utilizan las condiciones más favorables, se inhibe la producción de ácido oxálico.
- Oxígeno: El aire en grandes cantidades tiene un efecto perjudicial sobre el rendimiento de ácido cítrico, sin embargo el paso de pequeñas cantidades no es perjudicial, cada instalación ha de regularse al valor óptimo determinado previamente.
- Relación entre área superficial y volumen: En la fermentación cítrica, la conversión de azúcar es efectuada por las enzimas intracelulares y por lo tanto, tiene lugar dentro de las células vivas que constituyen la película de hongos. El azúcar pasa al interior de las células por osmosis y por consiguiente tanto este proceso de difusión como el enzimático determinan la longitud y el periodo de fermentación. En base a esto se determina la relación de área superficial a la que corresponda el menor periodo de fermentación y la cantidad mínima no transformada a ácido cítrico, la agitación del medio, aún muy ligera, hace disminuir la velocidad de producción.
- Temperatura: La temperatura depende del microorganismo empleado y las condiciones

de fermentación, generalmente se emplean temperaturas de 25 a 30 grados centígrados y la temperatura óptima de desarrollo es de 26 a 28 grados centígrados

Las soluciones nutricias estériles azucaradas se inoculan con esporas de mohos y se incuban en bandejas a la temperatura más favorable para la fermentación. Las esporas empiezan a germinar después de algunas horas y al cabo de 2 a 5 días la superficie esta cubierta con una fina capa de micelio. Con ello se verifica a gran velocidad la producción de ácido cítrico y la fermentación suele completarse en 7 u 8 días.

Bajo estas condiciones se han obtenido rendimientos máximos de 90.7% de ácido cítrico a partir de glucosa (referido a la cantidad de azúcar consumida), en una fermentación de superficie que tienen una duración de entre 7 a 10 días, en instalaciones industriales se han obtenido rendimientos de hasta el 87%

En una fermentación normal la acidez total aumenta hasta el noveno o décimo día y entonces habrá del 7 al 8 % de ácido cítrico y menos del 1 % de ácido oxálico, el ácido cítrico se degrada a menos que sea recuperado con suficiente rapidez tras su producción.

Al final de la fermentación se desagua la solución y se prensa la capa de mohos para separar el ácido. En una solución neutra caliente se precipita el citrato cálcico. El precipitado se trata con una cantidad equivalente de ácido sulfúrico para liberar el ácido cítrico, que se recupera por separación del sulfato de calcio.

En otro método, el azúcar no convertido puede ser fermentado por una levadura, cristalizando directamente al ácido cítrico.

#### 4.2.4.1.1 Tipos de producción.

##### a) A partir de melazas de caña

Si la melaza no se ha pretratado los rendimientos son menores, se utiliza *A. niger* a concentraciones óptimas de 25% a 33%, el pH natural inicial de la melazas, comprendido entre 5 y 5.5, es el más adecuado para la fermentación, la temperatura debe estar comprendida entre

#### 4. ÁCIDOS ORGÁNICOS

20 y 28 °C. Un ejemplo se puede ver en la figura 4.1

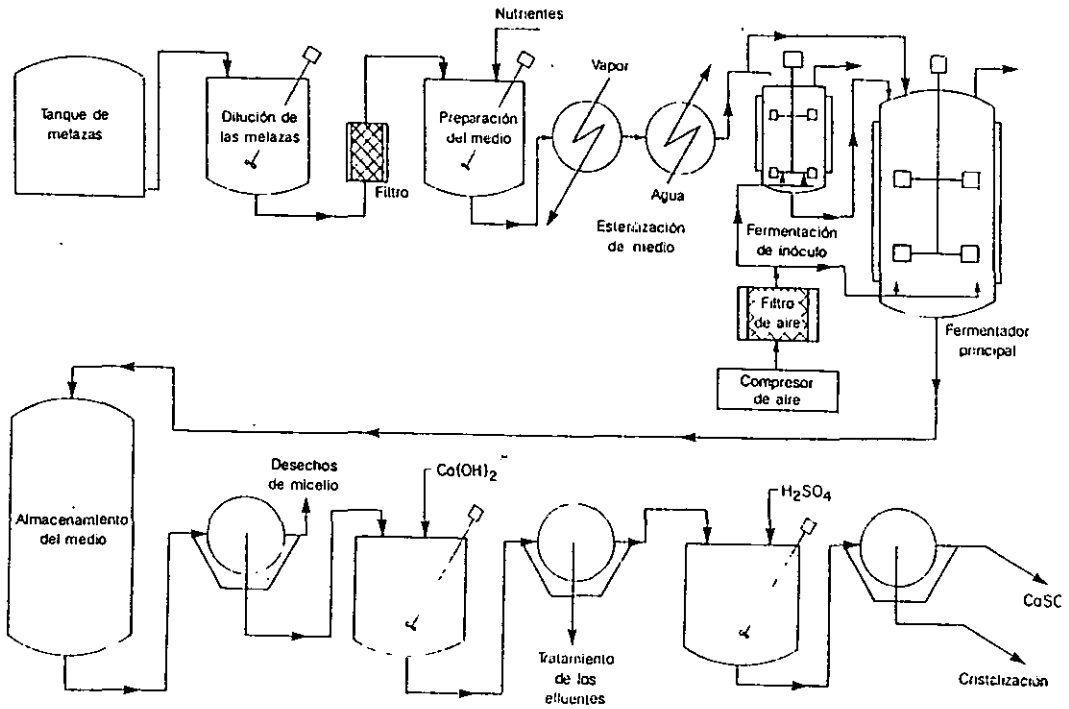


Figura 4.1 Proceso de producción de ácido cítrico utilizando melazas

## b) Método de Cahn

Consiste en impregnar materias sólidas, como pulpas de caña o de remolacha con soluciones de azúcar-sacarosa o melazas. La fermentación se produce rápidamente por toda la superficie a una temperatura de 20 a 35 °C y suele estar terminada a los 4 días o antes. El rendimiento en ácido cítrico es de un 55% referido a la sacarosa originalmente presente o de un 45 % si se refiere al azúcar de las melazas

c) Utilizando *Mucor*

Las soluciones de melazas pueden fermentar por un moho de la especie *Mucor*, con la adición de 1 % de sulfato de amonio, ajustado a un pH de 4 e incubado a 28 grados durante 7 días, produce un 33% de ácido cítrico referido al peso de azúcar.

## 4.2.4.2 Cultivo Sumergido

Esta fermentación se lleva a cabo a 30 °C, se produce calor y se necesita de algún grado de refrigeración, se pueden usar una gran variedad de sustratos como la melazas de remolacha, melazas de caña, almidón de maíz, jarabe de maíz, glucosa y sacarosa.

Se utiliza preferentemente una raza de *A. wentii* que produce los mayores rendimientos de ácido cítrico en cultivo sumergido, la colonias producidas por este moho son de aspecto globular, pero en ocasiones pueden ser cintiformes.

El siguiente medio es un medio óptimo para el crecimiento de *A. wentii* y la producción de ácido cítrico:

Sacarosa	150 g
Urea	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0.5 g
KCl	0.15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.08 g
MnSO <sub>4</sub> -4H <sub>2</sub> O	0.02 g
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0.01 g
Agua destilada	
pH ajustado con HCl a 2.0	

Una vez que se ha inoculado el moho en el medio de cultivo se le deja reposar durante



#### 4. ÁCIDOS ORGÁNICOS

---

12 a 18 horas antes de comenzar la agitación y la oxigenación, ya que de otra forma son menores los rendimientos.

- Oxígeno: El oxígeno tiene un efecto profundo sobre la producción de ácido cítrico, los mejores rendimientos se obtienen cuando se pasa oxígeno por cultivos sumergidos, los cultivos aireados producen rendimientos mayores, el dióxido de carbono en concentraciones de 5 al 15 % inhiben la producción de ácido cítrico.
- pH: Otro factor es la neutralización parcial del ácido cítrico con carbonato de calcio que aumenta la producción, si el ácido se neutraliza completamente se forma ácido oxálico en lugar de ácido cítrico.

Al final de la fermentación, que dura de 6 a 15 días, el organismo se separa por filtración o por centrifugación. El ácido cálcico se precipita del filtrado por adición de cal, como citrato cálcico tetrahidratado insoluble. Las sales cálcicas filtradas y lavadas se descomponen con ácido sulfúrico y el sulfato cálcico se filtra. La solución conteniendo el ácido cítrico se concentra por evaporación y se obtienen cosechas de cristales de forma convencional. El ácido se extrae en el solvente a baja temperatura y es re-extraído en agua a temperatura más alta. La solución purificada se concentra y cristaliza entonces en forma normal.

##### 4.2.4.2.1 Tipos de producción en cultivo sumergido

a) Método de Szaes: En este método el moho se cultiva primero en una solución, inoculada con esporas pregerminadas, micelio o papilla de micelio desmenuzada de *A. wentii*. Se pasa a través del medio un gas que contenga oxígeno estéril y en dispersión fina, al tiempo que se agita. Tras suficiente desarrollo del medio de crecimiento, se coloca en un segundo medio, conocido como solución de fermentación, esta tiene un glucídico que no contenga derivados fosfóricos asimilables, pues estos retardan la formación de ácido cítrico, la solución de fermentación se agita y se pasa por una solución en forma finamente dividida y con o sin sobrepresión un gas que contenga oxígeno, se puede añadir a la solución carbón activado,

ácido ascórbico u otros aceleradores que actúan como transportadores del oxígeno. Una vez concluida la fermentación, el micelio se separa de la solución y se usa en una o más fermentaciones sumergidas adicionales. En la Figura 4.1 se puede ver un proceso de producción de ácido cítrico a partir de melazas.

#### 4.2.5 Usos

El ácido cítrico se emplea en la industria alimentaria con diversas finalidades entre las cuales están: saborizante, aromatizante, en bebidas no alcohólicas, dulces, mermeladas y jaleas como conservador, estabilizador en alimentos congelados y en general para evitar el pardeamiento no enzimático de los alimentos.

En medicina se emplea como materia prima y en la industria para la producción de tintas, en las tintorerías y en estampados.

### 4.3 ACIDO ACÉTICO

#### 4.3.1 Generalidades

El ácido acético tiene la siguiente forma:



Es uno de los ácidos más sencillos y de mayor distribución, comúnmente conocido como vinagre, obtenido de la fermentación de manzanas, uvas, peras, melocotones, ciruelas, higos y naranjas, toda clase de bayas, miel, jarabes azucarados, materias feculentas hidrolizadas, cerveza y vino.

En un vinagre se puede encontrar junto a 4 g de ácido acético por cada 100 mL, pequeñas cantidades de alcohol, glicerina, ésteres, azúcares reductores (azúcares invertidos) pentosanas, sales y otras sustancias.

El vinagre se obtiene por medio de una fermentación alcohólica a partir de sustancias azucaradas, seguida por una fermentación acética.

#### 4. ÁCIDOS ORGÁNICOS

---

La palabra vinagre se deriva del término francés vinagre que significa vino agrio, se fabrica dejando que el vino se acidifique en condiciones controladas.

Aunque hace miles de años que se conoce el vinagre, no se determinó la naturaleza microbiana de su producción hasta hace poco más de cien años, cuando Kützing (1837) dio a conocer que la conversión de etanol en ácido acético era llevada a cabo por microorganismos vivos.

Pasteur en 1868, confirmó la opinión de Kützing y demostró la naturaleza fisiológica de la fermentación acética, pero Pasteur creía que esta fermentación era ocasionada por una sola especie de bacterias, *Mycoderma aceti*

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



En la producción de vinagre hay dos tipos de cambios bioquímicos

- a) Fermentación alcohólica del carbohidrato
- b) Oxidación de alcohol a ácido acético

##### 4.3.2 Microorganismos usados

Las bacterias que producen el vinagre se les conoce como bacterias acéticas que pertenecen a la familia *Acetobacter*, pueden ser móviles o inmóviles y no forman endosporas, pueden tomar energía de la oxidación de etanol o ácido acético o de varios azúcares o alcoholes y también de procesos catabólicos anaerobios.

Precisan de ciertas vitaminas del complejo B junto con un abastecedor de nitrógeno, otro de carbono y de minerales básico. Necesitan Tiamina, Pantotenato, nicotinato y p-aminobenzoico, las necesidades de vitamina de los *Acetobacter* son satisfechas generalmente con el uso de agua o extracto de levadura autolisada, extracto o brote de malta o líquido de remojo de maíz.

Los aminoácidos parecen ser fuente adecuadas de nitrógeno para las especies de *Acetobacter*,

Valina, isoleucina, alanina, cistina, histidina y prolina son los requerimientos comunes.

Algunas pueden usar el metanol para producir polisacáridos.

#### 4.3.3 Producción

En la moderna fabricación del vinagre hay que considerar especialmente varios factores, la selección del microorganismo, la naturaleza de la materia prima, a concentración del etanol empleado así como la de vinagre añadido al principiar a fermentación, la cantidad de oxígeno suministrado, la naturaleza del medio de fermentación, la temperatura de fermentación, la maduración y conservación, la clarificación, embotellamiento y pasteurización y el carácter y composición de los depósitos recientes y materiales que se ponen en contacto con el vinagre.

El vino y el zumo de manzanas o la sidra son las mejores materia primas para la producción de vinagre, el vinagre preparado apartir de malta es muy corriente, mientras que el que procede de la miel es considerada como muy sabrosa, es evidente que la calidad del vinagre dependerá de la calidad de la materia prima.

Antes de que de principio la fermentación acética, el azúcar presente ha de convertirse en etanol por medio de una fermentación con levadura, estas fermentaciones pueden realizarse favorablemente a temperaturas de entre 24 y 27 °C.

Debido a que previamente se realiza una fermentación alcohólica el ajuste del contenido en alcohol en el medio antes de iniciar la fermentación es uno de las maneras de asegurar a concentración fina apropiada, la concentración más aceptada varia entre 10 a 13 %, en concentraciones mayores se forma una cepa gelatinosa que ayude a la propagación de bacterias y la oxidación del etanol a ácido acético es incompleta.

La acidificación inicial tiene dos objetivos; inhibir el desarrollo de bacterias perjudiciales y suministrar los tipos adecuados para la inoculación, la cantidad de vinagre añadida al iniciar es de aproximadamente 10 a 25 % en volumen de vinagre fuerte.

Una de las características de la familia de bacterias acéticas es el intervalo de temperaturas en que se desarrollan, a 34 °C es su temperatura óptima, bajando la temperatura la fermentación

#### 4. ÁCIDOS ORGÁNICOS

se hace más lenta y a temperaturas altas aumentan las pérdidas por evaporación de etanol, ácido acético y otras sustancias volátiles que son importantes en la producción del sabor y el aroma.

La clarificación se efectúa por medio de filtración, antes de almacenaje ha de permitirse que se verifique completamente la fermentación para que el vinagre tenga su máxima fuerza. Si después de esto no se impide la acción de las bacterias, por exclusión de oxígeno o por otros medios, aquellas destruirán gradualmente el vinagre, para evitarlo se llenan completamente los barriles o depósitos en que se almacena el vinagre, cerrándolos herméticamente para impedir el acceso del aire.

Durante la maduración se mejora el aroma y la limpieza especialmente en los vinagres hecho de vino o de zumo de frutas. Con la formación de esteres desaparece el sabor áspero del producto reciente debido a la oxidación de algunos compuestos presentes en el vinagre y puede requerir de hasta un año.

Al embotellar el vinagre el cierre debe ser hermético para evitar la entrada al aire, para efectuar la pasteurización se calientan las botellas a temperatura de 60 a 66 °C durante unos minutos o hasta que la temperatura del vinagre haya alcanzado al menos 60 °C.

##### 4.3.4 Rendimientos

Apartir de 100 partes de azúcar se obtendrán de 50 a 55 partes de ácido acético o sea 1.26 g de ácido acético apartir de 1 g de etanol. Una parte del azúcar se consume en la producción de sustancias diferentes del etanol y también como alimento de la levadura.

##### 4.3.5 Usos

En los alimentos se emplea con diversos fines como condimento de mesa o de productos ya preparados ( mayonesa, mostaza, salsa aderezos, etc.), para impedir el crecimiento de mohos en el pan, en la fabricación de conservas, etc. También puede emplearse en vinagre como antiséptico.

---

#### 4.4 ÁCIDO LÁCTICO

##### 4.4.1 Generalidades

Su fórmula es: COOH

H C OH

CH<sub>3</sub>

El ácido láctico era conocido como componente de la leche agria y el que en general le da su sabor característico a los productos fermentados de origen lácteo.

Fue descubierto en 1780 por un químico sueco llamado Scheele en la leche agria

Avery fué el primero en producir ácido láctico a escala industrial en 1881 y desde ese entonces ha adquirido gran importancia, actualmente se produce apartir de azúcar de maíz, melaza y suero.

El ácido láctico se presenta en dos formas ópticamente activas los isómeros D y L y una forma ópticamente inactiva producto de la mezcla de las dos formas DL, el ácido láctico formado durante la fermentación es de forma DL, que puede ser convertido a una forma ópticamente activa por medio de la racemización efectuada por un sistema enzimático compuesto por *C. acetobutiricum* y *butilicum*. También se puede lograr la conversión de un ácido láctico ópticamente activo a uno inactivo mediante a utilización de bacterias lácticas.

##### 4.4.2 Microorganismos utilizados

Los microorganismos que pueden emplearse para la producción de ácido láctico por fermentación son: *L. delbrueckii*, *L. pentosus*, *L. casei*, *L. leichmani*, *L. bulgaricus* *S. lactis*, todos ellos de tipo homofermentativo o sea que su producto final es el ácido láctico, por lo que la elección del sustrato a utilizar dependerá del microorganismo que se utilice para la fermentación, en general se emplean glucosa, sacarosa y lactosa, las féculas de maíz y papa pueden hidrolizarse a maltosa y glucosa.

La fermentación láctica se lleva a cabo a temperaturas altas, dependiendo de

#### 4. ÁCIDOS ORGÁNICOS

---

microorganismo si se emplea *L. bugarius* la temperatura oscila entre 4 a 50 ° C y si se utiliza *L. casei* o *L. lactis* alrededor de 30 °C

##### 4.4.3 Medios de cultivo

La concentración de azúcar en los mostos se ajusta de 5 al 20 % según la naturaleza de la materia prima y las condiciones de proceso, por lo general las bacterias que realizan este tipo de fermentación suelen ser de tipo microaerofilicas o anaerobias

La fermentación se lleva a cabo más rápidamente cuando el pH se encuentra dentro de la zona ácida pero más cercano a la neutralidad (5.8), para mantener este pH a través de la fermentación se le puede añadir un agente neutralizante como el carbonato de calcio, hidróxido de calcio etc., el pH se puede mantener en un valor constante por regulación continua, lo que incrementa el rendimiento y la velocidad de producción.

En una fermentación regular se necesitan de 5 a 6 días para completar la fermentación con un rendimiento de 85 a 90 % en relación con el azúcar fermentada.

Es necesario agregar al medio riboflavina, las vitaminas del complejo B pueden ser añadidas en forma de extracto de levadura, y brotes de malta y ácido nicotico que estimula el crecimiento.

##### 4.4.4 Proceso general de producción

El proceso del ácido láctico se puede considerar como uno de los primeros procesos de fermentación industrial donde se controlan las condiciones del mismo.

Para la elección del sustrato fermentativo debe considerarse la disponibilidad, su fermentabilidad, el microorganismo a usar, si tiene o no tratamiento preliminar y su costo.

El *Lactobacillus delbrueckii*, es uno de los mejores microorganismos en la producción, esta bacteria es homoláctica y su temperatura óptima de crecimiento es de 45 a 48 °C, la producción se facilita iniciando la fermentación de un medio relativamente simple, si el carbohidrato a fermentar es glucosa, sacarosa o maltosa, como ocurren en las melazas y en los

hidrolizados de almidón se obtiene ácido acético de elevada calidad, el cual se debe extraer con un disolvente, el almidón como material crudo debe ser previamente hidrolizado, enzimáticamente o por medio de ácido, por que el *Lactobacillus* no tiene enzimas aminolíticas, lo que significa un costo adicional a la producción.

Después del tratamiento previo se calienta de 90 a 95 °C por 1 hr, la temperatura luego se reduce a 50 °C, se inocula con *Lactobacillus delbrueckii* y se va neutralizando a medida que avanza a fermentación con CaCO<sub>3</sub>, durante la mayor parte de la fermentación la temperatura se debe mantener a 48-50 °C y en continua agitación para prevenir la precipitación de carbonato de calcio, la producción de ácido láctico se realiza en fermentadores con capacidad de 20 a 300 m<sup>3</sup>, la fermentación generalmente lleva 6 a 7 días y son normales los rendimientos del 80 a 90 g de ácido láctico por cada 100 g de sustrato inicial

#### 4.4.5 Aislamiento

En la mayor parte de la producción de ácido láctico este se presenta en forma de lactato cálcico. Antes de la separación de la biomasa y otras sustancias insolubles, el caldo de fermentación se calienta para solubilizar todo el lactato. El resultado del filtrado es tratado con Ácido sulfúrico para liberar el Ácido láctico, formándose el sulfato de calcio, la purificación entonces depende de la aplicación final que se le vaya a dar, que puede ser con carbón activado, por intercambio iónico o electrodiálisis, extracción con solventes o purificación vía etil- o metil- eter

El procedimiento más sencillo es la solución de ácido láctico filtrada y posteriormente tratada con carbón activado en caliente y evaporada hasta una solución del 50 %, cuando el sustrato de la fermentación es muy impuro, por ejemplo con melazas de remolacha, se utiliza el intercambio iónico o la extracción con solventes

Alternativamente el ácido láctico se convierte en un ester volátil que se destila fraccionadamente para conseguir la purificación, la hidrólisis del ester, seguida por la



#### 4. ÁCIDOS ORGÁNICOS

---

evaporación, da un producto prácticamente como el agua

##### 4.4.5.1 PRODUCCIÓN A PARTIR DE AZÚCAR DE MAÍZ

El medio de cultivo contiene 15 % de azúcar de maíz .375% de brotes de malta .25% de fosfato diamónico 74.375 % de agua y 10 % de carbonato de calcio, como neutralizante, los tanques de cultivo se cargan con 17 L de mosto y se mantienen a 49 °C por circulación de agua a través de camisas de acero inoxidable en los tanques de cultivo y de serpentines del mismo material en los fermentadores. El inoculante *L. delbrueckii*, se prepara pasando desde el tubo de cultivo a un frasco de 500 mL, y luego a otro de 6 litros y de allí a un tanque de cultivo, el curso de la fermentación se debe seguir a diario comprobando el nivel de azúcar reductor del medio y su pH, se considera que la fermentación es completa cuando los azúcares descienden hasta .10%, lo que requiere de un tiempo aproximado de 4 a 6 días, al final de la fermentación la masa se calienta a 82.2 °C para destruir las bacterias y dar fin al proceso fermentativo.

##### 4.4.5.2 PRODUCCIÓN A PARTIR DE SUERO DE LECHE

El suero pasteurizado se inocula con *L. bulgaricus*, se mantienen a temperatura de 43 °C durante toda la fermentación que dura aproximadamente 42 horas, cada 6 horas se le añade cal viva en forma de lechada para neutralizar el ácido láctico y mantener la acidez del caldo por debajo del .6%.

El medio fermentado, de color verde pálido se calienta a 96 °C para coagular la lactoalbumina, dejándola sedimentar, lo que lleva un tiempo de aproximadamente 10 minutos, después de lo cual se decanta el líquido sobrenadante que pasa a un filtro prensa, después de lo cual la alcalinidad se ajusta a .1%, añadiendo un ayuda-filtro, como tierra de diatomeas y carbón decolorante, se agita la mezcla y se deja después en reposo; al cabo de 15 minutos se decanta el líquido que sobrenada y se vuelve a pasar por un filtro prensa.

El filtrado crudo puede ser almacenado en un depósito o bien concentrado en un evaporador a presión reducida de 120 mm de Hg hasta 16° brix y se lleva en cuba a

cristalización, esta se logra por medio de refrigeración con agua hasta que se enfría a una temperatura de 10 a 15 °C, cristalizando totalmente el lactato cálcico al cabo de 10 o 12 horas, seguida por sucesivos lavamientos concentraciones y recristalizaciones para purificarlo.

#### 4.4.5.3 PRODUCCIÓN POR MOHOS

En 1934 se publicaron los resultados de un trabajo en el que se empleó una especie de *Rhizopus* con el cual se obtuvieron rendimientos de 40 % a partir de azúcar invertido y almidón, la concentración óptima del medio es de 15% de azúcar y 4 % de carbonato cálcico, como fuente de nitrógeno se puede utilizar, cloruro de amonio nitrato de amonio, sulfato de amonio, glicocola, peptona y urea.

La temperatura de fermentación es de 30 °C y tarda un periodo de 16 a 21 días con un rendimiento de 62 a 67% de ácido láctico, las ventajas de esta producción son que al usar urea como fuente de nitrógeno se obtiene un ácido incoloro y de gran pureza, las sales de ácido láctico se recuperan fácilmente.

#### 4.4.6 Usos

El ácido láctico se utiliza en la industria de los alimentos como acidulante para alimentos y bebidas, como preservador de alimentos, como aditivo en bebida suave, esencias, extractos, jugos de fruta, mermeladas, jarabes, encurtidos, enlatados, también se utiliza en la producción de queso, en la leche materna para aumentar su digestibilidad y en las levaduras en polvo.

En la industria farmacéutica se utiliza como sales de ácido láctico (como sales de Ca y Fe) con una pureza mayor del 90%

En la industria química se utiliza en la síntesis de plásticos, disolventes y productos químicos y en la industria textil se usa para el descalcado de pieles durante el curtido.

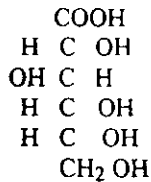
#### 4. ÁCIDOS ORGÁNICOS

---

##### 4.5 ÁCIDO GLUCÓNICO

###### 4.5.1 Generalidades

Su formula es:



Este ácido es producido por la oxidación del grupo aldehído de la glucosa. En 1978 Boutroux, observo la producción de ácido gluconico por *Acetobacter aceti*, creyendo que era ácido láctico pero dos años más tarde se identifico como ácido glúconico, el 1922 Molliaid, produjo ácido gluconico de la fermentación de *Aspergillus niger* y en 1924 Brenhaver, lo produjo a temperaturas bajas con escaso abastecimiento de nitrógeno, en gran escala.

###### 4.5.2 Producción

Para el proceso de fermentación, el medio consiste en una solución de hasta 40 % peso en volumen de glucosa monohidrato que contenga fuente de nitrógeno, fosfato, potasio magnesio y elementos traza, también pueden ser utilizados líquidos de maceración de maíz o extracto de levadura.

El sustrato es inoculado con una suspensión de esporas de *A. niger* o con aprox. 10 % de un inculo vegetativo pre-crecido, obtenido por germinación de dicha suspensión de esporas en un medio similar al medio de fermentación, la fermentación se lleva a cabo en tanques aireados y agitados con acero inoxidable con contracorriente provistos de control de pH y temperatura.

El proceso de fermentación se lleva a cabo aproximadamente a 30 °C, a medida que avanza la fermentación se añade un álcali para que la fermentación no se inhiba.

Entre los nutrientes que se deben adicionar o que el sustrato debe tener están el magnesio, potasio, fósforo, nitrógeno, y calcio.

Por lo general puede obtenerse por dos métodos

a) Método de bandejas planas

b) Método sumergido mediante aire a presión

A) Método de las bandejas: Se utiliza glucosa como sustrato y *A. niger*, durante la fermentación se desarrolla un velo miceliano que no debe ser removido sino hasta que termina la fermentación, tiene un mayor tiempo de fermentación.

B) Método de cultivo sumergido: en este caso se utiliza agitación, aireación y con adición de carbonato de calcio, se inocula con las esporas después de esterilizar el micelio, a través del fondo se pasa aire filtrado y humidificado a una velocidad regulada de 375 mL/ min., proporcionando así agitación y aireación, de esta forma se obtiene un rendimiento del 80 al 87 % de ácido gluconico a una temperatura de 30 °C, manteniendo constante la presión del aire a 2 atm. Al finalizar la fermentación cuando solo queda 1 % de glucosa sin convertir, se reduce la presión del fermentador a la atmosférica durante 35 min, en este intervalo la mayor parte del micelio asciende a la superficie, después de esto se separa el 80 % de la carga por la parte inferior, sustituyéndola por una cantidad igual del líquido nuevo, la parte remanente contiene más del 85% del micelio que ha quedado flotando sobre la superficie, en estas condiciones suele completarse la fermentación en menos de 9 horas.

Las ventajas de este proceso estriba en la eliminación del periodo perdido en los métodos ordinarios por el empleo repetido del micelio, así como por la eliminación de la necesidad de preparación del inoculante pregerminado y una mayor velocidad de oxidación de la glucosa a ácido gluconico.

#### 4.5.3 Recuperación del producto

Cuando se utiliza carbonato de sodio como agente neutralizante y las concentraciones no son demasiado altas para que el gluconato cálcico permanezca en solución, el micelio se elimina por filtración y adición de ácido sulfúrico. El sulfato de calcio precipitado se elimina por filtración y el ácido gluconico se evapora hasta una solución del 50 % de peso en volumen.

Cuando se utiliza hidróxido de sodio para neutralizar el Ácido de la fermentación, los

#### 4. ÁCIDOS ORGÁNICOS

---

iones sódicos pueden ser eliminados mediante intercambio catiónico.

Otra forma es filtrar primero el micelio, se ajusta el pH hasta la neutralidad y el gluconato sódico se cristaliza por evaporación.

##### 4.5.4 Usos

El ácido gluconico es utilizado como agente acomplejante particularmente para el calcio en formulaciones de detergentes, se emplea como agente que libera acidez lentamente en preparaciones desecadas para panadería.

El gluconato y fosfogluconato ferroso se usan en la quimioterapia, gluco-gama-lactona es un buen agente secuestrante en medio alcalino para hierro, aluminio y cobre. También el gluconato sódico se usa en la industria lácteas como un limpiador para evitar la formación de sedimentos lácteos y como componente de los limpiadores de las cántaras de leche. Se usa también en mezclas limpiametales, así como en estampado de textiles, tratamientos de cuero y en fotografía. El ácido gluconico, gluco-gama-lactona y gluconato de amoníaco son componentes de catalizadores ácidos o acidógenos.

#### 4.6 ÁCIDO GIBERILICO

##### 4.6.1 Generalidades

Su fórmula es:  $C_{19}H_{22}O_6$

Es fácilmente soluble en metanol, acetona, disolución de bicarbonato sódico y de acetato sódico. Solo es escasamente soluble en agua y éter, es producido en el metabolismo normal de las plantas como una hormona que favorece la madurez, en mayores cantidades es producido por *Piricularia oryzae*, un hongo que causa una enfermedad en los plantales de arroz a la que suele denominarse "enfermedad de los brotes".

##### 4.6.2 Producción

En 1954 se anunció la producción del ácido usando sacarosa como medio de sustrato,

en 1955 se obtienen rendimientos del 40 mg por litro en 14 días a 25 °C usando el medio de Raulin-Thomp que contenía 2.5% de sacarosa con un pH inicial ajustado a 5. Con el método sumergido los rendimientos aumentaron a 200 mg por litro. La producción se inicia durante la fase de crecimiento del micelio activo, sin embargo el 75 % del ácido se acumula una vez que se ha alcanzado el máximo peso seco del micelio, durante este período ha cesado la rápida fijación de azúcar y nitrógeno amoniacal.

#### 4.6.3 Aplicaciones

El ácido giberílico puede aplicarse a cualquier parte de la planta en forma de pomada con lanolina y en concentraciones de hasta 1% o en soluciones acuosas ayudando a acelerar el crecimiento y maduración de frutos y semillas, se ha sugerido que podrían estimular el rápido crecimiento de ciertas plantas en las fases en que resultan particularmente propensas a las enfermedades, acelerar el desarrollo de plantas de crecimiento lento, incrementar el peso seco en el momento de la recolección de las cosechas de piensos y estimular la producción de semillas en plantas como las remolachas y coles.

También se hace más precoz la formación de flores y la producción de semillas y la formación de renuevos en plantitas forestales jóvenes tales como alce, álamo y roble y otras plantas mediante el uso de ácido giberílico.

Su uso queda restringido a cosechas de valor elevado que se puedan obtener en invernaderos o jardines por su costo.

### 4.7 ÁCIDO PROPIONICO

#### 4.7.1 Generalidades

Su fórmula es: 
$$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{COOH} \end{array}$$

#### 4. ÁCIDOS ORGÁNICOS

Existe una gran variedad de bacterias que producen ácido propionico a todas estas se les denomina bacterias propionicas se pueden caracterizar como bacterias Gram-Positivas no forman esporas, son inmóviles y aeróbicas facultativas, pueden aislar de la leche, queso y otros productos de mantequilla, forraje, suelo, excremento de ganado etc. *P. technicum* tiene la capacidad para fermentar almidón, dextrina y glucógeno.

##### 4.7.2 Producción

➤ Fuentes de carbono: las distintas especies de *Propionibacterium* emplean gran variedad de materias primas como fuente de carbono entre las que se encuentran: lactosa, sacarosa, maltosa, glucosa, rafinosa, arabinosa, xilosa, glucógeno, dextrina y almidón; Ácido láctico, tartárico y químico; glicerina y manitol; proteínas y sus derivados y grasas. Para la producción industrial de ácido propionico se emplea, naturalmente, lactosa e hidratos de carbono de bajo costo.

➤ Fuentes de Nitrógeno: se usa el extracto de levadura a una concentración de .4%, puede utilizarse peptonas, suero y harina de maíz, además de algunas vitaminas que debe tener el medio son vitaminas del complejo B , el pH óptimo es de 7.0 pero puede estar entre un rango de 6.8 a 7.2 a una temperatura de 30 °C, bajo estas condiciones la fermentación lleva de 7 a 12 días.

En este caso la producción no es homogénea, se producen diversos ácidos como ácido propionico, acético y dióxido de carbono, pequeñas cantidades de ácido succinico, generalmente puede suponerse que más del 75 % de azúcar fermentado pasa a ácido propionico y acético.

##### 4.7.3 Aplicaciones

Las bacterias propionicas determinan el gusto y el aroma de productos fermentados en especial del queso Emmenthal, también se emplea en la fabricación de perfumes, mezclado con Ácido acético se utiliza como disolvente.

---

#### 4.8 ÁCIDO ITACÓNICO

Su fórmula es: 
$$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ | \\ \text{C} \text{ COOH} \\ | \\ \text{CH}_2 \text{ COOH} \end{array}$$

El ácido itaconico puro se presenta como un polvo blanco, cristalino con un punto de fusión de 165 a 166 °C y una densidad de 1.632, soluble en agua en una proporción de 8.3:100 a 20 °C y a 100°C 72.5:100. A partir de 1929 se produjeron un organismo al que se llamó *Aspergillus itaconicus*.

##### 4.8.1 Producción

El procedimiento de fermentación sumergida para la producción de ácido itaconico básicamente consta de a) la concentración regulada de azúcar, que no exceda de 7% 2) pH inicial inferior a 5 ajustado con ácido itaconico 3) una cantidad bastante grande de inoculante, se utiliza como fuente de nitrógeno sulfato de amonio.

La concentración de azúcar ejerce una influencia crítica sobre el rendimiento y la velocidad, de acumulación de ácido debe ser inferior a 7% y superior de 5%, para preparar el inoculante el moho debe crecer durante dos días a 34 °C con agitación y aireación, la aireación puede variar entre .1 y .25 volúmenes de aire por volumen de medio por minuto, se recomienda una presión de 15 psig y una velocidad de agitación de 100 a 125 r.p.m., es importante controlar la espumación con octadecanol. Bajo estas condiciones se obtienen rendimientos máximos de 61 al 65 % en una fermentación de 3 días.

##### 4.8.2 Recuperación

Una vez concluida la fermentación se separa el micelio del hongo del líquido por filtración, después de lo cual se concentra al vacío a un volumen de 1/10 o 1/13, el ácido concentrado caliente se deja cristalizar en una caldera, los cristales de ácido itaconico se separan del líquido concentrado los cuales se lavan con una cantidad mínima de agua fría,



#### 4. ÁCIDOS ORGÁNICOS

---

después se desecan en una estufa a vacío y una temperatura de 52 °C

##### 4.8.3 Aplicaciones

Se usa en la industria del plástico y la pintura, también se utiliza como ácido libre o como ester para mejorar las propiedades de los polímeros de vinilo.

#### 4.9 ÁCIDO TARTÁRICO

Su formula es: HO - CH - COOH

Este ácido existe como dos formas ópticamente activas, es un ácido que puede ser producido por vía sintética en forma ópticamente activa, los métodos de fermentación dan en cambio rendimientos más bajos.

##### 4.9.1 Producción

Para producirlo se usan especies de *Acetobacter* con rendimiento de entre 30%, con la dificultad de que también se produce Ácido glicólico el cual inhibe la fermentación.

Los microorganismos pueden crecer en el caldo de pre-germinación, alternativamente también se pueden usar células intactas lavadas o en extracto acuoso o la enzima extraída en forma inmovilizada, el proceso puede llevarse a cabo a valores de pH desde 6 a 10 y a una temperatura de rango de 20 a 60 °C, la eliminación del producto de la solución permite que el equilibrio proceda más completamente en la dirección del tartarato.

##### 4.9.2 Recuperación

Si el ácido tartárico se produce en solución, las células o las enzimas inmovilizadas son eliminadas, el tartarato es precipitado como sal calcica que se filtra y lava y luego es tratado con ácido sulfúrico, el sulfato de calcio es eliminado por filtración y la solución acuosa de ácido tartárico se concentra y cristaliza, si el ácido tartárico se produce como sal calcica insoluble, el precipitado se recoge y se lava y el ácido tartárico es liberado, con este procedimiento se obtienen rendimientos de 75 % aprox.

## 4.9.3 Aplicaciones

El principal uso es como acidulante alimentario en el que se prefieren la mezcla racémica pues es mucho más soluble en agua, también para algunos usos industriales como el retraso en el fraguado de yeso.

## 4.10 ÁCIDO FUMÁRICO

Su fórmula es.  $\text{COOH CH} = \text{CH COOH}$

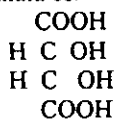
Es un ácido no saturado, producido por varios mohos principalmente por especies del género *Rhizopus*.

Este moho puede crecer y producir el ácido en un solo medio, pero es preferible que el moho crezca en una etapa en un medio especial y en condiciones dirigidas a fomentar el desarrollo y que el ácido se produzca en una segunda etapa usando un medio de remplazo, en condiciones que estimulen la producción de ácido que pueden tener lugar por métodos de cultivo superficial estacionario o por cultivo sumergido, el medio contienen material glucosídico (del 5 al 15%), nitrogenados (sales de amoníaco y urea), sales nutritivas y oligoelementos.

El medio se esteriliza por calor y se incuba con esporas, se incuba de 28 a 35 °C para fomentar el crecimiento del moho, de 2 a 7 días, en cultivo sumergido son necesarias de 24 a 60 horas para el desarrollo, se neutraliza con carbonato de calcio, debido a que necesita aireación el medio de fermentación se agita a 40 r.p.m. mientras se pasa una corriente de aire, con este procedimiento se obtiene un rendimiento de unos 6 kilogramos de ácido fumárico.

## 4.11 ÁCIDO MÁLICO

Su fórmula es:



#### 4. ÁCIDOS ORGÁNICOS

---

En la naturaleza se encuentra únicamente como Ácido L-malico, pero el microorganismo *Lactobacillus brevis* lo sintetiza en forma de racemato, ó sea las dos formas L y D

A un pH de 7 y 30 °C con agitación y aireación se le agrega ácido Fumarico que es convertido a ácido L-malico en 80 horas

Sus aplicaciones se encuentran en la industria de los alimentos como acidulante y preservador.

#### 4.12 OTROS ÁCIDOS

En la producción normal de ácido se producen en pequeñas cantidades en el metabolismo de entre los cuales se encuentran:

- Ácido Trans-L- exposuccinico, se produce en el metabolismo del ácido malico

-Ácido Butirico se debe a la presencia de *C. butyricum* puede ser causada por la descomposición de algún proceso, en forma instantánea, en la maduración del queso, industria panadera, en los enlatados o durante cualquier proceso de fermentación ácido láctica, puede ser utilizado para la producción de esteres en la industria del plástico y perfumes.

-Ácido 2-cetogluconico, se utiliza como material inicial en la síntesis química de Ácido eritorbico.

-Ácido eritorbico, que se utiliza en la industria alimenticia como antioxidante.

---

## 5 PRODUCCION DE VITAMINAS POR MICROORGANISMOS

### 5.1 INTRODUCCIÓN

Las vitaminas son sustancias orgánicas que son necesarias en cantidades determinadas para el funcionamiento de muchas formas de vida. Muchos organismos no pueden sintetizarla y por lo tanto deben obtenerlas de fuentes externas. Si no lo hacen entonces aparecerán signos de deficiencia.

El termino vitamina fue usado por primera vez en 1911 por Funk, que estuvo trabajando con el factor anti-beri-beri. El mostró que el factor era una amina esencial para vivir y por esto la llamo Vitamina, subsecuentemente el termino se extendió para cubrir todas las sustancias orgánicas (no solo aminas) que tienen las mismas características biológicas, por ejemplo aquellas que son esenciales para el crecimiento y el funcionamiento metabólico normal del organismo, aquellas que son activas a dosis muy bajas, que no tienen valor de energía natural, y que no pueden ser biosintetizados por el organismo. De esta forma no pueden ser confundidas las vitaminas y otras sustancias igualmente esenciales que son activas a pequeñas cantidades como los elementos traza, enzimas u hormonas.

Las vitaminas no solo son esenciales para el hombre, sino también para las plantas y microorganismos. La capacidad de sintetizarlas define los requerimientos nutricionales de vitaminas para una u otra especie.

Muchas vitaminas son producidas durante el metabolismo normal de los microorganismos, pero solo la riboflavina y la vitamina B<sub>12</sub> se producen de manera extensiva.

La producción de vitaminas ha llegado a tener una gran importancia en la industria alimentaria, puesto que las vitaminas en la actualidad se adicionan a muchos alimentos procesados y enriquecerlos de esta manera.

Las vitaminas pueden ser obtenidas por diversos métodos como la extracción, de fuentes animales o vegetales, por síntesis química o por biosíntesis, desde el punto de vista

---

## 5. VITAMINAS

económico la biosíntesis presenta grandes ventajas, apartir de los años '70 los procesos de biosíntesis se empezaron a desarrollar los procesos de fermentación a gran escala y en la actualidad se pueden producir varias vitaminas por este método pero la única vitamina producida así de manera comercial es la VitaminaB<sub>12</sub>

### 5.1.1 Necesidades diarias de vitaminas

Las necesidades metabólicas de una persona varían considerablemente, según el estado metabólico de cada una de ellas, por ejemplo, dependiendo del volumen del individuo, si hace ejercicio, si el sujeto esta en etapa de crecimiento, si esta enfermo, entonces tiene una necesidad mayor de vitamina.

#### Necesidades diarias

Vitamina	Necesidad diaria
A	1.7 mg
Tiamina	1.6 mg
Riboflavina	1.8 mg
Niacina	20 mg
Acido ascórbico	80 mg
E	Desconocida
K	Desconocida
B <sub>12</sub>	1.2 ug
Acido pantoténico	Desconocida
Biotina	Desconocida

Las vitaminas son generadas como subproductos del metabolismo intermedio de los microorganismos, así para que se lleven a cabo las reacciones se necesitan enzimas y coenzimas, las cuales actúan como mediadores entre dos enzimas, pues atraves de ellas hay intercambio de hidrógenos, electrones, grupos fosfato, etc.

## 5.1.2 Tipos de coenzimas

Las coenzimas son generalmente vitaminas o sustancias relacionadas con la vitamina y se clasifican en dos grupos: transportadoras de hidrógeno o electrones y transportadoras de grupos

## 1) Coenzimas transportadoras de hidrogeno o electrones

- a) NAD. Nicotinadeninucleotido
- b) NADP. Nicotinadeninucleotido fosfato

estas dos coenzimas están en relación con las vitaminas del grupo B; la niacinamida, su función es aceptar y ceder hidrógenos.

- c) FMN Flavinmononucleotido
- d) FAD Flavinadeninucleotido

presentan en su composición riboflavina o vitamina B<sub>2</sub>

- e) Citocromos a,b,c, a<sub>3</sub>, se caracterizan por tener en composición un grupo Hem, como el de la hemoglobina, con una átomo de Fe que varia al aceptar o ceder electrones.

## 2) Coenzima transportadora de grupos

- a) ATP Adenosin tripfosfato

Esta constituido por una base nitrogenada (adenina), un azúcar (ribosa) y tres grupos fosfato, de los cuales los dos últimos están unidos mediante enlaces de alta energía, el ATP como coenzima cede o transporta grupos fosfato, por ejemplo, en la contracción muscular en la que se requiere de energía contenida en el tercer enlace fosfato.

- b) Biotina

Está constituida por vitamina H y transfiere grupos CO<sub>2</sub>

- c) Coenzima A

La vitamina de que se compone es el ácido pantoténico y es transportadora de grupos acetilo.

## 5. VITAMINAS

### 5.1.3 Tipos de vitaminas

Tanto en la respiración como en otras vías metabólicas, las coenzimas juegan un papel muy importante.

A continuación se presenta un cuadro con las diferentes vitaminas, las coenzimas que utilizan y las reacciones que llevan a cabo:

Cuadro 5.1 Vitaminas y coenzimas

Vitamina	Coenzima	Reacción enzimática
Tiamina B <sub>1</sub>	Pirofosfato de tiamina	Decarboxilación oxidativa de cetoácidos.
Riboflavina	FMN, FAD	Citocromo C reductasa; monoácido-oxidasa; glicólico-oxidasa; succinil deshidrogenasa
Acido Pantoténico	Coenzima A	Transfiere grupos acilo; síntesis de ácidos grasos; biosíntesis de anillos aromáticos, terpenos.
Acido Nicotínico B <sub>3</sub> Piridoxina B <sub>6</sub>	DNP, NAD, TPN Fosfato de piridoxal y Trifosforo piridina nucleotido	Reacciones de deshidrogenación. Transaminasa, decarboxilasa, fosforilasa.
Acido Fólico Vitamina B <sub>12</sub>	Acido tetrahidrofólico Coenzima B <sub>12</sub>	Síntesis de purinas Isomerización del ácido metil málico a ácido succínico. Posibilidad de síntesis de desoxirribosa.
Biotina	l'NCarboxibiotina	Sistema de carboxilación-decarboxilación, síntesis de ácidos grasos.
Vitamina C		Tirosina oxidasa y reacciones de deshidrogenación.
Vitamina D	25 hidroxicolcalciferol	Metabolismo de calcio y fósforo, oxidación de citrato.
Vitamina A	Retinina	Proceso visual, sistema inmunológico.
Vitamina K		Posible cambio en la respiración y fosforilación.
Vitamina E		" " " "

---

## 5.2 VITAMINA B<sub>12</sub>

Esta fue descubierta como resultado de la investigación de la anemia megaloblastica o anemia perniciosa. En 1926 Minot y Murphy mostraron que puede ser tratado comiendo hígado crudo, este descubrimiento hizo que se investigara y aislara la estructura que permitía combatir esta enfermedad, para determinar su estructura y su posible síntesis, en 1948 se logro aislar la vitamina del hígado de buey y se obtuvo por cultivo microbiológico por Riches y Smith en 1955 su estructura fue determinada por Hodgkin en 1973 su síntesis química consta de 70 pasos razón por la que no fue de interés comercial.

### 5.2.1 Fuentes

Se encuentra principalmente en el hígado de buey a pequeñas concentraciones, y su fuente real es de tipo microbiológico, cerca de 1950 se descubrió que también se producía junto con algunos antibióticos producidos por *Streptomyces*, que se empezó a usar en forma comercial a los microorganismos para su producción.

### 5.2.2 Producción

Entre los microorganismos que se usan para su producción se encuentran la *Pseudomona Detrificans* y dos bacterias propionicas (*Propionibacterium shermanii* y *freudenreichii*), estos microorganismos tienen como sustrato a carbohidratos.

Otros microorganismos que se usan para su producción son los *Streptomyces* en sus varias especies, debido a su alta productividad de mutantes selectos y a su rápido crecimiento.

A. Fermentación por *Pseudomona Denitrificans*: Esta cepa se logro aislar en 1969 y es la que se usa comercialmente, su productividad industrial es de 0.6 mg/L hasta 60 mg/L, como fuente de carbohidratos se usa melaza de azúcar de remolacha, debido a que contienen grandes cantidades de betania (trimetilglicina) la cual estimula la producción de la vitamina por promoción de la síntesis de Ala-sintetasa, las enzimas involucradas en la producción de ac. amino leuvinico y probablemente por un aumento de la permeabilidad celular durante el



## 5. VITAMINAS

---

periodo de intensiva producción de vitamina se usa este sustrato. Crecen en un medio aeróbico con adición de sales de cobalto y de 5-6-dimetilbecimidasol como sustratos limitantes.

B. Fermentación por *Propionibacterium shermani*: Son bacterias microaerofílicas propionicas que producen cobaltocorinoides en condiciones anaerobias con suplementos de cobalto, así que para obtener mayores rendimientos se necesita un medio anaerobio, lo que implica un alto consumo de azúcares en la etapa de crecimiento sin que la cobinamina tenga un efecto represivo, después de lo cual el aire se introduce para inducir la biosíntesis de 5-6-dimetilbecimidasol (DBI) y para convertir la cobinamida. De 30 a 40 mg de vitaminas B<sub>12</sub> se pueden obtener en una fermentación piloto usando la técnica de Florent y Nitet.

C. Otro modo de producción es usando bacterias en geles de alginato e incubadas en medios ricos en carbono y nitrógeno conteniendo sulfato de cobalto producen hasta 20 mg/L de vitamina en 5 días si contienen DBI y un agente humectante, pudiendo ser rehusadas.

Un ejemplo de producción es el siguiente:

La spora para inoculación se separan dejando desarrollar el organismo sobre agar de Bennett durante 4 a 6 días a 28 °C. Se puede utilizar inmediatamente o conservar durante varias semanas a temperatura de refrigeración, para la fermentación el medio debe contener: Glucosa, sólidos correspondientes al líquido de remojo de maíz, productos solubles de destilería o harina de soja, cloruro de cobalto, carbonato de calcio, aceite de soja, a un pH de 7.

El medio líquido se inocula con esporas y se incuba con aireado o agitación durante 48 horas a 28 °C, en estos casos se hace necesario la adición de un antiespumante para evitar la formación de espuma durante el fermentado como monoglicéridos de aceite, DC antifoam, etc., los medios y materiales usados para la producción de vitamina B<sub>12</sub> se deben esterilizar y asimismo los tanques de fermentación, tuberías y conexiones correspondientes, una manera de hacerlo es calentar los medios a 121 °C durante 1.5 a 2 horas en el caso de operaciones discontinuas, y en

el caso de operaciones continuas una se logra la esterilización a una temperatura de 166 °C por 13 minutos para fermentaciones realizadas en fermentadores de cobre, acero inoxidable y acero ordinario

Para su recuperación se reduce el pH a 5 con ácido sulfúrico diluido, y se calienta la mezcla, se centrifuga y filtra para eliminar los sólidos innecesarios, el líquido resultante se concentra en evaporadores y se obtienen el concentrado que tienen aprox.60-75 mg/kg

### 5.3 VITAMINA B<sub>2</sub> (Rivoflavina)

Esta vitamina fue extraída en 1879 por Blyth pero solo fue reconocida como vitamina hasta 1920, se presenta en forma cristalina como polvo amarillo anaranjado, de sabor amargo y prácticamente inodoro, es higroscópico y relativamente estable a los ácidos minerales y al calor, en cambio es sensible a los álcalis y se descompone por radiaciones ultravioleta y del espectro visible

#### 5.3.1 Fuentes

La vitamina B<sub>2</sub> esta distribuida ampliamente en la naturaleza, pero se encuentra en su forma libre, solo se encuentra en cantidades apreciables en la retina, en la leche y en la orina, esta presente en su forma esterificada en cereales y semillas, músculos y ciertos órganos como el hígado, riñón etc. En forma de flavoproteína, la proteína esta presente en casi toda las células vivas y especialmente en la levadura de Bremer produciendo de 2 a 5 mg/100g.

#### 5.3.2 Producción

La rivoflavina es producida a escala comercial por síntesis química, produciendo primero D-ribosa que luego es convertida la vitamina directamente, estos pasos pueden ser sustituidos por una fermentación simple en un proceso semisintético.

Más del 30% de la producción mundial de riboflavina es producida por fermentación. En medios líquidos producen menos de 10 mg/L de vitamina pero las cepas especialmente

## 5. VITAMINAS

---

productoras pueden llegar a producir 1,000 a 2,000 veces más, estas cepas pueden ser clasificadas como 1) Microorganismos anaerobios como *Clostridium* spp con una producción máxima de 100mg/L en 4 día y en presencia de iones de  $Fe^{+2}$ . 2) Levaduras que producen entre 500 mg/L y 1 g/L como por ejemplo la *Candida Flareri* que produce 600 mg/L de rivo flavina en 7 días y su gran sensibilidad al  $Fe^{+2}$  ha optimizado su uso comercial 3) Algunos mutantes que producen hasta varios gramos por litro, entre estos microorganismos se encuentran 2 ascomisetos que no son afectados por la presencia de  $Fe^{+2}$ , sin embargo tienen la desventaja de que no son estables genéticamente.

A. Producción por fermentación, el microorganismo que se usa para producir riboflavina comercialmente es la *Asbya gossyphi* que puede producir hasta 10 a 15 g/L en 10 días. Estas cepas se han obtenido por medio de selección de mutaciones después de radiación ultravioleta o por tratamiento de varios agentes químicos como nitrato de uranio, sulfatos, etilendiamida, etc., usan como fuente de carbono glucosa, sacarosa y maltosa y aceites vegetales, peptonas como fuentes de nitrógeno especialmente producida por hidrólisis enzimática de proteínas como colágeno, extracto de levadura y otros suplementos enriquecidos de los factores de crecimiento como biotina, inositol y tiamina. Crecen en condiciones aeróbicas y a una temperatura optima entre 28 y 29 ° C la vitamina se presenta en forma de cristal.

B. Producción por fermentación de DNA, Se obtiene de una cepa recombinante de *Bacillus subtilis*, este tipo de producción de riboflavina es mucho más rápida que con ascomicetos pero no en cantidad pues su producción es de .8 g/l en 48 horas a 37 °C. Una patente registra una nueva cepa que ha sido formada al introducir un plásmido que ocasiona una resistencia bacteriana a la eritromicina. La nueva cepa crece en un medio simple de sacarosa, levadura, urea y otras sales como sulfatos y fosfatos en un medio aeróbico y con agitación produciendo 4.5 g de riboflavina por litro en 24 horas a una temperatura de 39 a 41 °C que después se aísla de un medio para ser usada en diferente propósitos.

---

#### 5.4 VITAMINA C

Esta vitamina previene en escorbuto, en el siglo XVIII se observó que la falta de vegetales frescos, provocaba esta enfermedad por lo que se buscó conocer la causa, se aisló por primera vez en 1928 y se le dio en nombre de ac. ascórbico.

##### 5.4.1 Fuentes

Muchos animales sintetizan sus requerimientos diarios por lo que se encuentra en sus tejidos, en cambio el hombre y algunos vertebrados dependen completamente de su dieta para satisfacer sus requerimientos, los alimentos que mayor cantidad de esta vitamina contienen son los cítricos como naranja, limón, lima, vegetales como col, espinaca y tomate. Algunos microorganismos producen cantidades muy pequeñas que ellos metabolizan, en cambio no se ha encontrado vitamina C, en bacterias pero parece que no las necesitan.

##### 5.4.2 Producción

Para su obtención se extrae de tejidos animales aunque con este método se obtiene muy poco. Se utiliza más su producción por síntesis que básicamente involucran algunos pasos bioquímicos que pasan por la vía 2-ceto-l-ac. glucoronico y pasos químicos por isomerización y atomización.

En base a la producción por procesos bioquímicos se llevan a cabo por los siguientes pasos: 1) oxidación de la D-glucosa 2) producción de 5-ceto-D-ac. glucoronico y 3) terminado con una oxidación bioquímica, comprendiendo esta biosíntesis, las posibilidades de realizar investigaciones, principalmente para introducir genes que codifiquen las enzimas involucradas en la producción en los microorganismos que puedan ayudar a la producción de vitamina C.

#### 5.5 PROVITAMINA A (B-caroteno)

La vitamina A, retinol o axeroftol es un alcohol de cadena larga que en la naturaleza se encuentra en forma de ésteres de ac. grasos. Se ha aislado de la mantequilla y de la yema de

## 5. VITAMINAS

---

huevo.

Su deficiencia retarda el crecimiento en los niños, deficiencias en sistema inmunológico y causa ceguera nocturna, puesto que la vitamina es un constituyente de la rodopsina, el receptor de la luz.

La vitamina A, que se adiciona a una gran cantidad de productos se obtiene por vía química, es una vitamina de tipo liposoluble y por lo tanto no se absorbe rápidamente en el intestino donde se convierte en vitamina A en las paredes del intestino.

Al añadir esta vitamina en alimentos altera ligeramente su color o la intensidad de este como la margarina, aceites y bebidas el color de la yema de huevo o la carne de pollo.

### 5.5.1 Producción

Solo los microorganismos y las plantas tiene las enzimas necesarias para sintetizar a estas sustancias, especialmente el B-caroteno, hasta ahora solo se han usado microorganismos como algas y hongos filamentosos pero con baja productividad, por manipulación genética se ha logrado una mayor productividad, los cuales pueden ser usados directamente en los alimentos para animales después de su filtrado, lavado y secado en bajas presiones y temperaturas.

Para uso humano la extracción abarca los pasos de filtrado, deshidratado, solubilización con alcohol y extracción con solventes orgánicos, precipitado, disuelto y cristalización.

### 5.6 VITAMINA B<sub>8</sub> (Biotina)

Esta vitamina se descubrió a principios de siglo, esta vitamina que tiene influencia en el crecimiento, en estudios de parálisis y dermatitis producidos en ratas que comían exclusivamente huevo blanco como fuente de proteína y se demostró que este síndrome podía prevenirse simplemente cocinando el huevo blanco o adicionando levadura a la dieta del animal, debido a la presencia de la glicoproteína termolábil del huevo blanco y que tienen una

gran afinidad por la biotina así que forma el complejo estable con la biotina evitando su absorción intestinal e inhibiendo las reacciones enzimáticas en las cuales participa la biotina

#### 5.6.1 Fuentes

En la naturaleza la biotina se encuentra en forma libre o ligada a la lisina o a las proteínas, en los microorganismos se encuentra ampliamente principalmente en levaduras y también en vegetales, el hígado la yema de huevo, el chocolate y las setas contienen cantidades apreciables de biotina, aunque esta vitamina también es sintetizada por la flora intestinal.

#### 5.6.2 Producción

Se puede extraer de los alimentos pero su producción comercial se hace por síntesis química y fermentación:

A. Producción directa por fermentación: muchos hongos, levaduras, bacterias en medios de glucosa glicerol o hidrocarburos sintetizan biotina a una temperatura de 37 °C en condiciones aeróbicas por tres días en un medio con glicerol, peptona y otras sales. La producción se puede incrementar con una cepa mutante al ac. Actitracico. También se pueden utilizar la levadura *Rhodotorula glutinis*

B. También puede ser obtenido por transformación bioquímica de biotina de ac. diaminocarboxílico al medio que contienen *Bacillus sphaericus*.

C. Otro método de producción es apartir de detiobiotina que se produce en un medio con peptona y ac. pimotico por cuatro días.

D. La producción por síntesis se logra con la co-oxidación de un sustrato esencial y un análogo, con una enzima que tiene un sustrato esencial supliendo las fuentes de carbono y requerimientos de energía por síntesis celular mientras resulta la oxidación de un sustrato secundario. Los microorganismos usados son: *Corynebacterium primodioxidans* cultivado a 28 °C con agitación en un medio con proteínas y sales aunque un exceso de incubación puede producir la degradación de la biotina, para purificarse se filtra, y se absorbe con carbón

## 5. VITAMINAS

---

activado y posteriormente se pasa por cromatografía con resina de intercambio iónico o por cristalización.

### 5.7 PROVITAMINA D<sub>2</sub> (Ergosterol)

El raquitismo caracterizado por defectos en la formación de los huesos ha sido eliminado con la ingestión de aceite de hígado de bacalao, en los años '20 y '30 el esteroil natural de la sustancia antiraquitica presente en este aceite fue determinado y también los beneficios de la salud obtenidos por la exposición a la radiación ultravioleta de la fracción de esteroil de algunos alimentos. También en 1932 se preparo vitamina D (calciferol) de la levadura ergosterol al abrir el anillo B de este esteroide con rayos ultravioleta. La vitamina D existe en dos formas 1) vitamina D<sub>2</sub> o ergocalciferol la cual es terapéuticamente y comercialmente desde que se extrae industrialmente de la levadura 2) vitamina D<sub>3</sub> o calciferol que es la forma natural presente en el aceite de hígado de bacalao y en el hombre formado por la radiación de luz ultravioleta de la luz solar por el 7-dehidrocolesterol que tiene presente que se sintetizan a nivel cutáneo suficiente en un adulto normal con una dieta normal.

#### 5.7.1 Producción

Esta vitamina es más comúnmente producida por mucho microorganismos, en cambio la levadura y los ascomicetos no la tienen o la producen en bajas cantidades, los hongos presentan concentraciones mayores, las principales fuentes comerciales son *Saccharomyces chevalieri*, *S. uvarum*, *S. carlsbergensis*, *S. cusiformis*, *S. cerevisiae* y *Candida tropicalis*

A. Producción por levaduras, se utilizan principalmente en condiciones que favorezcan su crecimiento y aeróbicas en un medio de etanol, con licor de maíz y sales minerales incluyendo pantotenato de calcio.

B. Producción por fermentación de hongos: se pueden utilizar hongos del género *Trichoderma* *Fusarium* o *Cephalosporium* en medio con carbohidratos y hasta n-parafinas, en

condiciones aeróbicas, posteriormente se extrae con solventes a base de amonio o aminas, se filtra y se le da un tratamiento con solvente, los cuales finalmente se evaporan, se saponifican los esteroides y se recristalizan para obtener la vitamina en forma comercial.

### 5.8 RESUMEN DE PRODUCCIÓN

A continuación se presenta un cuadro resumen donde se encuentran las vitaminas, sus condiciones de producción, rendimiento y enzimas estimuladas:

Cuadro 5.2 Resumen de producción de vitaminas

Vitamina	Enzima Estimulada	Condiciones de producción	Rendimiento
<b>B<sub>12</sub></b> Cobalamina	Ala-sintetasa	Aerobia, sales de cobalto y dimetilbenamidazol	60 mg/L
	Cobinamida Cobalamina	Anaerobia Sales de cobalto	30-40 mg/L 20 mg/L (reutilizable)
	Ala-sintetasa represor	Aeróbica, agitación pH 7-7.5 amoniac	135 mg/L
<b>B<sub>2</sub></b> Riboflavina	<i>C. Acetobutiricum</i> <i>C. Flareri</i> Ascomicetos	Fermentación Anaerobia Glucosa, sacarosa Aeróbica	
	<i>Eremothecium asbyii</i> <i>Bacillus subtilis</i> recombinante	En presencia de aceites Sacarosa, levadura Urea	
<b>C</b> Ac. ascórbico	<i>Acetobacter</i> <i>Pseudomona</i>	Reducción de la D-glucosa Oxidación de la D-glucosa	
<b>B<sub>8</sub></b> Biotina	Hongos, levaduras	Glucosa, glicerol Aeróbica	



## 5. VITAMINAS

---

	<i>Pseudomonas</i>	Biotransformación de producto relacionados
	<i>Corynebacterium</i>	Alcanos Co-oxidación de análogos
A Provitamina A	<i>Phycomyces</i> y <i>Blakeslea trispora</i>	Alta concentración de CHOS, lípidos y proteínas
D <sub>2</sub> Ergosterol	Levaduras	sustrato rico en CHOS Aeróbica
	Hongos	CHOS Hidrocarburos n-parafinos Aeróbica.

---

---

## 6 PRODUCTOS DERIVADOS DE LA HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN

### 6.1 INTRODUCCIÓN

El hombre ha buscado desde la antigüedad productos que deleiten a su paladar por su sabor dulce, uno de los productos que se conoció en la antigüedad es el resultado del ataque del vinagre a la harina de trigo, desde el siglo nueve se producía en Japón un jarabe de almidón de arroz y malta, aproximadamente al mismo tiempo, médicos Persas preparaban un sustituto de miel mediante la acción de saliva humana en almidón.

En Europa durante las guerras Napoleónicas, Kirchoff descubrió en 1811 que un jarabe dulce se podía obtener de la cocción de papas con ácido sulfúrico, había obtenido una masa impura de glucosa por hidrólisis ácida. El primer paso para la industrialización de este proceso fue tomado en 1933, cuando fue extraída por primera la amilasa procedente de malta, a partir de 1950 se utilizaron métodos de producción que involucran tanto la hidrólisis ácida como la acción de enzimas obteniendo jarabes con niveles más altos de azúcares reductores que los obtenidos con un solo método.

Otra revolución surgió en 1960 con el desarrollo de las glucoamilasas, estas enzimas producidas por *Aspergillus niger*, realizan una hidrólisis del almidón más completa lo que produce una mayor pureza y hace más fácil su cristalización y purificación.

En 1973 con la introducción de las alfa-amilasas derivada de *Bacillus licheniformis* que es activa a temperaturas de hasta 110°C, temperatura a la cual se puede asegurar la gelatinización completa de todo el almidón, se hace innecesaria la adición posterior de amilasa, consecuentemente el proceso se enfoca principalmente hacia la conversión enzimática, que es actualmente el proceso dominante en la industria.

---

## 6. HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN

---

### 6.2 ENZIMAS UTILIZADAS EN LA PRODUCCIÓN DE JARABES

Las enzimas de mayor interés en la industria de la hidrólisis de almidón son las amilasas, derivadas de bacterias, hongos o plantas. Estas las enzimas son clasificadas como alfa-amilasas, aunque dos enzimas de diferentes fuentes no son idénticas aunque tengan la misma función.

Este tipo de enzimas generalmente se encuentra en la naturaleza o de fuentes asociadas con los alimentos, por lo que tienen un alto grado de confiabilidad

#### 6.2.1 Enzimas productoras de maltodextrosa

El primer paso en la conversión de almidón es la liquefacción o una hidrólisis limitada, suficiente para reducir la viscosidad de la materia prima, para esto se utiliza calor o ácido (también llamado ácido ligero), este proceso se usa solo cuando el producto final es un jarabe de glucosa con un equivalente en dextrosa (DE) menor de 42 (que indica el porcentaje de azúcares reductores presente, expresado como dextrosa en base seca), por que el ácido promueve la deshidratación y la condensación los productos con un mayor valor, contienen niveles indeseables de productos como ácido fórmico, genobiosa, hidroximetilfurfural y otros, para evitar esta producción se utilizan enzimas.

Comúnmente la materia prima es una sustancia seca (30-40 %), la enzima usada es una alfa amilasa bacteriana que cataliza la hidrólisis interna de las ligaduras 1,4-glicosídicas, la enzima actúa en el glicogeno o almidón para producir maltodextrina, las tres principales fuentes productoras de esta enzima son: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus stearothermophilus*

#### 6.2.2 Enzimas productoras de jarabes de glucosa

Existen varios tipos de jarabes dependiendo del porcentaje de azúcar presente, hay desde 20 a 99.4, pero el más común es el de 42, los jarabes de alta fructosa de maíz se producen por sacarificación con alfa amilasa.

La hidrólisis enzimática o sacarificación del almidón para producir dextrosa es una operación por lotes que empieza con una licuefacción de 8 a 20 DE, se realiza a temperaturas entre 58° y 62° C y a valores de pH de 4.2 a 5.0, el tiempo que requiere es de 30 a 96 horas, dependiendo de la capacidad de la planta y de las necesidades.

Las enzimas que se utilizan comercialmente son mezclas de cepas seleccionadas de *Aspergillus* o *Rhizopus*

### 6.2.2.1 GLUCOAMILASA

Esta enzima (1,4-a-D-Glucano glucohidrolasa; EC.3.2.1.3; ) reduce el grupo terminal del almidón y del glicogeno, el producto final es glucosa en configuración beta, las muestras comerciales se componen de una mezcla de isoenzimas, con un peso molecular entre 66,000 y 90,000

### 6.2.2.2 AMILASA FÚNGICA

La beta amilasa (1,4-alfa-D-Glucano glucanohidrolasa, EC.3.2.1.1, glicogenasa) de *Aspergillus* o *Rhizopus* es una glicoproteína monomérica que contiene calcio y cuatro puentes de disulfuro, produce principalmente maltosa, con pequeñas cantidades de glucosa y maltotriosa, tienen un peso molecular de 58,000 y es activa a un pH de 2.0 a 6.0 con un pH óptimo de 4.0. La enzima es extremadamente estable bajo condiciones de sacarificación (60°C, pH 4.3), reteniendo el 80 % de su actividad inicial después de 7 días.

### 6.2.2.3 TRANSGLUCOSIDASA

La industria comúnmente se refiere a esta enzima como transglucosidasa, el nombre recomendado es alfa-glucosidasa, desafortunadamente este nombre es sinónimo de la glucoamilasa. La enzima es una glicoproteína con un peso molecular de 116,000, tienen un pH óptimo de 4.0 a 4.5 y es estable a 50 °C en ausencia de sustrato, cataliza la exohidrólisis de las ligaduras 1,4 glucosídicas, en el almidón soluble, bajo condiciones de sacarificación el mayor producto es la isomaltosa, que puede ser transformada en glucosa

## 6. HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN

---

### 6.2.2.4 ISOAMILASA

Es la única enzima conocida que rompe la glicoproteína completamente, tiene dos subunidades con un peso molecular de 45,000, no tienen grupos sulfhidrilos o carboxílicos y los iones de cobre y plata inhiben su actividad, la enzima es más activa entre un pH de 3 y 4. La máxima temperatura de estabilidad esta entre los 45 °C y los 55 °C.

### 6.2.2.5 PULULANASA

El nombre recomendado para esta enzima es alfa-dextrin-endo-1,6-alfa-glucosidasa, que es poco usado, se puede obtener de *Bacillus acidopullulyticus*. Esta enzima cataliza la hidrólisis de enlaces alfa-1,6 glucosídicos en oligosacáridos.

Tienen un peso molecular de 66,000, su temperatura óptima es de 50 °C y su pH óptimo es de 6.5, las condiciones de sacarificación son de 55°C y 6.0 de pH, muy cercanas a sus condiciones óptimas.

### 6.2.2.6 ALFA-AMILASA BACTERIANA

Esta enzima se obtienen comercialmente usando una cepa modificada genéticamente de *B. subtilis*, tiene un peso molecular de 55,000, solo hidroliza las ligaduras 1,4 en el almidón. glicogeno y ciclodextrina, pero no las ligaduras 1,6, tienen un pH óptimo de 5.5 y una temperatura óptima de 75 °C

## 6.2.3 Enzimas productoras de jarabes de maltosa

Los jarabes de maltosa son producidos por sacarificación de almidón previamente semi-hidrolizado, estos jarabes son preparados por una sacarificación en lotes a 55 °C, pH 4.8 a 5.2 con un porcentaje de sólidos de 35 % a 45 %, la industria clasifica estos jarabes como de alto contenido de maltosa, contenido extra-alto de maltosa o jarabes de alta conversión.

La producción de jarabes de contenido alto de maltosa comienza con una liquefacción ligera con enzimas, para obtener un jarabe inicial de 5 a 10 DE, este jarabe posteriormente se sacarifica con alfa-amilasa, para obtener un jarabe final con 48 a 52 DE, que contienen menos

del 5% en peso de glucosa, el jarabe con un contenido extra-alto de maltosa tiene un DE de 50 a 60 y un 70 a 80 % de peso en maltosa, los jarabes de alta conversión tienen un DE de 62 a 63 y de 30 a 40 % en peso de maltosa

#### 6.2.3.1 AMILASA DE *A. oryzae*

Tiene un peso molecular de 51,000 que se compone de un solo polipéptido, el mayor producto de esta enzima es maltosa y maltotriosa con un pequeño porcentaje de dextrosa, se requieren iones de calcio para su estabilidad y actividad, tienen una máxima actividad a 50 °C u pH de 5.0 a 6.0

#### 6.2.3.2 BETA AMILASA

Se obtiene de cebada, frijol soja o trigo, cataliza la hidrólisis de maltosa de los finales no reductores del glicogeno o almidón, esta enzima no hidroliza los enlaces 1,6, tienen un pH óptimo de 5.2 pero es estable en un rango de 4.55 a 9.0.

### 6.2.4 Enzimas usadas en la producción de jarabes de alta fructosa

Estos jarabes se producen por la isomerización enzimática de dextrosa refinada, la isomerización se puede realizar por medio glucosa isomerasa, la cual se puede inmovilizar fácilmente, las condiciones dependen de la inmovilización.

Posteriormente se clarifica, y se retiran las partículas, la isomerización de glucosa en fructosa se lleva a cabo como proceso continuo a una temperatura de 53 a 61 °C.

#### 6.2.4.1 GLUCOSA ISOMERASA

Las enzimas comercialmente disponibles son xilosas isomerasas, que pueden ser utilizadas para catalizar la isomerización de D-glucosa en D-fructosa, se obtiene comercialmente de *Streptomyces spp.* tienen un pH óptimo entre 7 y 8, pero las enzimas inmovilizadas requieren un poco más de alcalinidad

## 6. HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN

---

Todas las glucosas isomerasas son aloproteínas, los iones de calcio se requieren para su estabilidad, algunos metales como el cobalto, magnesio, estimulan su actividad e incrementan su estabilidad, y muestran una mínima actividad en ausencia de iones metálicos

### 6.2.5 Otras enzimas

#### alfa-Glucosidasa

La alfa-glucosidasa libera alfa-glucosa de las terminales no reducidas del sustrato, la enzima de *Aspergillus* produce isomaltosa y panosa de maltosa, enzimas de este tipo se utilizan en pruebas clínicas para medir la amilasa humana.

### 6.3 MATERIAS PRIMAS

El almidón se forma en las plantas como una fuente de reserva, mediante la condensación enzimática de glucosa. Dos moléculas de glucosa se pueden unir mediante un enlace entre los carbonos 1,4, lo que se llama un enlace alfa, si este enlace se repite se forma un largo polímero lineal llamado amilosa, cada molécula tiene un grupo reductor y uno no-reductor al final del grupo. Después que el almidón se forma, la planta lo almacena en forma de granos, que pueden tener diferentes geométricas.

Un segundo componente del almidón, la amilopectina, se produce cuando se presenta un enlace 1,6, en lugar del enlace 1,4, formando entonces ramificaciones de la cadena, las proporciones de estos dos polímeros varían de planta a planta.

Debido a que la hidrólisis del almidón es la reacción contraria de la condensación, se requieren de las herramientas necesarias para romper los enlaces 1,4 y 1,6 presentes en el polímero.

Las mayores impurezas que se presentan son grasa, proteínas y cenizas, las grasa y proteínas, presentes en niveles de 1 a .5 % en base seca, tienen una considerable influencia en el proceso de hidrólisis. Pequeñas cantidades de minerales presentes, menores del .2%, principalmente de calcio estabilizan las amilasas.

## 6. HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN

Para acondicionar el sustrato para una acción enzimática rápida es necesario romper los granos de almidón, destruyendo los cristales, esto se puede lograr calentando con agua el almidón, esto ocurre a una temperatura entre 60 y 90 °C.

Las fuentes de almidón son varias, la más usada es el maíz pero también se utiliza papa como fuente ideal por su bajo contenido de grasa y lípidos es de las fuentes más usadas en Europa, la tapioca que tienen una composición similar a la papa es muy usada en el lejano Este, la cebada es otra fuente pero muy poco económica, el trigo entre otros.

### 6.4 PROCESO DE PRODUCCIÓN

#### 6.4.1 Liquefacción

El proceso de liquefacción está mejor definido por la combinación de dos procesos

- 1.- La completa gelatinización (incluyendo la hidratación) del polímero de almidón, para asegurar la accesibilidad en el ataque hidrolítico
- 2.- La dextrinización a un grado que prevenga la retrogradación más adelante. El material resultante se puede considerar como producto final o ser utilizado en la sacarificación para obtener un Jarabe de mayor calidad.

Este proceso se mide mediante la cantidad de equivalente en dextrosa (DE), dextrosa el nombre trivial de la glucosa, es una medida del poder reductor relativo calculado en base seca comparado con la dextrosa anhidra que tiene un valor de 100, en comparación el almidón tiene un valor de cero, este valor nos puede dar una buena indicación del grado de hidrólisis.

Existen cinco formas principales de liquefacción que son las siguientes en el cuadro se hace un resumen de las condiciones del proceso

Cuadro 6.1 Condiciones de liquefacción de almidón

Etapa	EHE	LT	DEDH	DESH	TL
Preparación del almidón	Ca 300 ppm pH 6.2-6.5 Alfa-S	Ca 100 ppm pH 5.8-6.2 Alfa-L/St	Ca 100 ppm pH 5.8-6.2 Alfa-L/St	Ca 100 ppm pH 5.8-6.2 Alfa-L/St	Ca si se requiere



## 6. HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN

Calentamiento	85-88°C 5-10 min.	105-108°C 5-10 min.	105-108°C 15-61 seg	145-150°C 4-8 min	150-160°C
Conversión	85-88°C 4-8 DE	95-100°C	95-100°C 4-8 DE	95-100°C 20-30 min. Luego 85-95°C	95-100°C pH 5.6-6.2 AlfaL/St
Calentamiento	130-140°C 5-10 min.		130-140°C 2-5 min.		
Conversión	85-88°C Alfa-S		95-100°C Alfa-L/S.		

F.W. SCHENCK, Strach Hidrólisis products, 1992

Alfa-S, alfa-amilasa de *Bacillus subtilis*

Alfa-L/St, alfa-amilasa de *Bacillus lincheniformis* o *stearothermophilus*

EHE Tratamiento-Enzima-Calor-Enzima

LT Tratamiento de baja temperatura

DEDH Tratamiento de doble enzima-doble calentamiento

DESH Tratamiento de doble enzima, calentamiento

TL Tratamiento de liquefacción térmica

El proceso EHE fue el primer proceso enzimático, la enzima se dosifica aproximadamente en iguales cantidades, lo que previene la retrogradación durante la etapa de enfriamiento, cuando la mezcla llega a los 87 °C donde se continua con la hidrólisis con la segunda adición de amilasa.

En el proceso LT se añade enzima al almidón antes de la liquefacción, y la temperatura inicial es de 105-108°C suficiente para gelatinizar e hidratar el almidón en una sola etapa.

En el proceso DEDH Y DESH, la ventaja es el uso de alfa-amilasa más termoestables, pero la temperatura del proceso EHE, es usada nuevamente, esto asegura que todo el almidón se gelatinice completamente y después de la segunda adición de alfa-amilasa se puede enfriar a 100°C con pocas posibilidades de retrogradación, el equipo que requiere el proceso de DEDH es grande, dos etapas de calentamiento son necesarias, aunque el consumo de energía es

esencialmente el mismo, en el proceso de DESH la cantidad de enzima requerida es mayor, pues la primera enzima se destruye en la primera etapa de calentamiento.

El proceso de TL, la temperatura se eleva primero a 160°C en ausencia de la enzima, la enzima alfa-amilasa de *Bacillus subtilis* se agrega cuando la temperatura esta cercana a los 100°C, la inactivación total se previene reduciendo la temperatura hasta 87°C, mientras más altas temperaturas de utilicen menor es el riesgo de retrogradación .

#### 6.4.1.1 EQUIPO

El equipo y los procesos usados no son muy complicados, el calentamiento debe ser rápido y el producto debe mantenerse en agitación, la enzima y la dosificación química pueden ser bombeados, con bombas peristálticas, de pistón o de diafragma, el control del pH presenta problemas puesto que continuamente es necesario limpiarlo y recalibrarlo.

#### 6.4.1.2 CALENTAMIENTO

El calentamiento puede ser directo por inyección de vapor, los tipos de calentamiento indirecto raramente se utilizan de sistemas donde se utilizan enzimas por la lentitud de la respuesta, principalmente cuando el almidón se gelatiniza.

### 6.4.2 Sacarificación

El almidón que pasa por la liquefacción, principalmente se compone de oligosacáridos y polisacáridos, se hidroliza completamente para obtener azúcares de bajo peso molecular, este proceso se llama sacarificación si el proceso se completa hasta obtener el máximo grado de hidrólisis se obtienen dextrosa hidrolizada, cuando solo se hidroliza parcialmente el producto se llama jarabe de glucosa.

Una hidrólisis catalizada por enzimas puede resultar en varios grados de hidrólisis, entre los productos más comerciales encontramos: Dextrosa hidrolizada, Jarabe de alto contenido de maltosa, jarabe de muy alto contenido de maltosa y jarabes convertidos.

## 6. HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN

---

### 6.4.2.1 PROCESO DE SACARIFICACIÓN

El proceso de sacarificación, requiere entre 12 a 96 horas para completarse y usualmente se lleva a cabo por lotes en grandes contenedores con pequeños agitadores. Algunos de estos contenedores son típicos de los que se usan en procesos continuos, se pueden poner tanto en paralelo como en serie para convertir un proceso por lotes en uno continuo. Para procesos muy largos los contenedores se pueden usar en serie o en paralelo

La enzima que se usa en la sacarificación es una carbohidrasa que remueve las unidades de beta-glucosa de la terminal no reductora de la molécula de almidón catalizando la hidrólisis de los enlaces 1,4 y 1,6.

Cuando la sacarificación se completa el pH se regula con carbonato de sodio, hasta llegar a 4.8, para maximizar la precipitación de las proteínas y otras impurezas se puede utilizar la centrifugación y la filtración, después de lo cual los productos se tratan en un filtro de carbón para remover el color y otras impurezas solubles, entonces se concentra por evaporación hasta un contenido de sólidos de aprox. 98.0% para asegurar su estabilidad microbiológica.

En la figura 6.1 se muestra un proceso general de hidrólisis.

Los jarabes de alta maltosa se producen por sacarificación con amilasas de *Aspergillus oryzae*.

Los jarabes de muy alta maltosa contienen entre 70 y 80 % en base seca de maltosa, para algunas aplicaciones se requiere la ausencia total de dextrosa, para obtener estos altos niveles se requiere de incorporar enzimas en el proceso de sacarificación.

Los jarabes invertidos con alto contenido de maltosa, tienen entre 60 a 70 DE se formulan con un máximo de dulzor y fermentabilidad, se producen por sacarificación con glucoamilasa y enzimas provenientes de maltosa.

### 6.4.3 Inmovilización

La inmovilización incrementa la flexibilidad de la producción, debido a que la enzima esta inmovilizada no se necesita un paso de inactivación y los costos de energía y refinación se

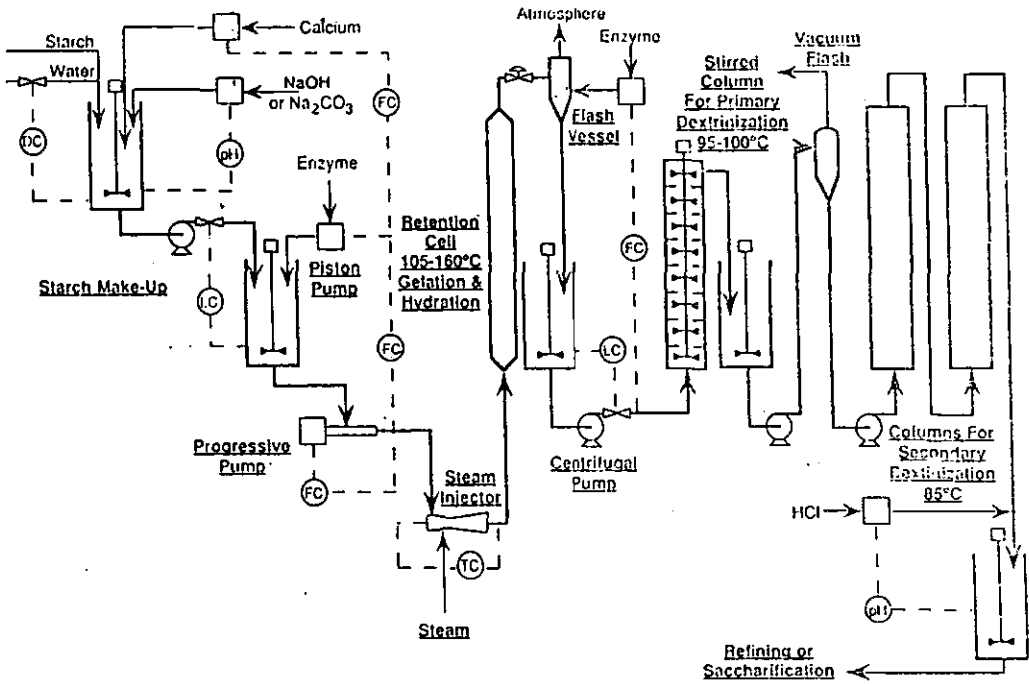


Figura 6.1 Proceso de hidrólisis de almidones fuente Hebeda 1992

## 6. HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN

reducen, aunque las amilasas por lo general son baratas y el costo de inmovilizarlas es mayor este costo se compensa debido a los puntos anteriores y al rehuso, cuando se inmoviliza una enzima sus características observan un considerable cambio, el pH la temperatura óptima se pueden ver afectadas, por esta razón se debe tomar en cuenta las nuevas condiciones de trabajo.

### 6.5 DEXTROSA CRISTALINA Y LIQUIDA

La dextrosa hidrolizada que se sacarifica enzimáticamente contiene el 90% de D-glucosa en base seca, los productos que se elaboran a partir de esta dextrosa son: dextrosa cristalina, dextrosa líquida, dextrosa hidrolizada refinada, glucosa sólida y dextrosa especial para azúcar seca, también se puede hacer la isomerización de dextrosa hidrolizada a D-fructosa para producir un jarabe.

Dextrosa es el nombre común para la D-glucosa, purificada y cristalizada comercial, la dextrosa cristalina es un polvo dulce que puede ser anhidro o monohidratado, es conocida como azúcar de uva puesto que se aisló primeramente a partir de uvas, es fácilmente soluble en agua, se metaboliza fácilmente por el cuerpo y se fermenta fácilmente por las levaduras y otros microorganismos.

Los jarabes de glucosa son ampliamente usados en la industria alimenticia en panadería, malteado y fermentaciones. Un gran número de acidulantes como el ácido cítrico se producen a partir de estos jarabes,

#### 6.5.1 Producción

##### A) Dextrosa hidrolizada

El proceso empieza calentando de una "leche" compuesta de granos de almidón, para lograr la hidrólisis, esto se logra por medio de una sacarificación se pueden usar enzimas especialmente la Aminoglucosidasa también llamada glucoamilasa que ataca al azar los segmentos no reductores, con esta enzima se pueden obtener altas concentraciones de glucosa,

cuando esta concentración llega a 98%, el proceso se considera satisfactorio, el líquido sacarificado se refina clarificándolo y después filtrándolo, con un filtro de vacío.

La evaporación sirve para concentrar los sólidos hasta un 50 % de sólidos antes de pasar a la etapa de decoloración, con esto se logra eliminar colores indeseables en el producto final y la supresión de crecimiento microbiológico, la decoloración remueve las proteínas solubles, ácidos orgánicos y compuestos intermedios que contribuyen al color amarillo no deseable

La desmineralización se lleva a cabo usando un intercambiador de iones convencional, después de la refinación el producto puede ser evaporado hasta un 71 % de sólidos y empacado, o utilizarse así.

#### B) Dextrosa líquida

La dextrosa líquida es un jarabe rico en D-glucosa que excede al 80 % llegando hasta 99% de pureza, se obtienen siguiendo el mismo proceso excepto la evaporación, adicionalmente el oxígeno se remueve por medio de vacío.

#### C) Dextrosa monohidratada

La dextrosa monohidratada cristalizada se produce por la cristalización de la D-glucosa saturada a temperaturas de 50 °C, en la cristalización a altas temperaturas predominan las formas alfa y beta, la solución saturada se enfría indirectamente en superficies donde puedan crecer los cristales monohidratados, al contrario de la cristalización por evaporación que favorece las formas anhidras, la clarificación y refinación produce glucosa con una pureza de 95 %, cuando la cristalización ha terminado se pasa a una centrifuga para separar los cristales del licor madre.

#### D) Glucosa Sólida

En este caso se realiza una evaporación después de la hidrólisis, el hidrolizado se deposita en moldes que se secan y enfrían. Los bloques enfriados de azúcar se conocen como "chispas de azúcar," este producto es extremadamente higroscópico, se utiliza ampliamente en la

## 6. HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN

industria alimentaria y en fermentaciones industriales donde no se requiere un alto grado de pureza.

### 6.5.2 Aplicaciones

#### 6.5.2.1 INDUSTRIA ALIMENTARIA

**Panadería.-** Se utiliza en rollos, galletas, pastas, panes, pays y pasteles para favorecer el crecimiento de levaduras y la producción de gas, además que ayuda a desarrollar el color característico de la cascara y el desarrollo del aroma, también se utiliza en cubiertas y helados en rellenos y geles para las especialidades, la dextrosa puede sustituir parcialmente a la sacarosa en fondants y rellenos de cremas donde se requieren cristales finos para una textura suave. En los pasteles se usa reemplazando la mitad de los sólidos de sacarosa con un beneficio en las propiedades sensoriales y disminuyendo el costo.

**Bebidas.-** En las bebidas en polvo se usa dextrosa anhidra dependiendo del contenido de humedad y de otros ingredientes en algunos casos la porosidad del polvo es un factor crítico y para evitar aglomeraciones se prefieren combinaciones de maltosa-dextrosa, En cerveza, licores de malta y cerveza ale se puede emplear D-glucosa, la dextrosa o la D-glucosa en base seca pueden ser añadidos a los productos bajos en calorías. En vinos se usa para incrementar los azúcares fermentables para una alta producción de alcohol y mayor estabilidad

**Otros.-** También se usa en bebidas carbonatadas reemplazando parcialmente a la sacarosa, en vegetales y frutas con fines edulcorantes ya que puede penetrar más fácilmente que la sacarosa, en la crema de cacahuete se usa para dar sensación de suavidad y palatabilidad en la boca, en confitería se emplea dextrosa en la producción de caramelos, chicle, cubiertas, etc. estos jarabes proveen humedad, cuerpo, palatabilidad y propiedades deseadas, para dar consistencia y crunch en los dulces.

La dextrosa se polimeriza para hacer polidextrosa un agente de relleno para hacer productos bajos en calorías. El proceso se hace a altas temperaturas de deshidratación de la dextrosa con

ácido cítrico y sorbitol. El polímero resultante es un alimento que el cuerpo metaboliza parcialmente y que se puede usar en alimentos y bebidas bajos en calorías.

La dextrosa se usa principalmente para endulzar y cubrir gomas de mascar y da color y brillo a la goma, debido a que tienen un alto punto de ebullición da una sensación de frescura en la boca, la dextrosa contribuye a la textura, esponjosidad y dulzor en bombones y nugats.

Evita el crecimiento de cristales en helados dando cuerpo y sabor, también puede ser usada en jaleas y mermeladas dando estabilidad debido a la alta presión osmótica.

La dextrosa puede ser fácilmente compresible y aglomerada para hacer tabletas, en base a esta característica puede ser un excelente excipiente en la industria farmacéutica.

#### **6.5.2.2 APLICACIONES INDUSTRIALES**

Se usa en adhesivos, materiales de construcción, en la manufactura de químicos, fermentaciones, tabaco y pieles, en la producción de resinas etc.

### **6.6 JARABES DE FRUCTOSA**

La producción del jarabe de fructosa se hizo posible en los años '70 debido a los avances en isomerización y cromatografía, el incentivo económico debido al valor del azúcar hizo que se desarrollara en gran manera este producto. La materia prima para este producto es el almidón de maíz, por lo tanto el producto se conoce como jarabe de alta fructosa de maíz

#### **6.6.1 Producción**

La sacarosa hidrolizada completamente tiene iguales cantidades de glucosa y fructosa, siguiendo este principio es posible producir jarabe a partir de almidón con una dulzura y funcionalidad equivalente.

El método de Dale y Langlois es un método ácido-enzimático que da altos rendimientos consta de las siguientes operaciones



## 6.HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN

1) Sacarificación.- Primeramente se realiza la liquefacción del almidón y la isomerización enzimática controlada de dextrosa a fructosa.

El camino bioquímico de dextrosa a fructosa se caracteriza usando series de reacciones enzimáticas con intermediarios fosforilados, se controla termodinámicamente por medio de la temperatura que varía de 1 a 60 °C, la cantidad de fructosa producida, empezando con una concentración de azúcares del 94% teóricamente presente en el equilibrio será de 47 %, lo que en la practica no siempre se obtiene. El sulfato de magnesio se añade en cantidades de 35 ppm antes de la isomerización para activar la enzima glucosa-isomerasa

2) Proceso de separación de la mezcla resultante. Para separar los productos de la isomerización se utilizan técnicas de separación como cromatografía, o carbón activado. La fructosa tiene una gran afinidad por la dextrosa, por las sales de calcio, por los ácidos fuerte y por las resinas intercambiadoras de cationes.

Los tratamientos en intercambiadores de iones y de carbón remueven contaminantes orgánicos e inorgánicos que ayudan a preservar la vida del filtro.

3) Blanqueado con vapor. La evaporación finalmente concentra los sacáridos presentes para obtener el producto deseado.

Las operaciones se mantienen bajo control para preservar la integridad de las enzimas y los productos

- El calentamiento y enfriamiento incrementan la eficiencia enzimática del filtrado y decoloración

- El control del pH optimiza la actividad enzimática y reduce la formación del color

- El filtrado remueve las particulas como lípidos y proteínas contaminantes y prolonga la vida de las enzimas inmovilizadas

### 6.6.2 Aplicaciones

El alza del precio del azúcar. Las grandes reservas de almidón, su bajo costo, la diferencia del impuesto entre la azúcar sólida y líquida fueron algunos de los factores que impulsaron el desarrollo y producción de los jarabes fructosados.

Los jarabes comerciales contienen de 42 % a 50 % de fructosa, se usan como edulcorantes en bebidas carbonatadas principalmente, este ha sido el mercado que más ha impulsado su desarrollo comercial, al principio solo se usaba parcialmente con la sacarosa debido a que producía un sabor extraño, actualmente gracias a los mejores procesos de refinación se puede utilizar el 100% como edulcorante en bebidas gaseosas.

Los atributos funcionales de los jarabes fructosados tales como la dulzura, viscosidad, humectación, fermentabilidad, resistencia a la cristalización desarrollo de sabor y color, enriquecimiento de sabor y propiedades coligativas (depresión del punto de congelación, presión osmótica), permiten que se puedan usar en una amplia gama de aplicaciones tales como:

Bebidas alcohólicas: Cerveza, brandy, licores y vinos, como azúcares fermentables

Horneados y Botanas: pastelillos, panes, galletas, donas, glaseados, pays, papas fritas, rollos

Bebidas no alcohólicas como refrescos, jugos de frutas, bebidas de sabores

Enlatados, frutas, sopas, salsa de tomate, vegetales.

Cereales para desayuno

En áreas químicas para la producción de ácidos orgánicos, aminoácidos, antibióticos, etc.

### 6.7 FRUCTOSA CRISTALINA

La producción de fructosa cristalina presenta nuevas oportunidades de hacer alimentos, se puede utilizar como ingrediente funcional aparte de su poder edulcorante, debido a que la forma cristalina es la más dulce, es una de las mayores razones para tener interés en ella.

## 6. HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN

---

### 6.7.1 Producción

La materia prima para su producción comercial son los jarabes hidrolizados de dextrosa que en presencia de enzimas y a un pH de 3 a 4 se realiza la conversión, después de lo cual se purifica por uno o varios métodos como son la separación por cromatografía o por membrana, centrifugación etc. después de esto se pasa a la cristalización que se realiza con alcohol, debido a que su gran afinidad por el alcohol, la recuperación del alcohol es uno de los principales y más costosas operaciones, la temperatura varía entre 60 a 85 °C y un pH de 3.5 a 8 el proceso tarda de 30 a 50 minutos, el secado posterior puede ser en un lecho fluidizado o un secador.

Los mayores productores de son USA, Finlandia, Alemania, Israel y Japón.

### 6.7.2 Propiedades funcionales

Presenta propiedades similares a otros monosacáridos algunas de sus propiedades son resultado de su bajo peso molecular mientras otros atributos son debido a su estructura.

#### A) Poder edulcorante

Es el endulzante más dulce de los endulzantes nutritivos esto se debe a que su sabor se percibe más rápidamente en la lengua que la dextrosa y la fructosa en jarabe, presenta el fenómeno de sinergismo, esto es que potencia el sabor de otros endulzantes que actúan junto con el.

#### B) Enriquecimiento del sabor

Contribuye en los atributos funcionales como una rápida percepción del sabor ya sea el sabor dulce o ácido lo que puede reducir los costos de saborizantes, al incorporar 50:50 en una mezcla de sacarosa-fructosa en una bebida se reduce la cantidad de edulcorante en un 22 % y en 10 % del saborizante, actualmente ya se usa en productos lácteos, jaleas, cereales, mermeladas y chocolates.

#### C) Interacciones endulzantes-almidónes

La temperatura de gelatinización del almidón generalmente es influenciada por la cantidad de endulzante presente. La adición de fructosa en general baja el punto de gelatinización del almidón.

D) Control de la humedad

El control de la humedad en un alimento es fundamental y afecta a un gran número de propiedades del alimento a una baja actividad de agua se obtiene una mayor estabilidad microbiológica, química enzimática y organoléptica. La fructosa debido a su afinidad por el agua disminuye la actividad de agua. Una área de gran estudio es el control de la humedad en productos congelados, al añadirse fructosa y balancear la fórmula con otros ingredientes como maltodextrinas, jarabes o gomas se obtiene un balance entre el agua y los cristales de azúcar y se obtiene un producto final con las características deseadas. La fructosa es superior a los edulcorantes nutritivos y humectantes excepto el propilenglicol, en controlar el agua en sistemas congelados.

E) Oscurecimiento

El desarrollo del color por medio de la reacción de Maillard es una de las reacciones que se buscan en algunos productos, en los cuales la fructosa puede participar en la reacción como azúcar reductor.

F) Depresión del punto de congelación

El punto de congelación de un sistema es proporcional al número de moléculas en solución y especialmente en productos como helados y congelados, la fructosa cristalina disminuye el punto de congelación más que otros carbohidratos como la sacarosa o los jarabes cuando se usa en el mismo nivel. Las ventajas de esta depresión incluyen el ahorro de energía, textura final debido a que no hay cristales que rompan las estructuras celulares y la característica de "listo para usarse"

G) Propiedades fisiológicas y metabólicas

## 6. HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN

La fructosa es un azúcar que el cuerpo metaboliza fácilmente su contenido calórico es de 4 Kcal/g pero debido a que es más dulce las calorías por unidad de dulzor son menores, se metaboliza primeramente en el hígado, puede ser útil en el tratamiento de la diabetes sobre todo en los no-dependientes de insulina

### 6.7.3 Aplicaciones

La fructosa principalmente es un endulzante pero no únicamente se utiliza como endulzante, también se usa por sus características de sinergismo, enriquecimiento del sabor y su ayuda para formar geles y su control de la humedad debido a su mayor precio en la comparación con la sacarosa hace que se utilice principalmente en el área de salud, nutricional y farmacéutica, productos como bebidas para deportistas complementos alimenticios y alimentos para diabéticos y dietéticos, se usa también en cereales para desayuno en productos para panadería especialmente cuando se usan sustitutos de grasa ayudando a un efecto en el oscurecimiento especialmente en productos para microondas, en el área de la confitería se puede usar en rellenos para chocolate con una baja actividad de agua, además se usa en mezclas secas de bebidas, pudines y gelatinas. La fructosa enriquece el sabor, da un mejor color y ofrece la posibilidad de aumentar la velocidad de producción por que se necesita menor tiempo para la cocción.

## 6.8 MALTODEXTRINAS

Se designa como maltodextrinas a mezclas de oligosacaridos que consisten esencialmente en unidades de glucosa con enlaces, son productos que se obtienen de la conversión de amilasa en maltosa, son mezclas de maltosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentosa y toman el nombre de maltodextrinas.

### 6.8.1 Producción

Existen dos procesos de una y dos etapas: en el de una sola etapa combina una conversión ácida y enzimática a temperaturas relativamente altas, con la gelatinización del almidón, si la materia prima son granos de maíz se realiza una conversión ácida a los 105 °C. La hidrólisis del almidón se realiza en tanques hasta que se llega a un nivel apropiado de DE deteniendo la hidrólisis con el ajuste de pH o con calor, luego se refina, se purifica y se seca.

En el proceso de 2 etapas se utilizan temperaturas mayores a 105 °C para gelatinizar/hacer la liquefacción ácido enzimática para llegar a un DE bajo, que es seguido por un tratamiento a alta temperatura para asegurar la gelatinización del almidón. Después de ajustar el pH y bajar la temperatura a 82 °C, una segunda conversión usa enzimas bacterianas como alfa amilasa, hasta el DE deseado. La enzima se inactiva y el hidrolizado se refina y se seca.

Existen aproximadamente productos en 12 compañías diferentes, en México se encuentra Arancia International e Industrializadora de Maíz ubicadas en Guadalajara.

### 6.8.2 Propiedades

A) Cohesividad.- Entre las propiedades que presenta están la cohesividad, esta disminuyen con el aumento de Equivalente de Dextrosa, esta propiedad se debe al promedio de tamaño de las moléculas de carbohidratos.

B) Depresión del punto de congelación.- Particularmente en los productos congelados sustituyendo parte de la sacarosa por maltodextrinas, el producto mantiene los sólidos disueltos en el nivel deseado

C) Higroscopicidad.- Las maltodextrinas se pueden usar para remplazar los jarabes por medio de la absorción de la humedad

D) Osmolaridad.- Bajando la presión osmótica de los fluidos previniendo la formación de cristales, y debido a que tiene una alta solubilidad.

## 6. HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN

E) Agente de relleno.- Debido a su bajo sabor dulce, es muy blando al gusto además de que no interfiere con otros sabores.

### 6.8.3 Aplicaciones

1.- Spray.- Encapsulación de sabor es el uso más extensivo que se le da

2.- Agente de relleno.- En productos secos particularmente en mezclas en polvo, pudines, sopas y postres, pasteles y harina para pasteles, cocoas té y té artificiales, sobre todo por la textura firme

3.- Usos médicos.- Se usa principalmente en fórmulas para infantes como base para alimentos sin lactosa

4.- Tabletas.- Como excipientes de medicamentos o como sustituto de sal.

5.- Sustitutos de grasa.- El potencial como sustituto de grasa, se descubrió en Alemania como productos de la hidrólisis de almidón que tienen la habilidad de formar geles irreversibles suaves, este gel puede ser usado para sustituir parte de la grasa o aceite en productos con alta cantidad de grasa como helados y aderezos, el gel da cremosidad como la que da la grasa en la boca. El gel sustituye la grasa y reduce el contenido calórico de los alimentos, algunas de las marcas producidas son Paselli SAZ, Maltrin M40, N-oil II y Oatrim

Se usa también en postres congelados, en el área de lactosa y cremas chantilly haciendo una imitación de la mantequilla, aderezos para ensaladas, confitería, da firmeza y propiedades higroscópicas, recubrimientos de alimentos especialmente con edulcorantes artificiales para producir una dispersión adecuada en agua leche, jugos y similares.

También se usa en la manufactura de antitranspirantes o como encapsulador de ingredientes activos.

### 6.9 JARABE DE GLUCOSA

Los jarabes de glucosa se conocen en USA como jarabes de maíz, debido principalmente a su fuente de producción pero también se puede utilizar como materia prima

papas, tapioca sago o arroz pero no de manera redituable como el maíz, el mayor problema es la proteína y lípidos liberados durante la hidrólisis que representa el 1 % de los sólidos totales.

### 6.9.1 Producción

I. **Conversión Ácida.**- Se produce calentando el almidón a ebullición bajo presión atmosférica por 36 horas con ácido sulfúrico o clorhídrico, que es una hidrólisis de tipo azaroso seguido por una hidrólisis enzimática en la que se utiliza beta-amilasa, para detener la reacción se reduce el pH a 3 en aprox 30 minutos.

II. **Refinación y evaporación.**- La palabra refinación se usa para describir el proceso por el cual el producto hidrolizado y filtrado se purifica y desodoriza para quitar las impurezas, el filtrado elimina las proteínas y lípidos que contaminan el producto, para una refinación fina se utilizan resinas de intercambio ionico. Después de la refinación el jarabe requiere una concentración de aproximadamente 80 % de sólidos para asegurar su estabilidad.

III. **Concentración.**- La evaporación se lleva a cabo a bajas temperaturas para evitar la formación de color y se pueden secar completamente para poder tenerlos como polvos con un contenido de 5 % de humedad, este producto es altamente higroscópico.

### 6.9.2 Propiedades

Están dadas básicamente por dos factores, su peso molecular promedio que esta en función del DE y la distribución de carbohidratos a un DE particular, esto quiere decir que dependiendo del valor de DE se pueden obtener diversos tipos de jarabes en el siguiente cuadro se muestra la variación de las propiedades de acuerdo al nivel de DE del jarabe.



## 6. HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN

Cuadro 6.2 Propiedades de los Jarabes de Glucosa

Propiedad	Bajo DE alto peso mol. prom	Alto DE bajo peso mol. prom.
Agente texturizador	+	-
Capacidad de oscurecimiento	-	+
Cohesividad	+	-
Formación de color	-	+
Control de la cristalización	+	+
Estabilizador de emulsiones	+	-
Fermentabilidad	-	+
Enriquecedor del sabor	-	+
Estabilizador de espuma	+	-
Reducción del punto de congelación	-	+
Higroscopía	-	+
Valor nutritivo	-	+
Presión osmótica	-	+
Preservación	-	+
Prevención de formación de cristales	+	-
Prevención de cristalización de sacarosa	+	-
Brillo	+	+
Endulzante	-	+
Agente adelgazante	-	-
Viscosidad	+	-

Hebeda 1992

El control de la higroscopía en las formulas alimenticias es la mayor función de los jarabes de glucosa debido a que se compone de dextrosa y maltosa, particularmente solubles en el paladar, además la ausencia de la tendencia a formar películas mejora la liberación del sabor especialmente en el área de la confitería.

### 6.9.3 Aplicaciones

Se usa tanto en áreas alimenticias como no alimenticias, entre las más importantes se encuentran la confitería, panadería, frutas procesadas y producción de cerveza.

Se pueden hacer dulces de leche duros, masticables y suaves, caracterizados por el desarrollo de color y sabor via reacción de Maillard con las proteínas de la leche, jaleas y

mermeladas, fondants, que son sistemas de azúcar donde se controla mucho la cristalización del azúcar, bombones, chicles, cremas no lácteas, frutas cubiertas postres congelados como helados o mousse, panadería, cereales para desayuno salsa catsup y aderezos bebidas suaves y alcohólicas y también en la industria farmacéutica tanto como materia prima para la producción de medicamentos como excipiente.

### 6.10 CICLODEXTRINAS

Se obtienen a partir del almidón o sus derivados y una enzima, la ciclodextrinaglicosiltransferasa (CDGTasa), que cierra el enlace 1,4 en una molécula circular que puede contener de 6 a 8 moléculas de glucosa, estas ciclodextrinas son capaces de formar asociaciones con una gran variedad de moléculas para formar complejos de inclusión y obtener cambios deseables en las propiedades químicas y físicas alterando propiedades como la solubilidad, volatilidad y estabilidad química

#### 6.10.1 Producción

Se usa una gran variedad de CDGTasas de diferentes fuentes, todas las enzimas realizan 3 reacciones, ciclización, transglucosidación e hidrólisis, con la ciclización se forma un anillo esta reacción es reversible, la transglucosilación une la molécula cíclica a una molécula de glucosa o a un oligosacárido resultando en una cadena larga, si hay presencia de agua se produce la hidrólisis y la enzima actúa como una alfa-amilasa. Si la reacción se lleva a cabo por suficiente tiempo se llega a un equilibrio entre ciclodextrinas y productos no cíclicos.

Existen dos métodos de producción, usando solventes y no solventes. En el método de los solventes se producen básicamente ciclodextrinas, se llena un reactor con el substrato parcialmente hidrolizado (DE 10), el solvente y la enzima, al final de la reacción se utiliza un complejo orgánico para dirigir la reacción y producir la transglucosidación y la hidrólisis, las ciclodextrinas se separan por centrifugación o filtración y después se refina como los productos anteriores, se puede cristalizar y secar.

6.10.2 Aplicaciones

Debido a su forma puede tener muchos efectos benéficos como el incremento de la solubilidad al formarse el complejos de los productos que se desean solubilizar, la ciclodextrina actúa como una caja donde se coloca la parte hidrófoba de la molécula dejando la parte hidrófila más accesible al agua, esto puede ser útil en medicamentos que se disuelven lentamente, en el área de alimentos este concepto de solubilidad puede ser usado para obtener una mejor dispersión de sabores y otros ingrediente incrementando la claridad, muchos aceites son difíciles de mezclar especialmente con ingredientes secos cuando se utilizan ciclodextrinas los aceites se convierten en sólidos y se pueden mezclar más fácilmente.

Otra aplicación es la estabilización previniendo la volatilización, al presentar una barrera atrapando los compuestos y olores indeseables que pueden ser tóxicos, al atraparlos impide que se liberen a la atmósfera, estabilizan las reacciones ya que la ciclodextrinas pueden funcionar como una caja que protege de reacciones indeseables y de efectos de labilidad ante el calor o la luz, estas propiedades pueden ser aprovechadas en áreas como alimenticia, química, farmacéutica, analítica, diagnóstica y otras áreas industriales.

## 7 APROVECHAMIENTO DE DESPERDICIOS AGROINDUSTRIALES

### 7.1 INTRODUCCION

La cantidad de desechos agroindustriales que se genera es de casi la mitad de la producción de la agroindustria, por medio del uso de la biotecnología se puede hacer uso de estos desperdicios y en lugar de que generen contaminación y necesidad de lugar donde colocarlo, se convierten en materias primas, pues la biotecnología tiene una gran potencial para transformar materias primas vegetales de baja digestibilidad o bajo contenido proteico en materias primas equilibradas en cuanto a energía digerible y proteínas, o para convertirlos en alimento pecuarios y biofertilizates.

La recirculación de residuos orgánicos tienen interés para la industria agroalimentaria por ser de manera sencilla y efectiva de reducir la contaminación ambiental y por que se convierte en un recurso lo que se considera, usualmente, como un problema. Los residuos orgánicos más importantes asociados con la industria alimentaria son:

- ❖ Excretas de animales confinados en las explotaciones intensivas, corrales de engorda, establos lecheros, zahurdas y gallineros.
- ❖ Afluentes líquidos: aguas de desecho y provenientes del proceso de agroindustrias.
- ❖ Residuales sólidos de grandes empresas agroindustriales: bagazo de procesadora de cítricos y otras fruta tropicales, residuos sólidos de cultivo de tierras como pajas

El volumen de esto residuos es muy importante y aveces se concentra en áreas muy pequeñas lo cual representa muchas veces un problema ecológico. El potencial casi ilimitado de la aplicación de organismos, sistemas o procesos biológicos en el aprovechamiento de residuos agrícolas e industriales, puede producir económicamente una extensa variedad de sustancias, que en un futuro cercano, junto con el descubrimiento de las técnicas de la ingeniería genética, cultivo de tejidos y posibles aplicaciones a los recursos renovables, darán sin lugar a duda una

## 7. DESECHOS AGROINDUSTRIALES

gran importancia en la producción eficiente y competitiva de bienes y servicios.

### *7.2 PRODUCCIÓN DE BIOGAS APARTIR DE DESECHOS AGROINDUTRIALES*

Debido a la necesidad de energía en el mundo actual, los precios de las fuentes de energía como el petróleo se han encarecido, así que en muchos países desarrollados se ha intensificado la investigación para la explotación de fuentes de energía barata, desarrollándose así la producción de biogas, las plantas productoras de biogas son un mecanismo ecológicamente puro para obtener potencia y energía ya que proveen un combustible limpio, alta y eficientemente aplicable con combustible exento de residuos contaminantes.

En una fermentación anaeróbica, la mayor parte de la energía se utiliza para proveer las necesidades de la célula obteniéndose una gran variedad de productos intermedios, mientras que en una fermentación aeróbica se produce biomasa, bióxido de carbono y agua con la utilización completa de los azúcares.

Cuando la materia prima se fermenta en digestores, tan solo parte de ella se convierte en gas metano, algo de material no digerido se acumula en el fermentador y otra parte pasa al residuo y a la espuma formada.

La producción de biogas es un proceso anaerobio, que se realiza por la asimilación de los azúcares presentes en polisacáridos, que primero se transforman en diversos productos como: etanol, propionato, acetato, fumarato y butirato entre otros, y que finalmente son degradados hasta metano y  $CO_2$ , se puede usar como sustrato el estiércol, ya que tiene una gran variedad de microflora.

#### 7.2.1 Características

La composición promedio del biogas :

Metano 60-70%

Bióxido de Carbono 30-40%

---

Hidrogeno	5-10%
Nitrógeno	4-6%
Acido Sulfúrico	Trazas

Es un gas incoloro, inodoro e insípido y además de una densidad menor a la del aire, su peligrosidad asfixiante y explosiva disminuye entre más alto sea el local de almacenamiento con ventilación.

La temperatura crítica del metano es - 82 °C y una presión crítica de 45.8 Kg/cm<sup>2</sup>, características que obligan a usarlo en su estado natural ya que el equipo para licuarlo consume demasiada energía eléctrica. En cuanto al hidrogeno este no es necesario eliminarlo ya que este aumenta el poder calórico del gas. La cantidad de ácido sulfúrico presente es baja pero debe ser eliminado pasando el gas a través de filtros que contengan limadura de fierro para eliminarlo.

Los usos que puede tener este gas se encuentran:

- ❖ Para alumbrado público
- ❖ Para cocinas
- ❖ Para bombeo de agua
- ❖ En las industrias mecánica y eléctrica
- ❖ En las industrias que utilizan fuentes de calor como en el secado, destilación, incubación, calderas, etc.

### 7.2.2 Producción

Antes de empezar la fermentación se hace pasar el estiércol por cal viva la cual absorbe la humedad lo que produce un gas con mayor poder calórico, el CO<sub>2</sub> que se encuentra presente reduce el poder calórico del combustible y este se puede eliminar pasando el gas a través de agua de cal o a gran escala se pueden usar sustancias como dietilamina, trietilamina, hidróxido de calcio, carbonato de potasio.

## 7. DESECHOS AGROINDUSTRIALES

---

El estiércol de bovino produce 300 litros de gas metano por kilogramo de estiércol seco, de la siguiente manera:

Días	% de Gas obtenido
0	0
10	55.0
20	25.5
30	10.5
40	9.0

Para la optimización de la producción de gas se tienen que considerar los siguientes puntos:

- **Acidez:** La acidez muy alta frena bruscamente el proceso de fermentación y a un pH alto como consecuencia se da la formación de  $\text{CO}_2$  y la digestión disminuye, un pH adecuado para las bacterias metanogénicas es de 8.0
- **Sólidos:** Un adecuado contenido de sólidos facilita la digestión por lo cual el contenido de sólidos facilita la digestión por lo cual el contenido de sólidos debe andar alrededor de 8%
- **Relación Carbono/Nitrógeno:** Si la cantidad de nitrógeno es baja las bacterias morirán por falta de nitrógeno, se produce  $\text{CO}_2$  y se disminuye la cantidad de carbono por lo tanto la digestión se vuelve más lenta.
- **Temperatura:** la digestión por las bacterias se da en el rango de  $0^\circ$  a  $77^\circ \text{C}$  pero una mejor digestión se efectúa a  $70^\circ \text{C}$ .

Aproximadamente el 80% del gas que se produce se hace en los primeros 20 días de digestión, una vez obtenido el gas, los residuos sirven como fertilizante ya que la materia orgánica es superior al 50% de los sólidos totales lo cual hace al residuo un excelente acondicionador de suelos.

La agitación del digestor es un aspecto muy importante para la velocidad de producción, que puede ser elevada sustancialmente al renovar con frecuencia el contacto del

sustrato con las bacterias metanogénicas, y por la necesidad de reducir la cantidad de espuma ya que esta afecta directamente a la producción de gas. La forma más sencilla y adaptable para una planta pequeña en la que no es costeable suministrar energía externa, es la agitación manual, bien siendo mediante un volante que mande el movimiento de la propela en el interior del tanque o bien por medio de un anillo o cuadro superficialmente pesado para que descienda al fondo de la mezcla colocada dentro del digestor y sostenido por un cable que sale a través del domo colector desde donde puede ser subido y bajado provocando así una turbulencia en el material.

Un sistema para una planta de mayor capacidad es la operación de una bomba centrífuga cuya descarga en el interior, está al centro del tanque, colocando la conexiones de carga y descarga a diferentes niveles para generar así una turbulencia en el material.

Para el calentamiento del tanque existen diversos métodos entre los que se encuentran:

- 1.- La instalación de serpentines fijos circulando en su interior agua caliente y colocados cerca de la paredes del tanque
- 2.- La instalación de serpentines rotatorios circulando en su interior agua caliente, esto sirven además como medio de agitación.
- 3.- El calentamiento de la mezcla de estiércol en un intercambiador de calor antes de entrar al digestor.
- 4.- En el caso de un digestor de dos etapas, calentar el líquido saliente de la segunda etapa y próximo a recircular a la primera etapa.
- 5.- La inyección de vapor por el fondo del tanque.
- 6.- Por el empleo de energía solar.

En una instalación chica donde el gas se usa regularmente, éste se recoge en un tambo de material invertido sobre la superficie de la materia a tratar, es decir, formando parte del propio digestor, se pueden obtener ventajas empleando uno o más colectores separados del digestor en caso de plantas más grandes, o bien cuando el gas no se usa enseguida, dando la



## 7. DESECHOS AGROINDUSTRIALES

ventaja de presentar menor presión en la superficie del estiercol y por lo tanto una formación más fácil del gas, otra ventaja es la dificultad de que existan fugas de gas, así como la penetración de aire, la peligrosidad de la primera la presenta el alto grado de explosividad del metano y la segunda, dado que la más leve cantidad de oxígeno en el interior del digestor es suficiente para alterar la producción de gas.

Los digestores pueden construirse sobre o bajo el nivel de la tierra, para una planta pequeña resulta más costeable hacer el digestor de acero pero a medida que aumenta la capacidad, el costo de la construcción con acero se incrementa notablemente de tal forma que es mejor construir un tanque de concreto y tabique.

Si la planta es superficial se tienen la facilidad de captar la energía solar si se pinta de negro el digestor, absorberá mayor cantidad de calor por radiación, y en cierta medida evitar el costo de instalación de algún medio de calentamiento.

A medida que la humedad es menor, la facilidad de combustión es mayor, el agua puede ser eliminada si pasamos el gas a través de cal viva, aunque con ello se afecta el porcentaje de bióxido de carbono.

La presencia de bióxido de carbono en el gas presenta el aspecto más grave, reduce el poder calorífico del combustible y aún más aumenta la capacidad de almacenamiento así como incrementa la presión en los tanques de almacenamiento.

La operación de estas plantas es muy sencilla después de su arranque, al inicio del ciclo se elimina el estiercol mezclándolo con la cantidad de agua necesaria para tener 8.0 % de sólidos y vigilando que la acidez se mantenga en un valor de 3 a través del tanque receptor. Esta operación se continúa hasta que alcanza en el digestor un nivel de 2.20 m<sup>3</sup> a partir del fondo, a tal capacidad, se quitan los contrapesos colocados en los soportes del domo colector, para que éste descienda hasta el fondo, abriendo de autemano la válvula para la salida de gas, colocada en su tapa y que permitirá el desalojo del aire contenido entre la superficie de la mezcla del fermentador y el interior del domo; la presencia de la más mínima cantidad de oxígeno es

dañina por lo que se procura eliminar totalmente el aire.

Una vez realizado esto se cierra la válvula del domo y se procede a poner en marcha el sistema de calentamiento abriendo al máximo válvulas del sistema permitiendo el paso del agua por toda la tubería. La única válvula que no se abre es la mezcladora. A la vez que se suministra calor al tanque, se debe mantener con agitación periódica para homogeneizar la temperatura en el interior de la mezcla, cuando se obtienen la temperatura uniforme de 35 °C en el sistema se regula el flujo de agua mediante el mezclador, para evitar sobre calentamiento.

Apartir de esto se espera la producción de gas, efectuando en los siguientes ocho días purgas de gas por la válvula de salida, con el propósito de eliminar la más mínima cantidad de aire, así como algo de vapor de agua en el arranque.

La agitación se lleva a cabo durante 5 a 10 minutos dos veces al día para una mayor generación de gas, en estas condiciones la fermentación perdurará por aproximadamente 25 días; después de este periodo se cargan diariamente al digestor con 200 L de mezcla de agua-estiercol y se retiran a la vez 190 L de solución digerida, manteniéndose así la operación en línea continua.

Una planta de este tipo provee gas para los requerimientos de un grupo de 3 ó 4 familias o bien un pequeño rancho que posea 9 a 10 cabezas de ganado vacuno o 20 cerdos con lo que proveerá el estiercol suficiente para la alimentación a la instalación.

#### 7.2.2.1 CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN

Considerando que el estiercol produce 3001 Kg de gas por Kg de estiércol seco, en un digestor que contenga 7% de sólidos y aun régimen de 35 días, se calcula el volumen del digestor y sus accesorios, para encontrar el volumen de gas producido por día y dimensionar las características de la planta.

#### 7.2.3 Compresión del gas

Las presiones a las que con regularidad se comprime el gas son de 7 a 10 kg/m<sup>2</sup> en instalaciones pequeñas, en las de tamaño regular de 28 a 35 kg/m<sup>2</sup> y en las grandes de 135 a

## 7. DESECHOS AGROINDUSTRIALES

---

200 kg/ m<sup>2</sup>, al comprimir el gas se obtienen ventajas como son:

- Se facilita su transporte por tubería a lo diferentes puntos de servicio
- Su volumen se reduce considerablemente y es posible abastecer cilindros para usar el biogas en vehículo con motor de combustión interna de cuatro tiempos.
- Se reduce el volumen del contenedor primario del digestor
- El gas puede ser empleado en motores diesel o gasolina estacionarios, diseñados o adaptados para tal uso.
- La homogeneidad del gas aumenta por tener volúmenes considerables almacenados en el mismo punto.

Aunque también presenta sus desventajas:

- Casi el 25 % de la energía procedente del digestor necesita ser utilizada para comprimir el gas, a su vez la eficiencia de la compresión es del 25 %
- Se estaría comprimiendo 1/3 de gas que no es combustible
- Las posibilidades de fuga aumentan
- Los problemas de mantenimiento son mayores

### 7.2.4 Poder calorífico

El poder calorífico del biogas en estas condiciones lo convierte en un combustible apreciable tanto en el ámbito doméstico, alumbrado y cocción de alimentos, en la industria en la producción de energía calorífica, mecánica o eléctrica al ser usado en calderas o en motores de combustión interna.

Cuadro 7.1 Poder calorífico de diferentes combustibles

---

Combustible	Poder calorífico Kcal/m <sup>3</sup>
Biogas	5,335
Gas Natural	9,185
Metano	8,847
Propano	22,050
Butano	28,588
Electricidad	60 /Kw-hr
Carbón	6,870 /kg

---

---

Petróleo	11,357 /kg
Fuel oil	10,138 /kg

---

### 7.2.5 Usos

Al decidir el sistema de lavado, compresión y almacenaje de biogas y conocer además el volumen producido por día, se puede decidir la forma de energía en la que va a transformar el gas, entre las que encontramos:

- Tener toda la energía disponible como electricidad
- Tener un sistema combinado como energía calorífica y energía eléctrica
- Tener toda la energía directamente como energía calorífica

Si la elección fuera eléctrica, existe algunos criterios para la selección de plantas generadoras:

Que los motores de gasolina puede adaptarse para usar biogas

- ✓ Que para motores diesel, el biogas se usa en 80 % usando el 20 % restante de diesel para conservación de sus inyectores
- ✓ El consumo de biogas por hora de operación en el rango de media a plena carga ser tal que permita operarlo de 5 a 6 horas al día
- ✓ Que pueden resistir por lo menos 6 horas de operación diaria
- ✓ Que la vida de motor al régimen de trabajo especificado interiormente justifique su inversión.
- ✓ Que su mantenimiento no requiera mano de obra especializada.

Considerando el generador este sería de corriente alterna, trifásico, de 220 volts, tal que la energía eléctrica que genera sea suficiente para cubrir las necesidades previstas tomando siempre en cuenta un diseño robusto que resista regímenes de trabajo de 5 a 6 horas diaria sin alterar su comportamiento.

Si la alternativa fuera tener un sistema combinado como energía térmica y energía eléctrica, entonces se debe tener en cuenta que los quemadores y carburadores para biogas

## 7. DESECHOS AGROINDUSTRIALES

deberán ser diseñados específicamente o adaptar las convencionales tomando en cuenta el poder calorífico del biogas, las proporciones gas-aire, la velocidad de la mezcla y la presión de gas, esto nos especificará el área de la espera, la toma de aire primario y el anillo del quemador o la cámara de combustión, la experiencia señala que el área de las espreas y la del anillo debe de ser  $1/300$ , es decir para una espera de 1 mm de diámetro el del anillo deberá de ser de 17 mm.

Para quemar  $1\text{m}^3$  de biogas son necesarios  $9.57\text{m}^3$  de aire.

### 7.2.6 Seguridad

El biogas puede causar explosiones provocadas por el metano su componente principal, que tienen niveles de explosión que van del 5.4 % al 13.9 %.

Tomando en cuenta su composición, necesita una temperatura entre 650 y 750 °C, para deflagrar o explotar, la cual puede ser alcanzada por un fósforo al encender o al producir chispas por choque.

La densidad de su composición son también factores importantes en la seguridad, pues tomando en cuenta que la densidad del aire es mayor que la del biogas, este se puede diluir fácilmente perdiendo así su peligrosidad.

Se deben seguir las siguientes precauciones:

- \* Al llenar los tanques de biogas, estos deben estar libres de oxígeno al igual que las líneas de transporte de gas
- \* Se deben realizar pruebas de fugas con agua jabonosa
- \* Cuidar que no haya flamas, brasas, cigarrillos encendidos o calzado con clavos capaces de producir chispas en las áreas de compresión y carga.
- \* Los locales donde se maneje biogas deben ser de preferencia altos y ventilados.
- \* Los extinguidores deben ser de  $\text{CO}_2$  y polvo ABC.

7.3 COMPOSTEO FERMENTACIÓN AL AIRE LIBRE DE MATERIA ORGÁNICA.

El proceso de composteo empieza, con una colección heterogénea de material orgánico, el cual contiene una población grande de hongos y bacterias que se desarrollan e inician el proceso de composteo en el momento en que se presentan condiciones favorables de humedad, temperatura y aireación.

El composteo es una degradación microbiana de sólidos orgánicos por medio de una respiración anaerobia que pasa por una fase termofílica, este composteo permite aprovechar los desperdicios agrícolas para obtener fertilizantes de buena calidad, que presentan las siguientes ventajas:

- \* La creciente escasez y alto costo de los energéticos restringen la producción de abonos químicos hechos a base de nitrógeno, por lo que se busca el máximo aprovechamiento de los abonos orgánicos.
- \* La retención de humedad mayor en los abonos orgánicos debido a su estructura.
- \* Formación de complejos orgánicos
- \* Reducción de la erosión de los suelos
- \* Liberación de CO<sub>2</sub> que propicia la solubilidad de nutrientes
- \* Suministro de nitrógeno aprovechable para las plantas.

Se estima que en México hay una producción anual de 48,700,00 Ton de estiércol de ganado estabulado susceptible de manejarse adecuadamente, esto representa que se pueden producir 9,900,000 Ton. de subproductos industriales agrícolas, además de la gran cantidad de basura que se genera en todas las ciudades, al separar la basura en inorgánica y orgánica, esta última se puede utilizar en el proceso de composteo y producción de abonos orgánicos.

7.3.1 Factores importantes en el Composteo

9 Temperatura: Dado que la pérdida de calor es proporcional a la superficie y la

## 7. DESECHOS AGROINDUSTRIALES

generación de calor al volumen, en las pilas grandes se tienen aumentos continuos de temperatura, mientras que en las pilas pequeñas se presenta un estancamiento temporal de la temperatura, la temperatura optima es de descomposición tomando en cuenta la producción de  $\text{CO}_2$  es de 50-60 °C. El calentamiento de masas de la fermentación por medio de la actividad microbiana puede alcanzar un máximo de 76 °C en caso de que se tenga suficiente agua para el crecimiento y la temperatura limite es de 80 °C

§ Humedad: Un mismo contenido de humedad puede reflejar situaciones muy distintas respecto de la disponibilidad del agua para los microorganismos, dependiendo de las características físicas y químicas de los materiales orgánicos considerados, dependiendo del tipo de desperdicio se tienen diferentes humedades, para la basura municipal de 50-60%, en el caso de contener mayor material celulósico llega hasta 67%.

§ Aireación: Esta tiene dos finalidades suministrar oxígeno y extraer el calor producido, esta se realiza por medio del volteo periódico, el cual se realiza en base a la temperatura de las capas intermedias, la cual no debe ser mayor de 70 °C cuando su humedad excede de 60%

§ Relación Carbono/Nitrógeno: La mayoría de los microorganismos usan partes en peso de carbono por cada parte de nitrógeno. Por lo cual se enriquece con fosfato o roca fosfórica así como ácidos para estabilizar la cantidad de nitrógeno.

### 7.3.2 Cambios durante el composteo:

- Los microorganismos utilizan rápidamente los carbohidratos fácilmente degradables y los lípidos presentes, las hemicelulosas y las celulosas son degradadas hasta cierto punto mientras que la lignina es el material más resistente a la degradación.
- El pH inicial es ligeramente ácido pH 6, obteniéndose al final un pH ligeramente alcalino, a causa de la producción de amoníaco
- Las formas solubles de nitrógeno son asimilables de inmediato y las formas insolubles son solubilizadas antes de ser usadas por los microorganismos, durante la fermentación se

## 7. DESECHOS AGROINDUSTRIALES

produce amoníaco por medio de la deaminación oxidativa de aminoácido. La mayor parte del nitrógeno sintetizado se encuentra como proteína.

Dentro del desarrollo de este proceso se ha encontrado que la adición de  $\text{CaCO}_3$  o  $\text{Ca(OH)}_2$  acelera la velocidad de descomposición de los materiales orgánicos, desafortunadamente su uso conlleva una desventaja, que es la pérdida de grandes cantidades de nitrógeno como amoníaco, debido al pH ligeramente básico que favorece su formación.

### 7.3.3 Microorganismos presentes

Con relación a los microorganismos involucrados durante la fermentación de materiales orgánico se presenta una clara sucesión de poblaciones microbiana. En un principio durante la etapa mesofílica se desarrollan hongos y bacterias productoras de ácido. Al aumentar la temperatura por encima de  $40\text{ }^\circ\text{C}$  son sustituidas por bacterias y hongo termofílico y actinomicetos. A temperatura cercanas a  $70\text{ }^\circ\text{C}$  se encuentran principalmente bacteria esporulante. Al disminuir la temperatura reaparecen las bacterias y hongos mesofílicos, en esta última etapa e encuentran también protozoario, nematodos e insectos en el material fermentado.

### 7.4 PRODUCCIÓN DE HONGOS

Los hongos son organismos heterótrofos, es decir, solo son capaces de propagarse en material orgánico, ya que son dependientes de los organismos autótrofos para el suministro de materia orgánica en la cual pueden crecer.

Ejemplos de algunos hongos son:

Hongo	Se encuentra en:
<i>Pleurotus ostreatus</i>	En árboles
<i>Volvariella volvacea</i>	En paja
<i>Agaricus sp.</i>	En suelo rico en humus
<i>Pleurotus ostreatus e.</i>	En maíz y diversos tipos de pajas,



Preparación del sustrato:

Para el cultivo de *Agaricus sp.*

- \* Humedad necesaria del 70%, una disminución en la cantidad de agua en el sustrato da como consecuencia una falta de actividad microbiana y una disipación muy rápida del calor durante la fermentación al aire libre.
- \* Material uniforme en el caso de mezcla de diversos materiales o aditivos (se requiere de homogeneización, química como física) con el fin de distribuir los componentes y ablandar la estructura de los materiales fibrosos.
- \* Sólidos totales menores al 75%, una cantidad mayor al 75% se presentan en condiciones de anaerobiosis como consecuencia de los pocos espacios libres y de la dificultad de intercambio de gases.
- \* Requiere de una fermentación termofílica controlada.
- \* El tipo de nutrientes en el material inicial (pajas y estiércol) no es directamente asimilable por este tipo de microorganismos.

*Agaricus sp.* y otros hongos comestibles cultivables son sumamente sensibles a la presencia de amoníaco, el que favorece también el desarrollo de otro tipo de micromicetos y macromicetos dañinos (*chaetoniium sp.*) al micelio de los hongos comestibles o bien compiten por sus nutrientes con el hongo comestible cultivado.

En el caso de *agaricus sp.* se necesita cerca de 250 gr de materia orgánica por cada kilogramo de cuerpos fructificantes (epóforos) formados (90% de humedad)

La carencia de algún mineral será elemento limitante para el desarrollo de hongos comestibles, ya que la cantidad de minerales presente en los sustratos al término de la fermentación es de 10% en base húmeda y 30% en base seca.

7.4.1 Producción

7.4.1.1 Fase I

Calentamiento (fermentación) al aire libre que toma alrededor de 12 días, en esta fermentación el material se divide, mezcla y humidifica con el objetivo de reducir su estructura y producir material homogéneo, en esta fase se realiza el consumo de nutrientes degradables, la conversión de suficiente nitrógeno a formas de proteína microbiana, se abre la estructura de la lignina y se humidifica, al material se le acondiciona para que se mantenga en la humedad correcta 73%.

Las bacterias y los hongos mesofilicos consumen los nutrientes fácilmente degradables (asimilables) produciendo calor metabólico que inicia este proceso, la materia orgánica actúa como aislante térmico y este permite el aumento de la temperatura en el interior de la pila de material en fermentación que normalmente llega hasta 75 °C, estas condiciones favorecen el proceso de producción de amoniaco microbiano creando una atmósfera con alto contenido en amoniaco en el interior de la pila.

7.4.1.1.1 Reacciones químicas que se producen en el interior de la pila:

➤ Caramelización de polisacáridos: A esta temperatura de 75 °C. Estos forman una capa oscura que cubre las paja en descomposición, estos polisacáridos son probablemente de origen microbiano ya que los organismos presentes en la fermentación producen polisacáridos extracelulares.

En los hidrolizados de esta capa oscura se encuentran glucosa, galactita y manosea, los cuales son azúcares presentes en las cápsulas celulares y que desaparecen del sustrato durante el ciclo de crecimiento del microorganismo, estas reacciones son importantes ya que consisten en la síntesis de una fuente de nutrientes específica para *Agaricus sp.*

➤ Síntesis del complejo lignina-humus-proteína

La lignina presente en desperdicios agrícolas de naturaleza fenólica es parte de

## 7. DESECHOS AGROINDUSTRIALES

reacciones de polimerización con sustancias nitrogenadas en sustancias húmedas que contienen nitrógeno pegado a su estructura.

Compuesto Húmedo: 20-40% con aminoácidos

10-15% como amoníaco, el resto es resistente a la hidrólisis.

En el caso de reacciones de aminoácidos y grupos fenólicos, se sabe que toda la estructura del aminoácido es atrapada y que una reacción subsecuente de polimerización es posible dependiendo del tipo de aminoácido. La captura de iones amonio por grupos fenólicos ocurre a valores de pH entre 8 y 9 un valor comúnmente encontrado en pila de fermentación en la

### Fase I

Este tipo de proceso es muy importante ya que la conversión de las fuentes de carbono fácilmente degradables son convertidos en biomasa simultáneamente con la asimilación de fuentes solubles de nitrógeno y la incorporación posterior de estos nutrientes al complejo lignina-humus-proteína. Esto confiere al sustrato producido al término de la fermentación una selectividad muy grande para el cultivo de hongo del tipo *Agaricus*, dado que este organismo es el único capaz de utilizar tales sustancias para su crecimiento.

### ➤ Oxigenación

El oxígeno necesario es suministrado por medio de rotación de pilas, en la base del centro de la pila a causa de la carencia de  $O_2$  disminuye la actividad microbiana, aumenta la concentración de  $CO_2$  presentándose concentraciones anaerobias.

Arriba de esta zona se registran las mayores temperaturas de 65- 80 °C, una gran amonificación y actividad química ( reacciones de caramelización y humidificación), estas actúan con las condiciones más favorables y las dimensiones de la pila deben ser tales que la mayor parte de esta se encuentra en esas condiciones

En la zona comprendida entre las distancia de 15 a 40 cm. de la superficie hay una gran actividad de mohos y actinomicetos termófilos a temperaturas que varían de 45 a 60 °C y una

concentración de CO<sub>2</sub> de 10% y los procesos de descomposición microbiana se encuentran al máximo.

La última capa se encuentra algo seca y con poca actividad termofílica aprox. 45 °C y CO<sub>2</sub> al 5%

#### 7.4.1.2 Fase II

En esta fase el producto del composteo al aire libre, es sujeto a un acondicionamiento antes de ser inoculado con el micelio de *Agaricus*, esto tiene dos finalidades importantes:

1.- Producir un sustrato electivo para *Agaricus* lo más uniforme posible, lo que significa que se deben consumir la totalidad de polisacarido fácilmente asimilables, se somete la totalidad del sustrato a las condiciones de descomposición termofílica aerobia.

2.- Prevenir que en el sustrato se encuentren organismos dañinos al micelio de *Agaricus* o que compitan con el por las fuentes de nutrientes, este paso de desarrollo del microorganismo termofílico tiene la finalidad de la síntesis de biomasa microbiana la cual servirá como fuente de nutrientes a *Agaricus*

Los microorganismos activos durante esta fase, con sus temperaturas optimas de desarrollo son:

Bacterias termofílicas	60-65 °C
Actinomicetos	55-60 °C
Hongos termofílicos	35-45 °C

Este se lleva acabo por disminución gradual de la temperatura de 60 a 45 °C (aprox. 2°C por día), lo que ocasiona una sucesión gradual de la poblaciones de los organismos antes mencionados terminado en los hongos termofílicos. Se logra acometiendo la totalidad del sustrato a una temperatura de 60°C durante 4 hora más con una humedad mayor al 70%, esta fase termina cuando no se detecta más amoniaco libre en el sustrato., lo cual esta íntimamente relacionado con la disminución del pH hasta valores de 7-7.5, así mismo no se deben detectar olores rancios (que indican resto de fermentación anaerobia). El producto obtenido después de

## 7. DESECHOS AGROINDUSTRIALES

esta fermentación tiene las características semejantes no importando cual haya sido el material de con el cual se inicia, paja, estiércol de caballo, gallinaza, etc.

### 7.4.2 Cambios en el sustrato durante la fermentación

§ Humedad.- El valor óptimo de crecimiento aeróbico está en 70-71 %, al terminar la fermentación se busca reducirla hasta el 66%

§ Fuente de nitrógeno.- Pérdida mínima de nitrógeno durante la fermentación sin afectar negativamente el desarrollo microbiano, la concentración inicial de nitrógeno en el sustrato es de 1.5 a 2.0 %, después del proceso de fermentación el sustrato contiene 1.5% de nitrógeno en el caso de estiércol de caballo y de 2% en el caso de pajas en la preparación, el nitrógeno a controlar es la cantidad de  $\text{NH}_3$  presente en el sustrato no debe exceder de .4 a .45 %

§ Fuente de carbono.- Los polisacáridos fácilmente degradables deben haber desaparecido en el producto en la segunda fase mientras que las sustancias difíciles de metabolizar (lignina, celulosa y hemicelulosa), permanecen casi intactas, esto le otorga al sustrato selectividad para el desarrollo de hongos.

§ Relación Carbono/Nitrógeno.- La relación óptima para el desarrollo de *Agaricus* es de 15, para iniciar la fermentación al aire libre debe de ser de 30

§ pH - Un pH neutro es el óptimo para el desarrollo de *Agaricus*, mientras que el desarrollo bacteriano es favorecido por uno ligeramente básico (7.5-8.5)

Los materiales iniciales (estiércol de caballo o mezclas de pajas o gallinaza) tienen valores básicos de pH (9.0) por lo que se acostumbra agregar algo de  $\text{CaSO}_4$  para disminuir un poco el pH, entre 25 Kg de  $\text{CaSO}_4$  por tonelada, disminuyendo el pH del sustrato hasta 6.5.

## 7.5 TRATAMIENTO Y ELIMINACIÓN DE LOS VERTIDOS DE LAS INDUSTRIAS DE CONSERVAS VEGETALES.

Las industrias de conservas producen en sus operaciones de elaboración, residuos

sólidos y afluentes que son una fuente muy rica para la proliferación de microorganismos cuya contaminación puede considerarse baja con respecto a la de otras industrias. Los contaminantes de estos efluentes son principalmente materia orgánica y en algunos casos desechos de álcalis y otros productos químicos empleados en el proceso de elaboración. Para la depuración de estos afluentes no se puede aplicar un tratamiento general ya que cada industria presenta características diferentes dependientes de la materia prima, tipo de instalación, tecnología aplicada, etc. Además hay que tomar en cuenta que los desechos no son homogéneos y por lo tanto los perfiles de contaminación varían durante la época de fabricación, sin embargo los factores determinantes para la elección del procedimiento de depuración más adecuado son la cantidad de residuos producidos, características de los mismos y su concentración en las aguas residuales.

Por estas razones es necesaria la evaluación del nivel de contaminación del agua donde se han establecido varios parámetros; los más utilizados en el estudio de las aguas residuales de las industrias de conservas son: Residuos, sólidos en suspensión, sólidos sedimentables, sólidos disueltos, demanda biológica de oxígeno y demanda biológica química; y pH.

Las frutas u hortalizas se someten en la fábrica a una serie de operaciones para sus transformaciones. En la mayor parte de estas operaciones se producen residuos en cantidad más o menos importante, según la naturaleza del producto, procedencia o tratamiento al que se someten.

Los residuos sólidos son pieles, huesos, partes maltratadas, hojas que proceden de las operaciones de selección, cortado, pelado mecánico, deshuesado, descorazonado, trillado, etc. Estos son de forma, tamaño y características diferentes según la materia prima y la operación aplicada. La eliminación de estos residuos se realiza mediante sistemas mecánicos simples.

Las operaciones de lavado pelado químico, escaldado, esterilización enfriamiento y limpieza en general, se realizan mediante el empleo de agua limpia. Los residuos producidos: tierra, suciedad, restos de plaguicidas, ácidos, álcalis, azúcares, almidón, pectinas, etc. son

## 7. DESECHOS AGROINDUSTRIALES

eliminados con el agua empleada en el proceso. Los afluentes formados se reúnen en un desagüe común para someterlos a los tratamientos de depuración y eliminación posterior, el tratamiento del desagüe se puede hacer empleando una variedad de métodos, el uso de microorganismos en el proceso de depuración del agua se basa en el empleo de microorganismos que poseen la propiedad de flocular las materias orgánicas y que a su vez son los responsables de la depuración natural de las aguas de los cauces, no ionicamente se utiliza esta técnica, también se emplean la oxigenación y la filtración para poder obtener agua potable, en el diagrama 7.1, se muestra un proceso usado en una planta en Alemania para el tratamiento de agua.

### 7.5.1 Lechos bacterianos:

El uso de lechos bacterianos, esta precisa una decantación previa destinada a retener la mayor parte de las sustancias sedimentables, el agua procedente de la bolsa de decantación se pasa a través de una masa filtrante formada por fragmentos como lava. Este material se recubre al cabo de pocas semanas una película biológica gelatinosa, constituida esencialmente de bacterias y protozoos.

Las sustancias orgánicas presentes en las aguas residuales se absorben y degradan, principalmente por vía aerobia. Para formar los lechos bacterianos se pueden utilizar se pueden utilizar también enrejados de plástico, con ello se consigue mayor superficie para la fijación de la película biológica, menor peso y mayor facilidad para desmontarlos. Para una mayor repartición del agua se utilizan distribuidores rotarios.

Por otra parte la acumulación de sustancias en el lecho filtrante produce una disminución de su rendimiento. Para evitar este inconveniente se recircula una fracción de las aguas residuales, con lo que se aumenta la velocidad de paso del agua atreva del filtro.

Esta recirculación se efectúa desde la salida del lecho bacteriano hacia tres zonas diferentes del sistema de depuración:

a) La entrada del mismo lecho

b) El decantado final

c) El decantado primario

Pasando previamente por el decantado final, la elección entre estas tres alternativas depende entre otro factores del caudal del agua de entrada y de las fluctuaciones del mismo.

### 7.5.2 La técnica de Lodos Activados

Esta técnica consiste en provocar el desarrollo de microorganismos en el tanque o deposito de agua residual mediante la inyección de aire comprimido o bien utilizando un agitador mecánico. De esta manera se forma una masa gelatinosa que retiene la materia disuelta y coloidal del agua a tratar, que los microorganismos descomponen con formación de gases, sustancias minerales y lodos orgánicos. Los lodos o fangos se mantienen en suspensión debido a la agitación producida por medio de aireación. Se puede observar un esquema del proceso en la figura 7.1

Su separación se realiza por decantación en una balsa adjunta, desde donde una parte de los lodos se envía nuevamente al deposito de aireación y el resto al decantados primario.

Este procedimiento comparado con los lechos bacterianos, suele conseguir mayor grado de depuración además el rendimiento es uniforme. Estas instalaciones requieren de mayor atención y la producción de lodos es mayor.

Con relación a los lodos producidos por la depuración biológica es necesario eliminarlos. Si este exceso de lodos es disminuido no se requiere tratamiento alguno siendo suficiente un secado. Sin embargo si la cantidad de lodos es elevada, se hace necesario disponer de una instalación para el tratamiento de los mismos, el cual consta de dos etapas, en la primera se hace un espesamiento gradual aumentando el porcentaje de sólidos, en la segunda etapa se pueden tener dos alternativas

A) Poner lo lodo en digestores de dos a cuatro semanas en donde producen metano, posteriormente estos lecho son secados y se utilizan como abono y

B) Por medio de agente floculantes se hace una separación que se completa con una



7. DESECHOS AGROINDUSTRIALES

centrifugación y filtrado donde el resultado también se puede usar como abono.

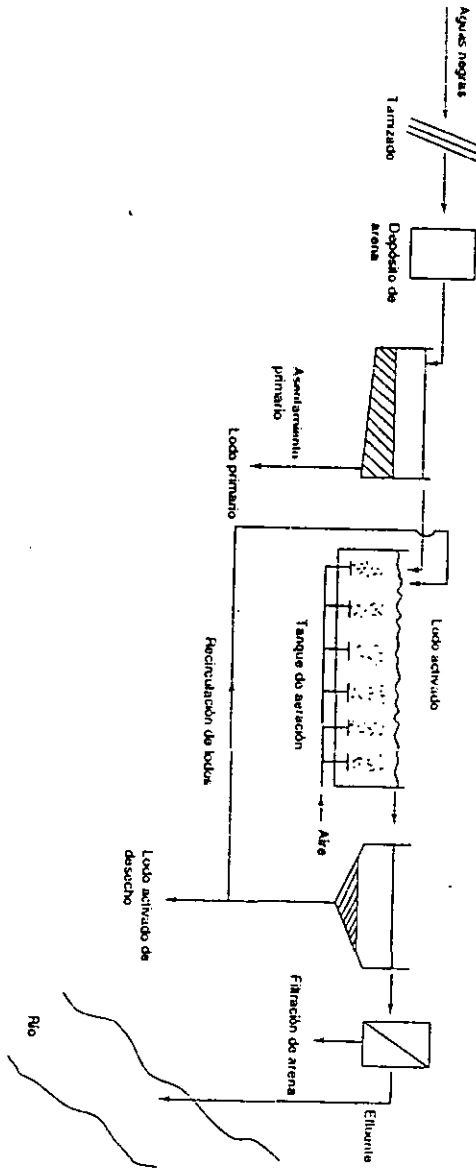


Figura 7.1 Proceso general de tratamiento de aguas

---

## 8 PRODUCCIÓN DE ENZIMAS MICROBIANAS

### 8.1 INTRODUCCIÓN

El comienzo de la tecnología enzimática se remonta a Christian Hansen, quien en 1874 comercializó por primera vez la primera preparación enzimática normalizada (cuajo). En 1907 se usó proteasas pancreática en el curtido de cueros, después se usaron enzimas proteolíticas para pruebas de enfriamiento durante la fabricación de cerveza en 1911 y en 1917 se usaron algunas enzimas bacterianas para el blanqueado de textiles y para 1970 a nivel industrial se producían aminoácidos y azúcares a partir de glucosa isomerizada.

Así las industrias de fermentación basadas en siglos de experiencia en la producción de cerveza, quesos y similares, han sido la base para la creación de la fermentación industrial enzimática, ya que por ellas se descubrió que los procesos biológicos se realizan en gran medida mediante reacciones catalizadas por enzimas.

Los conceptos de catálisis enzimática, especialmente de bebidas alcohólicas, se conoce desde el siglo pasado.

Desde su descubrimiento por Payeu y Persoz en 1833, el conocimiento de las enzimas evolucionó lentamente y todavía a principios de siglo se cuestionaba su existencia y su forma de actuar.

Los conceptos de catálisis enzimática en la obtención de productos primarios y secundarios de microorganismos especialmente de bebidas alcohólicas, se conoce desde el siglo pasado. La explotación comercial de enzimas microbiológicas se ha llevado a cabo desde que se tiene un amplio conocimiento de la naturaleza y propiedades de las enzimas. Los animales fueron la principal fuente de producción de enzimas (eje. la renina), pero estas fuentes resultaban caras y desconfiables en su disponibilidad, en la actualidad la enzimología industrial se ha enfocado a los microorganismos como fuente de enzimas, con grandes ventajas sobre las fuentes

---

## 8. ENZIMAS

animales y vegetales.

Alrededor de 1945 la producción de enzimas era principalmente por variantes en los procesos de sustratos sólidos pero solo se hacían con hongos y la producción industrial era limitada, a partir del uso de la fermentación sumergida se ha expandido hasta alcanzar entre la 1,000 y 2,000 toneladas de proteína enzimática al año.

A pesar de que con la adsorción de extractos de levaduras sobre carbón activado, realizada en 1900, se demostró por primera vez la posibilidad de inmovilizar enzimas, hubo que esperar hasta 1953 para que el significado de esta técnica fuera evidente, ya que en este año es cuando se desarrollan estos métodos.

Las enzimas son un grupo especial de proteínas, pues tiene una función catalizadora, con ventajas de especificidad y condiciones de reacción muy suaves, debido a esto en ocasiones han sustituido a catalizadores tradicionales, gracias al aumento en el conocimiento de algunos mecanismos enzimáticos ha sido un hecho clave para promover el desarrollo de la catálisis convencional, ya que basados en ello es posible sintetizar ahora nuevos compuestos no enzimáticos de bajo peso molecular. Sin embargo es bien claro que el campo de aplicación de la enzimología esta perfectamente definido y que sigue aumentando el número de productos obtenidos por tecnología enzimática.

En la célula las enzimas trabajan en secuencias organizadas, catalizando centenares de reacciones. su producción en una célula depende de muchos factores pero siempre se encuentran presentes y activas.

Además, los avances recientes que giran alrededor del empleo de las enzimas ofrecen la posibilidad de abrir nuevos mercados.

Las repercusiones sociales del desarrollo de la utilización de las enzimas tienen una gran aptitud entre los que encontramos algunos como:

- La reutilización de desperdicios industriales
- El uso de materiales de bajo precio para producción

- La disminución de la dependencia del petróleo en la industria química, y por lo tanto una disminución en la contaminación.
- El uso más eficiente de los recursos
- La disminución del consumo del agua en la industria química
- Nuevos procesos químicos no contaminantes
- La disminución en el número de unidades de proceso
- La disminución de accidentes de trabajo
- El desarrollo de nuevos productos
- Mejora en la calidad de los productos
- Un abastecimiento constante de los productos
- La facilidad de mantener la oferta de acuerdo a la demanda.

Finalmente, no es aventurado suponer que en el futuro, la aplicación de las enzimas en la producción de nuevas sustancias experimentará un progreso mayor que los intentos para sustituir procesos ya existentes.

## 8.2 DEFINICIÓN

En 1978 se introdujo por primera vez el término **enzima** y posteriormente se registran los primeros intentos por establecer una nomenclatura sistemática, los cuales condujeron a utilizar el sufijo **asa** añadido al nombre del sustrato. Durante esta etapa de investigación se establecieron también los conceptos de especificidad requerimiento de coenzimas y existencia de enzimas libres de células. Estos hallazgos prepararon el camino tanto para la descripción cinética de la actividad enzimática, realizada por Michelis y Menten en 1913.

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores biológicos en los procesos metabólicos y el significado de la palabra es "en la levadura". Son proteínas globulares que tienen funciones catalíticas o termodinámicas, acelerando la reacción o bajando la energía de activación.

Su peso molecular va de 12,000 a 1,000,000 y pueden estar constituidos por pepitidos

## 8. ENZIMAS

solamente necesitar un componente adicional llamado cofactor el cual puede ser hierro, magnesio, manganeso, zinc, en este caso se les conoce con el nombre de haloenzima y la parte que proteica de la enzima se llama apoenzima, esta parte no es estable al calor, pero en general este tipo de enzimas son estables al calor, el cofactor tambien puede ser una vitamina, puede estar unido débilmente y ser transitorio ó estar unido intima y permanentemente, a este se le denomina grupo prostético

Las enzimas pueden ser de tipo endógeno, como por ejemplo la Amilasa, presente en la cebada que se encuentran en la célula o de tipo exógenas, que han sido añadidas como la Pepsina en los quesos, las glucoisomerasas que se utilizan para jarabes.

En algunas ocasiones las enzimas producen reacciones indeseables en los alimentos como por ejemplo la fenolasa, que provoca el oscurecimiento en las papas, las clorifilasa que producen cambio de color en los vegetales las lipasas que generan enranciamiento en la leche.

### 8.3 CLASIFICACIÓN

Algunas presentan especificidad absoluta, o sea que solo reconocen a un sustrato, otras pueden reconocer a varios sustratos, por ejemplo de un grupo similar.

La clasificación internacional de las enzimas esta basada en la reacción que catalizan:

**Cuadro 8.1 Clasificación de enzimas**

Clase	Tipo de reacción que catalizan
Oxidoreductasas	Trasferencia de electrones
Transferasas	Reacciones de transferencia de grupos
Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis (transferencia de grupos funcionales con el desprendimiento de una molécula de agua)
Liasas	Adición de grupos a los dobles enlaces
Isomerasas	Transferencia de grupos en el interior de las moléculas para dar formas isomericas
Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O C-N mediante reacciones de condensación y acoplamiento a la ruptura del ATP

Lehninger, Albert, L., 1986

#### 8.4 PROCEDENCIA DE LAS ENZIMAS

Existen aproximadamente 3000 enzimas de las cuales alrededor del 15% son accesibles por medio de proveedores bioquímicos, en cantidades que varían desde los microgramos hasta los kilogramos, aunque básicamente su mayor uso es para la investigación. Solo unas 40-50 enzimas son fabricadas a escala industrial, en cantidades de multi-kilogramos a toneladas anuales, estas son producidas a partir de microbios o plantas.

Tradicionalmente se han obtenido pocas enzimas de origen animal debido a que estas pueden ser remplazadas por otras similares derivadas de microorganismos, sin embargo, los sustitutos microbianos, aunque catalíticamente eficaces, presentan sutiles diferencias en sus propiedades que pueden ser cruciales en el proceso de su aplicación. Las plantas también han sido fuente tradicional de algunas enzimas sobre todo donde la materia prima es fácil de obtener. El empleo de este tipo de enzimas va disminuyendo en el mercado, con respecto de la totalidad, debido a los problemas producidos por el abastecimiento de materias primas.

Los microorganismos producen una enorme cantidad de enzimas potencialmente útiles, muchas de las cuales son segregadas al exterior celular. Por otra parte, son capaces de desarrollarse fácil y rápidamente en su medios de cultivo y la tecnología al respecto, a gran escala se encuentra hoy bien establecida.

Las ventajas de la enzimas microbianas son entre otras:

- § Calidad superior a la del producto tradicional
- § Mayor utilidad en sus aplicaciones
- § Más barata que la enzimas normales, esto se puede conseguir indirectamente disminuyendo los costos de operación y/o equipo requeridos del proceso.
- § Obtención de otras enzimas modificadas genéticamente

Los productos obtenidos enzimáticamente se dividen en tres categorías

- 1.- Los que son exactamente iguales a los productos obtenidos tradicionalmente por otros

## 8. ENZIMAS

---

medios

- 2.- Los productos que se asemejan a los productos tradicionales pero con algunas diferencias y/o mejoras del producto
- 3.- Los productos nuevos no disponibles hasta que fue posible su producción mediante enzimas.

Además la producción de enzimas por fermentación presenta las siguientes ventajas:

- La producción puede ser elevada con relativa facilidad si la demanda así lo requiere.
- Las células microbianas, son fáciles de cultivar, muy manejables y con tiempos de regeneración bastante cortos.
- El ciclo de reproducción en un reactor batch dura de medio día hasta 10 días, en contraste con los organismos superiores los cuales tardan de dos meses hasta años.
- La fermentación también permite la selección de especies para favorecer su crecimiento y obtener solo los productos deseados.

### 8.5 ENZIMAS EXTRACELULARES

Existen dos tipos de enzimas:

Las enzimas intracelulares que se encuentran dentro de las células y que necesitan ser extraídas de ellas para obtenerlas, presentan la desventaja de que se les puede hacer un daño a las enzimas y requieren de un mayor costo en su extracción.

Las enzimas extracelulares, que no requieren de la ruptura de la célula presentan algunas ventajas como son:

- a) Dado que la enzima es segregada al medio ambiente no se requiere de técnicas de disrupción celular,
- b) El número de proteínas que segregan es aislado por lo que es relativamente fácil poder aislarlas
- c) Las enzimas extracelulares suelen presentar una estructura compacta y no menos susceptibles a la desnaturalización que las correspondientes intracelulares.

Las enzimas extracelulares como aquellas que han cruzado la membrana celular. Es importante establecer este concepto, por que los microorganismos poseen una variedad de estructuras del tipo pared celular y en muchos casos la enzima extracelular se encuentra asociada a ellas y no liberada al medio de cultivo.

#### 8.5.1 Secreción de enzimas

Durante su síntesis en el interior de la célula, ciertas proteínas son reconocidas como moléculas destinadas a la secreción mediante la presencia de un péptido señal N-terminal. Estas enzimas extracelulares se sintetizan parcialmente en los ribosomas libres de citosol, antes de que el complejo se asocie a la membrana celular, la biosíntesis prosigue mientras que se produce la secreción de la cadena peptídica en crecimiento. El péptido N-terminal es separado, durante el proceso de secreción por medio de una proteína ligada a la membrana.

El proceso de secreción descrito para las bacterias es esencialmente idéntico para los hongos y otros eucariotas. Sin embargo la cadena polipeptídica es introducida durante su síntesis en el lumen del retículo endoplasmico, en vez de ser dirigida hacia la membrana citoplasmática, desde dicho lumen, la enzima es procesada través del aparato de Golgi y finalmente es exportada en vesículas hacia la membrana celular. Esta complejidad extra del proceso en las células eucariotas permite que las enzimas segregadas sean modificadas extensamente durante su paso a través de retículo endoplasmico y aparato de Golgi. Las modificaciones posteriores, pueden incluir glucilaciones, separaciones de pequeños fragmentos polipeptídicos, introducción de puentes de disulfuro y muchas otras posibilidades, suelen ser una influencia importante sobre la estabilidad y propiedades de la enzima, aun cuando todavía falta mucho por aprender de estos mecanismos.

Las bacterias y los hongos están rodeados por paredes celulares integradas respectivamente por peptido-glucanos y por complejos de glucano-quitina en unión 1-3, cuando la enzima ha sido segregada, lo habitual es que pueda difundir libremente a través de la pared celular y en casos de los hongos y bacterias Gram positivas, llegar al medio externo.



## 8. ENZIMAS

---

Alternativamente, algunas enzimas permanecen asociadas a estructuras de la membrana o a la pared celular. En las bacterias Gram negativas la secreción de enzimas es más compleja, debido a la presencia de una membrana externa; por esa causa las enzimas segregadas son retenidas a menudo en el espacio periplásmico, en vez de ser liberadas a medio de cultivo, esta membrana extra y la diferente localización de las proteínas ha restringido el uso de los microorganismos Gram negativos para la obtención de enzimas extracelulares; de hecho la única enzima relevante producida por una bacteria Gram-negativa es la Pullulanasa producida a partir de *Klebsiella pneumoniae*

### 8.6 PRODUCCIÓN

Se dispone de dos formas de proceso en general usados para la producción de enzimas comerciales:

#### 8.6.1 A) Fermentación sumergida

La fermentación en medio sumergido se realiza en tanques el medio de cultivo es líquido y generalmente se utiliza cuando las enzimas segregan al medio el producto deseado, es un método más costoso, pero dependiendo del microorganismo y del tipo de producto puede ser mejor.

#### 8.6.2 B) Fermentación de sustrato sólido

En esta fermentación los microorganismos crecen sobre materiales sólidos insolubles con la humedad absorbida dentro de la matriz, pero con una fase líquida libre, como lo son los quesos, la salsa de soya, el sake, producto de producción antigua. Es un sistema complejo, puesto que tiene diversas limitaciones físicas y como consecuencia se presentan gradientes de temperatura, pH, humedad, etc., que afectan de forma crítica al proceso fermentativo.

Entre los factores que deben tenerse en cuenta para la producción se encuentran:

a) Los materiales comúnmente usados como sustratos tienen un alto contenido de

---

carbohidratos y/o proteínas

- b) El sustrato debe estar ubicado en el fermentador de forma que se permita la libre circulación del aire.
- c) El agua es requerida como un componente más del medio
- d) Debido a la baja humedad del medio, la posibilidad de contaminación bacteriana es reducida.
- e) El control de la temperatura es algunas veces crítica al igual que el control de la composición atmosférica con respecto a las concentraciones de oxígeno, CO<sub>2</sub>
- f) El inoculo es adicionado en forma de esporas, para que germine uniformemente.

Entre los parámetros a controlar se encuentran los siguientes:

- **Humedad:** Debe ser el suficiente para asegurar el buen desarrollo del microorganismo, pero demasiado alto para evitar la contaminación, y para permitir la germinación de las esporas, y se encuentran en función de cada microorganismo y la fase de crecimiento en la que se encuentre, por lo que es necesario regular a través de todo el proceso la humedad presente.
- **Aireación:** Esta depende del microorganismo usado en la fermentación, la cantidad de oxígeno requerido por el microorganismo, la cantidad de calor metabólico a ser disipado de la masa, el espesor de la capa del sustrato, el grado de CO<sub>2</sub> y otros metabolitos volátiles que deban ser eliminados y el grado de espacios disponibles en el sustrato.
- **La transferencia de oxígeno** puede ser afectada por la formación de aglomerados de masa compacta debidos al crecimiento fungal, a la presencia de un exceso de agua y al uso de partículas muy finas del sustrato, este tipo de problemas pueden ser eliminados con el uso de materiales porosos granulados, con capas delgadas, con agitación del sustrato y rotación de los fermentadores
- **Temperatura:** Debido al proceso metabólico se genera una gran cantidad de calor durante la fermentación, la remoción del calor metabólico generado se dificulta cuando el sustrato esta húmedo, lo que ocasiona un incremento en la temperatura que puede tener efectos

## 8. ENZIMAS

sobre la germinación de esporas el crecimiento de hongos y la síntesis del producto y la esporulación

➤ pH: Normalmente se trabaja en un rango ácido, pero a través de toda la fermentación se debe controlar para evitar que este impida el desarrollo del microorganismo, y detenga la fermentación.

En el siguiente cuadro se presenta una comparación entre el cultivo sumergido el sólido:

Cuadro 8.2 Comparación entre cultivo sumergido y sólido

Criterio	C. sólido	C. sumergido
Espacio físico	Poco	Mucho
Mano de obra	Mucha	Poca
Energía para aireación	Poca	Mucha
Energía para mezclado	Muy poca	Mucha
Problemas de contaminación	Poco	Mucho
Agua requerida	Poca	Mucha
Operaciones de recuperación de enzimas	Mucha	Mucha
Tipo de proceso	sencillo	Complejo
Generación de aguas residuales contaminantes	Poca	Mucha

No obstante el criterio más importante es sin duda el económico del cual depende la capacidad de producción de metabolitos por cada medio de cultivo.

### 8.6.3 Control de la producción de enzimas en microorganismos

La optimización de la producción de enzimas a partir de microorganismos depende de una serie de factores interrelacionados, pues una enzima solo puede producirse a partir de una parte del ciclo de crecimiento del microorganismo.

Además de que una enzima solo se producirá cuando el medio y las características del microorganismo así lo dispongan, para comprender mejor esto es necesario conocer algunos aspectos del control genético de la producción enzimática. Esencialmente existen dos clases de enzimas, el primero es de las enzimas llamadas constitutivas, en proporción estas se encuentran una proporción minoritaria con respecto con respecto al total, pero por lo general son las

enzimas que se encuentran implicadas en aspectos centrales del metabolismo, se producen continuamente al margen de la presencia del sustrato.

### 8.6.3.1 INDUCCIÓN

El segundo grupo que es mucho más amplio comprende a las enzimas inductivas, estas van siendo sintetizadas en proporciones muy bajas, aunque significativas, en presencia del sustrato se induce un gran incremento en la síntesis para poner disponible para el microorganismo al sustrato, en estas circunstancias la síntesis de una enzima inducible se multiplica hasta por 1,000, en la mayoría de los casos el inductor es metabolizado por la enzima inducida, por lo que al acabarse el sustrato la producción de tal enzima se acaba. En la figura 8.1 se puede ver el modelo de inducción de Jacob y Monod.

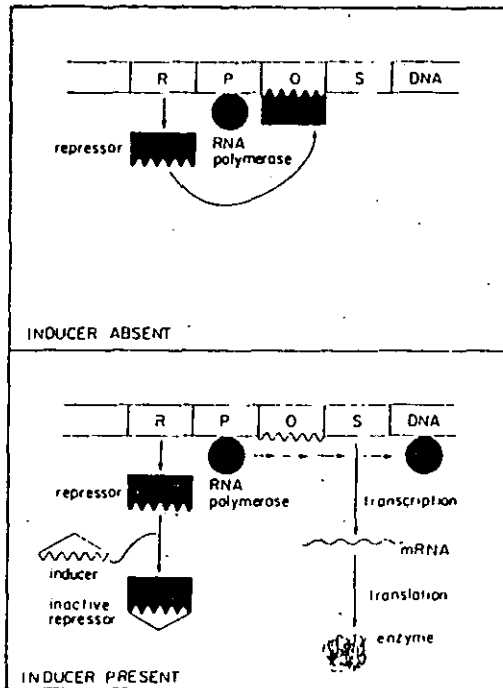


Figura 8.1 Modelo de inducción de Jacob y Monod. Fuente Wang 1979

## 8. ENZIMAS

### 8.6.3.2 INDUCCIÓN GRATUITA

Un inductor gratuito, es un inductor que no sea consumido por la enzima a medida que esta se produce, este tipo de inductores se les llama gratuitos y pueden ser compuestos sumamente parecidos al sustrato normal.

Tanto en las enzimas inducibles como las constitutivas, tienen un mecanismo posterior de control que también puede ser efectivo en presencia de una fuente de carbón asimilable, por ejemplo la D-glucosa, la síntesis se encuentra reprimida. La lógica que reluce este fenómeno es que un organismo puede utilizar la glucosa sin necesidad de gastar energía en la síntesis de enzimas útiles para degradar otras fuentes carbonadas más complejas.

La represión por degradar un catabolito carbonado es un fenómeno que se da comúnmente en los microorganismos y que afecta a muchas enzimas constitutivas e inducibles. Por ello es muy difícil decir si la síntesis transitoria de una enzima es el resultado de una inducción, de una represión o de una combinación de ambos mecanismos, la síntesis de ciertas enzimas puede ser reprimida por la presencia de compuestos que contengan nitrógeno, azufre y otros.

### 8.6.3.3 OPERON LAC

Uno de los modelos más simples y mejor conocidos que existen en la inducción y represión de las enzimas implicadas en el metabolismo de la lactosa en la *Escherichia coli* llamado operón-lac

Los genes que codifican a las proteínas, B-galactosidasa, galactosido permeasa y tiogalactosido, se encuentran codificados en los genes y se les conoce como lac-a, lac-z, y lac-i, y se encuentran agrupados formando en su conjunto el operón lac. La transcripción de estos genes es regulada por la región control del operón, que consiste en el gen lac-i, y las regiones promotoras y operadoras.

Lo que determina la eficiencia de la transcripción es la intensidad con la que el ARN polimerasa, ADN-dependiente es capaz de unirse al promotor. El gen lac-i codifica la proteína represora lac, que es sintetizada constitutivamente a muy bajos niveles. Esta proteína

tetramérica se unirá estrechamente a la región operadora e impedirá que el ARN polimerasa transcriba los genes lac-z, lac-a y lac-i. La lactosa y otros B-galactosidos actúan como inductores de la síntesis enzimática porque se unen a cada uno de las cuatro subunidades del represor lac, provocando su cambio de conformación e impidiendo la unión al operador. El ARN polimerasa es entonces capaz de transcribir los genes que codifican las proteínas estructurales. Dicho de otro modo, las enzimas necesarias para el metabolismo de la lactosa habrán sido inducidos por la presencia de B-galactosidos.

### 8.7 EXTRACCIÓN DE ENZIMAS

En los casos en los que las enzimas producidas no sean de tipo extracelular, se hace necesaria una extracción de la enzima, esta extracción puede darse por métodos físicos y químicos.

#### 8.7.1 Métodos Físicos

A. Homogeneización: Se puede decir que por lo general, los tejidos de los organismos superiores son muy duros, pero pueden romperse satisfactoriamente en cantidades apreciables utilizando métodos relativamente violentos. La homogeneización a alta presión, de tejidos seleccionados con una solución adecuada es la técnica más ampliamente utilizada. Una vez rota, la célula liberará a la enzima fácilmente, aunque en algunos casos se utilizan detergentes como ayuda para liberar las enzimas unidas a la membrana. Es preferible utilizar los tejidos más delicados de los organismos para disminuir el tiempo requerido para la trituración y reducir la introducción de oxígeno, el calentamiento de la mezcla y el tiempo de exposición en el cual pueda actuar las enzimas que son perjudiciales, en la Figura 8.2 se aprecia una representación esquemática.

B. Agitación con abrasivos: El molino de bolas es uno de los mejores métodos para la ruptura celular. El aparato consiste en un recipiente que contiene pequeñas bolas de vidrio que se somete a una vibración muy rápida y que crea fuerzas de cizalla debido a los gradientes de

## 8. ENZIMAS

velocidad por el choque de las dos bolas de vidrio

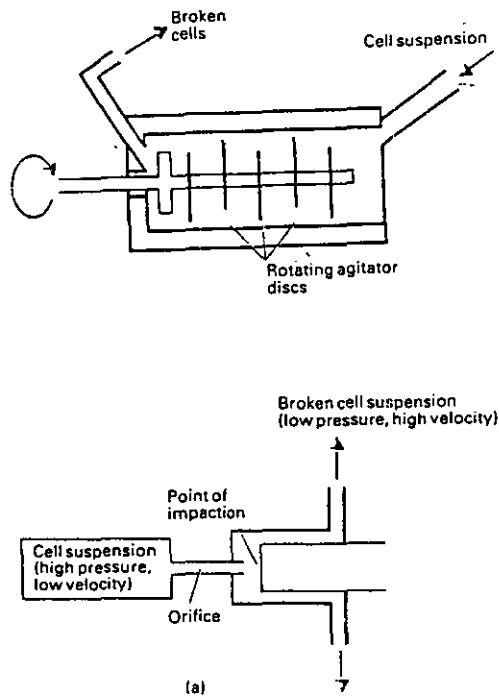


Figura 8.2 Equipo usado para la extracción de enzimas

El nivel de desintegración dependerá de la intensidad de la vibración, de la proporción entre las bolas de vidrio y las células, el tamaño de las bolas y el tiempo de contacto. El equipo que se utiliza con más frecuencia consiste en un agitador tipo Mickle.

C. Cizalla Líquida: Cuando se hace pasar una suspensión celular sometida a elevada presión a través de un orificio estrecho, la rápida caída de presión proporciona un método muy eficaz para las rupturas de las células, cambiando la presión aplicada se puede romper a las células o solo suficientemente como para que se liberen las enzimas periplasmicas.

D. Sonificación: Cuando se aplican frecuencias que están por encima del límite perceptible por el hombre es decir los ultrasonidos de frecuencia mayor a 20 khz, se produce lo que se

denomina cavitación gaseosa, es decir aparecen áreas donde se produce el rápido intercambio de fenómeno de compresión y expansión, cuando las burbujas gaseosas que se producen se colapsan, producen ondas de choque que son los elementos destructores de este procedimiento.

E. Ruptura por cizalladura en medio sólido: Para este método se hace pasar una pasta de células congeladas a través de un orificio combinando el efecto que produce la agitación en presencia de compuestos abrasivos y la ruptura de por cizalladura en medio líquido la ruptura con este equipo se produce al aplicar las fuerzas de corte sobre las células que pasan a través de un orificio así como por el desgarrar con los cristales de hielo presentes en la pasta congelada, en este caso hay peligro de desnaturalización térmica de la enzima ya que se trabaja a temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

F. Congelado y descongelado: Siempre que se guarde una pasta a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se someterá a un proceso de descongelación, la formación y fusión de los cristales de hielo alteran el material celular, lo suficiente como para permitir la liberación de algunas proteínas que vienen a ser del orden del 50% de la proteínas del espacio periplasmático, aunque solamente representa en 10% del total de proteínas solubles.

G. Choque osmótico: Las proteínas enzimáticas y las no enzimáticas se pueden extraer de las bacterias gram negativas que son más delicadas, suspendiendo las células en una solución tamponada que sea de una alta presión osmótica como la que se consigue disolviendo sacarosa al 20% y entonces, después de que se alcance el equilibrio y se concentran por centrifugación, suspendiéndolas en agua en las células, produce prácticamente la explosión de la célula liberando del orden del 4 al 7 % del total de la proteína bacteriana presente en estos delicados organismos.

H. Agitador: Una suspensión de células se hace pasar por un cilindro el cual contiene discos que se encuentran girando, el paso a presión así como en choque con los discos hacen que se rompan las células y por el otro extremo salen las células rotas.



## 8. ENZIMAS

---

### 8.7.2 Métodos químicos

También existen los medios químicos para extraer las enzimas de la célula, estos permiten la liberación muy delicada de las enzimas lo que necesita una suave agitación para dispersar el agente químico de extracción utilizado por el proceso, entre estos medios encontramos:

I. Detergentes: Para la extracción de enzimas existen detergentes de tipo aniónico (eje. lauril sulfato sódico), catiónicos (eje. bromuro de cetil-trimetil-amonio) y no iónicos (eje. Tweens, Spans o Tritón), cuando se emplean las condiciones de pH y fuerza iónica adecuadas, los detergentes se combinan con las lipoproteínas para formar micelas solubilizándose las lipoproteínas constituyentes de las membranas biológicas y algunas enzimas integradas en ellas. No obstante los detergentes pueden inactivar algunas enzimas provocando la desnaturalización y precipitación de las proteínas por lo que son agentes de extracción ideales.

II. Enzimas liticas: Las enzimas liticas proporcionan medios muy suaves y selectivos de ruptura para las células microbianas. La más conocida es la lizosima que se fabrica en cantidades comerciales a partir de la clara de huevo y que cataliza la hidrólisis de los enlaces de alfa-1,4-glicosídicos de la porción polisacárida de las paredes celulares bacterianas. Los polisacáridos son los más importantes para mantener la estructura de las bacterias, sobre todo en las bacterias gram positivas, por lo que estas son más sensibles a la lizosima, se necesita además un pequeño choque osmótico para romper la membrana celular una vez que se ha eliminado la pared celular. Es necesario añadir EDTA para quelar los cationes bivalentes antes de que la lizosima se añada para romper las células.

III. Tratamiento con álcali: Un breve tratamiento (20 min.) a pH 11-12.5 provoca la hidrólisis del material de la pared celular y la liberación de las enzimas, lógicamente la utilización de este método depende de la estabilidad de algunas enzimas a pH elevados.

## 8.8 PURIFICACIÓN DE ENZIMAS

Una vez que la enzima ha sido extraída, y se encuentra en la solución pero junto con otros

mucho compuestos se procede a purificarla, los métodos de purificación, este proceso debe llevarse a cabo lo más rápidamente posible, pues la susceptibilidad para desnaturalizarse aumenta cuando ha sido sacada de la célula y por lo tanto puede perder su actividad biológica y sus estructuras superiores, por esta razón habrá ocasiones en que sea necesario sacrificar la sensibilidad por la rapidez para poder discriminar la presencia de la proteína en distintas fracciones y continuar con el proceso de purificación.

La enzima a purificar se encuentra en la fracción sobrenadante en forma soluble o precipitable, asociada o no a alguna fracción subcelular, por lo que la centrifugación es un paso casi de rutina para la separación de las fracciones que también dependerán de la naturaleza de la proteína, de la fuerza y del tiempo de centrifugación.

Para separar las proteínas correspondientes se puede aprovechar una serie de propiedades de las proteínas como son:

- ❖ Solubilidad
- ❖ Carga
- ❖ Tamaño forma y peso
- ❖ Actividad biológica
- ❖ O la combinación de ellas, mientras que se deben mantener por lo menos dos parámetros constantes además de mantener el pH y la concentración de electrolitos que sea constante.

#### 8.8.1 Solubilidad

El fraccionamiento basado en la solubilidad de la proteína se puede lograr modificando:

- pH
- Fuerza ionica
- Propiedades dieléctricas del solvente
- Temperatura

El **pH**, es un de los primeros pasos y permite eliminar fácilmente algunos de los contaminantes, una proteína es menos soluble a pH isoelectrico, que es un pH en el cual la molécula no tiene carga neta, en esta condición no hay repulsión electrostática entre moléculas de proteínas vecinas, por lo que tienden a aglutinarse y a precipitar, este punto es una característica de las proteínas y a menudo permite separar unas proteínas de otras por precipitación isoelectrica depende de la fuerza de la solución y de la composición ionica de la misma, si una proteína se dializa exhaustivamente contra agua destilada, el pH de la solución se conoce como pH isotónico, que es constante para cada proteína.

La **fuerza ionica**, las sales influyen en la solubilidad, por lo que es otro de los métodos obligados, además de que el uso de estas es barato, a concentraciones bajas las sales aumentan la solubilidad de muchas proteínas, esto se debe a cambios en la tendencia en los grupos R disociables a ionizarse en la proteína, a este proceso se le llama *saltin in*, que se podría traducir como salado.

A medida que la concentración de las sales aumenta la solubilidad de la proteína disminuye y cuando la fuerza iónica es suficiente, la proteína debe precipitar en la solución, efecto que se ha denominado *salting out*.

A medida que la fuerza ionica de la solución aumenta se va llegando al punto que la solubilidad de la enzima es igual a su concentración y entonces precipita, el rango de concentración en el cual precipita depende de:

- la naturaleza de la proteína
- la naturaleza de la sal añadida
- la temperatura
- el pH

Como ejemplo se tienen el sulfato de amonio en donde las enzimas pueden ser precipitadas y fraccionadas. Dicho compuesto es muy soluble, inocuo para la mayoría de las enzimas,

además de ser económico.

La **temperatura**, la temperatura también precipita las proteínas, pero al mismo tiempo las desnaturaliza, sin que en la mayoría de los casos pueda ser reversible.

### 8.8.2 Carga eléctrica

En cada molécula de proteína hay un número de grupos que pueden disociar o unir protones, dando como resultado la formación, en primer caso de aniones y en el segundo de cationes. Debido a que cada proteína tiene una composición y una secuencia de aminoácidos distinta, tendrá propiedades ácido base características.

Los métodos de separación y análisis de proteínas con base en su conducta ácido-base se pueden dividir en tres: **electroforesis, cromatografía de intercambio y absorción.**

✓ **Electroforesis:** Se basa en la aceleración de las partículas cargadas en un campo eléctrico, a las que se opone la fricción debida al paso de las partículas a través del medio que las rodea, de modo que se mueven a una velocidad constante proporcional a su carga.

Existen tres tipos de sistemas electroforeticos fundamentales de frente móvil o libre

- electroforesis de zona
- electroforesis de desplazamiento

Los métodos de electroforesis más usados se pueden clasificar en

- a) Electroforesis en medio uniforme de pH
- b) Electroenfoque
- c) Electroforesis en un medio con tamiz molecular
- d) Isotacoferosis

✓ **Cromatografía en gel:** El proceso de cromatografía en gel consiste en el reparto de las moléculas de soluto entre la fase estacionaria, constituida por los espacios existentes entre las partículas porosas del gel. El mecanismo de esta técnica es fácil de comprender si se considera que el gel tiene una estructura porosa similar a la del pan.

## 8. ENZIMAS

---

✓ **Cromatografía de intercambio iónico.** Se basa en la separación de mezclas complejas de compuestos de interés bioquímico. La fase estacionaria consiste en un material sintético, polimerizado generalmente de naturaleza orgánica que contiene numerosos grupos ácidos o básicos y depende del tipo de resina. La fase móvil está compuesta por un gradiente de elución que puede ser lineal de tres clases. Este tipo de cromatografía puede combinarse con el de exclusión que resuelve las mezclas de proteínas con base en carga y tamaño.

Existe una enorme variedad de materiales de intercambio iónico, aunque no todos pueden utilizarse para purificar enzimas, se dividen en dos clases: celulosa de cambio y resinas de intercambio iónico.

✓ **Cromatografía de exclusión molecular:** Comprende una fase móvil (líquida o gaseosa) y otra estacionaria (sólido o líquido) que hacen contacto a través de las cuales son transportados los componentes de una mezcla a diferentes velocidades, dependiendo de sus afinidades relativas para las dos fases.

La teoría de la migración esta basada en las transferencias repetidas de la moléculas o iones, del soluto hacia atrás y hacia adelante entre una fase y otra.

En la cromatografía de exclusión molecular, la fase estacionaria está formada por esferas de materiales porosos del mismo tamaño de poro. Las moléculas más pequeñas que el poro se difunden completamente en el interior de los granos y se adsorben fuertemente, mientras que las moléculas más grandes no pueden entrar por lo tanto, las pequeñas son retenidas por más tiempo.

### 8.8.3 Tamaño peso molecular y forma:

Una de las características de las proteínas es el gran tamaño de su molécula, propiedad que se puede aprovechar en el diseño de métodos para la separación de tras moléculas de tamaño pequeño.

Entre estos métodos los más comunes son:

- Diálisis y ultrafiltración
- Centrifugación
- Cromatografía de exclusión molecular

✓ Diálisis y ultrafiltración: Se utilizan membranas semipermeables de tamaño de poro controlado que permite el paso de moléculas a través de ellas dependiendo de su tamaño.

En la ultrafiltración se utiliza presión o fuerza centrífuga para obligar a pasar el medio acuoso y las moléculas de menor peso molecular a través de la membrana semipermeable que permite la retención de las proteínas.

✓ Centrifugación: Cuando se somete una partícula a un campo centrífugo experimental, su fuerza es directamente proporcional a su masa. Y a su vez, esta fuerza está contrarrestada por la tendencia que tiene la partícula a flotar, causada por el desplazamiento del solvente, lo que nos da un coeficiente de sedimentación de la partícula.

✓ Centrifugas de rotor tubular: Consisten esencialmente en un tubo cilíndrico que está movido por un motor colocado en la parte superior y unido al rotor por un eje flexible. El material que se va a clarificar se bombea en la parte inferior del cilindro rotatorio siendo pequeño el espesor de la capa líquida, lo mismo que el volumen, por lo que la viscosidad del medio no sea elevada, el flujo del líquido es continuo durante el funcionamiento pero debe pararse la centrifuga para vaciar el precipitado. Existe el peligro de aireación que lleva consigo la formación de espuma en una solución clarificada.

✓ Centrifuga de disco y cámara múltiple: Estas centrifugas tienen un radio relativamente alto y por consiguiente, solo pueden someterse a bajas velocidades angulares aunque al tener varias cámaras el líquido se distribuye en capas delgadas. De tal forma que la sedimentación tiene lugar sobre la superficie, obteniendo una gran eficiencia.

✓ Centrifugas de rotor macizo y cámara en espiral: Este tipo de centrifuga está provista de un espiral dentro de un rotor macizo. A medida que los dos componentes giran a velocidades ligeramente diferentes los sólidos salen por un lado y los líquidos por el otro. La velocidad de

## 8. ENZIMAS

rotación es relativamente lenta para evitar la ruptura mecánica.

Centrífuga de rotor perforado: Este tipo de centrífuga se asemeja a las centrifugas de las lavadoras domesticas.

En la figura 8.3 se presentan algunos de los tipos de las centrifugas antes mencionadas

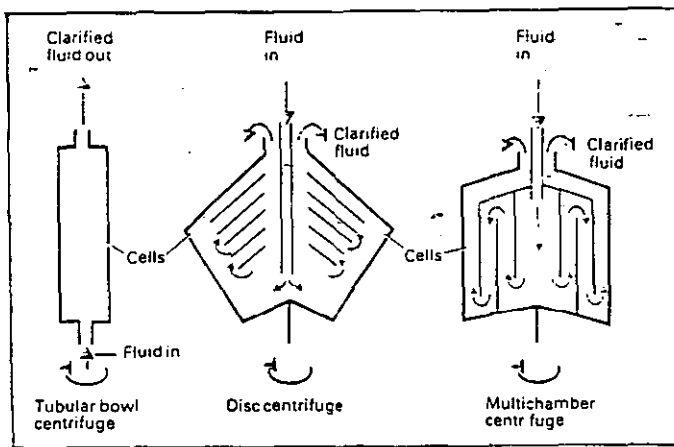


Figura 8.3 Centrifugas más comunes

A.- Centrífuga Tubular

B.-Centrífuga de Disco

C.- Centrífuga de cámara múltiple

1.- Células

2.- Fluido que entra

3.- Fluido que sale

### 8.9 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

La inmovilización se define como el proceso por el cual el movimiento de las enzimas, células, organulos, etc. en el espacio se ve restringido total o parcialmente, dando lugar a una forma de enzima insoluble en agua. Las enzima inm:ovilizadas son enzimas unidas, insolubilizadas, soportadas o ligadas a una matriz. La inmovilización de catalizadores no es

exclusiva de las enzimas, si no que también se emplea con catalizadores metálicos caros.

También en el suelo hay enzimas inmovilizados naturales, por ejemplo las enzimas liberadas durante la putrefacción de una planta, animal o microbio, que se adsorben en las partículas del suelo y células inmovilizadas en forma de partículas de micelo naturales.

En la industria se usan frecuentemente enzimas células inmovilizadas porque, estos biocatalizadores se pueden reusar o usar en procesos continuos. Es continuo es especialmente importante para mantener un medio ambiente constante para el biocatalizador inmovilizado, factor determinante en la estabilidad de la enzima, además porque se evita la contaminación de producto por las enzimas o las células y la contaminación ambiental. Tanto el capital como el costo constante de los procesos catalizados por enzimas puede reducirse de golpe inmovilizando la enzima.

Considerando las propiedades de las enzimas, es importante examinar las implicaciones de cualquier modificación hecha en la estructura enzimática. Desde el punto de vista de un proceso puede ser deseable inmovilizar la enzima para permitir su retención en un reactor. Esta inmovilización está dirigida a inducir cambios en las propiedades observadas. El tipo y la magnitud de estos cambios dependerá de la enzima y del método de inmovilización utilizado.

#### 8.9.1 Tipos de inmovilización

**Adsorción:** Las enzimas pueden ser absorbidas sobre la superficie de un soporte, este proceso resulta de interacciones físicas más que de químicas y la flexibilidad de este tipo de inmovilización reduce el mínimo las posibilidades de distorsión estructural de la enzima. Pero la fuerza de este método depende de las condiciones como pH, o fuerza iónica.

A pesar de este inconveniente la adsorción ha sido utilizada para algunos procesos industriales eje. la glucosa isomerasa en DEAE-celulosa. En la figura 8.4 se puede ver una representación de la adsorción.

La **unión covalente** de enzimas solubles a un soporte insoluble es el método más común para la inmovilización de enzimas habiéndose utilizado una amplia gama de técnicas y



## 8. ENZIMAS

soportes para este propósito, aunque parte de la actividad puede perderse durante el proceso de acoplamiento, es improbable la lixiviación de la enzima a partir del soporte en preparaciones unidas covalentemente. asegurando una mayor estabilidad del material catalítico, en la figura 8.4 se puede ver una representación.

Como una alternativa a la unión de la enzima a un soporte, se puede adaptar un método de **atrapamiento**. En este caso la enzima permanece en un estado sin modificar, pero es atrapada en una gotita de disolvente dentro de una matriz polimérica. En caso de atrapamiento la enzima será dispersada por todas las partes de una preparación polimérica como ejemplo tenemos a la poliacrilamida, en la figura 8.4 se puede ver su representación correspondiente.

Para la **encapsulación**, se lleva a cabo una aproximación más controlada y la enzima es atrapada en pequeñas cápsulas, este se ha utilizado haciendo una polimerización interfacial de una membrana de nylon alrededor de una gotita que contenga la enzima. Los inconvenientes de estas aproximaciones son los efectos del polímero sobre la disponibilidad del reactivo del reactivo. Esto impide la utilización de enzimas atrapadas con reactivos de alto peso molecular. Sin embargo, parece que el polímero protege la enzima bajo algunas circunstancias. En particular enzimas microencapsuladas han sido utilizadas in vivo, donde la cápsula protege a la enzima del sistema inmune del huésped, en la figura 8.4 se puede ver su representación.

Aunque existen otros métodos de inmovilización como las membranas ultrafiltrantes, y el entrecruzamiento, el intercambio iónico y la copolimerización, las formas anteriores representan las principales metodologías de inmovilización

A continuación se presenta un cuadro con la enzimas inmovilizadas en procesos industriales para 1982 y su consumo anual.

Cuadro 8.3 Utilización de enzimas inmovilizadas

Enzima	Producto
Aminoacilasa	Presumiblemente menos de 250 t de l-aminoácido producido por año, cantidad estimada de enzima: menos de 5 t/año
Amilglucosidasa	Presumiblemente menos de 5,000 t de jarabe producidas por año.

Glucoamilasa	Cantidad estimada de enzima: menos de 1 t/año Empresa más importante: Tate & Lyle, UK.
Glucosa isomerasa	Aproximadamente 2,150,000t de HFC42% y 145,000 t de HFCC 55% producidas por año (datos posteriores a los de Poulsen 1981-1982), cantidad estimada de enzima: 1500-1750 t/año, empresa más importante: Novo Industri, DK y Gist Brocades, NL.
Hidantoínasa	Presumiblemente una producción menor de 50 t de p-fenilglicina por año, cantidad estimada de enzima: 1 t/año
Lactasa	Presumiblemente una producción menor de 1,000 t de hidrolizado de lactosa por año, cantidad estimada por año: 5 t/año, empresa más importante: Valio, SF
Nitrilasa	Presumiblemente una producción menor de 5 t de acrilamida por año, cantidad estimada de enzima: menos de .1 t/año, empresa más importante: Nitto, Japón.
Penicilina G acilasa	Aproximadamente una producción de 4000t de 6-APA por año. Cantidad estimada de enzima: 3-4 t/año, empresa más importante: Gist Brocades, NL. Beecham Uk. y Toyo Jozo, Japón.
Penicilina V acilasa	Aproximadamente una producción de 500 t por año de APA por año, cantidad estimada de enzima aproximadamente 1 t por año, empresa más importante: Biocheme, Austria, y Novo Industri DK

Poulsen 1984

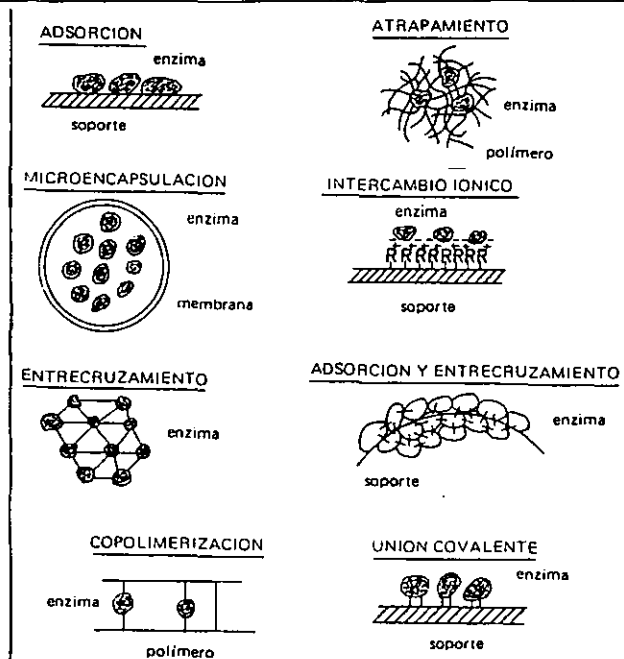


Figura 8.4 Formas de inmovilización Fuente Quintero 1991

## 8. ENZIMAS

---

En términos comparativos la enzima más importante destinada a un solo uso es la amiloglucosidasa, de la que se producen anualmente 15 000 t (cantidad de sustrato aproximada  $20 \times 10^6$  t de materia seca), utilizada para la producción de jarabe, etanol y cerveza

### 8.10 INGENIERIA ENZIMATICA:

Los espectaculares avances que ha tenido la genética, ofrecen la perspectiva de obtener fácilmente una enzima con la independencia de su función catalítica su origen en la misma cantidad y al mismo precio que las pocas enzimas, que ya son comerciales como las proteasas y las carbohidrasas que actualmente se usan para los procesos de azúcar y almidón.

Esto se logra incrementando el número de copias de un gen en un organismo dado y por lo tanto las concentraciones de y cantidades de enzima producido o mediante técnicas de fusión de protoplastos, estas técnicas se denominan como ingeniería genética, en donde uno de los principales recursos que se utilizan son unas enzimas llamadas endonucleasas de restricción que se utilizan para cortar selectivamente el DNA, que posteriormente se pueden volver a unir según la conveniencia por medio de otra enzima llamada DNA ligasa. Checar diagrama\*\*\*

Los recientes avances en la tecnología del ADN recombinante ofrecen muchas ventajas potenciales al enzímologo industrial. Por ejemplo hoy es posible la incorporación de un gen animal o vegetal a un microorganismo, en consecuencia, las enzimas difíciles de producir por medios convencionales pueden producirse con éxito aplicando la tecnología tradicional de la fermentación.

### 8.11 LEGISLACIÓN EN EL EMPLEO DE LAS ENZIMAS

Tradicionalmente las enzimas se han considerado como seguras, debido a su descripción como extractos naturales, el uso de enzimas en los alimentos y en su manufactura está legislada en la mayoría de los países, aunque las regulaciones locales varían un poco.

El comité de aditivos y contaminantes alimentarios (FACC) del ministerio de Agricultura,

Pesca y alimentación inglés ha clasificado las enzimas en 5 clases, de la A a la E en base a su seguridad para ser usados tanto en los propios alimentos como en su manufactura. Esta clasificación toma en cuenta la naturaleza del enzima o de cualquier contaminante que contenga por ejemplo, derivados tóxicos del caldo de fermentación.

La definición de cada clase es la siguiente:

Grupo A.- Sustancias en las que los datos disponibles indican que son aceptadas para ser usados en alimentos.

Grupo B.- Sustancias que por los datos disponibles pueden considerarse provisionalmente como aceptables para ser usadas en alimentación aunque requieren la obtención de más información posterior dentro de un tiempo dado para su revisión.

Grupo C.- Sustancias de las que los datos disponibles sugieren una posible toxicidad y que por lo tanto no pueden ser utilizadas en alimentación hasta que no exista una evidencia de su seguridad para establecer su aceptabilidad.

Grupo D.- Sustancias para las que la información disponible indica una probable o definitiva toxicidad y que no deben ser utilizadas en alimentos.

Grupo E.- Sustancias de la que se tiene datos inadecuados o no se conoce su toxicidad por lo que no es posible expresar una opinión sobre su aceptabilidad en el campo de la alimentación.

La siguiente es una lista de los microorganismos que han sido empleados en la producción de enzimas:

Grupo A: Microorganismos que han sido utilizados tradicionalmente en alimentación o en la preparación de alimentos:

<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Mucor javanicus</i>
<i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	<i>Leuconostoc oenos</i>

## 8. ENZIMAS

---

Grupo B: Microorganismos presentes en los alimentos que han sido aceptados como contaminantes inofensivos:

*Bacillus stearothermophilus*    *Bacillus licheniformis*

*Bacillus megaterium*            *Bacillus circulans*

*Klebsiella aerogenes*

Grupo C: microorganismos que no están incluidos en los grupos anteriores

*Mucor miehei*                    *Mucor pusillus*

*Endothia parasitica*           *Actinoplanes missouriensis*

*Bacillus cereus*                *Streptomyces albus*

*Trichoderma reesei*           *Penicillium lilacinum*

*Penicillium emersoni*        *Sporotrichum dimorphosporum*

*Streptomyces olivaceus*      *Penicillium simplicissimum*

*Penicillium funiculosum*

El incremento del empleo de enzimas en las industrias de manufacturación y procesamiento ha tenido lugar en dos áreas:

- El mejoramiento de los procesos tradicionales
- El desarrollo de caminos totalmente nuevos basados en el estudio de las propiedades de las enzimas.

### 8.12 USOS DE LA ENZIMAS EN LA INDUSTRIA

#### 8.12.1 Disponibilidad

El incremento del empleo de enzimas en las industrias de manufacturación y procesamiento ha tenido lugar en dos áreas:

- El mejoramiento de los procesos tradicionales
- El desarrollo de caminos totalmente nuevos basados en el estudio de las propiedades de las enzimas.

En la industria en general las enzimas presentan una gran variedad de usos, por ejemplo en el área textil, química, producción de cuero, farmacéutica, papel, plásticos y principalmente en la industria alimentaria.

Aproximadamente el 60% de las enzimas son proteolíticas y el 30 % carbohidrasas, aunque la cantidad total es baja ya que las enzimas se emplean comúnmente a concentraciones por debajo del 1% en peso del sustrato a procesar.

Las enzimas disponibles comercialmente puede dividirse en tres clases en función de su disponibilidad, precio y pureza. Los enzimas utilizados a gran escala, como la glucosa isomerasa, son relativamente baratos y se suministran en grandes cantidades, aunque con frecuencia se utilizan en una forma relativamente impura para los estándares bioquímicos. Muchas enzimas ampliamente utilizadas en cantidades menores, son más caras por los elevados costos de capital y producción asociados a la necesidad de emplear una serie de técnicas de purificación de comparativamente baja capacidad y eficacia.

En tercer lugar los enzimas especializados, producidos para ser usados en investigación, cuya pureza es muy alta, son de limitada disponibilidad y usualmente extremadamente caros.

#### 8.12.2 Principales usos en la industria alimentaria

El uso de las enzimas en la industria de los alimentos es muy vasto, existen muchas áreas donde pueden ser usadas y muchas más que en lo futuro podrían ser usadas, en el siguiente cuadro se muestran algunas de las que en la actualidad se utilizan

Cuadro 8.4 Usos de enzimas en la Industria alimentaria

Enzima	Fuente principal	Principales aplicaciones
Invertasa	<i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> y <i>cerevisiae</i> <i>Candida</i> spp.	Producción de azúcar invertido para repostería y como humectante, elaboración de cerveza, manufactura de sucedáneos de miel, formación de isomaltasa
Isomaltosa sintetasa	<i>Erwinia rhapsontici</i> <i>Protaminobacter rubrum</i>	Procesado de la lana y el cuero, modificación del aroma de la mantequilla y el queso, modificación de grasas y aceites, tratamiento de residuos.

## 8. ENZIMAS

---

Lacto- peroxidasa Lipoxigenasa	Harina de soja	Esterilización en frío de la leche, Blanqueado del pan y oxidado de los aceites.
Acido málico decarboxilasa	<i>Leuconostoc oenos</i>	Producción de bebidas
Naranginasa	<i>Aspergillus niger</i>	Eliminación del sabor amargo de los zumos de los cítricos
Nisianasa	<i>Bacillus cereus</i>	Eliminación de nisina (antibiótico) de la leche
Pectinasa Pectinesterasa	<i>Aspergillus niger</i> <i>rhraceus oryzae</i> , <i>Rhizopus oryzae</i>	Extracción y clarificación de los zumos de frutas empleados en las bebidas no alcohólicas y en el vino, extracción de especias y café.
	<i>Trichoderma reesei</i> <i>Penicillium simplicissium</i>	
Penicilinas	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>cereus</i>	Eliminación de antibióticos en la leche
Penicilina amidasa	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Basidomycetes</i> <i>Achromobacter spp</i>	Formación de ácido 6-aminopenicilico mediante la síntesis de antibióticos semisintéticos
Fenilalanina amonio liasa	Levaduras	Formación de fenilalanina
Fitasa	<i>Aspergillus ficcium</i>	Eliminación del ácido fitico de los cereales
Proteasas de vegetales	<i>Papayi latex</i> , <i>Ficus carica</i> <i>Bromus sps</i>	Producción de extractos de levaduras, cerveza resistente a la congelación, panadería, cuero, textiles, farmacéuticos y procesado de alimentos para animales y hombres incluyendo el ablandamiento de carnes.
Proteasas animales	Vacas, ovejas y cerdos	Industrias farmacéuticas y del cuero, procesado de alimentos, especialmente la hidrólisis de proteínas como las del suero de queso, la síntesis de péptidos.
Proteasas microbianas	<i>Aspergillus niger</i> <i>flavus</i>	Queso, carne, pescado, cereales, frutas, bebidas, panadería.
Proteasa	<i>Aspergillus oryzae</i>	Hidrólisis proteica, especialmente en el

microbianas ácida y neutra		procesado de la carne y el pescado, en la industria de la cerveza y en panadería
Proteasas microbianas	<i>Aspergillus melleus</i> <i>Endothia parasitica</i> <i>Mucor miehei</i> y <i>pusillus</i>	Manufactura del queso (coagulación de la leche)
Proteasas microbianas	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>subtilis alkaline</i> <i>proteases</i>	Detergentes e industria del cuero, procesado de carne, pescado y derivados lácteos.
Proteasas microbianas	<i>Bacillus subtilis</i> proteasa neutra	Producción de bebidas y pan
Pululanasa	<i>Klebsiella</i> <i>aerogenes</i> <i>Bacillus</i> sps	Desramificación del almidón durante la formación de jarabes de glucosa y la elaboración de cerveza
Renina	Cuarto estomago de terneros	Coagulación de la leche en la producción de queso
Ribonucleasas	<i>Penicillium citrinum</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Streptomyces griseus</i>	Formación de nucleótidos empleados como potenciadores del sabor y aromatizantes.
Sulfhidrilo oxidasa	Suero de leche	Reducción del aroma y sabor a quemado de la leche
Tanasa	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>niger</i>	Procesado de bebidas, té, cerveza.
Termolisina	<i>Bacillus proteolyticus</i>	Producción de edulcorante aspartame (ácido aspártico-éster metílico de fenilalanina)
Triptofanasa		Formación de triptófano.
Xilanasas	<i>Streptomyces</i> sps <i>Aspergillus niger</i> <i>oryzae</i> <i>Sporotrichium</i> <i>dimorphosporium</i>	Procesado de cereales, té, café, cacao y chocolate.
Enzimas utilizadas como mezclas complejas		
Pectinasas, hemicélulasas y proteasas	<i>Aspergillus</i> , <i>Rhizopus</i> <i>Trichoderma</i> sps	Procesado de frutas (extracción y clarificación)



## 8. ENZIMAS

---

Glucosa	<i>Aspergillus niger</i>	Empleo de antioxidantes por ejemplo en bebidas oxidasa suaves y en la producción de ácido glucónico y catalasa mantequilla.
Amilasa B-glucanasa proteasa célulasa	<i>Bacillus subtilis</i>	Producción de cerveza
Mezclas de enzimas de <i>Actinomyces, Achromobacter</i> y <i>Pseudomonas</i> sps		Lisis de células
Proteasas amilasas y lipasas	<i>Bacillus subtilis</i>	Detergentes
Célulasa	<i>Trichoderma reesei</i> <i>Aspergillus niger</i> , <i>oryzae, phoenicis</i> y <i>wentii</i> <i>Mucor miehei</i>	Procesado de frutas y verduras
Ciclo- dextranasa	<i>Bacillus macerans</i> y <i>megaterium</i>	Formación de ciclodextrinas
Dextranasa	<i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Penicillium funiculosum</i> y <i>liacnium</i> <i>Fusarium</i> <i>Flavobacterium</i> sps	Hidrólisis de los polisacáridos durante la producción de azúcar y en el procesado de los alimentos
Diacilasa - ductasa	<i>Aerobacter aerogenes</i>	Eliminación del diacetilo de la cerveza, que le da un aroma desagradable
Epoxi- succinato hidrolasa	<i>Nocardia tatartaricus</i>	Formación de ácido tartárico
Fumarasa <i>ammoniagenes</i>	<i>Brevibacterium</i>	Producción de ácido málico
a-Galacto- sidasa	<i>A. niger</i> <i>Mortierella vinacea</i> <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisae</i>	Hidrólisis de oligosacáridos en el refinado del azúcar y en la producción de leche de soja.

Lactasa	<i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus</i> sps <i>A. niger, oryzae</i> <i>Klebsiella fragilis</i> <i>Saccharomyces fragilis lactis</i> <i>Kluyveromyces lactis fragilis</i>	Hidrólisis de la leche y otras operaciones de procesado de la leche, especialmente en la hidrólisis del suero y también en la elaboración de productos farmacéuticos
B-glucanasa	<i>B. subtilis</i> y <i>circulans</i> <i>A. niger, oryzae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hidrólisis de polisacáridos en la elaboración de cerveza, la extracción del zumo de frutas y otros productos a partir de plantas por ejemplo aromas
Glucosa isomerasa	<i>Actinoplanes missouriensis</i> <i>Bacillus coagulans</i> <i>Streptomyces albus olivaceus,</i> <i>olivochromogenes</i>	Isomerización de la glucosa en jarabes ricos en fructosa
Glucosa oxidasa	<i>A. niger</i> <i>Penicillium glaucum notatum</i>	Antioxidante, por ejemplo en las frutas o en la conservación de la albúmina y en el control del color del vino, y la formación de ácido glucónico
Histidina amoníaco liasa	<i>Achromobacter liquidium</i>	Producción de ácido glucónico
a-hidroxilasa	<i>Rhizopus arrhizus</i>	11 a-hidroxilación de progesterona dando lugar a la síntesis de cortisona, hidrocortisona, prednisolona y prednisona.
Inulinasa	<i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Aspergillus</i> sps	Fabricación de edulcorantes.

A continuación se describen algunas áreas donde se utilizan las enzimas:

a) Extracción de jugos o pulpas

Al tratar de obtener un fluido de vegetales fluido de pulpa por presión por lo general, la misma tiende a obstruir el extractor, por lo que continuamente se tienen que estar destapando el extractor, al añadir enzimas a la pulpa inicial, la cual posteriormente es calentada a 100-123

## 8. ENZIMAS

grados durante 10 a 60 minutos con agitación, este tratamiento provoca un desdoblamiento de las cadenas pépticas haciendo de la pulpa presente una consistencia más fluida.

### b) Clarificación de jugos

Al extraer un jugo de cualquier fruta, este se encuentra turbio debido a la cantidad de pectina que queda en este, pues esta presente en forma de coloides en el jugo y quedan suspendidas partículas que le dan la turbidez, si se añaden pectinansas se hidrolizan las pectinas y precipitaran las sustancias que provocan esta turbidez

Procesos de conversión de almidones.- Se usan como sustrato a ciertos almidones como almidón de maíz, de papa, y la enzima hidroliza los enlaces para obtener glucosa o jarabes fructosados, las enzimas que se usan son amilasas, aunque se usan diferentes enzimas dependiendo del sustrato.

### c) Suavización de carne

Para este proceso se utilizan enzimas como papaina, bromelina y ficina, en algunos casos la enzima se le da al animal antemortem en el sistema vascular que mejoran las características de suavidad de la carne, así como también un tratamiento posterior motriz

### d) Reducción del encogimiento de carne cocida

El mayor problema en la producción de carne cocida, es el resultado común que puede presentar estos productos, se desmenuzan fácilmente, se secan, se reduce la jugosidad y muestra un excesivo encogimiento, tienen una textura gomosa y se dificulta para la masticación.

El freírla o asarla causa una coagulación de las proteínas y altera la estructura celular de a carne. La consistencia de la carne puede ser mejorada usando amilopectina que previene la destrucción de la carne en su cocimiento y ayuda a la retención de agua en la carne, esto ayuda a prevenir el encogimiento.

### e) Extracción de proteínas del pescado y deodorización

Se ha encontrado que cierto grupo de enzimas provenientes de hongos pueden modificar las

proteínas de pescado sin perjudicar la calidad del alimento y puede también neutralizar el olor y sabor a pescado en alto grado. Las enzimas que son especialmente efectivas en este caso son las producidas por el género *Aspergillus*, estas enzimas son purificadas comercialmente, son proteasas, amilasas, lipasas, pectinasas, etc., todas estas enzimas actúan de modo sinérgico, una característica de este proceso es que las aminas responsables del sabor de pescado se liberan por acción enzimática.

#### f) Aplicación en el sabor

El sabor de frutas y hortalizas puede ser aumentado por la acción enzimática, sobre todo cuando el sabor es bajo, un ejemplo son las cebollas frescas blanqueadas en corriente por 2 a 3 minutos, para inactivar las enzimas que provocan su oscurecimiento y afectan su calidad, el jugo de la cebolla se extrae y se filtra, este filtrado es casi inodoro y con muy poco sabor característico, por medio de enzimas puede recuperarse un poco de su aroma y sabor característico.

El sabor y aroma característico es debido a la reacción de un sustrato, un aminoácido, que al descomponerse, produce componentes típicos del sabor.

Cuando las células de las plantas están lisiadas, la enzima alinasa entra en contacto con el sustrato para producir un sulfuro conteniendo alicina, que da el olor típico. La alicina es inestable y se deteriora con el tiempo, el sabor y olor característico de estas plantas una forma de retardar su deterioro es el uso de ac. cítrico que actúa como buffer, permitiendo que las reacciones continúen.

También se han logrado producir otros sabores que son producidos por enzimas como por ejemplo el sabor a diversos quesos y a coca, así como el mejoramiento de sabor de otros productos como la margarina.

#### g) Desazucarización de huevos

La conversión de glucosa a ac. glucónico por medio de un sistema enzimático, se logra por medio de una glucosa oxidasa, antes de la deshidratación del huevo y minimizar el

## 8. ENZIMAS

---

espumamiento.

### h) Mejoramiento del color de productos de huevo

Con un pequeño tratamiento de enzimas proteolíticas, reduce las características de coloración del huevo de gris o verde que se presenta en la interfase de la yema-clara en productos de huevo cocinado, las yemas son combinadas con una pequeña cantidad de enzima que hidroliza la proteína que esta presente y provee una textura lisa en los productos, después de la reacción la enzima es inactivada por la acción del calor.

### i) Productos lácteos

El principal derivado lácteo en la alimentación es el queso, el cual se produce mediante la precipitación y recuperación de la caseína, esta precipitación se lleva a cabo mediante la producción bacteriana de ácido láctico, lo que provoca una disminución del pH hasta llegar al punto isoelectico de la proteína, después de esto el queso es sometido a un proceso de maduración en el cual actúan las enzimas como lipasas, que hidrolizan la grasa proporcionando un sabor y aroma característico.

### j) Proteolisis

La hidrólisis enzimática de una proteína se utiliza en un número de industrias por una amplia variedad de razones, incluyendo los cambios en el sabor del producto, en la textura y en el aspecto, la papina y la bromelalina son empleadas para obtener carne tierna, algunas proteinasa se utilizan para la hidrólisis de proteínas solubles presentes en la cerveza, en la hidrólisis de gelatina para evitar la gelificación posterior en los productos alimentarios y para hidrolizar el gluten en la masa del pan para controlar la viscosidad durante la manipulación e incrementar la textura y apariencia final.

### k) Degradación de carbohidratos

En la ruptura de almidón hasta azúcares solubles, necesario en los procesos de cerveza, producción de jarabes a partir de maíz, en la recuperación de alginatos y el procesamiento de jugos de frutas.

1) Refinado de azúcar

En la extracción de sacarosa a partir de remolacha azucarera, la presencia de rafinosa puede traer algunos problemas a la cristalización de la sacarosa, esta se degrada enzimáticamente por medio de la rafinasa, con un resultado doble, la producción de sacarosa y el favorecimiento de la cristalización.

**8.13      *FABRICANTES DE ENZIMAS:***

De las compañías que venden enzimas aproximadamente una media docena son dominantes en variedad, calidad y cantidad de enzimas comercializados. Existe una asociación de comerciantes denominada "The association of Microbial Food Enzyme Producers"

La amplia expansión del mercado probablemente se deba a la formación de nuevas compañías, y a la creciente utilización de enzimas para un mayor propósito como los análisis, debido probablemente a que no se requieren de ensayos tan extensos previos a su autorización.

El mayor mercado de las enzimas se encuentra en Estados Unidos y Europa, los cuales cuentan con casi tres cuartas partes de la ventas del mundo, la producción se encuentra principalmente en Europa donde se valúa la manufactura en dos tercios del total del mercado de enzimas a nivel mundial.

---

## 9 PRODUCCIÓN DE AMINOACIDOS

### 9.1 INTRODUCCIÓN

Un aminoácido es un compuesto orgánico que contiene dos grupos funcionales, un grupo amino y uno carboxilo, son componentes particularmente importantes en la alimentación de todo ser vivo, por que son la estructura base para la formación de las proteínas. Del total de veinte aminoácidos que los organismos vivos necesitan para fabricar sus proteínas 10 son sintetizados normalmente en el organismo, a estos se les llama aminoácidos no esenciales, los restantes deben suministrarse en la dieta o como aminoácidos libres y se les conoce como aminoácidos esenciales, (arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano y valina), estos son particularmente escasos y de elevado precio. Aparte de estos existen muchos otros que no son constituyentes de las proteínas pero que pueden tener diversas propiedades interesantes o ser intermediarios en la producción de aminoácidos, como la Ornitina y la citrulina.

Los aminoácidos son estructuras incoloras, cristalizan bien y forman fácilmente sales tanto con los ácidos como con las bases, por ser ácidos orgánicos forman esteres con algunos alcoholes, tienen puntos de fusión elevados pero se descomponen antes de alcanzar la temperatura de fusión, tienden a solubilizarse en disolventes polares y tienen un peso molecular bajo.

Además de ser constituyentes de las proteínas los aminoácidos en la industria alimenticia por otras propiedades como son: mejoradores del sabor, sazonadores y aditivos nutricionales en alimentos que presentan deficiencias, también se emplean en la industria química como agentes tensoactivos y en la síntesis de polímeros, en la industria farmacéutica se usan en cosméticos y con fines terapéuticos.

Como mejoradores del sabor han sido utilizados desde la antigüedad, un producto llamado Konbu, originario del Japón se utilizaba como condimento, en 1908 se identifico como

---

el ácido L-glutámico y en 1909 la empresa Ajimoto Co. lo empezó a producir industrialmente, a partir de 1957 se descubrió que existían microorganismos que lo producían en cantidades considerables, se inició entonces la investigación y desarrollo, principalmente en Japón, de la producción y sobreproducción de metabolitos por los microorganismos, en especial del ácido glutámico, avanzando en el conocimiento de microorganismos mutantes y del camino biosintético de los aminoácidos.

Aproximadamente el 60 % de los aminoácidos producidos se destinan a la industria alimentaria ejemplos de ellos son el aspartato y la alanina que mejoran el sabor en jugos, la glicina se usa como edulcorante sobre todo combinado con otros, la cisteína mejora la calidad del pan y antioxidante, el triptofano y la histidina se usan también como antioxidantes y en la leche para evitar la rancidez.

En México existen dos compañías productoras de aminoácidos Fermex (México D.F.) Y Enzimologa (Monterrey N.L.), existen otras compañías como Ajimoto que solo son importadores y distribuidores en el país.

Las empresas más importantes a nivel internacional tanto en producción como en investigación son de origen Japones (Ajimoto, Kyowa Hakko, Tanabe Seiyaku)

Los aminoácidos que principalmente se producen se pueden ver en el cuadro 9.1

Cuadro 9.1 Producción mundial de aminoácidos

Aminoácido	Producción (Ton/año)
DL-Alanina	700
L-Arginina	1,000
L-Aspartato	4,000
L-Fenilalanina	3,000
L-Glutamina	500
L-Glutamato	500,000
L-Histidina	200
L-Isoleucina	150
L-Lisina	70,000
DL-Metionina	120,000
L-Prolina	100
L-Serina	50



## 9. AMINOÁCIDOS

---

L-Treonina	160
L-Triptofano	200
L-Valina	150

---

García Garibay 1993

### 9.2 MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Existen tres tipos de microorganismos que se utilizan en la producción de aminoácidos, los microorganismos silvestres, mutantes auxotróficos y mutantes regulatorios, los aminoácidos que normalmente se producen en la célula son utilizados en la síntesis de proteínas, no se producen en exceso debido a los sistemas de regulación-represión de las células, por esta razón es importante conocer las rutas metabólicas y formas de regulación antes de intentar modificarla genéticamente.

#### 9.2.1 Cepas Silvestres

La mayoría son Gram positivas, no forman esporas, no son motoras y requieren de biotina para su crecimiento, en la fermentación la formación de producto es mayor cuando la concentración de biotina en el medio es por debajo de la óptima, el exceso provoca un crecimiento abundante pero inhibe la formación de producto. El descubrimiento de la penicilina y los ácidos grasos saturados como agentes antibióticos, permitió la utilización industrial de materias primas ricas en biotina como caña y remolacha para la producción de ácido L-glutámico.

La actividad metabólica de un microorganismo es consecuencia del funcionamiento simultáneo de un gran número de rutas metabólicas, la célula posee los medios adecuados para equilibrar las velocidades del metabolismo, para que no exista la sobreproducción o desperdicio, en el caso de que se presenten sustancias que no sean utilizables directamente, la célula sintetiza enzimas que hacen disponible el sustrato, para regular este mecanismo existen principalmente dos formas

---

Regulación de la actividad enzimática, el producto final elimina la actividad de la primera enzima de la vía

Regulación de la síntesis enzimática, en este caso los represores, que pueden ser los productos, se unen al gen en un lugar cercano a los genes estructurales impidiendo la transcripción, cuando un represor se une a su efector alosterico, llamado inductor, pierde su capacidad de bloquear la transcripción y la síntesis enzimática específica.

La célula también es capaz de efectuar reajustes en su maquinaria metabólica como respuesta a nuevas exigencias impuestas por variaciones.

### 9.2.2 Mutantes Auxotróficos

Son microorganismos de los géneros de *Brevibacterium* o *Corynebactrium* en sus diferentes especies, para hacer a un microorganismo auxotrófico se bloquea las ramificaciones biosintéticas que no se desean, esto se logra poniendo en el medio de cultivo aquellos aminoácidos que no nos interesan y un agente que les haga mutar para que se corten esas vías metabólicas, luego entonces para que ese organismo pueda crecer siempre requerirá que el medio presente los aminoácidos y se dice que se ha convertido en auxótrofo de ese aminoácido, para expresar esta condición se le pone el signo - al aminoácido que ya no puede sintetizar (Ile-), el producto final acapara toda la materia prima que se destina normalmente para esa ruta sobreproduciendo un aminoácido, esto es, al obtener auxotrofia a un aminoácido el flujo de materia prima se canaliza hacia la producción de aquellos otros de la misma familia cuya síntesis no ha sido bloqueada, un ejemplo es la producción de L-lisina, este aminoácido es de la familia del aspartato y se produce en la misma ruta metabólica que la, L-treonina, L-metionina, y la L-iso-leucina, en este caso el punto de control se encuentra en la aspartoquinasa que cataliza el primer paso en la síntesis de todos los aminoácidos de esta familia, haciendo al microorganismo auxótrofo a la treonina y metionina, el mutante es capaz de acumular grandes cantidades de lisina, en el siguiente cuadro se pueden ver que aminoácidos son producidos por mutantes auxotróficos.

## 9. AMINOÁCIDOS

Cuadro 9.2 Aminoácidos producidos por Mutantes auxotróficos

Aminoácido	Microorganismo	Marcador	Producción (g/L)
ácido L-Aspartico	<i>Brevibacterium flavum</i>	citrato sintetasa-	10.6
L-Leucina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Phe- His- Ile-	16
L-Lisina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Homoser-	13
	<i>Brevibacterium flavum</i>	Thr- Met-	34
	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	Homoser-	20.2
L-Prolina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Ile-	14.8
	<i>Brevibacterium spp.</i>	His-	23
	<i>Brevibacterium flavum</i>	Ile, SG	35
L-Treonina	<i>Arthrobacter paraffineus</i>	Ile-	9
	<i>Escherichia coli</i>	Met- Val-	13
	<i>Candida guilliermondii</i>	Ile-, Met-, Trp-	4
L-Valanina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Ile-, Leu-	30
	<i>Arthrobacter paraffineus</i>	Ile-	9
L-Ornitina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Cit-	26
	<i>Corynebacterium hydrocarboulactum</i>	Cit-	9
	<i>Arthrobacter paraffineus</i>	Cit-	8
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Arg-	10.7
L-Citrulina	<i>Bacillus subtilis</i>	Arg-	16.5

SG Resistencia a la sulfaguanina  
Reed, 1984

## 9.2.3 Mutantes regulatorios

Existen compuestos que son estructuralmente similares a los aminoácidos naturales y que poseen un efecto inhibitorio en la producción de estos, estos compuestos se les llama análogos y tienen un efecto de falsa inhibición por retroalimentación, por que el verdadero inhibidor no se encuentra presente. Sin embargo si se logra obtener un mutante resistente al análogo se espera que el mecanismo normal de regulación se bloqué y produzca el aminoácido deseado en grandes cantidades.

Otro ejemplo de la aplicación de los mutantes regulatorios junto con mutantes auxotróficos es la producción de L-treonina, en *Corynebacterium glutamicum* y *Brevibacterium flavum* la sobreproducción de L-treonina se inhibe por retroalimentación sobre la aspartoquinasa con L-treonina y L-lisina y la inhibición por retroalimentación de la homoserina deshidrogenasa por L-treonina. Se puede lograr la sobreproducción de treonina usando un análogo de este, la alfa-amino-beta-hidroxivalerato (AHV), que actúa produciendo un mutante resistente a la inhibición por retroalimentación de la treonina, además de que la homoserina deshidrogenasa que participa en la producción de L-treonina puede ser reprimida por la presencia de L-metionina, si el microorganismo también se hace auxótrofo a la metionina la producción de treonina será mucho mayor.

La siguiente tabla muestra un resumen de los aminoácidos producidos por Mutantes regulatorios y Mutantes regulatorios auxotróficos.

## 9.3 Aminoácidos producidos por Mutantes regulatorios y Mutantes auxotróficos-regulatorios

Aminoácido	Microorganismo	Marcador	Producción (g/L)
L-Fenilalanina	<i>Brevibacterium flavum</i>	citrato sintetasa-	2.2
	<i>Bacillus subtilis</i>	FT	6
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	PFP, PAP, Try-	9.5
	<i>Brevibacterium</i>	MT, PFP,	24.8

## 9. AMINOÁCIDOS

L-Leucina	<i>lactofermentum</i>	Try-, Met-	28
	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	TA, Met-, Ile-	
L-Lisina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	AEC, Homoser-	42
	<i>Brevibacterium flavum</i>	AEC	32
	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	AEC, AHV	29
L-Serina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	OMS, MSE,	3.8
L-Treonina	<i>Brevibacterium flavum</i>	AHV, Met-	18
	<i>Escherichia coli</i>	Met- Ile-	6.1
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	AHV, Met-, AEC	14
L-Valanina	<i>Brevibacterium flavum</i>	TA	31
L-Citrulina	<i>Bacillus subtilis</i>	AU	26.2
L-Arginina	<i>Bacillus subtilis</i>	Arg-	28
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Ile-, D-ser,	25
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	D-Arg,	
L-Histidina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	TRA, MG, AG	
L-Isoleucina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	TU,MP,MT	9.7
	<i>Brevibacterium flavum</i>	Met-, AHV	
	<i>Brevibacterium flavum</i>	TIL, AEC, ETH	14.5
L-Metionina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	AHV, OMT	
L-Triptofano	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Thr-, ETH	2
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	SME,	
	<i>Brevibacterium flavum</i>	MT,FT,	12
L-Tirosina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	PFP, PAP,	6.2
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	FT,	
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Phe-	17.6
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	AT,		
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	PFP, PAP, Phe-		

Reed, 1984

AEC(beta-aminoetil-cisteina),AG(azaguanina),AHV(alfa amino beta hidroxil valerato), AU(azauracil),ET(etionina),FT(flurofanilalanina),MG(mercaptoguanina), MP(Mercaptopurina),MSE(metilserina),MT(metilriptofano),OMS(orto-metilserina), OMT(orto-metiltreonina),PAP(para-aminofenilalanina),PFP(para-flurofenilalanina), SME(selenometionina),TA(tiazolalanina),TIL(tioisoleucina), TRA(1,2,4triazolalanina) TU(tiouracil).

## 9.2.4 Producción por precursores biosintéticos

Este método se basa en la utilización como materia prima, de un intermediario metabólico del aminoácido en la ruta metabólica, de esta manera el microorganismo termina la conversión en la fermentación.

La L-isooleucina se biosintetiza vía alfa-ketobutirato, derivado de la L-treonina, la treonina hidratasa cataliza el primer paso para la biosíntesis de la L-isooleucina, la conversión de L-treonina a alfa-cetobutirato y amoniaco es susceptible de inhibición por retroalimentación con L-isooleucina. Sin embargo si se usa D-treonina como materia prima, la D-treonina deshidratasa cataliza la conversión a alfa-cetobutirato y amoniaco, y esta enzima es inducible por la adición de D-treonina al medio, no se inhibe por la presencia de L-isooleucina, por lo tanto la biosíntesis continua sin un control metabólico y se logra la sobreproducción, en la siguiente tabla se muestran algunos precursores de aminoácidos.

Cuadro 9.4 Aminoácidos producidos por precursores biosintéticos

Aminoácido	Microorganismo	Precursor
L-Histidina	<i>Brevibacterium flavum</i>	Histidinol
L-Isoleucina	<i>Brevibacterium, Corynebacterium</i>	DL-alfa-bromobutirato
L-metionina	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	2-hidroxi-4-tiobutirato
L-fenilalanina	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	2-hidroxi-3-fenilpropionato
L-serina	<i>Pseudomonas spp</i>	Glicina
L-treonina	<i>Bacillus subtilis</i>	L-homoserina
L-triptofano	<i>Claviceps purpurea</i> <i>Hansenula anomala</i>	Indol Ácido antranílico

Reed, 1984

## 9.3 PRODUCCIÓN

Los aminoácidos pueden ser producidos de tres maneras: Por síntesis química, por hidrólisis de proteínas, o por fermentación, de los tres métodos el más útil es la fermentación, los aminoácidos obtenidos son del tipo L, biológicamente activos, y si se utiliza el

## 9. AMINOÁCIDOS

microorganismo adecuado la sobre producción del aminoácido hace más fácil tanto la recuperación como la separación.

Los aminoácidos se producen a partir de intermediarios del metabolismo de los glúcidos: fosfato de eritrosa, fosfato de triosa, piruvato, acetyl Co-A, oxalacetato.

La producción industrial de aminoácidos por fermentación se inicio con el descubrimiento del *Corynebacterium glutamicum*, usada primero como cepa silvestre y posteriormente haciéndole modificaciones en su producción

El método general para la producción industrial de aminoácidos por vía fermentativa es el siguiente:

El proceso se inicia en el laboratorio, con la preparación del cultivo microbiano el microorganismo que generalmente se conserva liofilizado.

Se resiembrar varias veces para adaptarlo nuevamente a condiciones óptimas de crecimiento y producción

Se traspara a tanques fermentadores hasta llegar al fermentador de máxima capacidad, esta etapa debe ser muy cuidadosa para evitar la contaminación, la fermentación termina por lo general con una acidificación.

Después de la fermentación se separan los aminoácidos por medio de una resina de intercambio iónico.

Una vez separado se concentra y seca para obtener su forma cristalina y pueda ser almacenado.

### 9.3.1 Factores a controlar en la producción de aminoácidos

Fuente de carbono.- La fuente de carbono empleada es uno de los factores más importantes en la factibilidad del proceso, por esta razón siempre se busca utilizar fuentes baratas como la melaza, el porcentaje de rendimiento se calcula en base a la cantidad de aminoácido producido por cantidad de azúcar utilizado.

Fuente de nitrógeno.- Depende principalmente de las características nutricionales del cultivo de producción, los microorganismos auxotróficos requieren poco nitrógeno, aunque se pueden adicionar hidrolizados de varias harinas como la de soya, frijol, algodón, cacahuate, o en su defecto se puede utilizar urea o sulfato de amonio.

PH.- La conversión de azúcar en aminoácidos da como resultado un cambio en el pH, este se debe mantener para que la cepa productora se mantenga en la mayor productividad, el rango para la mayoría de los procesos es entre 6 y 7, la neutralidad es la condición óptima para la producción.

Temperatura.- Las temperaturas también varían de acuerdo al microorganismo empleado, de los géneros antes mencionados, el rango de temperatura a usar esta entre los 25 a 37°C, pues son bacterias mesófilas, sin embargo la temperatura debe ser determinada a nivel laboratorio para las bacterias modificadas

Aireación.- Por lo general los géneros utilizados presentan condiciones de crecimiento y producción aerobia, por lo que se prefiere la mayor aireación

### 9.3.2 Aminoácidos Producidos

#### 9.3.2.1 ÁCIDO L-GLUTÁMICO

Es el aminoácido de mayor consumo comercial y por lo tanto el más producido, la razón es que su sal sódica o glutamato monosódico se utiliza como potenciador del sabor de los alimentos, es el aminoácido más abundante en las proteínas animales y al parecer el único que es oxidado por el tejido cerebral su consumo esta aprobado por la FDA en los Estados Unidos. En su producción se emplean fundamentalmente cepas de *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Microbacterium* y *Bacillus*. que pueden transformar en ácido glutámico sustratos diversos. Existen muchos métodos de producción pero uno de los más comerciales utiliza como materias primas papas, el medio debe tener de .5 a 5 g por litro de biotina que es el subóptimo, esto produce un descenso en el contenido de fosfolípidos de la



## 9. AMINOÁCIDOS

membrana celular y por lo tanto produce permeabilidad en la membrana que facilita la secreción del aminoácido además de que limita el crecimiento, la acumulación de ácido L-glutámico no está gobernada por la biosíntesis sino por la secreción, por esta razón esta asociada con la permeabilidad de la membrana. La adición de penicilina, cefalosporina o ácidos grasos de 16 a 18 carbonos aumentan también la permeabilidad de la pared celular aún en presencia de biotina. El sustrato usado puede ser glucosa, fructuosa, sacarosa, maltosa, xilosa, almidón o una combinación de estas. El nitrógeno suele ser suministrado en alguna de las siguientes formas: urea, amoníaco, sales de amonio, peptona, líquido de remojo de maíz, caseína hidrolizada, extracto de carne, harina de soya o pescado. El pH óptimo es de 7 a 8.5 y la temperatura entre 27 y 30°C, bajo condiciones aeróbicas la fermentación tarda aproximadamente tres días. Al final de la fermentación se separan las células por centrifugación y el medio se acidifica hasta el punto isoelectrico del aminoácido (3.2), obteniéndose en forma sólida, se filtra y se lava y por último se secan para obtener la forma comercial. Los rendimientos son del 50 al 60 % en referido a la glucosa consumida.

### **9.3.2.2 L- TRIPTÓFANO**

Es un aminoácido esencial presente en las proteínas en pequeñas cantidades, la bacteria *E. coli* transforma el indol y la serina en triptofano si se cultivo en presencia de ácido antranílico, el precursor, y glicerina, después de lo cual se debe trasladar a una solución con 3g/l de indol y un exceso de serina, después de 16 horas aproximadamente se obtienen 5.2 g/l de L-triptofano. Si se utilizan levaduras como *Hansenula anomala*, en una fermentación a un pH de 5 y una temperatura de 27°C durante 7 días, en un exceso de ácido antranílico además de la fuente de carbono se obtienen rendimientos del 2.5 al 3.5 %.

**9.3.2.3 L-FENILALANINA**

Es un aminoácido que se utiliza en la elaboración del aspartame, se produce comercialmente con un cultivo de *E. coli* recombinante que convierte el ácido transcinámico en L-fenilalanina, con un rendimiento de 30g/l,

**9.3.2.4 L-LISINA**

Es un aminoácido esencial con un esqueleto de seis carbonos, para su producción se utilizan principalmente mutantes de *Corynebacterium glutamicum* y *Brevibacterium flavum*, en los que esta bloqueada la transformación de homoserina, en condiciones normales la ruta metabólica producirá también metionina y treonina. El medio de cultivo se suplementa con 20% de melaza, de 40 a 50 mg/l de biotina, el pH debe ser lo más posible cercano a la neutralidad, la temperatura debe estar entre 28 y 30 °C, la fermentación termina al cabo de 60 horas, con un rendimiento de 44g/l.

**9.3.2.5 L-LEUCINA**

Es un aminoácido que se utiliza como materia prima en la elaboración de lisina, para su producción se puede utilizar como sustrato azúcar con un rendimiento del 14 al 16%, aproximadamente se producen 120 toneladas al año.

## 10 PRODUCCION DE GOMAS MICROBIANAS

### 10.1 INTRODUCCIÓN

**L**os microorganismos productores de polisacáridos ya existían cuando se descubrieron las gomas de exudados de árboles, de semillas, de algas marinas, de tubérculos, de animales, pero no lograron descubrirse como potenciales productores de polisacáridos sino hasta que la biotecnología hizo factible su obtención a gran escala y todavía existen muchos microorganismos capaces de producir exudados que no han sido desarrollados en su producción a gran escala.

Estas gomas pueden tener un sinnúmero de aplicaciones a la industria alimenticia, farmacéutica, agrícola, cosméticos, textil, aceitera etc.

Un polisacárido (goma) es una macromolécula de origen natural, que puede disolverse o dispersarse en agua para formar soluciones, suspensiones de alta viscosidad o geles.

Existen diversos tipos de polisacáridos entre los que encontramos:

- ✓ Gomas naturales: Son las que provienen de exudados de árboles como el chicle, extractos de plantas como la pectina, extractos de semillas la goma de algarrobo, algas marinas como el alginato, almidones de cereales, almidones de tubérculos, almidones de animales como el glucógeno, proteínas animales como la gelatina y la caseína, proteínas vegetales como la soya y gomas microbianas como la xantana.
  - ✓ Gomas modificadas o semisintéticas: Son las gomas derivadas de la celulosa (carboximetilcelulosa, metilcelulosa), almidones (dextrinas, acetato de almidones) y otros como metoxipeptina, alginato de propilen glicol.
  - ✓ Gomas sintéticas: Son las que se obtienen de productos petroquímicos tales como alcohol polivinílico, polivinilpirrolodina, policarboxivinil, sales de ácido poliacrílico,
-

polímeros de óxido de etileno.

Todas estas gomas tienen un gran campo de uso en la industria por su propiedad de alterar las propiedades del flujo de agua, ya sea como gelificantes, agentes suspendedores, estabilizantes, espantes emulsificantes, agentes de sedimentación, preservación de alimentos (en forma de películas protectoras), así como conservador (en combinación con antibióticos).

Las gomas microbianas presentan grandes ventajas en su uso frente a otras gomas, el siguiente cuadro presenta las ventajas y desventajas de las gomas microbianas

Cuadro 10.1 Ventajas y Desventajas del uso de gomas microbianas

Ventajas	Desventajas
1.- Su producción no depende de condiciones climáticas ni de recolección 2.- Pueden producirse en zonas donde las condiciones no permitan el desarrollo de gomas naturales 3.- Es factible el uso de materias primas regionales 4.- Manejo de la escala de producción dependiendo del mercado 5.- Uniformidad en las propiedades, pureza y características de calidad ya que su biosíntesis es muy específica. 6.- Posibilidad de alterar las características de los microorganismos productores con el fin de mejorar la producción o producir gomas especiales. 7.- En la mayoría de los microorganismos los polisacáridos que producen son extracelulares, lo que permite una mayor pureza, menor costo y menor degradación.	1.- Alto costo de desarrollo 2.- Alto costo de capital de las planta de proceso (Adquisición, instalación, gasto de energía, tecnología etc.)

Glicksman, 1986

De esta tabla podemos darnos cuenta de las grandes ventajas que ofrece el uso de gomas microbianas en los diferentes campos de la industria, sin embargo la penetración al mercado ha sido lenta debido al poco conocimiento de sus propiedades.

## *10 GOMAS MICROBIANAS*

---

### *10.2 PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS POLISACÁRIDOS*

Los polisacáridos son hidrocoloides capaces de formar dispersiones en medio acuoso, los polisacáridos se pueden utilizar como aditivos puesto que imparten textura y confieren características deseables como la apariencia y la estabilidad, gracias a sus propiedades funcionales

Los cambios físicos sufridos por los alimentos dependen en gran parte de la cantidad de agua que son capaces de retener, que está directamente relacionado con los residuos de gomas constitutivas y de los aditivos utilizados.

Todos los polisacáridos, tienen un efecto de espesamiento, cuando son dispersados en un medio acuoso y esta propiedad es la base de su utilización como agentes espantes, estabilizantes y por su capacidad de formar geles.

Las características reológicas de un sistema disperso dependen de las propiedades de la fase continua, de la fase dispersa y la interacción entre ambas. En la fase continua, influyen en estas propiedades reológicas, la composición química, el pH y la concentración de electrolitos. En la fase dispersa, que puede ser líquida o sólida (emulsiones y suspensiones), la concentración en volumen, la forma, la distribución por tamaños y la composición química. La interacción entre las dos fases puede verse afectada por la presencia de agentes estabilizadores y surfactantes.

### *10.3 CARACTERÍSTICAS GENERALES*

Los microorganismos al igual que los organismos superiores, sintetizan oligosacáridos y polisacáridos, para diversas funciones, estructurales formando parte de la pared celular, de reserva como el glicógeno y extracelulares, algunos de ellos se encuentran adheridos a la pared celular por enlaces covalentes y otros son secretados al medio. En función con la relación que el polímero guarda con la célula estos pueden ser capsulares, microcapsulares o extracelulares (glicocalix), las cantidades de estos compuestos varían considerablemente y los de tipo extracelular pueden llegar hasta un 80 % en peso seco.

Las gomas microbianas extracelulares son de dos tipos. las que forman una capa alrededor del microorganismo o capsulares y aquellas que se solubilizan en el medio de cultivo incrementando la viscosidad del caldo de fermentación.

Estructuralmente pueden ser de dos tipos:

- ❖ Los Homopolisacáridos, constituidos por la misma unidad monomérica estructural que son sintetizados mediante una enzima de transglusidación, la cual adiciona unidades monoméricas eliminando un moléculas de agua entre un grupo hidroxilhemiacetalico, de la unidad y un grupo hidroxilo disponible de la otra unidad.
- ❖ Los heteropolisacáridos están constituidos por diversas unidades monoméricas y son sintetizados dentro de la célula en un mecanismo análogo al involucrado en la síntesis de pared celular mediante reacciones multienzimáticas.

Las enzimas involucradas en la biosíntesis pueden ser clasificadas en cuatro tipos:

- I. Las que se encuentran involucradas en el metabolismo inicial se encuentran intracelularmente y están involucrados en muchos procesos metabólicos. La primera de estas enzimas la exocinasa esta involucrada en la fosforilación de glucosa a glucosa-6-fosfato iniciando el proceso.
- II. Las enzimas que son responsables de la síntesis de interconversión de azúcares nucleotidos, también se encuentran intracelularmente, catalizan la conversión de glucosa-1-fosfato a uridinadifosfato, que es una llave del nucleotido azúcar y es importante por que es el medio precursor durante la biosíntesis de polisacáridos, otro de los papeles importantes de los azúcares nucleotidos es que son los donadores de residuos de monosacáridos que son activados durante la biosíntesis, estos residuos son transportados por las enzimas.
- III. Las tranferasas son responsables de la unión de las unidades de monosacáridos, se encuentran situadas en el espacio periplasmico de las células, están involucradas en la transferencia de nucleotido-azúcares para formar unidades repetidas de esta unión.
- IV. Las Translocasas o polimerasas que forman las moléculas del polímero, se encuentran

## 10 GOMAS MICROBIANAS

localizadas sobre la parte exterior de la membrana celular y la pared celular, se encuentran involucrados en la expulsión final del polisacáridos fuera de la membrana, que se une a la cápsula alrededor de la célula.

Desde el punto de vista industrial los polisacáridos microbianos solubles tienen mayor potencial, en vista de que pueden ser recuperados en concentraciones mayores, a partir del caldo de cultivo.

### *10.4 PROPOSITO DE LOS POLISACARIDOS MICROBIANOS*

La producción de polisacáridos extracelulares por los microorganismos tiene varios propósitos:

- a) Protección contra condiciones ambientales adversas (en un medio de poca humedad la secreción constituye un medio de aislamiento del medio exterior)
- b) Adhesión a superficies sólidas (altera la concentración de iones en la superficie la que le permite adherirse)
- c) Protección contra otros seres vivos (La capa externa no permite el ataque )
- d) Nutrición por medio de absorción principalmente en los grupos de ácido carboxílico y ácidos urónicos

### *10.5 PRINCIPALES POLISACÁRIDOS MICROBIANOS*

Polímeros producidos por hongos

#### 10.5.1 Scleroglucan

Este es un polisacáridos producido por un hongo del género *Sclerotium*, su estructura es básicamente lineal (1-3) con enlaces de D-glucano y tiene ramificaciones de grupos D-glucopirasonil(1-6) en cada tercer residuo de la cadena principal

El grado de polimerización es de aproximadamente de 110-1600, con valores de 800 para el valor comercial. El polisacárido de distintas especies varía en peso molecular, dependiendo

también en el número y tamaño de sus cadenas.

Se han sugerido algunos usos para el seroglucan. como utilizar su viscosidad en dispersión por su estabilidad a elevar temperaturas (10-90°C), dentro de un amplio rango de pH (1-10) y en presencia de electrolitos. La propiedad más importante es su acción sinergista junto con la bentonita para incrementar la viscosidad. Las dispersiones tienen un comportamiento pseudoplástico, y puede utilizarse como agentes suspensores, gelificantes o como agente cubriente. Y ha sido usado para diversas aplicaciones como tintas, cerámica, usos farmacéuticos y cosméticos.

Este polisacárido ha sido desarrollado por la compañía Pillsbury y comercializado bajo el nombre de Polytran y es producido a nivel comercial.

#### 10.5.2 Zanflo

Zanflo es la marca comercial para un heteropolisacárido producido por una línea extensa de bacterias mutantes originarias del suelo, estas bacterias crecen a 30°C solo en presencia de hierro.

Esta goma es producida por una fermentación aeróbica y presenta una alta viscosidad, una de las propiedades más importantes es su compatibilidad con tintes catiónicos, sus mayores aplicaciones se encuentran en la industria de la pintura.

#### 10.5.3 Pullulan

Es un polímero extracelular producido por *Aerobasidium pullulans* es un D-glucano en el cual unidades de maltotriosa con enlaces (1-4), en pares son seguidas de cadenas de (1-6). Es resistente a la hidrólisis por amilasas, este polímero es capaz de producir fibras y películas resistentes, las películas se preparan con dispersiones de 5% al 10% de concentración de pullulan, aplicándola a una misma superficie plana y secando cada vez y así sucesivamente y obtener el grosor deseado, estas pueden ser moldeadas para dar diversas formas.

Estas películas tienen baja permeabilidad al oxígeno (0.6-2.5)mL/m<sup>2</sup>, en 24 hr a 1 atm y



## 10 GOMAS MICROBIANAS

---

25°C, comparándolo con otros materiales comerciales como el celofán (4-7 mL en 24 hr, a 1 atm y 25°C).

Tienen un comportamiento pseudoplástico muy estable a elevadas temperaturas y dentro de un gran rango de pH. A temperaturas menores a 10°C aún en dispersiones diluidas puede ser fácilmente destruido con agitación, para formar geles irreversibles se utiliza borato en solución alcalina.

Se ha propuesto su uso en la elaboración de empaques para alimentos puesto que pueden obtenerse películas incoloras, inodoras e insaboras, además de ser biodegradable.

Para 1974 se encontraba en desarrollo comercial en una planta piloto de la compañía Hayashabara de Japón.

### Polímeros producidos por levaduras

#### 10.5.4 Fosfomanan

Las levaduras *Hansenula hostili* produce un polisacárido con D-manosa, fósforo y calcio en una proporción de 5:1:1 y tiene el nombre de fosfomana, con un peso molecular de 157,000.

El polisacárido se disuelve fácilmente en agua dando una dispersión transparente, que tiene la textura de un gel suave, aún a concentraciones del 0.25%, estas dispersiones son muy resistentes al ataque microbiano. La viscosidad máxima se tiene a concentraciones del 1.5% y disminuye hasta alcanzar una concentración del 3%, sin embargo es sensible a la agitación mecánica vigorosa y al calor y a los medios ácidos y es por estas razones que no se ha podido aplicar comercialmente,

#### 10.5.5 Polisacárido Y-1401

Este polisacárido es producido por *Cryptococcus laurentii var. flavescens*, es un heteropolisacárido compuesto por D-manosa, D-xilosa, y ácido glucurónico en una proporción de 4:1:1, tienen una pequeña proporción de grupos O-acetilo.

Cuando las dispersiones son calentadas a 80°C y luego enfriadas a 25°C pueden formarse películas transparentes que tienen valores de elongación y tensión bastante buenos.

La dispersión de los polisacáridos tienen una marcada tixotropía, las dispersiones de 1.5 a 2.0 % forman geles, de dureza perceptibles y no se adhieren al vidrio pero no son producidas comercialmente.

#### Polímeros producidos por bacterias

##### 10.5.6 Curdian

El curdian es un polisacárido microbiano que tiene la capacidad de formar geles, es un polímero lineal que forma enlaces de D-glucano(1-3). El microorganismo que lo produce es el *Alcaligenes faecalis* var. *myxógenes*, *Aerobacterium rhizogene*, *Agrobacterium* sp.

Es insoluble en agua fría, y forma geles rígidos cuando se calienta sobre los 45°C, la firmeza del gel es constante de 60 a 80°C pero se incrementa de 80 a 100 °C cuando previamente es calentado a 120°C.

Sus posibles aplicaciones se encuentran en la preparación de películas, geles, fibras o en el mejoramiento de la viscoelasticidad, como agente espesante y estabilizante.

##### 10.5.7 Polisacárido de *Arthobacter*

Este polisacárido es producido por las especies de *Arthobacter*, está compuesto de D-glucosa y D-galactosa y ácido D-manurónico, en proporciones 1:1:1, también contiene 25% de grupos O-acetilo

El polímero puede darse en tres formas distintas a) nativo, b) tratado con calentamiento, c) polímero diacetilado en concentraciones de .1 al 10%, tienen mayor viscosidad los polímeros tratados que los nativos, estos pueden ser por que con el tratamiento se incrementa sus características de hidratación.

La viscosidad del polímero aumenta en presencia de sal, se mantiene constante en un rango

## 10 GOMAS MICROBIANAS

de pH de 4 a 11, y presenta una degradación muy rápida a pH mayores de 11, donde disminuyendo la viscosidad.

El polímero nativo no es afectado por el calentamiento, o por el enfriamiento, no así el polímero deacetilado que disminuye su viscosidad al calentarse pero la recupera en el enfriamiento, presenta un comportamiento pseudoplástico.

### 10.5.8 Alginato Bacteriano

Este es un copolímero de ácido D-manurónico y L-glucurónico, la única diferencia con el alginato producido por algas es la presencia de grupos O-acetilos. Las especies microbianas que lo producen son: *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas aeruginosa*. El mayor problema que presenta su producción es la pérdida del 90% de la fuente de carbono en forma de CO<sub>2</sub> debido al proceso de respiración, este problema se puede solucionar controlando la cantidad de fosfatos en el medio y regulando el pH del medio.

Por sus propiedades similares tiene la misma utilidad en la industria de los alimentos, aunque presentan mayor estabilidad los alginatos de baja viscosidad, como estabilizadores, formadores de geles, estabilizadores de espumas y como agentes espesante.

### 10.5.9 Levan

El levan es un polifructano con enlaces (1-6), producido por: *Bacillus polymyxa*, *Aerobacter levanicum*, *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas spp.*, *Corynebacterium aevaniformans*.

El levan es un polisacárido de peso molecular entre 1a 100\*10<sup>6</sup>, pese a su alto peso molecular, la viscosidad de las soluciones de levan es considerablemente más baja que los polisacáridos lineales como los alginatos, pero puede ser usada comercialmente en gomas solubles en agua.

### 10.5.10 Polisacárido de *Beijerinchia indica*

La bacteria *Beijerinchia indica* produce un polisacárido formado por glucosa, ramnosa y

ácido glucoronico en proporción de 6.6:1.5:1 llamado polisacáridos PS-7, y la característica principal de este polisacáridos es su alta viscosidad y alto grado pseudoplastico, tiene una excelente solubilidad en agua de alta concentración de sales (25%) , presenta una buena estabilidad al pH (3-12) y temperatura.

La propiedad más importante que presenta es la habilidad de ser estabilizador con mejores estabilidad que otras gomas comerciales

#### 10.5.11 Polisacárido de *Erwinia tahitica*

Esta bacteria produce un polisacáridos de elevada viscosidad y esta formado por el 13% de fructosa, 29% de galactosa, 39% de glucosa y 19% de ácido uronico, 4.5% de grupos O-acetilo.

Las soluciones de polímero son pseudoplasticas, la máxima viscosidad se observa a temperaturas menores de 60°C y dentro de un pH de 4-10, para valores de pH menores existe un decremento en su viscosidad aparente.

Polisacáridos producidos por *Pseudomonas*

#### 10.5.12 Dextrano

Es un polímero lineal de glucosa, sintetizado por una enzima extracelular de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, históricamente fue el primer polisacáridos producido industrialmente por vía microbiana, esta formado por poliglucanos de elevado peso molecular que contiene del 90 al 95% de enlaces (1-6) de residuos de glucosa, los demás enlaces so (1-4) y (1-3), su peso molecular es de  $1.5 \cdot 10^4$  a  $2 \cdot 10^7$  daltones. Es estable a sales, ácidos y bases y resistente a la degradación a altas temperaturas.

Entre las aplicaciones al dextrano encontramos:

Plasma de sangre, usados en casos de emergencia se usa para restablecer el volumen de la sangre en pacientes que sufren de shock por perdida de sangre. Complejo hierro-dextrano. Para formar complejos de hierro usado para el tratamiento de anemias, principalmente en animales.

## 10 GOMAS MICROBIANAS

También se usa en la industria de alimentos, emulsiones fotográficas, medicinas encapsuladas, metalurgia. Como base para la elaboración de mallas moleculares de uso común en cromatografía en gel y purificación de productos biológicos

### 10.5.13 Xantana

Se le ha considerado a este polisacárido como el de mayor importancia comercial, es producido por la bacteria *Xantomonas campestri* y es un polímero ramificado con unidades monoméricas de glucosa, manosa y ácido glucurónico en una proporción de 3:3:2.

Su estructura ramificada le confiere características reológicas de estabilidad muy superiores a las de las dextrinas y otras gomas, lo que ha sido tan importante en su impacto en el mercado.

Las propiedades más importantes de la xantana son su alta capacidad como elevador de la viscosidad, pronunciada pseudoplasticidad, elevada estabilidad de la viscosidad aparente dentro de ciertos rangos de temperatura, pH y concentración de sales, sinergia en cuanto a viscosidad y fuerza del gel al combinarse con otras gomas naturales.

La característica más importante de la Xantana es la capacidad de para interactuar con galactomanas (guar, algarrobo) y formar soluciones sinérgicas para aumentar su viscosidad y fuerza del gel.

Las propiedades reológicas de la goma xantana son las más importantes, al disolverla en agua caliente o fría se pueden obtener soluciones de alta viscosidad a bajas concentraciones, entre .5 a 2.5%, La viscosidad de las soluciones es independiente del pH en un rango de 1.5 -

13

Las enzimas como proteasas, celulasas, hemicelulasas, pectinasas y amilasa no degradan la xantana en solución

Las aplicaciones industriales de la Xantana son numerosas entre ellas encontramos:

- ⊗ en la industria textil para evitar que se corran los colorantes
- ⊗ en cerámica para suspender los componentes de los barnices

- 9 como aditivo en agentes limpiadores para incrementar el tiempo de contacto
- 9 como base para explosivos en forma de lodos
- 9 como aditivo en adhesivos
- 9 agente suspendedor en alimentos líquidos
- 9 como agente suspendedor de medicamentos
- 9 como texturizador de cosméticos

En el área de alimentos ha tenido gran éxito por sus propiedades de solubilidad, capacidad de suspensión, estabilidad térmica y a soluciones ácidas y por ser espesador y texturizante

I. Rellenos de pastelillos.- Las típicas mermeladas usadas para rellenar pastelillos o donas contienen grandes concentraciones de azúcar, a bajos niveles de almidón y pequeñas cantidades de colorantes y saborizantes, la adición de .2% de goma Xantana a la formulación provee un relleno con bajos niveles de sinergismo y que evita la absorción por el pastelillo, además de que hace que sea más fácilmente bombeada puesto que la viscosidad es baja a altos niveles de cisallamiento.

II. Salsas.- La salsa para Spaguetti contiene altos niveles de sólidos de jitomate y queso, junto con pequeñas cantidades de especias y sabores, la adición de goma Xantana a la formulación provee a la salsa una excelente estabilidad térmica por largos periodos de tiempo y mantiene constante la viscosidad en altos rangos de temperatura. La alta viscosidad permite que la salsa se adhiera al spaguetti durante su consumo. La salsa presenta un excelente sabor en la boca debido a la baja viscosidad en las condiciones que se presentan en la boca.

III. Aderezos.- Los aderezos son emulsiones de agua-aceite que contienen vinagre, azúcar, yema de huevo y saborizantes, la adición de .25% de goma Xantana provee una excelente estabilidad a la emulsión por periodos de hasta 1 año, los aderezos pueden ser fácilmente bombeados durante la operación de llenado y fácilmente pueden fluir de la botella durante su uso, estas propiedades son el resultado de las propiedades reológicas de la goma Xantana, específicamente del alto grado de pseudoplasticidad

## 10 GOMAS MICROBIANAS

IV. Productos lácteos.- La goma xantana en combinación con otras gomas estabilizan los quesos cremosos, emulsifican la grasa y proveyendo adherencia, la goma xantana es efectiva como emulsificante en helados en los cuales provee un excelente control de mezclado dando una consistencia suave, con cuerpo y una mayor tolerancia al choque térmico del ambiente y en licuados donde estabilizan los sólidos.

V. Otras aplicaciones.- La goma Xantana puede ser usado en alimentos enlatados, mezclas secas, alimentos congelados, bebidas de jugos, jarabes y aderezos, estos son solo algunos ejemplos de las alimentos que pueden ser beneficiados con la goma Xantana.

VI. En cuanto a las aplicaciones en agricultura incluyen el uso en alimentos para animales, químicos para la agricultura en farmacia y en cosméticos emulsiones, así como en pastas de dientes por la adherencia a los dientes durante el cepillado y en medicinas, en el área petrolera se aprovechan sus propiedades reológicas que lubrican las barreras durante la perforación, su resistencia a la degradación mecánica con un daño mínimo.

En el siguiente cuadro podemos encontrar resumidas las aplicaciones de la goma Xantana en alimentos

### Cuadro 9.2 Aplicaciones de la goma Xantana

Propiedad	Alimentos en los que se usa
Emulsificante	Aderezos, helados, licuados,
Estabilizante	Quesos, productos lácteos, salsas, jaleas, espuma de cerveza
Viscosidad	Quesos, Salsa catsup, jaleas
Adherente	Salsas, pasta de dientes, jaleas, glaseador en panadería
Texturizador	Salsas, Helados, Jarabes
Agente ligante	Embutidos
Previene la cristalización	Helados y jarabes
Agente de revestimiento	Confitería

Espesante                      Mermeladas, pays, salsas, helados

En el siguiente cuadro podemos encontrar los polisacáridos microbianos más utilizados en la industria alimentaria.

Cuadro 1.2 Biopolímeros en la industria alimentaria

Biopolímero	Organismo	Composición	Peso	Usos
Celulosa	<i>Acetobacter</i>	D-glucosa	2*10 <sup>6</sup>	Fermentación Sistemas genéticos
	<i>Agrobacterium</i>	B(1-4)		
	<i>Alcaligenes</i>			
Dextranos	<i>Lactobacillus</i>	D-glucosa	2*10 <sup>4</sup>	Sistemas genéticos
	<i>Leuconostoc</i>	(1-6)	2*10 <sup>8</sup>	Biosíntesis
	<i>Streptococcus</i>			
Alginatos	<i>Azetobacter</i>	D-manurato	1.5*10 <sup>5</sup>	Fermentación
	<i>Pseudomonas</i>			
Curdlan	<i>Alcaligenes</i>	D-glucosa		Recuperación de productos.
Pullulan	<i>Aureobasidium</i>		2.5*10 <sup>5</sup>	Fermentación Propiedades funcionales
		D-glucosa		
Xantana	<i>Xantomonas</i>	D-glucosa	2*10 <sup>6</sup>	Propiedades funcionales
		D-manosa	1.5*10 <sup>7</sup>	
		D-glucoronato		
Citosina	<i>Mucorale</i>	D-glucosamina		Fermentación.

## 10.6 PRODUCCIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE POLISACÁRIDOS

### 10.6.1 Microorganismo productor

Se debe tener un microorganismo que produzca un polisacáridos, este se puede aislarlo de alguna fuente como son el suelo, el agua de mar, las plantas con plagas, y en general hábitats ricos en carbohidratos, en los que por lo general se encuentran cultivos mixtos.

Para aislar el polisacáridos se pueden seguir los siguientes pasos:



## 10 GOMAS MICROBIANAS

- I. Se preparan diluciones 1:10 con agua y material estéril
- II. Una vez que se hayan efectuado las diluciones, se coloca .1 mL de cada dilución en la superficie de cada uno de las placas con el medio de cultivo adecuado, en condiciones de esterilidad, se homogeneiza el inoculo en la placa con una varilla de vidrio en ángulo de 90° estéril.
- III. Se incuban a 28°C el tiempo necesario para que las colonias de microorganismos se desarrollen lo suficiente y puedan apreciarse sus características (2 a 5 días). Se efectúan observaciones diarias, para seguir el avance del crecimiento de las colonias de microorganismos. Los cultivos que se obtienen son cultivos mixtos, ya que en el medio ambiente no existe cultivos puros.
- IV. Se efectúan resiembras sucesivas, hasta obtener un cultivo puro, por medio de su morfología colonial y microscopia.
- V. Una vez obtenidos los cultivos puros, se les realiza una tinción de Gram y una tinción de cápsula.
- VI. La segunda selección se efectúa en función de la relación del tamaño de la cápsula, al cuerpo del microorganismo, se escogen aquellos que tengan la cápsula más grande en relación al cuerpo del microorganismo, puesto que la cápsula es en si un polisacáridos generado por la bacteria, posteriormente se prueba su crecimiento en un medio líquido.
- VII. La tercera selección se hace tomando en consideración varios factores, se eligen los microorganismos que incrementen más la viscosidad del medio líquido, en el menor tiempo y que este resultado sea repetitivo.
- VIII. Una vez seleccionado el microorganismo se conserva en viales, suspendiendo el cultivo fresco de un tubo en una solución.

### 10.6.2 Características del medio de cultivo

Se desarrolla un medio favorable para el desarrollo del microorganismo y experimentar con diversos nutrientes en los que el microorganismo pueda producir más y mejor.

En el siguiente cuadro se muestra el efecto del nutriente limitante en el crecimiento de varios polisacáridos

Cuadro 9.4 Efecto del nutriente limitante

Microorganismo	Polímero	Nutriente limitante	Producción(células/hora)
<i>X. campestris</i>	Xantana	glucosa	0.12
		NH <sub>4</sub>	0.22
		PO <sub>4</sub>	0.09
<i>A. vielandii</i>	Alginato	sacarosa	0.25
		N <sub>2</sub>	0.22
		PO <sub>4</sub>	0.28
<i>R. trifolii</i>	no identificado	manitol	.0017
		SO <sub>4</sub>	.0049
<i>P. aureginosa</i>	Alginato	glucosa	0.19
		NH <sub>4</sub>	0.34

Glicksman, 1969

Puesto que la fermentación termina cuando el primer nutriente se termina, el sustrato limitante es un factor que se debe cuidar para llegar hasta el final de la fermentación y obtener el producto deseado.

#### 10.6.3 Condiciones de incubación

La temperatura que se utiliza esta generalmente entre 20°C y 30°C (mesofilicos), la mayoría son aeróbicas estrictas, asemejando lo más posible su medio natural de crecimiento, con un pH cercano a la neutralidad.

#### 10.6.4 Técnicas de producción

Existen cuatro técnicas de producción,

- a) Crecimiento en medio sólido
- b) Crecimiento en medio líquido, cultivo batch
- c) Cultivo continuo
- d) Síntesis en ausencia de células (producción enzimática).

## 10 GOMAS MICROBIANAS

### 10.6.5 Selección de la cepa adecuada

Los microorganismos aislados deben seleccionarse en base a la producción del polisacáridos en medio líquido que genere en grandes cantidades y que además tenga características viscosas interesantes.

Utilizando como base el medio de cultivo original, pueden vararse algunos de los parámetros importantes para el crecimiento de las bacterias, tales pueden ser: el valor del pH, la concentración de la fuente de nitrógeno, la concentración de minerales en el medio y la aireación del medio.

### 10.6.6 Conservación de cepas seleccionadas

Cuando ya se seleccionó un microorganismo que produce un polisacáridos en medio líquido, es importante conservarlo mediante la utilización de viales o liofilización. Cuando se utilizan los viales, estos se deben mantener en congelación a temperaturas bajas de  $-30^{\circ}\text{C}$  a  $-40^{\circ}\text{C}$ , el tiempo de viabilidad de un microorganismo conservado por este método es de uno a dos años y a veces más.

Cuando se utiliza el método de liofilización, el microorganismo puede permanecer viable dentro de un periodo de tiempo de 10 a 15 años, sin mantener el liofilizado en congelación. Para la obtención del polisacáridos se hacen siembras sucesivas, de tubo, a matraz Erlenmeyer y luego a un matraz de fernbach de 3 L. Para extraer el polisacáridos de este medio de cultivo se centrifuga, cuando ya se ha llegado al final de la fermentación, se hace una recuperación en alcohol isopropílico, se seca y se muele. Para la producción del polisacáridos se deben tener en cuenta ciertos parámetros para una buena producción:

A partir del liofilizado, desarrollar un cultivo para observar sus características de crecimiento, y establecer los criterios de aceptación y de calidad, después de lo cual se somete a pruebas de laboratorio (1 a 10 L), usando el medio de cultivo que se usará en la producción, estableciendo en lo posible las condiciones que no permitan una degeneración celular después

de lo cual se pasa a la fermentación.

## 10.7 PRODUCCIÓN

### 10.7.1 Características reológicas

Generalmente se lleva a cabo en cultivos por lotes, en tanques equipados con suministros de aire estéril, agitación mecánica, control de temperatura y control de pH. Su característica principal es el cambio en el comportamiento reológico del caldo de cultivo que en un principio es newtoniano llegando al final a ser pseudoplástico, cambio sumamente importante puesto que afecta parámetros críticos de la fermentación, transferencia de masa y calor, características del mezclado, requerimiento de potencia de agitación.

### 10.7.2 Mezclado

Este es un parámetro crítico en las fermentaciones en vista de que influye en los procesos de transferencia de masa y calor. Por otra parte, repercute sobre los procesos en los que es deseable controlar parámetros fisicoquímicos, como el pH, que influyen en la fisiología de los microorganismos y determina la biosíntesis del polisacárido.

### 10.7.3 Transferencia de calor

La transferencia de oxígeno en un fermentador está determinada por la capacidad del sistema para generar burbujas pequeñas (para incrementar el área de contacto interfacial) y distribuir las adecuadamente. Las características reológicas que influyen sobre este proceso, afectan la formación, tamaño y forma de las burbujas, y caracterizan en buena medida el coeficiente de transferencia de masa.

Los impulsores seleccionados tienen un efecto pronunciado sobre la velocidad de transferencia de oxígeno y mezclado.

10.7.4 Recuperación del polisacáridos

Después de terminado el proceso de fermentación, el proceso de la recuperación es muy importante y estas operaciones deciden la viabilidad económica de un proceso, debido son productos extracelulares o pegados a la pared celular que se pueden recuperar fácilmente. En la figura 10.1 se puede ver el proceso de producción de polimeros microbianos

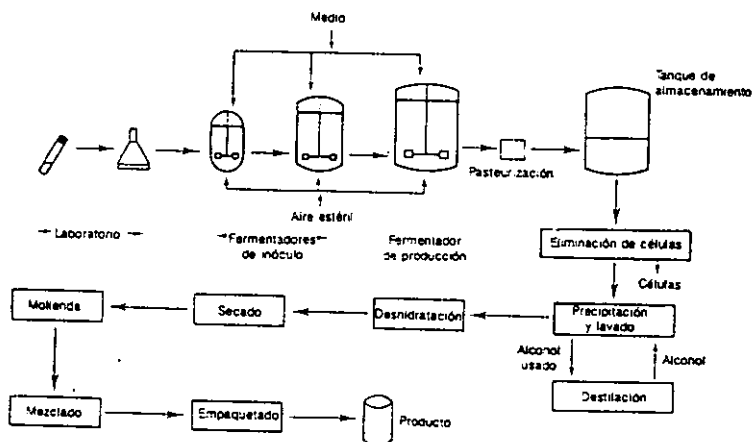


Figura 10.1 Proceso de producción de gomas microbianas fuente Bo`lock 1987

10.8 TRATAMIENTOS PREFERMENTATIVOS

Los tratamientos postfermentativos incluyen uno o más de los siguientes objetivos:

- (a) Concentrar o extraer el caldo de fermentación a una forma generalmente sólida que sea microbiológicamente estable y fácil de manejar, transportar o almacenar.
- (b) Purificar para reducir el nivel de no-polimeros y mejorar las características funcionales:

---

color, olor o sabor del producto.

(c) Desactivar enzimas no deseables

(d) Modificar o alterar químicamente el polímero con el fin de afectar sus propiedades funcionales, de manejo de sólidos o sus características de solución o dispersión.

De manera muy general un esquema típico de separación comprende tratamientos posfermentativos previos a la recuperación, aislamiento del polímero en forma concentrada, eliminación de agua, secado y molido. La precipitación con solventes es la forma generalmente usada a nivel industrial para obtener polímero concentrado.

---

## 11 ADITIVOS ALIMENTARIOS

### 11.1 INTRODUCCIÓN

**E**l hombre siempre ha añadido a los alimentos sustancias, que mejoren su presentación. En un principio fue para prolongar su conservación, los primeros aditivos fueron la sal, azúcares, el vinagre o salitre, esta fue de las primeras ramas en las que se empezaron a desarrollar los aditivos alimentarios, con sustancias que fueran capaces de conservar el alimento seguro por más tiempo, pero en la actualidad el uso de aditivos cubre una amplia variedad de usos, desde la adición de compuestos para devolver las cualidades naturales que los alimentos han perdido debido a los procesos térmicos, los potenciados del sabor, los edulcorantes, colorantes, aromatizantes, hasta los aditivos que confieren propiedades de textura o que la modifican o como sustitutos para reducir calorías principalmente, todo esto sin olvidar que la apariencia de un alimento es uno de los factores importantes para su consumo.

A principios del siglo pasado se empezó la fabricación industrial mediante síntesis química de colorantes, aromatizantes y reforzadores del gusto, pero solamente hasta mediados de este siglo apareció el concepto de aditivo, debido principalmente a las disposiciones restrictivas respecto a su inocuidad, lo que ha repercutido en el consumidor que se hace cada vez más reservado hacia los aditivos principalmente a los aditivos químicos o artificiales, haciendo que el enfoque principal se haga sobre los aditivos de origen natural, los extraídos de animales o vegetales o sintetizados por los microorganismos, como por ejemplo el ácido cítrico (del cual se trató en un capítulo anterior), otros como los extraídos de las plantas.

### 11.2 CONSERVADORES

Debido a que en la actualidad la mayoría de los alimentos no se consumen frescos es necesario procesarlos o de alguna forma asegurar su calidad higiénica y nutritiva para el consumo posterior, uno de estos medios es la incorporación de conservantes, estos trabajan básicamente en impedir la oxidación y la formación de radicales libres de oxígeno y los

---

peróxidos peligrosos para el organismo o bien para inhibir el desarrollo de microorganismos perjudiciales.

Los antioxidantes pueden ser sustancias químicas de síntesis como el BHT o el BHA (los que tienen efectos tóxicos) o productos naturales como los tocoferoles (parecidos a la vitamina E), sales alcalinas o el palmitato de ascorbilo.

El ácido ascórbico y sus sales añadidos a la carne no actúan en ella como vitamina, sino que ejercen un papel tecnológico específico, en la carne fresca impiden la oxidación de la mioglobina de los músculos. En las salazones, además de su papel de conservante, tiene dos efectos específicos, en presencia de nitritos, añadidos como conservantes y modificadores de gusto, inhiben la formación de nitrosamina y estabilizan el nitrosomioglobina, pigmento rosa que da su color característico a las carnes frías,

El segundo tipo de conservadores tienen como misión reducir la cantidad de agua disponible para el desarrollo de microorganismos perjudiciales en el alimento, por debajo de un umbral crítico esta disponibilidad se traduce por la noción de actividad del agua  $A_w$ , o presión relativa del vapor de agua en equilibrio, antiguamente se utilizaban salmueras, salitre o azúcar para reducir la cantidad de agua disponible para los microorganismos, actualmente se utilizan ácidos orgánicos obtenidos por vía microbiana, como el ácido láctico y cítrico, otro aditivo eficaz para reducir la actividad de agua es el un polialcohol, el glicerol, este es sintetizado por *Saccharomyces cerevisiae* a partir de glucosa con un rendimiento de 25 g/L.

### 11.3 EDULCORANTES

Estas sustancias tienen un poder endulzante de centenares de veces mayor que la azúcar y son utilizadas en una dosis de la décima de gramo, están clasificados como aditivos ya que no aportan casi ninguna caloría, de estos edulcorante, conocidos desde hace más de un siglo, la sacarina que es quinientas veces más endulzante que la sacarosa, fue descubierta en 1879 y la dulcina 200 veces más dulce, fue descubierta en 1883, el edulcorante más usado en la actualidad el aspartame se obtiene por fermentación de células, fue desarrollado basándose en



## 11. ADITIVOS

---

edulcorantes sintetizados por plantas tropicales, a los cuales se les hizo pruebas de recombinación genética, este edulcorante esta formado por dos aminoácidos el ácido L-aspartico y el metil ester de la L-fenilalanina, este dipeptido aproximadamente 200 veces más endulzante que una solución de sacarosa al 4 3% normalmente es metabolizado por el intestino y los dos aminoácidos separados son absorbidos por la mucosa intestinal, no es tóxico, desprovisto de efectos nocivos, excepto para las personas afectadas por la fenilcetonuria, para finales de siglo representará un mercado de cerca de ocho toneladas por año, el inconveniente más grande que tiene es su precio aprox. 200 dólares por kilogramo debido al elevado costo de la producción de la L-fenilalanina en estado puro.

### 11.3.1 Aspartame

La L-fenilalanina se puede producir apartir de L-fenilpiruvato utilizando ácido aspartico como donador del grupo (-NH<sub>2</sub>), el microorganismo empleado es una cepa de *E. coli* (B11303), de elevada actividad transaminasa e inmovilizada en poliazetidina, con una producción de 30 g/L.

El interés de los investigadores por el aspartame no se limita a los nuevos sistemas de síntesis de cada uno de sus dos componentes, también se extiende a las nuevas técnicas de síntesis enzimática del mismo dipeptido, por medio de síntesis enzimática utilizando como catalizador una protejas bacteriana termoestable, esta enzima la termolisina se inmoviliza en una resina rígida dentro de un bioreactor de agitación continua. Una mezcla de L-fenilalanina metil-ester y de ácido N-(benzoxilcarbonil)-L-aspartico en un disolvente orgánico se condensa a 40°C para dar lugar al precursor del aspartame, seguidamente este es transformado en aspartame.

### 11.3.2 Esteviósido

Actualmente están siendo investigados otros edulcorantes no calóricos de elevado poder endulzante. Uno de ello es el esteviósido, extracto de hojas de una planta sudamericana.

*Stevia rebaudiana*. El poder edulcorante del esteviósido es igual a cien veces el de la solución de azúcar al 10% con persistencia del gusto azucarado y es estable al calor, esta formado por una molécula compleja que asocia tres moléculas de glucosa con una de esteviol, de fórmula química cercana a los esteroides.

### 11.3.3 Taumatina

Otro edulcorante es una proteína llamada la taumatina, presente en algunos frutos de la planta originaria del Africa ecuatorial *Thamatococcus danielli*, una de las sustancias más potentes aprox. 2000 veces el poder edulcorante de una solución de sacarosa al 10%, pero pierde parte de este a un pH inferior a 2.5, la planta puede ser cultivada solamente en su clima de origen, lo que ha conducido a sintetizar este edulcorante por medio de la ingeniería genética, identificando el gen e insertándolo en un plasmido de *Saccharomyces cerevisiae*.

## 11.4 REFORZADORES DEL SABOR

### 11.4.1 Taumatina

La taumatina también puede ser utilizado no solamente como edulcorante no calórico sino también por una propiedad totalmente distinta, la de reforzar el gusto, que es una de las categorías menos conocidas, como reforzadores del gusto las dosis que se utilizan van del .1% al 2% del producto final.

### 11.4.2 Monoglutamato de sodio

Uno de los productos que más se ha utilizado en este aspecto es el monoglutamato de sodio, que aumenta la palabilidad, aumentando la intensidad de la percepción olfagostativa, producido a principios de siglo por medio de la hidrólisis química del trigo, actualmente se produce mediante fermentación bacteriana, se cultivan células de *Corynebacterium glutamicum*, el ácido glutámico se acumula en las células casi hasta la saturación y después mediante la adición de penicilina se aumenta la permeabilidad de las membranas celulares y se

## 11. ADITIVOS

---

excreta al medio donde después se extrae y se purifica.

### 11.4.3 Ácido orgánicos

Otros reforzadores del gusto son el ácido inosínico y el ácido guanilico estas sustancias se producen mediante ingeniería enzimática, se trata de unos nucleosidos que son el resultado de la degradación enzimática del ácido ribonucleico en cultivos de *Penicillium*.

### 11.4.4 Glucon-delta-lactona

Un tercer tipo de reforzador del sabor de fórmula química distinta es la glucon-delta-lactona, se obtiene a partir de glucosa mediante cultivos de *Aspergillus niger*, también sirve como ajustador del pH o en la maduración de las salazones.

Los reforzadores del gusto forman parte del conjunto de sustancias destinadas a reforzar la apetencia del consumidor para los alimentos que le proponen los industriales alimentarios.

## 11.5 COLORANTES

Los colorantes son entre los aditivos alimentarios, los que desde los años setenta han suscitado, por parte de los consumidores una mayor oposición, sin duda ello es debido a que muchos de ellos son productos de síntesis química, la imagen misma de los aditivos artificiales. De hecho se ha prohibido varios colorantes sintéticos, derivados del carbón, debido a su toxicidad, la lista autorizada por la CCE, se compone de 24 colorantes 12 de los cuales son de origen natural.

La *Epicoccum nigrum* es capaz de producir un favonoide que es un colorante amarillo hidrosoluble a razón de 1 g/l en condiciones óptimas, algunas algas unicelulares como *Dunaliella salina* sintetizan de forma natural, hasta un 8% en peso seco de un colorante anaranjado, mejorando estas cepas por mutación pueden llegar a producir hasta un 20 % en peso seco.

En lo que se refiere a los colorantes sintetizados por células vegetales, la extracción

apartir de plantas es la técnica más antigua, como es el caso de los antocianos de las frutas rojas, la betanina de la remolacha o de la curcumina del azafrán, pero para algunos colorantes naturales se presenta el siguiente problema: el tiempo que tarda en crecer la planta para llegar a adulta y sintetizar el colorante deseado, este es el caso del rocú, colorante rojo extraído del achiote. También sucede lo mismo para otro colorante rojo, la chiconina, extraída de las raíces de una planta cultivada desde hace tiempo en el Japón. *Lithospermum erythrorhizon*. Las células de las raíces solamente empiezan a producir chiconina al cabo de cinco o siete años y la concentración no sobre pasa nunca 1 o 2 g por Kg de raíces. A principios de los años ochenta, los investigadores de Mitsui Petrochemical Industries se dedicaron a cultivar células de las raíces de *Lithospermum*. Las células que producían las cantidades más importantes de colorante (10 a 15 % del peso seco) se seleccionaron y posteriormente fueron cultivadas en biorreactor durante tres semanas. Cada bioreactor de 750 litros proporciona 5 Kg de chiconina; la producción debería alcanza 65 Kg por año.

### 11.6 AROMATIZANTES

En el caso de los aromatizantes, no solo es una molécula la que da un aroma específico, sin una gran combinación de compuestos cuyo número exacto es difícil de determinar, más de quinientos para el café torrefacto y más de doscientos para la manzana por ejemplo.

Los aromas en especial son muy sensibles a los tratamientos térmicos de conservación de los alimentos, a veces incluso los aromas se debilitan con el tiempo, una manera de acercarse a los aromas naturales es producirlos por síntesis estrictamente idénticas a las moléculas naturales o bien adoptar métodos de microesquejes, cultivo de células vegetales o fermentaciones microbianas, estos aromatizantes tienen la ventaja de tener una composición exacta independientemente de la estación y de la condiciones de producción y de poder ser producidas en cantidades moduladas según la demanda.

Se intenta también obtener, mediante cultivos de células producir directamente aromas complejos, Así por ejemplo, se han obtenido los aromas característicos del café o del cacao

## 11. ADITIVOS

---

mediante cultivos de *Coffea arabica* y de *Theobroma cacao* cultivados posteriormente tostados.

También se puede producir otros compuestos aditivos aromatizantes mediante microorganismos, el aroma a melocotón caracterizado por las lactonas está sintetizado por la levadura *Sporobolomyces odorus* en bioreactores de células inmovilizadas. Otra levadura *Hansenula saturnus* produce lactonas que dan un aroma de manzana y melocotón. El moho *Trichoderma reesei*, sintetiza una lactona de fuerte olor a nuez de coco la 6-pentil-alfa-pirona mientras que la síntesis química de estas molécula supone la sucesión de siete reacciones. En algunos casos un microorganismo es capaz de transformar mediante reacción enzimática una sustancia olorosa en otra. Algunas bacterias convierten al valenceno, presente en cantidades apreciables en la esencia de la naranja, en notkiatona, aroma del pomelo cuyo costo mediante extracción es muy elevado. La producción de L-mentol, responsable del aroma a menta, se podría realizar en dos fases: síntesis en la planta del precursor, la L-mentona y después la conversión de la totalidad de la L-mentona por una bacterias *Pseudomona putida*, mientras que en las plantas de menta solamente una pequeña proporción de este compuesto sufre la transformación en L-mentol.

### 11.7 GOMAS

Los aditivos que confieren a los alimentos su textura y que juegan un papel importante desde el punto de vista sensorial, cualidades que se puede proporcionar o mejorar en un alimento, como la untuosidad, suavidad o consistencia, esto se puede obtener gracias a la adición de gelificantes o espesantes como la gelatina, la goma de algarrobo los alginatos o una goma producida especialmente por microorganismos la goma Xantana, de la cual ya se ha tratado en un capítulo anterior, pero podría tener la competencia de otros dos nuevos biopolímeros el quitosán y la quitina, estos se encuentran en el caparazón de los crustáceos, hasta el presente el quitosán se obtienen de la quitina por vía química pero su transformación por vía enzimática ya es posible gracias a la obtención de quitinasa.

De todos los aditivos que se han visto existe una gran variedad en la naturaleza de compuesto que pueden ser aprovechados por la industria alimentaria y donde todavía hay un gran campo de trabajo, sobre todo por la tendencia hacia lo natural y ya que los microorganismos y cultivos vegetales que se pueden considerar naturales, representan un campo de las fermentaciones industriales con mucho futuro.

## 12 RECOMBINANTES GENETICOS

### 12.1 INTRODUCCIÓN

La rama de las fermentaciones industriales es una parte de la ciencia que aprovecha los conocimientos biológicos y químicos y los integra con el fin de desarrollar técnicas de producción industrial, para alcanzar estos objetivos se sirve de elementos tales como los microorganismos y células vegetales o animales o bien de sus elementos constituyentes (enzimas, ac. nucleicos).

A continuación se presenta una breve historia del desarrollo de la tecnología hasta llegar a los últimos avances en el desarrollo de recombinantes genéticos

Cuadro 12.1 Acontecimientos importantes de la recombinación genética

Año	Acontecimiento
1861	Pasteur demuestra que las fermentaciones se deben a la presencia de microorganismos, con lo que destruye la teoría de la generación espontánea.
1865	Mendel publica sus experimentos con guisantes, que posteriormente darán lugar a las leyes de la herencia.
1943	Beadley y Tatum deducen la relación de un gen o un enzima.
1944	Avery, McLeod y McCarty demuestran que la información genética se encuentra codificada en el ADN, sus experimentos demuestran también el fenómeno de transformación genética.
1946	Lederberg y Tatum describen la conjugación genética en bacterias
1952	Zinder y Lederberg describen el fenómeno de Trasducción genética
1953	Watson y Crick, postulan que el ADN es estructuralmente una doble hélice.
1959	Descubrimiento de una enzima que sintetiza ARN a partir de ADN
1960	Demostración de que el ARN contiene la información que determina el orden de aminoácidos en la proteínas.
1967	Aislamiento del enzima ADN ligasa, que es capaz de unir fragmentos de ADN.
1970	Aislamiento del primer enzima de restricción que corta ADN en lugares específicos dependiendo de una determinada secuencia de bases. Se obtiene por primera vez un gen por síntesis química.
1972	El primer experimento de clonaje de ADN recombinante que indica el nacimiento de la Ingeniería Genética como tal.
1977	Clonaje de un gen humano en una bacteria
1980	Primera patente utilizando la ingeniería genética
1982	Se aprueba el uso de la insulina obtenida por técnicas de Ingeniería genética.
1997	Se obtiene el primer animal, un borrego, por clonación.

Este cuadro muestra que ha habido una revolución en el área del conocimiento y la comprensión de los microorganismos y los procesos por los cuales este se reproducen, este conocimiento puede ser usado en bien de las necesidades que se presentan en la actualidad.

Por esta razón los conocimientos integrados provienen fundamentalmente del campo de la bioquímica, la microbiología y la ingeniería genética, en el área de la ingeniería genética, las fermentaciones industriales buscan el desarrollo de técnicas dirigidas a reprogramar las células vivas para la obtención de productos.

### 12.2 DEFINICIONES

**ADN:** Es una molécula en la que se encuentra codificada la información genética, es la abreviatura de ácido desoxirribonucleico.

**Mutación:** Alteración heredable de la información genética almacenada en el ADN, estas alteraciones pueden ser espontáneas o causadas intencionalmente, se pueden utilizar en beneficio de la medicina, la industria química y la industria alimentaria

**Elementos genéticos transponibles:** Son segmentos del ADN capaces de trasladarse de un lugar a otro del cromosoma o entre el cromosoma, plásmidos y bacteriofagos presentes en la célula bacteriana.

**Plásmidos:** Fragmento de ADN que no está ligado al cromosoma y que puede ser utilizado como vehículo de introducción de un gen.

**Gen:** segmento de DNA que contiene la secuencia de nucleótidos capaz de codificar la síntesis de una proteína.

**Genoma:** El conjunto de los genes de un organismo.

### 12.3 EL CODIGO GENÉTICO

Las células de cualquier organismo vivo se encuentran regenerando constantemente, dentro de ellas se encuentra la información para regenerarse, esta información se guarda en el archivo de una molécula llamada ADN que contiene toda la información necesaria no sólo de la célula



## 12. RECOMBINACIÓN GENÉTICA

sino de todo el organismo, esta información puede ser usada de diferentes maneras, el desarrollo de la ciencia ha permitido que se usa esta molécula para la producción de medicinas químicas, etc.

La organización estructural de los seres vivos se comporta como un auténtico centro de producción, la dirección del mismo corresponde a las moléculas de ADN, almacenadas en el núcleo celular desde donde parte la información necesaria para el funcionamiento de la célula. A los ribosomas corresponde la producción de proteínas según los planes del núcleo celular.

Las proteínas asumen todas las funciones importantes de los seres vivos. Construyen estructuras, contribuyen a la defensa inmunitaria, transportan el oxígeno, dirigen nuestro mundo sensorial y funcionan como catalizadores para todos los procesos metabólicos. Todos los demás productos requeridos por la célula se sintetizan mediante biocatalizadores (enzimas), tales como coenzimas, hidratos de carbono, aminoácidos, grasas, hormonas, etc.

El ADN es un polímero formado por subunidades estructurales denominadas nucleótidos. Estas son moléculas químicas compuestas a su vez de un azúcar la 2-desoxiribosa, un grupo fosfato y una base nitrogenada, la Adenina (A), la guanina (G), la timina (T) o la citosina (C).

La Adenina y la guanina se denominan bases púricas y la timina y la citosina, bases pirimidínicas. La ordenación secuencial de las bases nucleotídicas en la molécula de DNA determina la información que especifica la composición de todas las proteínas de una célula.

Esta información codificada en forma de clave, de tres bases de DNA, para cada aminoácido que compone una proteína, se denomina codón. Así por ejemplo si una molécula de proteína contiene 100 aminoácidos, la secuencia codificante del DNA debe contener, como mínimo 300 nucleótidos.

El código genético es universal, porque en todas las especies un aminoácido es codificado siempre por un mismo codón. El codón GGT, del DNA codifica, por ejemplo, para el aminoácido prolina, no obstante un mismo aminoácido puede ser codificado por diferentes codones a lo que se le llama degeneración del código genético.

El análisis clínico y ultraestructural mediante la difracción por rayos X ofrece una visión de la molécula del DNA en forma de una doble hélice llamada generalmente dúplex. Dicha molécula está constituida por dos fibras o cadenas entrelazadas. El exterior de la misma está formado por los armazones de las dos cadenas entrelazadas.

Cada cadena, un largo polímero de nucleotidos posee un esqueleto alternante desoxiribosa/fosfato, unido por enlaces covalentes es, por tanto, una estructura de gran cohesión merced a que sus átomos comparten pares de electrones. Las cadenas poseen una polaridad o fuerza en el dúplex (sentidos opuestos) y dispone de un paso de rosca dextrógiro (giro opuesto al movimiento de las agujas del reloj).

Las bases nitrogenadas se encuentran unidas también, covalentemente a la desoxiribosa, sobresaliendo del armazón azúcar-fosfato y proyectándose hacia el interior de la hélice.

El descubrimiento del código genético como base química de la herencia así como las técnicas enzimáticas capaces de modificarlo han ampliado el espectro de la investigación básica en el área de la genética, la bioquímica y la biología molecular, ofreciendo en la actualidad la capacidad de reprogramar los códigos celulares de los microorganismos.

Existen actualmente microorganismos manipulados genéticamente capaces de sintetizar gran número de moléculas, fundamentalmente proteínas y antibióticos, procedentes en su origen de otras especies gracias a la universalidad del código genético.

### 12.3.1 Transcripción de código genético

Cuando se quiere transferir información del DNA a una proteína, se necesita la presencia de una molécula de ARN que actúa como decodificador y sea capaz de transformar un código de bases en un código de aminoácidos

Este fenómeno básico para la codificación de proteínas, se desarrolla en dos etapas:

*Transcripción:* mediante la cual una parte del DNA es copiada al RNA

*Traducción:* el objetivo de esta etapa es pasar del código de cuatro bases de ácidos nucleicos a un código de 20 aminoácidos constituyentes de las proteínas.

## 12. RECOMBINACIÓN GENÉTICA

---

Jugando un papel esencial en este fenómeno descrito, el ARN actúa reconociendo los dos códigos en juego, el de bases y el de aminoácidos. Existe al menos un tARN específico para cada aminoácido. Estas moléculas transportan un aminoácido que es complementario al codón del mRNA y que se denomina anticodón del tRNA. El apareamiento codón-anticodón es el proceso responsable de la incorporación del aminoácido a la cadena proteica en síntesis.

### 12.4 MODIFICACIONES GENÉTICAS

Al igual que si estuviéramos montando una película, mediante la unión de diferentes secuencias, así las técnicas de Ingeniería genética nos van a permitir la expresión de un gen de cualquier organismo, insertándolo en el genoma de otro diferente

Este mecanismo se produce en varios pasos sucesivos:

- Obtención del fragmento de DNA que contenga el gen de interés (DNAr)
- Inserción del DNA, en un vector de clonación adecuado
- Introducción del vector con el DNAr ya insertado en la célula receptora.
- Selección de aquellas células que han incorporado el vector y reconocen el producto del DNAr nuevo.

Técnicas como estas permiten la producción de sustancias de elevado interés en diversos campos industriales y a partir de ellas se pueden obtener productos con especial interés.

#### 12.4.1 Obtención del gen

El primer paso consiste en aislar y reconocer el gen de la célula que codifica tal proteína, con excepción de las células de reproducción sexual todas las demás células contienen la misma información aunque no la utilicen en su totalidad, se dice que un gen se expresa si se utiliza para dirigir la elaboración de una molécula de ARNm, que entonces se puede emplear para producir una proteína, y estos se activan o desactivan como una bombilla dependiendo de las necesidades de la célula en producir dicho compuesto, la expresión genética no es un proceso totalitario, ya que algunos genes trabajan al máximo rendimiento mientras que otros laboran intermitentemente mientras que otros no hacen nada, todo depende

de la proteína que necesita la célula en determinado momento

Para simplificar el proceso de identificación de un gen es mejor localizar la molécula de ARNm de la célula, cuando se rompe una célula se liberan gran número de sustancias, enzimas, proteínas de todos tipos, fragmentos de membrana celular y ácidos nucleicos, todos estos se pueden separar mediante métodos físicos, el más usual es la centrifugación, en donde los materiales globulares y pesados caen rápidamente, mientras que los más ligeros permanecen en la parte superior.

Con la ayuda de enzimas se logra que el ARNm presente pueda ser transcrito a ADN por medio de una enzima llamada transcriptasa inversa, o sea que transcribe la información del ARN a ADN en forma de un filamento sencillo y luego con la ayuda de una ADN polimerasa se termina de construir la doble hélice, este ADN se le conoce con el nombre de copia o complementario o ADNc ya que es solo un fragmento de las instrucciones totales, pero que sirve para la producción de una proteína en específico.

#### 12.4.2 Introducción del gen en el microorganismo

Todos los genes esenciales para la supervivencia de una bacteria se hallan en su único, grande y circular cromosoma, en el interior de la bacteria se encuentran también otros círculos mucho más pequeños de ADN conocidos con el nombre de plásmidos, que son estructuras enigmáticas de las cuales no se conocen bien todas sus funciones. Los plásmidos mantienen una singular relación con el resto de la célula y el aspecto más destacado desde el punto de vista de la ingeniería genética es que a menudo pasan de una célula a otra e incluso entre estirpes celulares de la misma especie.

Por consiguiente si se toma un plásmido bacteriano y se pega a un gen de ADNc en su anillo, la facultad natural del plásmido para penetrar en el interior de las bacterias permitirá a dicho gen entrar en su nuevo hogar, el plásmido que se utiliza para esto tiene el nombre de vector, en algunas ocasiones algunos virus también se pueden usar como vectores.

Para pegar un gen humano a un plásmido se requiere la intervención de otro tipo de

## 12. RECOMBINACIÓN GENÉTICA

---

enzimas, que son extremadamente precisas, pues tienen la capacidad de distinguir entre las estructuras similares, recorriendo la doble hélice hasta que reconocen determinadas secuencias específicas de bases y entonces efectúan una precisa incisión entre ambos filamentos de ADN, en las moléculas circulares de plásmidos, estos permiten la apertura del anillo y posibilitan la introducción del gen humano.

La acción de estas enzimas es producir un corte escalonado dejando 4 bases colgantes en cada extremo, bases que son capaces de enlazarse con otro fragmento de ADN que posean las bases correspondientes, por lo tanto se dice que estos extremos son pegajosos, que constituyen ganchos de los que se cuelga el gen humano. Mientras tanto en tubo de ensayo se prepara el gen humano en forma de ADNc para su fijación en el plásmido abierto, formando finalmente un plásmido nuevo.

En este estado los dos fragmentos de ADN están adheridos de manera más bien escasa puesto que solo los mantiene juntos otros enlaces débiles entre los extremos pegajosos, mediante otra enzima, la ADN ligasa, es posible establecer una adhesión permanente ya que dicha enzima adhiere las cadenas de ambos filamentos, hecho esto la molécula recombinante resulta estable.

### 12.4.3 Obtención de la cepa con el gen deseado

En este momento ya se puede introducir la molécula recombinante en las bacterias que actuaran como fábrica de producción de la proteína buscada. La bacteria más frecuentemente utilizada es la *E. coli*

Los plásmidos se eligen en función de su característica inherente para penetrar en las células, algunas veces la invasión puede facilitarse añadiendo algunas sencillas sustancias químicas a la mezcla. Los plásmidos presentan otra propiedad muy valiosa que es que son capaces de producir copias de sí mismos una vez en el interior de la célula bacteriana, un plásmido puede multiplicarse por sí solo hasta elaborar docenas de copias y puesto que la bacteria que alberga el plásmido también crece y se divide toda célula hija recibirá algunos

plásmidos que pueden duplicarse así mismos. Antes de que transcurra mucho tiempo, una sola bacteria puede haber originado millones de descendientes. Una población de células derivadas de un antecesor común se denomina clon y todas las células de un clon tiene una idéntica dotación genética, de modo que una bacteria portadora de una molécula recombinante puede originar millones de células idénticas, que contendrán el gen humano original, entonces se dice que dicho gen ha sido sometido a clonación.

En esta fase es necesario conocer que tipos de bacterias hay en la mezcla de células que crecen en el medio, existen tres tipos de bacterias

- A. Las bacterias infectadas por un plásmido recombinante portador del gen y por lo tanto las células de interes
- B. Bacterias con un plásmido normal y
- C. Bacterias que han resistido a la invasión de cualquier tipo de plásmido.

Una sencilla pero valiosa técnica para la identificación de células con el plásmido deseado, es primero separar a cada colonia para que pueda crecer y multiplicarse independientemente y luego someterla a una serie de experiencias las cuales mataran parte de las bacterias, pero identificaran que bacterias tienen el gen añadido, sobre la base de la sustitución del gen que presenta la resistencia por lo general a determinados antibióticos.

### 12.5 FORMAS DE RECOMBINACIÓN

#### 12.5.1 Trasposición

El mecanismo de transposición se ha dado en llamar recombinación ilegítima, puesto que no requiere de regiones homólogas extensas entre la secuencia de bases del ADN traspuesto en el ADN del lugar al que se integra.

La secuencia de inserción son fragmentos de ADN de una longitud de unos 800 a 1400 pares de bases, de los cuales hay varias copias en diversos lugares del ADN cromosómico, plasmídico o fágico, en sus extremos contienen secuencias de inserción.

La mayoría de los transposones conocidos poseen marcadores genéticos como por ejemplo;

## 12. RECOMBINACIÓN GENÉTICA

genes que determinan la resistencia de cierto antibiótico, esta propiedad permite identificar y aislar aquellas células microbianas que poseen el fragmento, entre una población de bacterias que no lo contiene y que por lo tanto son sensibles al antibiótico, ofrecen la posibilidad de diseñar *in vivo* cepas microbianas más útiles o lo que es lo mismo, permite llevar a cabo experimentos de Ingeniería genética *in vivo*.

### 12.5.2 Transformación

Es el proceso de transferencia genética mediante el cual una bacteria incorpora un fragmento de ADN desnudo que se encuentra en el medio exterior en solución, este fragmento de ADN se puede recombinar con el cromosoma mediante zonas de homólogos, las bacterias capaces de incorporar fragmentos de ADN, se denominan competentes. El apareamiento de bacterias competentes en un cultivo bacteriano ocurre en determinados periodos durante el ciclo de crecimiento.

El mecanismo de incorporación del ADN comprende tres fases:

1. La doble hélice de ADN se une a los lugares accesibles de la pared celular en las células competentes.
2. El ADN unido a la pared celular sufre rupturas en una de sus cadenas por la acción de endonucleasas. Esta cadena de ADN es transportada al interior de la célula al mismo tiempo que la otra cadena del ADN es degradada completamente
3. El ADN incorporado en la célula bacteriana se recombina con el ADN cromosómico debido a la existencia de zonas homólogas entre ambos.

### 12.5.3 Conjugación

Es el proceso de transferencia de genes de una bacteria (donante) a otra (receptora) previa unión de ambas, la conjugación genética es unidireccional, ya que el ADN solamente puede ser transferido de la bacteria donante a la receptora, pero no en sentido contrario. La capacidad de actuar como donador de ADN se la confiere a la bacteria donante, un tipo de plásmidos

conjugantes, que no están presentes en la bacteria receptora. Este proceso de intercambio genético puede ocasionar la transferencia de ADN plasmídico y cromosómico simultáneamente.

El mecanismo de conjugación puede resumirse como sigue:

1. Las bacterias donante y receptora se unen como consecuencia de alteraciones específicas en su pared celular al menos en parte, están determinadas por el ADN del plásmido conjugante que posee unos 50 genes.
2. El plásmido conjugante, que es una molécula circular de ADN de doble cadena en la bacteria donante, sufre una ruptura enzimática en una de las dos cadenas y de esta cadena penetra en forma lineal en la bacteria receptora. En ambas bacterias se procede además a la circulación de la doble cadena de ADN plasmídico.

#### 12.5.4 Trasducción

Es el proceso de transferencia genética debido a un virus bacteriano o bacteriofago. El ADN bacteriano transferido constituye en este caso parte o la totalidad del ADN introducido en el fago, que actúa como vector genético.

La infección de una bacteria por un fago empieza por la adsorción del fago a receptores específicos de la pared bacteriana. El ADN contenido en la cúspide del fago es inyectado en el citoplasma bacteriano, donde es capaz de replicarse y transcribirse.

La infección de una bacteria por un fago puede ocasionar dos respuestas:

1. Respuesta lítica: una vez en el citoplasma bacteriano, el ADN fágico se replica un número de veces y utiliza la maquinaria de la bacteria para a partir de ADN, transcribir ARN y dirigir la síntesis de proteínas.
2. Respuesta lisogénica: El ADN fágico se asienta en forma estable en la bacteria, la mayoría de las veces debido a su integración en el cromosoma bacteriano replicándose entonces como un segmento más del mismo.



## 12. RECOMBINACIÓN GENÉTICA

---

### 12.5.5 Clonación de genes

Es el aislamiento y purificación de un gen de un organismo, que después se introduce en células de un organismo distinto al original, donde los elementos trasponibles son fragmentos de ADN trasponible.

En las bacterias se conocen tres clases de elementos trasponibles:

1. Secuencias de inserción, que son fragmentos relativamente cortos de ADN, que codifican solamente una función necesaria para que la secuencia de inserción cambie de lugar.
2. Trasposones, que no solo codifican una función de transposición, sino también otras funciones, como resistencia a productos químicos, producción de bacteriocinas, e incapacidad metabólica concretas.
3. Ciertas secuencias de bacteriofagos son capaces de integrarse en el genoma del hospedador esencialmente al azar.

La clonación de un gen se basa en:

- A. La fragmentación del ADN total del organismo poseedor del gen de interés, con el objeto de separar del ADN total el gen elegido, sin que este último resulte fragmentado.
- B. La unión del ADN correspondiente al gen aislado con el ADN de un vector genético, resultando una molécula de ADN recombinante (ADNr)
- C. La introducción de este ADNr en un hospedador que permita su propagación
- D. La selección de células individuales del hospedador, o clones, que hayan recibido la molécula del ADNr, molécula que puede expresarse dando lugar a la proteína que codifica.

Este proceso se puede ver en la figura 12.1

### 12.5.6 Aplicaciones

La ingeniería genética podría mejorar los procesos de producción de materias primas orgánicas mediante los siguientes caminos:

- I. Conseguir microorganismos que además de ser más resistentes a los productos de la

fermentación sean capaces de fermentar compuestos complejos, como la celulosa directamente.

- II. Conseguir microorganismos que siendo capaces de producir un determinado producto final, pueden operar en condiciones más ventajosa.

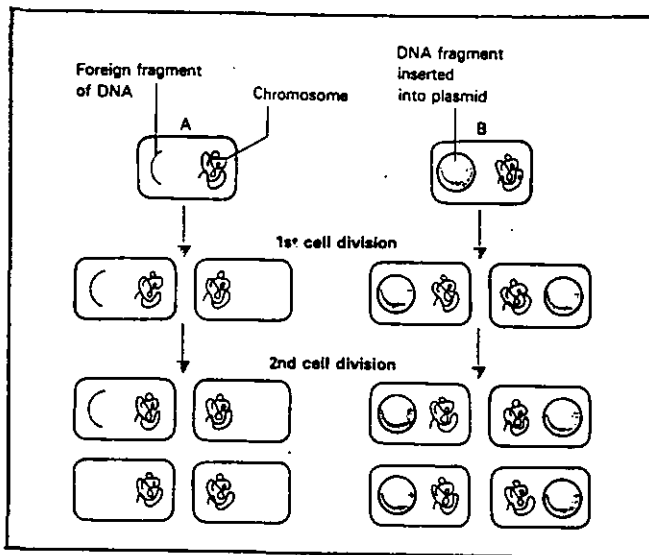


Figura 12.1 Proceso de clonación en un hospedador

También se puede utilizar la ingeniería genética para la producción de enzimas en las que ofrece ventajas como:

- ✓ Incremento en el rendimiento mediante el aumento del número de copias del gen que codifica la enzima de interés.
- ✓ Incremento del rendimiento a través de la alteración de la regulación genética
- ✓ Incremento del rendimiento aumentando la cantidad de enzimas que el microorganismo

## 12. RECOMBINACIÓN GENÉTICA

---

productor excreta al medio de cultivo

- ✓ La producción de enzimas animales o vegetales en microorganismos
- ✓ Integración de la producción de enzimas, mediante técnicas de ingeniería genética se podría lograr producir en un solo microorganismo varios enzimas que se utilizan en un mismo proceso industrial.
- ✓ Obtención de enzimas que más resistentes a la desnaturalización, aumenta a si la vida media de las enzimas en procesos industriales.

### 12.6 MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

No se conoce mucho más del 10% del mundo de los microorganismos y los investigadores se han enfocado a aquellos potencialmente útiles, prácticamente un gran número de huéspedes son utilizables, entre ellos hay bacterias y levaduras, de las bacterias llamadas gram negativas (por una propiedad de coloración que las distingue de las bacterias gram (+) el huésped más famoso y más estudiado es el *Escherichia coli*, otras bacterias útiles gram (+) son el *Bacillus subtilis* o los hongos microscópicos o micelianos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Aspergillus niger*, etc., pero los huéspedes pueden ser también células de plantas o animales en cultivo o *in vivo*.

Son dos las principales especies que se usan en fermentaciones una bacteria y una levadura:

12.6.1 *E. coli* que es una bacteria sencilla y la más conocida en su código genético, se trata del mejor sistema de producción en masa, es fácil de cultivar y de abrir, algunos de sus inconvenientes son que existen algunas proteínas que el colibacilo sintetiza mal, que no segrega demasiado bien además es incapaz de realizar modificaciones secundarias a las proteínas que en algunas ocasiones son fundamentales para la actividad de estas y por último que los productos sintetizados por este a veces en cantidades enormes se acumulan en el citoplasma de la célula productora en forma insoluble, reducida y a menudo inactiva, sin embargo la lista general entre ventajas y desventajas supera los inconvenientes en la mayoría

de los casos, su característica principal, es su fácil aceptación de material genético extraño y la relativamente fácil expresión de las proteínas extrañas.

12.6.2 *Saccharomyces cerevisiae* mejor conocido como la levadura de cerveza, es un eucarionte unicelular. Por lo general una parte de sus ciclo biológico se desarrolla en una fase "diploide", cada célula contiene dos lotes de cromosomas. Pero además la levadura de laboratorio, es también capaz de reproducirse en una forma "haploide" con un solo juego de cromosomas (en los organismos superiores, esta situación es la de las células sexuales). Hay dos signos sexuales distintivos para las células haploides, el signo "a" y el signo "alfa", la forma diploide solo puede obtenerse por la fusión de dos células haploides de signo sexual distinto. Después de la fusión, el diploide se divide activamente. Al contrario de las otras células de organismos superiores que se dividen dando lugar a dos células hijas idénticas, la levadura diploide se reproduce produciendo brotes de pequeñas células hijas en la periferia de la célula madre. Estas nuevas células contienen su núcleo la misma información genética que la madre, pero tienen mucho menos citoplasma. Mientras su entorno es favorable, el diploide continúa reproduciéndose, pero si los elementos nutrientes se agotan, la célula vuelve a pasar a la fase haploide por medio de la meiosis y permanecen en reposo hasta que el medio es favorable, lo que les hace germinar.

#### 12.6.2.1 CRUZAMIENTO

Cruzar entre sí dos cepas distintas supone disponer de formas haploides de signo sexual contrario. Una aplicación práctica es la industria cervecera, donde se busca mejorar las cepas industriales. Por ejemplo el cruzamiento entre dos cepas de cervecera, las *S. cerevisiae* y la *S. diastaticus*, esta última produce una enzima que es capaz de digerir las dextrinas, azúcares complejos que la *S. cerevisiae* es incapaz de degradar y que por lo tanto deja en el zumo fermentado, la cepa salida de cruzamiento produce una cerveza cuyas dextrinas han sido degradadas, por lo tanto esta cerveza es más pobre en calorías, lo que podría constituir un argumento publicitario, lamentablemente la cepa surgida del cruzamiento tiene unos genes que

## 12. RECOMBINACIÓN GENÉTICA

---

dan a la cerveza un sabor desagradable.

Así pues mezclando el material genético (el genomio) de dos cepas por cruzamiento, cuando es posible, se corre el riesgo de aportar a la levadura industrial no solamente el carácter interesante, sino también otros indeseables. Una forma de eliminarlos es volver a cruzar la cepa obtenida con el progenitor industrial para eliminar los genes no deseados

### 12.6.2.2 CITODUCCIÓN

Otra forma de lograrlo es por medio de citoducción, esta técnica se basa en que cuando dos células haploides se fusionan, deberían formar un diploide, pero estas células llevan una mutación llamada *kar 1* que impiden esta fusión nuclear, durante el brote uno solo de los dos núcleos pasa a una de las células hijas. El resultado de esta operación es que obtienen de nuevo una célula haploide que posee el núcleo de uno de los padres solamente. Pero esta célula reúne toda la información genética extranuclear de las dos cepas iniciales, esta técnica puede servir para introducir en una cepa, un carácter particular llevado por un ADN distinto del existente en el núcleo

En el ámbito industrial se tienen que asegurar que los microorganismos que se usan sean realmente los que se desean, una manera de comprobarlo es usando cepas iniciales conocidas, por ejemplo un gen de resistencia a un antibiótico llevado por un determinante hereditario citoplasmático, puede obtenerse una cepa de tipo industrial que habrá captado por citoducción la resistencia al antibiótico, gracias a esta resistencia, que de alguna manera sirve de marcador. Se podrá verificar al final de la fermentación que el producto posee las cualidades esperadas de la cepa mejorada.

Otro caso sería el de la producción selectiva de alcohol, El mosto de la uva contiene naturalmente casi un millón de levaduras aportadas por la piel, las levaduras que se siembran y que finalmente darán las características deseadas deben dominar al final de la fermentación esto se puede lograr por citoducción. Con este método es posible introducir en una cepa seleccionada el carácter genético denominado "killer" (asesino), que determina la aptitud de

matar a sus vecinos, las cepas de *S. cerevisiae*, que poseen este carácter contienen dos virus en su citoplasma. El pequeño virus codifica una proteína tóxica que se difunde en el medio de cultivo, se fija en la membrana de las levaduras normales y las mata, codifica también la inmunidad frente a la toxina, así las levaduras killer no se matan entre sí, este carácter puede resultar muy útil para la hegemonía de una cepa industrial en un medio de cultivo, e incluso puede llegar a sustituir en el transcurso de algunas generaciones, a una cepa normal aun en el caso de que esta fuera al principio cien veces más abundante, por lo tanto este carácter puede ser introducido sistemáticamente en las levaduras seleccionadas. De hecho esta técnica se uso industrialmente en Canadá pero las otras compañías productoras de cerveza asustaron al consumidor al decir que se estaban usando levaduras asesinas para la producción de cerveza y se abandonó esta técnica.

#### 12.6.2.3 FUSIÓN DE PROTOPLASTOS

Pero para introducir en una cepa industrial un carácter de otra cepa siempre es necesario que ambas puedan cruzarse y por lo tanto producir esporas, lo que no siempre se obtiene. Un primer método es realizar una fusión de protoplastos, estos son células desnudas desprovistas de su pared rígida, en presencia de una sustancia como el polietilenglicol, pueden fusionarse, las células resultantes de la fusión regeneran a continuación y con una gran rapidez, una pared y se multiplican formando una colonia híbrida, la fusión de protoplastos puede efectuarse entre cepas de signo sexual idéntico y por lo tanto normalmente incompatibles y también puede efectuarse a pesar de las diferencias en el número de cromosomas de las cepas, de manera que es posible fusionar cepas haploides, diploides y hasta triplodes y sus respectivos cruzamientos que de otra forma sería imposibles, aunque el número de células realmente híbridas es muy bajo del orden de una entre varios miles.

Para identificar estas células híbridas se fusionan generalmente dos células que presentan defectos distintos que les permite estar "marcados", por ejemplo una cepa que ha perdido la capacidad de sintetizar leucina no puede vivir si el medio de cultivo no contiene

## 12. RECOMBINACIÓN GENÉTICA

---

este aminoácido, y por otro lado una cepa que su ADN mitocondrial ha sido específicamente destruido puede fermentar pero no respirar en un medio de glicerol el cual la levadura solo puede utilizar respirando, una cepa sin ADN mitocondrial no se multiplica, por lo tanto en un medio con glicerol y sin leucina solamente sobreviven las células que después de la fusión llevan las dos informaciones genéticas que faltan en cada una de las células madres, son los híbridos buscados, pueden vivir sin leucina ya que como poseen el núcleo de la cepa industrial, se han vuelto capaces de sintetizarla y pueden respirar porque están provistos del ADN mitocondrial.

Al igual que la citoducción, la fusión de protoplastos, asociada a este sistema de selección, permite introducir en una cepa cualquiera una carácter deseado, sin embargo esta técnica presenta el mismo inconveniente que el cruzamiento simple, con el nuevo núcleo introducido en la cepa industrial se aportan muchos caracteres algunos de los cuales pueden ser indeseables.

Para detectar las células que han recibido el gen, esto se hace fácilmente ya que se utiliza como receptor una cepa de levadura marcada, por ejemplo para la leucina, se introduce un gen que en su ADN contenga simultáneamente el gen que se desea ver expresado y el gen *leu 2+*, el mantenimiento y la expresión de este último en las células transformadas se traducirá por la aparición de células nuevamente capaces de crecer en un medio sin leucina, el problema de este tipo de selección estriba en la obtención de la cepa receptora, hay que inactivar todos los ejemplares del gen *leu 2* y por lo tanto es difícil hacerla axótrofa.

### 12.6.2.4 CONSERVACIÓN DE LA CEPA

El ADN introducido puede eliminarse durante la producción en masa por consiguiente suele ser necesario efectuar selecciones permanentes para su conservación en las levaduras. Como en la industria alimentaria se descarta la fabricación de productos ricos en cobre o en antibióticos hay que adoptar otros modos de selección. Existen dos sistemas que en este caso son ventajosos ya que pueden utilizarse para mantener una presión de selección en el

transcurso de una fermentación industrial.

(a) El primero consiste en introducir con el gen interesante los genes killer, y el gen "Flo" que confiere la aptitud para el precipitado en forma de copos, en el primer caso toda la célula transformante es muerta por sus vecinas, ya que al mismo tiempo pierde la inmunidad frente a la toxina y en el segundo caso es eliminada por flotación durante una fermentación en continuo. El balance de estas operaciones es la facilidad de aislar una cepa de levadura que contenga el gen extraño introducido. Asegurando una correcta transferencia de un gen haciendo que el número de copias permanezca estable a lo largo de sucesivas divisiones de las células de levaduras modificadas. (En la bacteria el ADN extraño es introducido generalmente con un plásmido. Se mantiene en la célula bacteriana en un gran número de copias y se expresa quedando insertado en el plásmido, que se perpetúa de generación en generación. A diferencia de los organismos superiores y a semejanza de las bacterias la levadura posee también un plásmido. El plásmido de *S. cerevisiae*, denominado 2 micras, por su tamaño está presente en la mayoría de las cepas a razón de cincuenta por célula. En 1978 se demostró que el plásmido se mantenía en un elevado número de copias en las células transformadas.

(b) Otra forma puede ser la implantación de ADN extraño en los cromosomas de la levadura. La integración cuando tienen lugar, se hace en el ámbito de fragmentos que presentan una serie homóloga de estructuras con el segmento de ADN introducido. Que en el caso de la levadura es una singularidad pues en los demás eucariontes, la integración se realiza fundamentalmente de manera aleatoria, en la levadura en cambio es necesario asociarlo previamente a un gen extraído de este organismo, por consiguiente la elección del gen de levadura anexo al gen extraño determina el lugar de integración del ADN extraño en el genoma de la levadura receptora, una vez integrado, se replica pasivamente con el cromosoma y se mantiene de manera muy estable en la descendencia de la célula transformada e incluso en ausencia de un sistema de selección.



## 12. RECOMBINACIÓN GENÉTICA

---

### 12.6.3 Casos prácticos

Dos ejemplos de algunos experimentos en las levaduras se encuentran uno en la producción de vino, que implica dos fermentaciones sucesivas. En la primera la levadura transforma el azúcar en alcohol y en la segunda las bacterias transforman el ácido málico presente en el zumo de uva en ácido láctico y CO<sub>2</sub>, en general estas bacterias no se añaden sino que proceden de la flora natural de la uva, sería interesante dotar a las levaduras de gen bacteriano que asegure la transformación del ácido málico en ácido láctico.

Otra nueva propiedad que puede aportarse a la levadura es la posibilidad de producir alcohol a partir de otros compuestos distintos a los azúcares simples, por ejemplo podrían introducirse genes que codificaran para amilasa, que degrada azúcares complejos, de esta forma podría utilizar una mayor variedad de sustratos, como por ejemplo de lactosa, una cepa así resultaría muy útil en la utilización de los sueros de leche, desperdicio de la industria quesera.

### 12.6.4 Expresión de proteínas modificadas

Aparte de las utilizaciones tradicionales de la levadura, la ingeniería genética ha abierto la posibilidad de hacerle producir proteínas potencialmente lucrativas, así para el ensayo médico es necesario disponer de una proteína idéntica, incluso en los más mínimos detalles, a la forma en la que se encuentra en el hombre, esto no se logra únicamente con la secuencia de los aminoácidos de la proteína, para ser activas algunas proteínas, como los factores sanguíneos de coagulación, han de sufrir modificaciones que sobrevienen después de la síntesis.

Estas modificaciones, llamadas postraduccionales, consisten en la adición de grupos diversos en puntos muy específicos de la cadena proteica. A menudo solamente las células animales o incluso y más precisamente las humanas, poseen los mecanismos necesarios para llevar a cabo tales modificaciones. En otros casos, la secuencia de la proteína basta por sí sola,

entonces es la bacteria *E. coli* la indicada para realizar este tipo de producción, pero presenta algunos inconvenientes, especialmente las pequeñas proteínas son destruidas en su interior, lo que complica la producción y afecta el rendimiento, además produce sustancias patógenas que hay que eliminar, por lo que su utilización se limita a las sustancias de alto valor que permiten una extensa purificación, para la industria alimentaria, para las vacunas o para la producción de enzimas un huésped no patógeno parece que sería preferible la levadura, que presenta las ventajas de su rusticidad, su tamaño que ayuda a la separación, en el área alimenticia es perfectamente utilizable y se han hecho avances importantes en cuanto al conocimiento de su genética.

Pero por otro lado el introducir un gen en la levadura no necesariamente quiere decir que este se expresará, es necesario que el gen extraño contenga todas las señales necesarias, comprensibles para la célula huésped, para que las distintas etapas de la expresión del gen puedan realizarse, en principio el gen ha de ser copiado, transcrito en un ARNm, esto implica que las señales de comienzo y de fin de mensaje (promotor y finalización de la transcripción) que se introducen con el gen extraño sean reconocidos por la levadura.

Ahora bien, estas señales son bastante divergentes en el transcurso de la evolución y la levadura no reconoce por ejemplo, señales de bacterias o de vertebrados. Grupos de investigación han logrado separar estas señales en la levadura a la que han llamado "cajita de expresión" que solo incluye las señales de comienzo y fin de transcripción, introducido en esta cajita de expresión el ADN extraño será transcrito en ARN mensajero de la levadura, gracias a las señales propias de esta, estas cajitas de expresión son muy adecuadas en sistemas homólogos, un gen de levadura transferido a una levadura, donde el nivel de expresión es muy elevado, pero en otros casos no es así, al mismo tiempo acumular el ARN mensajero no significa que la proteína deba producirse al mismo ritmo, se choca aquí con la dificultad ligada al hecho de que los distintos organismos no practican la decodificación de la información genética exactamente de la misma manera. Recordemos que la decodificación consiste en

## 12. RECOMBINACIÓN GENÉTICA

---

traducir la información genética del ARN mensajero que copia a su vez de la molécula del ADN en una secuencia de aminoácidos que forma una proteína

La molécula de ARN, como las de ADN, está formada por un encadenamiento de cuatro bases. Pero según los organismos, los codones del código genético no se utilizan con la misma frecuencia. Por ejemplo, en la levadura la leucina es codificada por seis codones "sinónimos" con una frecuencia de utilización distinta para cada codón, esta diferencia de frecuencia refleja la abundancia desigual de las moléculas de ARN de transferencia encargadas de adaptar la traducción de un codón en el aminoácido correspondiente, en un gen humano la leucina es codificada por los mismos seis codones pero no con la misma frecuencia de utilización que en la levadura. Entonces un ARN mensajero que presenta una estadística de codones distinta de la que tiene la levadura verá limitada su velocidad de traducción debido a la rareza de ciertos ARN de transferencia.

Entonces se puede modificarse localmente el gen extraño para darle codones más apreciados por la levadura, especialmente cuando el gen extraño no es demasiado grande es posible sintetizar químicamente un gen artificial que respete la estadística de utilización de los codones de la levadura. Entonces puede compararse el gen de expresión en la levadura de un gen humano "natural" y de su homólogo sintético empleando los codones usuales de los genes de la levadura.

Superada esta etapa viene la etapa de las modificaciones postraduccionales, que varían en cada género, por ejemplo para que una hormona sea activa necesita la adición de residuos de azúcar, en este caso el receptor reconoce la parte de la proteína portadora de los azúcares, la levadura está en condiciones de operar estas modificaciones en el lugar adecuado, pero no en todos los casos, por ejemplo no sabe añadir un azúcar al final de la cadena, finalmente algunas veces la proteína debe su actividad a la inserción de un edificio multimolecular complejo, de manera bastante sorprendente la levadura puede formar estas estructuras, es lo que ocurre en la superficie del virus de la hepatitis B que sirve para preparar la vacuna, en este caso se recupera

---

la proteína correctamente conformada haciendo estallar las levaduras.

En vez de hacer romper las células, sería mejor hacerles secretar la proteína producida, lo que haría más fácil su recuperación del medio de cultivo. La levadura "secreta" espontáneamente un determinado número de proteínas, estas se encuentran entre la membrana y la pared celular o en el medio de cultivo, como en el caso de la toxina killer. La orden de secretar una proteína va ligada a la presencia de un péptido especial al principio de la proteína naciente, a continuación este péptido es eliminado en el transcurso del desplazamiento de la proteína hacia el exterior. Evidentemente, se espera utilizar esta señal de la levadura para dirigir la secreción de una proteína extraña a la levadura, fusionando el gen de dicha proteína con la parte del gen que codifica para el péptido señal. Son ya varias las proteínas que se han obtenido de esta manera: la hormona del crecimiento humano, la hormona del factor de crecimiento de la epidermis, y de interferones.

Este enfoque ofrece una ventaja principal, utilizando la levadura puede esperarse reproducir las modificaciones que sufren las proteínas de organismos superiores, esta ventaja se ilustra con la producción de quimosina, que es secretada por uno de los cuatro estómagos de un ternero destetado y se utiliza para la coagulación de la leche en la fabricación del queso, esta enzima conocida comúnmente como cuajo es una proteasa, es secretada en forma de un precursor inactivo que lleva, en sus comienzos, una extensión de 42 aminoácidos, en un medio ácido, en el estómago del ternero, el precursor se autoactiva y parte la extensión de 42 aminoácidos, liberando la quimosina activa, los ensayos de producción en *E. coli* no han dado los resultados esperados, la quimosina precipita en forma inactiva y no es muy activa en medio ácido, en una levadura tras la señal del péptido de secreción se han obtenido producciones de 20 mg/L de precursor autoactivable al 90% de pH ácido.

## 13 TEJIDOS VEGETALES

### 13.1 INTRODUCCIÓN

Las plantas acumulan sustancias muy variadas, que el hombre ha utilizado desde hace mucho tiempo, ejemplos de ello son los aceites, resinas, la cera, el chicle, esencias, colorantes entre algunas, todas estas sustancias tienen una química muy diversa, con propiedades igualmente diversas y aunque su papel fisiológico en la planta no es muy conocido, su aprovechamiento por el hombre ha sido constante.

En realidad hay dos tipos de productos extraídos de las plantas: los metabolitos primarios, y los metabolitos secundarios, como son los colorantes y resinas entre otros. Los primeros son muy abundantes en la naturaleza en general pues son indispensables para el desarrollo fisiológico de las plantas, comprenden los ácidos grasos, aceites y diversos tipos de carbohidratos como las pectinas, almidones azúcares, todos ellos presentes en grandes cantidades y de fácil extracción y relativamente baratas, en cambio los segundos son derivados de los primeros, pero su distribución en la naturaleza es mucho más limitada y no todos los compuestos están presentes en todas las plantas, sino que se limitan a un grupo de especies incluso están restringidos a grupos dentro de una misma especie, estos se acumulan en la planta en cantidades pequeñas lo que hace su extracción difícil y costosa, aunque utilizados para una amplia variedad de productos en la industria.

A pesar de que en la actualidad se pueden sintetizar muchos productos por vía química, la mayoría de los compuestos de origen vegetal son tan complejos que su producción por vía química resultaría muy costosa o complicada, razón por la cual es de gran interés el cultivo de células vegetales capaces de producir estas sustancias deseadas, como por ejemplo los perfumes de las flores, el de la frambuesa y del jazmín, resultantes de una mezcla de varios centenares de compuestos diversos y/o de estructura molecular compleja, con la ventaja de que

el tiempo de producción por medio de cultivos vegetales se puede ver reducido hasta en doscientas veces, en comparación con la producción de la planta.

El mercado mundial de estos productos por el momento se enfocan principalmente a los productos de alto valor agregado, principalmente de la industria farmacéutica, otra fuente estaría en la obtención de nuevos productos para la industria farmacéutica, esta área tendrá una amortización a largo plazo. Otra área es la utilización de los procesos para la producción de aromas, aditivos alimentarios o bases de perfumería que aunque suelen tener un valor menor que los anteriores representan mercados generalmente mucho más grandes que los anteriores.

### 13.2 DEFINICIÓN

El cultivo de células vegetales es el crecimiento y la multiplicación ilimitadas de células o tejidos de origen vegetal, cultivados *in vitro* en condiciones asépticas y perfectamente controladas.

Las células se colocan en un medio nutriente sólido o en suspensión en un medio líquido. Estas técnicas de cultivo son conocidas desde principios de siglo, fueron expuestas por el botánico G. Haberland, y los primeros en demostrar que era posible cultivar tejidos vegetales fuera del contexto de la planta de manera indefinida y en forma de masas celulares indiferenciadas fueron R.G. Gautheret en Francia y J.P. White en Estados Unidos.

### 12.3 CULTIVOS VEGETALES

En 1954 el perfeccionamiento de las técnicas permitió establecer los primeros cultivos de células vegetales en suspensión comparables a los practicados en microorganismos y en 1956 se pidió la primera patente para la producción de metabolitos por medio de cultivos vegetales por J.B. Routien y L.G. Nickell, para la Pfizer en Estados Unidos.

En 1952 G. Morel y Cl. Martin demostraron que algunos tejidos vegetales, en especial los meristemáticos, eran capaces de producir *in vitro* plantas completas, el resultado de este descubrimiento fue una verdadera revolución en esta campo pues permitió el desarrollo de

### 13. TEJIDOS VEJETALES

técnicas de micropropagación que actualmente se desarrollan a nivel comercial para la reproducción rápida de un gran número de especies a su vez que han permitido la manipulación a nivel genético de las plantas.

En el área de la explotación de metabolitos secundarios este desarrollo fue más lento, pues las sustancias que en la planta completa se acumulan principalmente en órganos particulares bien diferenciados no podían ser producidos por células en estado diferenciado en cultivo, posteriormente se descubrió que la naturaleza y la cantidad de metabolitos producidos son muy diversos de un cultivo a otro, aun con células procedentes de la misma planta, convenientemente explotada esta diversidad natural debía permitir la selección de cultivos más productivos.

En 1983 tuvo lugar la primera comercialización de un producto, un colorante, extraído de un cultivo de células vegetales por la firma japonesa Mitsui. La producción de metabolitos por cultivos celulares vegetales podría ya considerarse con la esperanza de que un día pasara a ser una realidad industrial.

#### 13.4 TRANSPLANTES

Los primeros trabajos con cultivos de células vegetales tuvieron rendimientos muy bajos y variables, para el aislamiento de las cepas productoras la primera etapa consiste en explotar la variabilidad existente dentro de la misma especie considerando seleccionando el mejor genotipo, el más productivo para la sustancia investigada.

Una vez hecha esta selección conviene crear una colección de cultivos, a partir de fragmentos asépticos de un órgano de la planta (hoja, tallo, raíz, etc.) colocados *in vitro* en un medio sólido, es posible producir proliferaciones primarias, algunas semanas después del inicio del cultivo se forman masas celulares indiferenciadas llamadas "callos" que pueden ser transplantadas a un nuevo medio nutriente. Los medios de cultivo, a base de minerales, de hierro, de sustancias de crecimiento, de un sustrato carbonado orgánico (glucosa, sacarosa, lactosa), están totalmente definidos.

A lo largo de sucesivos trasplantes, aparecen diferencias morfológicas y metabólicas entre los callos, como las células tienen un mismo origen genético, esta variabilidad es producida por las condiciones del cultivo *in vitro*, esta modificación puede ser en su contenido o en su expresión, lo que conduce a tipos celulares distintos, sin embargo la variabilidad tiende a difundirse cuando se mantienen condiciones ambientales constantes, por lo que se debe aislar del cultivo inicial, este proceso se sigue hasta por lo menos dos años que es cuando se obtiene una colección de cepas estables con características de crecimiento muy diferentes a las células madres.

### 13.5 SELECCIÓN DE CEPAS

En esta fase es necesario proceder a una selección de cepas, con la ayuda de pruebas muy bien definidas se realiza una selección para detectar las que producen compuestos interesantes. Los callos de las cepas seleccionadas se transfieren entonces a un medio líquido para formar suspensiones celulares, este cambio es necesario para la producción masiva, de la cual se pueden obtener cepas altamente productivas, la selección en esta fase consiste en multiplicar células aisladas enteras o liberadas de su pared o también pequeñas masas celulares, después de esto se les considera altamente productoras y pueden ser objeto de un cultivo masivo antes de la extracción de los productos deseados.

De todos los avances logrados hasta ahora se sabe que determinados metabolitos que habitualmente se acumulan en un órgano especializado de la planta pueden ser sintetizados por células indiferenciadas, por ejemplo, cepas seleccionadas de adormidera producen alcaloides morfínicos, mientras que estos mismos se acumulan en la planta entera, en tejidos laticíferos.

También se ha demostrado que es posible seleccionar cepas que producen tantos metabolitos e incluso más que la planta entera, este es un factor fundamental cuando se persigue la explotación a nivel industrial.



### 13. TEJIDOS VEGETALES

#### 13.6 METABOLITOS QUE SE PUEDEN OBTENER DE PLANTAS

En el siguiente cuadro se muestran algunos de los productos y su aplicación de los metabolitos que se han obtenido del cultivo de tejidos vegetales y su comparación con la producción natural de la planta.

Cuadro 13.1 Metabolitos producidos por cultivos vegetales

Compuesto	Especies	Utilización	Producción en cultivo g/L	Cultivo/ planta
(Cultivos de suspensiones celulares o de callos)				
Antraquinonas	<i>Golium aparine</i>	Colorante	43	20
	<i>Morinda citrifolia</i>		2.5	8
Berberina	<i>Coptis japonica</i>	Tónico, coleretico	1.4	3
	<i>Talictum minus</i>	Antipalúdico	0.8	1000
Cafeína	<i>Coffea arabica</i>	Tónico cardiaco	---	92
Ginsengosido	<i>Panax ginseng</i>	Tónico y afrodisiaco	----	7
Jatroricina	<i>Dioscoreophyllum cumminisii</i>	Tónico amargo	----	100
Acido rosmarinico	<i>Coleus blumei</i>	Antioxidante	3.6	5
Shikonina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Cicatrizante colorante	1.5	14
Tripdiólido	<i>Tryterigium wilfordii</i>	Anticancerígeno	.004	36
Ubiquinona 10	<i>Nicotiana tabacum</i>	Cofactor enzimático	---	173
Vomilenina	<i>Rauwolfia serpentina</i>		.057	51
(Cultivo de raíces)				
Nicotina	<i>Nicotiana rustica</i>	Fitosanitario	mg/g .31	2.5
Betaxantina	<i>Beta vulgaris</i>	Colorante	1.3	2

Atropina	<i>Atropa belladonna</i>	Antiespasmodico	37	11
Escopolanina	<i>Atropa belladonna</i>	Sedante del sistema	.024	3
	<i>Dubiosia leichhardtii</i>	nervioso central	1 16	5 3
Hisciamina	<i>Dubiosia leichhardtii</i>	Antiespasmódico	53	9

V. Petiard, *El cultivo de células vegetales*.

--- no definido

De este cuadro podemos observar que la producción por medio de cultivos vegetales es por lo menos igual mayor en todos los casos y en algunos donde la relación de producción es de hasta 1000 veces como en el caso de la berberina, es de observar que el cultivo resulta en un mayor rendimiento en comparación con el cultivo de raíces, pues en el primer tipo de cultivo la producción en cultivo comparada con la planta es de un alto rendimiento mientras que el rendimiento de los cultivos por medio de raíces es menor aunque en la mayoría de los casos superior al de la planta original. También es de considerar el tiempo que se necesita para los cultivos con cepas es menor que el necesario para cultivar una planta.

Otro punto importante es la presencia de metabolitos originales, ausentes en la planta madre, por ejemplo a partir de una cepa de *Catharanthus* se encontraron trece alcaloides, de los cuales solamente siete de ellos habían sido anteriormente identificados en la planta original, otros tres se conocían en unas especies de la misma familia y los tres últimos jamás habían sido descritos en estado natural, estos últimos podrían constituir una interesante fuente de nuevos principio farmacológicos activos.

Otra forma posible de explotación de las células *in vitro* se basa en la capacidad de estas para la biotransformación, puesto que estas células son capaces de modificar moléculas añadidas al medio de cultivo, ejemplo de esto es la obtención de un derivado de la aspirina por medio de cultivos vegetales, que suman un grupo glucosídico al ácido salicílico. El rendimiento de la bioconversión es del 75% del sustrato en 24 horas. El producto obtenido presenta una actividad analgésica más rápida que la aspirina, así como una mayor tolerancia gástrica.

Para ampliar la diversidad que espontáneamente aparece en un cultivo existen un gran

### 13. TEJIDOS VEGETALES

número de técnicas, esto se puede lograr por medio de agentes mutagenicos, creando de esta manera cultivos mucho más productivos, también se puede fusionar células vegetales complementarias e incluso se puede incursionar en el campo de la ingeniería genética y modificar en alguna forma los genes de los cultivos vegetales, un ejemplo de esto es el estudio realizado sobre la enfermedad conocida como la "agalla de cuello".

#### 13.7 MODIFICACIONES GENETICAS

La " agalla de cuello " es una enfermedad que se caracteriza por la formación de agallas voluminosas en el cuello del tallo, es producida por una bacteria llamada *Agrobacterium tumefaciens*, esta bacteria vive en el suelo y penetra en la planta por alguna herida, a diferencia de las agallas producidas por insectos u hongos, estas agallas pueden alcanzar tamaños considerables y su crecimiento solo se detiene con la muerte de la planta o del órgano afectado, se sugirió entonces que se trataba de un cáncer vegetal la prueba de esta teoría fue aportada por P.R White y A.C.Braun que demostraron que a partir de la agalla es posible obtener tejidos sin bacterias cultivándolos *in vitro*, en estas condiciones los tejidos conservaban sus propiedades tumorales y proliferaban de forma anárquica, injertados en una planta daban origen a un tumor.

En 1973 J.Schell anuncio el descubrimiento en cepas patógenas de *Agrobacterium tumefaciens* de un plásmido de tamaño jamas observado antes, este plásmidos llamado Ti confiere el carácter de patógeno a la bacteria, por medio de la transferencia de información genética entre las células de la bacteria y de la célula vegetal, se llegó a esta conclusión por medio de la demostración de que todas la células de agalla de cuello tenían integrado en su propio genomio, un fragmento del plásmido Ti, fragmento que denominaron T-DNA, una vez que se incorpora al genomio de la célula se expresa y confiere a la célula el carácter tumoral.

Estudios posteriores han permitido tener un estudio preciso de las funciones del plásmido Ti, entre las funciones identificadas se encuentran especialmente la parte virulenta, la supresión del plásmido en la bacteria o la inactivación por medio de mutación, hace que la bacteria sea

perfectamente inofensiva sin que por ello se le prive de la capacidad de transferir DNA a una célula de una planta con la ventaja de que en lo sucesivo formaran parte de su patrimonio genético.

Una vez dentro de la célula vegetal las funciones contenidas dentro del T-DNA se expresarán en ella, la idea de servirse del plásmido Ti como vector de genes fue una idea que surgió después de su descubrimiento, de los estudios realizados se encontró que el T-DNA esta delimitado en ambos extremos por "regiones", constituidos por la misma secuencia de 25 nucleotidos, la región transferida y que se integra en el genomio de la planta es la comprendida entre estas dos regiones, desde este punto de vista es posible introducir nuevo material genético en una célula vegetal introduciéndolo entre estas dos regiones, y así se confirmó, que es posible integrar ADN extraño sin modificar las propiedades de transferencia e integración.

La expresión del gen es otro problema, pues el lenguaje debe ser reconocido por las células de la planta, de esta forma junto con el gen se debe introducir también un promotor que la célula utilice generalmente para poder expresar el gen deseado.

Actualmente, la vía para intentar transformar genéticamente las plantas cultivadas ya esta abierta, un uso que ya se ha dado es el uso de este plásmido para la resistencia a ciertos herbicidas, haciendo resistente a la planta a un herbicida, mientras que las malas hierbas no lo son, de este modo se puede desyerbar un campo fácil y selectivamente, o codificar sustancias tóxicas para los insectos pero no para las plantas, este aspecto se ha desarrollado especialmente para las larvas de mariposas, el desarrollo de este tipo de estrategias conduciría a la reducción del empleo de plaguicidas en la agricultura

Este conocimiento se podría aprovechar para realizar mejoras en los cultivos como la mejora de la composición proteica de las semillas o incluso aumentar su riqueza en proteínas, de forma general lo que se podrá conseguir es una mejora general en calidad alimentaria.

### 13. TEJIDOS VEGETALES

---

#### 13.8 PRODUCCIÓN A NIVEL INDUSTRIAL.

Lo primero que se debe tener en cuenta para la producción industrial es la capacidad de producción de un cultivo, este debe ser el suficiente para justificar la producción, una parte clave en la obtención de cepas altamente productivas es la utilización de método de selección confiables y rápidos, cuando los metabolitos se producen en cantidades suficientes las cepas pueden seleccionarse por diferentes estimaciones en su coloración en luz visible, para cepas que produzcan colorantes, o en fluorescencia, y también por extracción y cuantificación por medios colorimétricos o cromatográficos e incluso métodos inmunológicos.

Después de obtener buenas cepas de producción *in vitro*, existe la posibilidad de poder explotarla a nivel industrial, lo cual supone producir los metabolitos de manera eficaz y constante esto implica un dominio de las técnicas de cultivo, pues no es fácil poder mantener una cepa productora estable, se puede lograr por medio de resiembras regulares en medios rigurosamente controlados, aunque este proceso es una tarea muy pesada pues se hacen resiembras cada 4 a 8 semanas en cultivos en medio geloso y del a 10 semanas en suspensiones celulares y representa un riesgo muy grande debido a la manipulación y posible contaminación, otros medios de conservación se basan en un ritmo de crecimiento lento, a baja temperatura, en condiciones de hipoxia, (cultivo bajo aceite de parafina por ejemplo), la detención del crecimiento al sumergirlos en nitrógeno líquido (crioconservación) o por liofilización la mayoría de las cepas así conservadas conservan sus propiedades.

Es también importante considerar las características del crecimiento de los cultivos pues de ello depende la productividad, estos factores como el pH, la luminosidad, la composición del medio, la temperatura, etc., son factores que constantemente se deben controlar en específico para cada tipo de cultivo, considerando también en que fase del desarrollo se encuentra, pues por lo general las condiciones que favorecen el crecimiento del cultivo no son siempre las mismas que favorecen la producción del metabolito deseado.

La principal dificultad para la producción industrial, tal como se efectúa con los

microorganismos, es la reducida velocidad de crecimiento de las células vegetales, de dos a tres días para la duplicación de la población, mientras que en algunos microorganismos este tiempo es de horas, lo que hace que el tiempo de la producción se extienda hasta varias semanas incrementando el costo y los riesgos de contaminación, un medio de minimizar las consecuencias de este problema podría ser la utilización de biorreactores a base de células inmovilizadas, de esta manera se incluyen en un gel permeable las moléculas del medio nutriente, las células, conservando a la vez su actividad por un largo tiempo (aprox 7 meses), el inconveniente es la lenta excreción de los metabolitos, pues por lo general permanecen en las vacuolas dentro de las células además que la demanda de oxígeno es muy limitada lo que no permite eliminar el empleo de costosos aparatos de aireación y de agitación rápidas que afectarían a la pared celular de los cultivos vegetales, estos puntos se pueden ir modificando para los cultivos vegetales poco a poco, de hecho ya se han obtenido algunos éxitos, realizando cultivos continuos de células de tabaco en aparatos o "bioreactores" de 20 m<sup>3</sup> durante más de dos meses estos trabajos se debe al grupo de T. Hashimoto en Japón, estos cultivo presentan una productividad de 5.82 gramos de materia seca por litro por día, el cultivo en continuo consiste en recoger solamente una parte del cultivo cuando éste ha alcanzado la densidad máxima, y el resto sirve para el ciclo siguiente.

Estos resultados muestran que la producción industrial de biomasa y de metabolitos por células vegetales es posible si se utilizan instalaciones y procedimientos similares a los que se emplean para microorganismos, esto implica que el desarrollo de estas tecnologías no requiere de necesariamente de nueva inversión.

La perspectiva de utilización de los cultivos vegetales presenta una gran variedad, sobre todo por la gran cantidad de sustancias generadas por las plantas de manera natural, el aprovechamiento y manipulación de todas ellas representa un gran campo de aplicación además de la producción de compuestos de alta calidad que pueden ser clasificados como "naturales", teniendo a las plantas y cultivos vegetales como pequeñas fabricas de compuestos.

---

## 14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

### 14.1 PRODUCCIÓN DE PAN

#### 14.1.1 Introducción

Los cereales y el pan han sido el alimento básico para una gran cantidad de gente por mucho tiempo, la historia del pan puede trazarse hasta hace 6 milenios, es probable que se haya desarrollado de una masa blanda, durante la edad de piedra la preparación de la masa blanda era de granos o con gomas naturales, agua o leche.

El pan que en su interior lleva burbujas de aire (inflado) se desarrolló probablemente de esta masa blanda que posteriormente se seco con aire caliente o se horneaba en piedras calientes, el horneado primitivo se realizaba poniendo la masa en las cenizas calientes.

Los egipcios desarrollaron un horno de diseño aproximado al moderno en el año 2700 a. C. desde 1750 a. C. había panaderos profesionales en Egipto, ellos estaban familiarizados con el levantamiento de la masa de trigo con levadura de cerveza y también con leudantes químicos. En el año 100 a.C. la masa ácida de pan ya era generalmente conocida alrededor de todo el mundo antiguo, los griegos desarrollaron el arte de la panificación y especialmente el diseño de los hornos. Los griegos llevaron el arte de la panadería a Roma y los romanos les tocó desarrollar las técnicas de otros pueblos a un alto nivel técnico y organizacional.

En Europa central la preparación de pan en la forma propiamente dicha se desarrolló desde la mitad del primer milenio antes de Cristo. Las primeras máquinas de amasado datan de la segunda mitad del siglo 18.

Finalmente la producción industrial de levadura para la panificación fue decisiva para la tecnología del pan tal como la conocemos ahora, el crecimiento de la población hizo que se incrementara la producción y que se racionalizara.

Las propiedades típicas del pan como la apariencia, textura y sabor que originalmente

---

se producían manualmente y de acuerdo con la calidad de los granos disponibles, ahora podían ser producidos en una forma estandarizada.

#### 14.1.2 PROCESO GENERAL

Una masa preparada solo con agua y harina puede presentar extensibilidad y elasticidad variables, la producción de panes con una estructura definida requiere del leudado de la masa con gases o vapor, la pasta debe ser estable para poder retener el gas producido.

La producción consiste básicamente en la preparación de las materias primas, la selección, el pesado, la formación de la pasta, el leudado de la masa, el moldeo, horneado, enfriado y empaquetado.

Varios procesos mecánicos, físicos, químicos, bioquímicos y microbiológicos ocurren durante la producción de pan y estos pueden llevarse a cabo al mismo tiempo o en sucesión, produciendo cambios estructurales y químicos como el hinchamiento de la masa, cambios en la forma y solidificación, cambios en la composición y la producción de aromas y sabores, para convertir al almidón nativo e indigerible y al gluten original en digeribles y de forma deseable.

Aunque el leudado empieza desde el momento en que se incorpora la levadura, la parte más importante de esta se desarrolla mientras la masa se deja reposar y se empieza a formar el gas, la superficie externa de la masa y consecuentemente del horneado se incrementa de 2 a 3 veces debido a la acción del gas, posteriormente se divide y se forman los panes donde todavía ocurre una última etapa de leudado.

Los productos primarios de la fermentación son  $\text{CO}_2$  y etanol con un sabor neutro, después de lo cual sigue una fermentación secundaria que tiene un efecto en el sabor del pan. Finalmente la estructura de la masa se fija por horneado, resultando en un producto comestible.

#### 14.1.3 Agentes Leudantes

Que pueden ser microbiológicos o químicos, para el pan, rollo y otras pastas dulces se utiliza una fermentación microbiana, otras pastas dulces requieren de agentes químicos debido a la presión osmótica del azúcar que impide el crecimiento de las levaduras, la levadura que se



#### 14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

---

utiliza es la *Saccharomyces cerevisiae* que tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 28 y 32 °C y un pH de 4 a 5, se añade de 1 a 6% del peso de la harina en levadura, más de esta cantidad produce un efecto en el sabor del producto

La levadura se puede obtener en varias presentaciones.

- **Pasta.-** Después del crecimiento en un fermentador se separa, lava y recoge por filtración al vacío, se corta en forma rectangular para su venta, esta levadura se necesita guardar a una temperatura de 4°C, también se puede obtener en forma de trozos irregulares, pero su duración es menor.
- **Levadura seca.-** Después del crecimiento y la filtración, se seca hasta 84% de humedad y se empaca herméticamente, puede durar hasta un año, necesita ser re-hidratada para su uso y la forma de rehidratación afecta la reología de la masa
- **Cultivos ácidos para pasta.-** Contienen de  $2 \cdot 10^7$  a  $9 \cdot 10^{11}$  de bacterias ácidas por gramo y  $1.7 \cdot 10^5$  a  $8 \cdot 10^6$  de levaduras por gramo, contienen básicamente del género *Lactobacillus* anaerobios o microaerofilos tolerantes al medio ácido capaces de fermentar carbohidratos y producir ácido láctico si son homofermentativos, ácido láctico, ácido acético, alcohol y CO<sub>2</sub> si son heterofermentativos, también pueden contener bacterias ácido propionicas que ayudan a la inhibición del crecimiento de hongos.
- **Amilasa bacterianas.-** Este tipo de productos se han utilizado durante los últimos 30 años y su objetivo es el de proveer azúcares fermentables a partir de la hidrólisis de almidón, se encuentran disponibles como concentrado en polvo y se producen por cultivos sumergidos de *Aspergillus oryzae*, tienen la ventaja de estar libres de proteasas y de beta Amilasa
- **Extractos de malta.-** Se usaba anteriormente a la amilasa bacteriana, pues es uno de sus principales compuestos, pero además contiene beta-amilasas y proteasas, la presencia de proteasas no es muy deseable sobre todo en harinas que tienen un gluten débil.
- **Productos obtenidos de la hidrólisis de almidones.-** En este ramo se usan Jarabe de alta fructosa de maíz o dextrosa, se pueden usar como azúcares fermentables, esto propicia la

iniciación de la fermentación por la presencia directa de azúcares fermentables, estos aditivos causan un gran volumen en el producto y una mejor textura y producen una mejor costra.

- Otros aditivos constituyen generalmente en mezclas de compuestos como glucosa, lecitina, minerales, agentes leudantes, concentrados enzimáticos y compuestos oxidantes o reductores. El cloruro de amonio o de fosfato se añade generalmente a las levaduras como nutriente.

#### 14.1.4 Producción

Aunque cada pasta tiene diferentes características, la mayoría sigue el mismo proceso de producción.

- 1) Preparación de los ingredientes - Después de seleccionar los ingredientes necesarios y adecuados al producto que se desea.
- 2) Mezclado.- Es importante por la aireación que se da al producto, al mezclarse se incorporan el aire que se distribuye en pequeñas burbujas, que son esenciales para el leudado de la masa y la formación de la textura del pan. Durante la subsecuente fermentación el número de burbujas no se incrementa, el gas en las burbujas es el que incrementa el volumen. El oxígeno en las burbujas estimula la fermentación de las levaduras. Durante esta etapa la masa requiere de cierta temperatura que se encuentra entre los 24 y 30 °C, no se recomiendan temperaturas más altas para evitar la gelatinización o daño a las levaduras. El proceso de mezclado tiene como finalidad la formación de una estructura del gluten adecuada para el inflado de la masa, mediante el proceso de amasado la pasta adquiere una estructura terciaria por medio de puentes ácidos y grupos básicos, entre aminoácidos y puentes de disulfuro, esta estructura permite la retención de gas.
- 3) Fermentación de la masa.- Generalmente se lleva a cabo una fermentación biológica, y el tiempo total depende no solo de la cantidad de gas producido sino de la retención del mismo. Después del mezclado la pasta generalmente es húmeda y pegajosa, durante la fermentación la pasta se seca y se vuelve más plástica de manera que facilita su posterior manejo. El leudado

#### *14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES*

---

de la masa por levaduras de fermentación presupone la presencia de azúcares fermentables que pueden estar disponibles solo durante la fermentación y las primeras etapas del horneado. Se requiere de la hidrólisis de almidón iniciada por la acción de la alfa-amilasa, las dextrinas resultantes son hidrolizadas por la beta-amilasa y convertidas en maltosa o también pueden ser hidrolizadas por la amiloglucosidasa para obtener glucosa. La hidrólisis enzimática del almidón continúa hasta que la fermentación se completa. La fermentación alcanza su punto óptimo cuando se forma una estructura coloidal en la estructura de la pasta, si la fermentación se prolonga el gluten absorbe mucha agua y la pasta pierde extensibilidad. Si existe una carencia de azúcares fermentables la cantidad de CO<sub>2</sub> formado por las levaduras es menor, el volumen del pan es pequeño y de textura densa. Harinas con baja actividad enzimática producen panes que no se doran bien, que tienden a desmoronarse fácilmente, estas harinas pueden ser suplidas por la adición directa de azúcares fermentables o por la adición de amilasa. La adición de alfa-amilasa es muy importante para empezar la hidrólisis del almidón y la formación del sustrato para la acción de la beta-amilasa. Después del período de fermentación la pasta se divide en piezas individuales, este paso elimina grandes burbujas que se hayan formado y lleva a cabo una distribución de burbujas pequeñas en toda la masa, el último período de fermentación se realiza en los moldes y toma de 30 a 60 minutos dependiendo del tamaño de la barra y la actividad de la levadura, se necesita una temperatura de 40 °C. Después de la fermentación es conveniente que queden azúcares no fermentados, para permitir la formación de sustancias caramelizadas que contribuyen al aroma y al sabor del pan y sobre todo al dorado y formación de la costra. La producción de gas continúa por unos pocos minutos después en el horno hasta que la masa pierda su plasticidad y la estructura del horneado pasa a ser estable y firme.

##### 14.1.5 Procesos industriales de producción de masa

La elección del proceso depende de las consideraciones técnicas y la calidad de la harina, para pastas fuertes se prefiere utilizar harinas pobres en gluten y de poca retención, el tiempo

#### 14. ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

total de la fermentación puede ser relativamente corto desde las pastas ácidas hasta las muy suaves que son fermentadas por largos periodos. Para las pastas esponjosas se utilizan harinas de gluten fuerte y baja actividad aminolítica que con una fermentación prolongada se vuelven más suaves y extensibles y más fáciles de manejar.

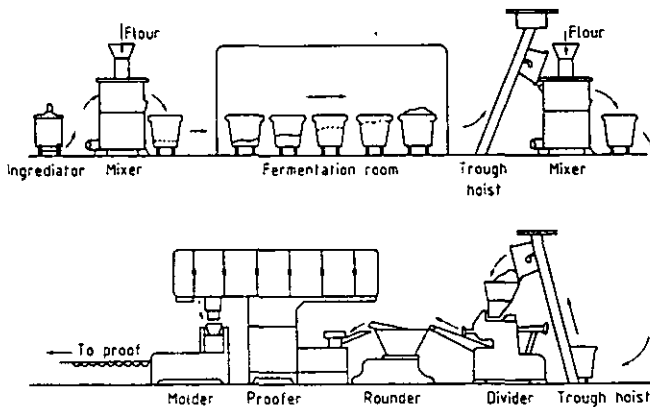


Figura 14.1 Proceso de masa esponjosa, Reed 1982

- a) Masa fuerte.- Se utiliza una temperatura de 28 a 32 °C para la fermentación y de 8 a 12 horas de tiempo, todos los ingredientes se mezclan al mismo tiempo y el tiempo total de producción es menor que otros métodos.
- b) Masa esponjosa.- Es un proceso indirecto en el que el agua y una porción de levadura se mezclan en una pre-pasta a 25 °C, cuando la pre-pasta esta completamente fermentada se mezcla con la harina restante y los demás ingredientes, se usa de levadura un 1 a 2.5 % para fermentaciones cortas y de 1 a 1.5% para fermentaciones largas. Para pastas que contienen

#### 14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

grasa o azúcar se requieren fermentaciones de 20 a 30 minutos. Esto causa un mejor alzado de la masa y el aclimatamiento de la levadura a las condiciones de la pasta.

El resultado es una leudado de los compuestos de la harina y mayor uniformidad en la distribución de levaduras resultante en un mayor volumen y una mayor vida de anaquel adicionalmente la fermentación también produce un aroma. El tiempo de fermentación es de 3.5 a 5 horas a una temperatura de 26 a 28 °C y luego se mezcla con el resto de los ingredientes

c) Proceso de líquido pre-fermentado.- Fue un método introducido en las panaderías americanas desde los años '50, simplifica el proceso convencional de masa esponjada. El líquido prefermentado contiene levaduras azúcares y sales inorgánicas, esta masa procede a la verdadera fermentación y reduce costos, tiempo y permite un mejor control en el proceso de producción y una calidad uniforme en el producto final.

Durante la fermentación se forman CO<sub>2</sub> y alcohol, ácidos orgánicos y otros metabolitos que contribuyen al aroma del pan, la regulación del pH es particularmente importante para asegurar una fermentación óptima, buena manejabilidad y aroma. Se requiere un pH de 4.5 a 5.2 en la pre-fermentación, esto se logra con sustancias como sales minerales, leche en polvo y harina.

La levadura, azúcar, sal y alimento para levaduras se disuelven a suspenden en una parte del agua en un tanque. El agua restante y algunas veces la harina se añade al tanque de mezclado. Desde allí el líquido pre-fermentado es bombeado a uno o dos tanques de fermentación a una temperatura de 21 a 31 °C la temperatura puede elevarse de 2 a 5 °C durante la fermentación. El líquido es agitado lentamente para prevenir la formación de espuma después del periodo deseado de fermentación se enfría a 8 a 10 °C y se mantienen refrigerado hasta su uso.

Su propósito es básicamente la activación de la levadura y su aclimatación al substrato con el 2% de azúcar se requiere una fermentación de 1 hora y 10 minutos y un poco de harina.

Después del mezclado sigue la fermentación de toda la pasta, esta se divide en dos partes, esto permite un periodo de descanso, y se le coloca en moldes para su horneado.

4) Horneado.- Finalmente la masa se hornea, esta operación es la fase intensiva que convierte la

masa en un producto firme, además de la formación de sustancias aromáticas. En esta fase el gas se expande por el calor y causa un incremento de hasta el 40 % del área superficial

#### 14.1.5.1 CAMBIOS FÍSICO QUÍMICOS DURANTE EL HORNEADO

- 1) Zona de actividad enzimática activa con una temperatura de 30 a 60 °C
- 2) Zona de gelatinización del almidón con una temperatura de 50 a 60 °C
- 3) Zona de evaporación de agua
- 4) Zona de dorado y formación del aroma más de 100°C

Durante la primera fase la temperatura no excede de 45 °C, la fermentación por levaduras continua al igual que la formación de CO<sub>2</sub>, la actividad enzimática incrementa con la temperatura afectando la fermentación. La expansión del CO<sub>2</sub> con la temperatura causa un levantamiento adicional. A temperaturas mayores de 50 grados la actividad enzimática disminuye y finalmente las levaduras mueren, sin embargo la actividad de las amilasas continua hasta una temperatura de 50-60 °C

En la costra la temperatura sobrepasa los 100°C, con la perdida total de la humedad, el almidón se degrada no-enzimáticamente a dextrinas y se forman productos caramelizados, se forman aromas, las proteínas se degradan a aminoácidos y reaccionan con azúcares para formar pigmentos oscuros (Reacciones de Maillard), estos compuestos son los responsables del color y sabor de la costra.

Durante la fermentación se forman ácidos orgánicos, aminoácidos y alcoholes. Las sustancias volátiles escapan durante el horneado y las menos volátiles se utilizan para reacciones químicas uno de los compuestos más importante son el ácido acético y láctico.

14.2 PRODUCCION DE QUESOS

14.2.1 Introducción

No existe evidencia que puede llevar al origen de la producción de quesos. Se cree que los rudimentos de la producción de quesos se originó en el medio este, con la gente que habitaba el valle del Tigris y Eufrates, y que más tarde emigró y se diseminó por Europa y Asia, probablemente esta gente era nómada que se movían en busca de pastura y agua para su ganado, la leche de este ganado era parte integral de su alimentación. Llevaban el agua en los bolsos de estómagos y piel de animales y es posible que también otros fluidos como la leche. Probablemente hubo una combinación de factores los que llevaron al descubrimiento de la producción de quesos, la flora natural del estómago, la renina presente en la pared celular de los estómagos y la temperatura adecuada. Después de su descubrimiento la propagación de esta forma de conservación de la leche fue rápida por todo el centro y sur de Asia, y la parte norte del mediterráneo.

Antiguos escritos que datan del año 2000 a.C. muestran evidencia de del uso del queso como mercancía de trueque. En el Antiguo Testamento en la Biblia, existen referencias al queso como artículo de consumo humano. Durante las guerras y después de una conquista las tropas de Genghis Khan llevaban queso como parte de su ración.

Los Romanos fueron quienes revolucionaron el arte de la producción de quesos, con la expansión romana, este arte se expandió hacia otras regiones especialmente, Galia, lo que hoy es Francia, y Suiza donde tomó la gran variedad que hoy tiene, por ejemplo las primeras variedades de queso Emmenthal se desarrollaron por el año 58 d.C. como consecuencia de las incursiones romanas en las regiones alpinas. Con la conquista romana de Inglaterra, el queso se convirtió en un producto de comercio entre los años 100 y 300 d.C. Con el paso del tiempo el arte y la ciencia de la producción de quesos se preservó y nutrió en los monasterios de Europa.

Después del descubrimiento de América los inmigrantes llevaron consigo este arte, la primera fábrica de quesos se estableció en el año de 1851 en Nueva York.

#### 14.2.2 Definición

En términos simples el queso puede ser definido como la cuajada sólida de leche, la cuajada está hecha estructuralmente de la caseína coagulada de la leche, la cual atrapa la mayor parte de la grasa de la leche y una parte del suero de la leche y otros constituyentes que se solubilizan en él.

Una definición más completa del queso podría ser: El queso es la cuajada sólida, que se consume moderada o extremadamente modificada por la introducción de diferentes microorganismos y/o aditivos, ya sea o no madurado.

Con unas pocas excepciones los quesos son producidos por la fermentación microbiana. La fermentación involucrada no solo involucra las diferentes variedades de quesos sino ayuda a la consolidación de la cuajada hasta un nivel deseado de humedad, contribuyendo al cuerpo, textura, color y sabor del producto terminado.

#### 14.2.3 Principios de preservación que se usan en la producción de queso

Básicamente los principios de preservación que se usan en la producción de queso son los siguientes:

A. Remoción de la cantidad de agua presente.- En la manufactura del queso solo una parte de la humedad total se retira del producto en forma de suero, durante el madurado y añejamiento se retira una mayor cantidad. Con los propósitos de la conservación del producto por un mayor tiempo y la reducción del espacio que ocupa la materia prima.

B. Reducción de la concentración de oxígeno disponible.- La habilidad de los microorganismos para metabolizar y multiplicarse está en parte determinada por el potencial del sustrato de oxidación. La reducción o exclusión del oxígeno en parte o totalmente



#### 14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

---

ejerce un efecto de control sobre el crecimiento de los microorganismos y también de selección sobre el crecimiento de los microorganismos seleccionados.

C. Adición de preservativos naturales.- El aditivo natural más común es el cloruro de sodio, sus efectos en el queso son principalmente tres:

- Contribuye al sabor propio
- Incrementa notablemente los sabores sutiles del propio queso
- En algunos quesos es el principal factor de preservación del queso

La naturaleza inhibitoria de la sal se debe principalmente a la reducción de la actividad de agua, debido a que la sal se ioniza en solución e incrementa la presión osmótica del sistema.

D. Aplicación de calor.- El simple calentamiento es uno de los más efectivos métodos de control de microorganismos y deterioro de la actividad enzimática, en la manufactura de los quesos, un paso necesario es un tratamiento térmico o pasteurización, que puede destruir los microorganismos patogénicos y la microflora e inactiva parcialmente la actividad enzimática de la leche.

E. Reducción del pH.- La mayoría de los quesos así como otros productos lácteos tienen un pH de 5.3 o menor, y si además se acompaña de la reducción de actividad de agua, estos efectos se pueden combinar para controlar el crecimiento de microorganismo patógenos y el esporulamiento de bacterias, sin embargo los hongos son más resistentes a este medio. La reducción del pH se debe básicamente a la fermentación de la lactosa, para convertirla en ácido láctico que facilita la formación de la cuajada, la expulsión de la humedad, ayudando también a desarrollar el aroma y sabor del producto.

F. Fermentación usando cultivo seleccionados.- El crecimiento de microorganismos seleccionados hace que se inhiba el crecimiento de microorganismos que compiten por los mismos recursos, favoreciendo las condiciones de crecimiento de los cultivos seleccionados.

G. Uso de compuestos directamente usados por los microorganismos - Los microorganismos requieren de una fuente de carbón, una fuente de nitrógeno y una fuente de

minerales para un crecimiento normal, el uso de esta fuente de carbono es el objetivo de los microorganismos debido a la necesidad de energía para los mecanismos de síntesis. Con la fermentación la lactosa disponible disminuye y finalmente con la pérdida del suero se pierde lo que quedó de lactosa dejando el medio sin una fuente de carbón disponible para los microorganismos

H Ahumado - El ahumado de algunos quesos tiene dos beneficios:

- Le da características de sabor
- Ayuda a preservar la alta calidad del queso.

El ahumado causa varios grados de secado dependiendo de la cantidad de tiempo, humedad relativa y temperatura del cuarto de ahumado, algunos ahumados depositan sustancias antimicrobianas como fenoles y compuestos de aldehídos.

El ahumado natural se hace colgando los quesos en el interior de un cuarto de ahumado, para ahumar se utilizan maderas de maple que al quemarse producen un sabor especial.

#### 14.2.4 Enzimas usadas en la producción de queso

La enzima que más se usa en la producción de quesos es la renina, la renina cruda es una mezcla de enzimas que se extraen del cuarto estómago de un ternero, esta compuesto principalmente de una enzima llamada quimosina y pepsina bovina, que presentan una fuerte actividad proteolítica a un bajo pH.

En la actualidad esta enzima se produce por otras vías que la extracción de su fuente natural, la renina comercial se compone de mezclas de renina bovina y pepsina porcina y otras enzimas aunque no siempre conservando las mismas características.

El desarrollo de la genética ha permitido la clonación de renina en microorganismos que la producen de manera eficiente y de bajo costo, las reninas más comerciales provenientes de microorganismos son de *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* y *Endothia parasitica*

#### 14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

---

El mecanismo de coagulación de la leche consiste en el desdoblamiento de la fracción proteica, que desestabiliza la kapa-caseína y sensibiliza a las micelas de caseínas a la presencia de iones de calcio. En presencia de los iones de calcio libres la suspensión coloidal de calcio se precipita. La presencia de enzimas que precipiten las fracciones de alfa y beta caseína no es deseable, así como tampoco la presencia externa de lipasas.

También se han usado otras enzimas, estas enzimas son derivadas de las glándulas pregastricas de corderos y otros animales.

##### 14.2.5 Microorganismos usados

Es uno de los factores más importantes en la variedad de los quesos, sobre por todo la formación de sabores y olores propios de las variedades.

✓ Cuando cuajada se cocina a altas temperaturas (aprox 40 °C) se utilizan microorganismos termoresistentes y termofílicos como *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* o *bulgaricus* y en algunos casos *Lactobacillus lactis*.

✓ Cuando se utilizan temperaturas menores a los cuarenta grados se pueden utilizar *Streptococcus lactis* y *cremoris*.

✓ Algunos quesos se caracterizan por la formación de ojos en el interior de los quesos, como el Gruyere y el Samsøe, las bacterias involucradas en la formación de ojos son del género *Propionibacterium* particularmente *Propionibacterium freudenreichii*.

✓ Otras clases de quesos como el Gouda que tienen una pequeña formación de gas, principalmente dióxido de carbono producido por bacterias heterofermentativas como *Leuconostoc cremoris* y *Streptococcus lactis* y *Diacetylactis*.

✓ Los quesos madurados con desarrollo de hongos como el Roquefort, Azul y el Gorgonzola, que poseen el color característico azul, textura relativamente abierta y un sabor especial, debido a la presencia de hongos, para que estos puedan crecer se utilizan bacterias que promuevan el rompimiento por el gas producido, de la estructura, para esto se utilizan *Leuconostoc cremois*, *S. lactis*, y en algunas ocasiones se realiza un picado para promover la difusión del aire. El

hongo usado en estos quesos es el *Penicillium roqueforti*, que produce las características antes mencionadas mediante la oxidación de los ácidos grasos y los convierte en cetonas.

✓ Otro tipo de quesos es el que requiere de una maduración externa, de la flora superficial para proporcionar cuerpo y sabor, como es el caso del Camembert, Brie, Coulommiers, en estos casos la formación de la cuajada se hace basándose en la acidificación de la leche por los microorganismos y con una pequeña cantidad de renina, la flora superficial dominante está compuesta de hongos como el *Penicillium camemberti*, *P. caseicolum*, *P. candidum* y *P. album*, el hongo se añade a esta clase de quesos en la salmuera o rociando una suspensión en la superficie del queso para asegurar un crecimiento rápido, por ejemplo el queso Camembert que tiene un cuerpo suave una textura cremosa y un sabor delicado, se madura desde el exterior hacia el interior por las enzimas que secreta el hongo y que se difunden dentro del queso, por esta razón este queso tiene un radio y un espesor crítico y su sabor, descrito como de champiñones y ligeramente a fruta, es más pronunciado cerca de donde crece el hongo.

✓ Los quesos Brik, Limburger representan los quesos que son madurados internamente por bacterias y externamente por flora que es una mezcla de levaduras micrococcos y *Brevibacterium linens* que generalmente se inocula desde antiguos cultivos, la liberación de compuestos sulfhidrilos, de amoníaco y una ligera lipólisis que le dan su sabor característico.

#### 14.2.6 Clasificación de quesos

Existe una gran variedad de quesos y sería difícil clasificarlos completamente, a continuación se presenta un resumen de la variedad de quesos

##### 1. Quesos suaves (50 a 80 % de humedad)

###### a) Quesos no madurados- con bajo contenido de grasa

Cottage      Baker's

Quark

###### b) Quesos no madurados con alto contenido de grasa

Queso crema      Neufchatel

#### 14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

---

c) Quesos no madurados de tamaño pequeño

Mozzarella                  Scamorze

d) Quesos madurados con crecimiento externo de hongos

Camembert                  Brie

e) Quesos madurados por fermentación bacteriana

Kochkäse                  Caciotta

Handhäse

f) Quesos curados con sal

Feta-Griego                  Domiati-Egipcio

g) Quesos de superficie madurada

Liederkranz

2. Quesos semi-suaves (39-50% de humedad)

a) Quesos madurados por crecimiento interno de hongos

Azul                  Roquefort

Gorgonzola

b) Quesos de superficie madurada por bacterias y levaduras

Limburger                  Brick

Trappist                  Port du Salut, St. Paulin

Oka

c) Quesos madurados principalmente por fermentación bacteriana pero con algún crecimiento superficial

Münster                  Tilsiter

Bel Paesa

d) Quesos madurados internamente por fermentación bacteriana

Provolone                  Mozzarella de baja humedad

3. Quesos Duros (máximo 39% de humedad)

a) Quesos madurados internamente por fermentación bacteriana

Cheddar                      Caciocavallo  
Colby

b) Quesos madurados por fermentación bacteriana con la producción de CO<sub>2</sub> que resulta en la formación de ojos

Emmental                      Gruyere  
Gouda                          Edam  
Samsøe

c) Quesos madurados internamente con el crecimiento de hongos

Stilton

4. Quesos muy duros (máximo 34 % de humedad)

Asiago viejo                      Parmesano  
Romano                          Sardo  
Grana

5. Quesos del suero

a) Producto de la desnaturalización por calor y por ácido, de las proteínas de suero

Ricotta (60% de humedad)

b) Quesos de la condensación del suero por calor y evaporación del agua

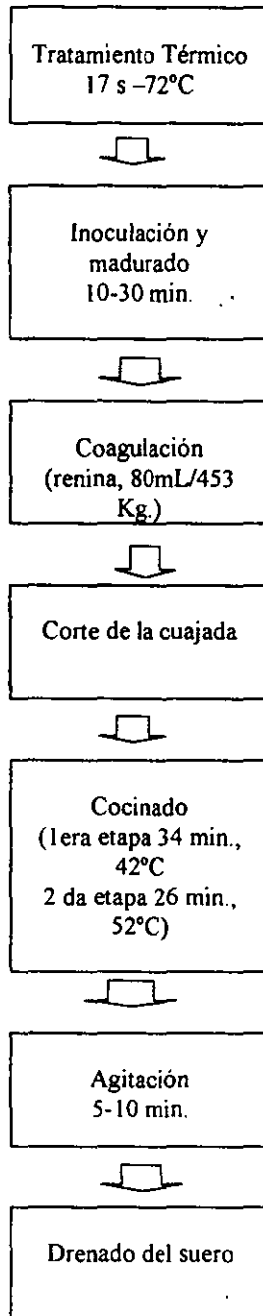
Gjetost (13 % de humedad)    Myost (13-18% de humedad)

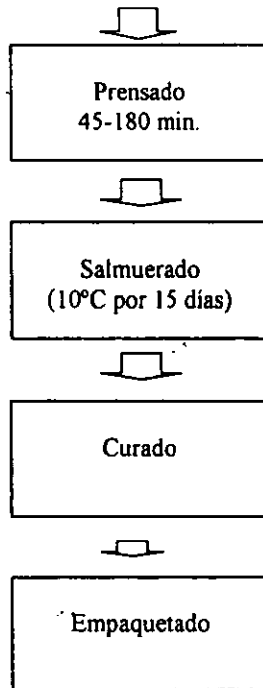
6. Quesos con especias

Alcaravea, con semillas de alcaravea                      Noekkelost.- con clavo y comino  
Kuminost.- Comino, y semillas de alcaravea                      Sapsago.- clavo

Como ejemplo de producción de un queso se toma al queso Parmesano, en este caso el proceso que se sigue es el siguiente:

14.2.7 Producción de queso parmesano





### 14.3 PRODUCTOS LACTEOS FERMENTADOS

#### 14.3.1 Introducción

Una de las practicas más antiguas del hombre es la fermentación ácida de la leche para la obtención de un producto de características particulares de sabor, olor y consistencia, los cuales se pueden mantener igual por un periodo largo de tiempo. Este tipo de productos se pueden encontrar por todo el mundo en una gran variedad de tipos, los cuales difieren en el origen de la leche, los microorganismos utilizados y la tecnología de producción.

Además, los elementos como la geografía, ecología, dieta y estructura social en las diferentes áreas es un reflejo de los tipos de productos finales dificultando una buena clasificación general de la leche fermentadas.



## 14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

---

Las leches fermentadas son productos lácteos que tienen propiedades especiales ligadas con la existencia de flora microbiana específica y activa y la presencia de sustancias que resultan del metabolismo de esos microorganismos, la microflora láctica responsable de la fermentación, debe ser razonablemente abundante en el momento de consumir el producto.

Sin embargo la fermentación no puede ser considerada el resultado de la acción de enzimas que son producidas por separado y luego añadidas a la leche, sino el exclusivo resultado de la presencia y crecimiento “*in situ*” de los microorganismos específicos, por lo tanto debe cuidarse la fermentación para evitar fermentaciones incontroladas y no deseables. En cada caso la fermentación no es limitada a un solo microorganismo y puede involucrar varias especies asociadas en diferentes vías.

### 14.3.2 Tipos de productos fermentados

- a) Productos muy ácidos (yogur)
- b) Productos ligeramente ácidos (leche cultivada)
- c) Productos ácido-alcohólicos (Kefir)
- d) Productos ligeramente ácidos y densos (Long milk y viiii)
- e) Productos que se pueden mantener por largo tiempo (lebneh)

#### 14.3.2.1 PRODUCTOS MUY ÁCIDOS

A) Yogur.- Es una leche fermentada a 40-45 °C con la intervención de cultivos lácticos específicos. La acidez normal del producto varía de .7 a 1.1 % de ácido láctico, un pH de 4.0 a 4.2. La producción técnica puede dividirse en dos tipos el tipo de fermentación y coagulación en el mismo recipiente y el tipo agitado con la estructura rota, que se obtienen de la fermentación en un tanque en el que el gel puede ser muy firme y después ser agitado al ser transportado el cual posteriormente retoma parte de su estructura. Este yogur puede ser suave, ligero y fresco de sabor ácido.

Las variaciones del yogur tradicionales son el yogur líquido, con fruta, saborizado, congelado, deshidratado, bajo en lactosa y bajo en calorías.

#### 14. ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

□ El yogur fluido puede ser considerado un yogur donde la estructura ha sido rota, con baja viscosidad al principio de la fermentación, la cantidad de sólidos totales debe ser aproximadamente 1% sin embargo la técnica tradicional recomienda mezclar yogur y agua en partes iguales con fruta picada, jalea y azúcar o saborizantes artificiales.

□ El yogur congelado tiene la apariencia de helado pero es similar al yogur en su composición química, para lograr una textura uniforme se debe utilizar un congelado rápido para evitar la formación de trozos de hielo.

□ De acuerdo con una antigua tradición el yogur deshidratado se obtiene en el medio este, es secado al sol, particularmente durante el verano, el yogur bajo en lactosa es un producto de larga duración, obtenido por la hidrólisis de lactosa con B-D-galactosidasa. El yogur bajo en calorías se obtienen con leche descremada y reduce de 250 a 300 kJ/100 gramos

**Leche acidófila.**- Es una leche fermentada producida por la intervención de un microorganismo termoestable que crece lentamente a 37-38°C llega a producir hasta .60-.70 g/100 mL de ácido láctico, su sabor es muy distintivo y no muy popular entre los europeos, su mérito es que fue uno de los primeros productos de las leches fermentadas debido a que los microorganismos responsables de la fermentación de la leche colonizan fácilmente la leche y tiene efectos benéficos en el intestino humano.

##### 14.3.2.2 PRODUCTOS LIGERAMENTE ÁCIDOS

B) **Leche cultivada.**- Es una leche fermentada producida por la acidificación láctica, la fermentación se realiza a 20°C y se obtiene una acidez baja según el Codex Alimentarius Austriacus la definición de este producto es: “ un producto ligeramente ácido de sabor y que contiene de .45 a .90 g ácido láctico por 100 gramos”, productos similares en este grupo son las mantequillas y cremas ácidas.

La mantequilla ácida, es el producto que resulta después del batido de la crema, del cual sale suero y que es sujeta a una fermentación láctica similar a la leche cultivada, la fermentación usualmente se lleva a cabo en grandes cantidades a 20 °C y en la mayoría de los casos con la

#### 14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

adición sabor. La acidez final generalmente es fijada entre .6 y .8 de ácido láctico por 100 gramos.

##### **14.3.2.3 PRODUCTOS ÁCIDO ALCOHOLICOS**

C) Kefir.- De las leches ácido-alcohólicas es la más conocida, tiene un alto consumo en Rusia, es producida por la fermentación alcohólica y ácida de un complejo de bacterias mesófilas y levaduras que forman un aglomerado llamado grano de Kefir. Generalmente tiene .6 a .9 gramos de ácido láctico y .2 a .8 % de etanol. Se prepara a una temperatura aproximada de 20 °C y en su estado natural tiene una consistencia similar a la de la crema pero al mismo tiempo es espumosa y efervescente debido a la producción de CO<sub>2</sub>. En Rusia su consumo esta asociado a su fuerte poder probiotico y en muchos casos a su propiedad terapéutica, particularmente cuando se consume fresco.

Kumis.- Es similar al Kefir excepto por la leche que se usa, es más alcohólica que el kefir su % varia de 1 a 2.5 %, la apariencia fisica es inusual debido al tipo de leche que tiene un bajo nivel de caseína, lo que produce una cuajada débil, en Rusia se usa terapéuticamente.

##### **14.3.2.4 PRODUCTOS QUE SE PUEDEN MANTENER POR LARGO TIEMPO**

E) Labneh.- Puede ser tomado como un ejemplo de producto fermentado que ha perdido parte del suero y que puede ser mantenido por un largo periodo de tiempo. Es un producto típico de las poblaciones árabes y es obtenido por la interacción en la leche de vaca de bacterias termófilas lácticas y levaduras. Después de la fermentación el suero se escurre y se sala el producto, la crema resultante, tipo queso se le da forma de bolas de aproximadamente 3 cm de diámetro y luego mantenidos en aceite por más de un año, el producto final contiene aproximadamente 53 % de humedad y 43 % de grasa y un pH de 3.58 a 3.68

Queso cottage.- Es un producto cremoso de leche coagulada por una microflora láctica mesofila con la ayuda de una pequeña cantidad de renina. La cuajada se hacen en un cubo se sala ligeramente y se mezcla con crema, el producto es ligeramente ácido, agradablemente salado con un sabor y aroma muy similar a la leche cultivada.

## 14.3.3 Microorganismos utilizados

De acuerdo a las investigaciones realizadas los microorganismos más utilizados en el yogur son:

- a) Lactobacilos termófilos que realizan fermentaciones homolácticas

*Lactobacillus bulgaricus*, *L. lactis*, *L. leichmannii*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. jugurti*,  
*L. acidophilus*

- b) Lactobacilos mesófilos que realizan fermentaciones homolácticas

*Lactobacillus casei*, *L. pseudoplantarum*, *L. ramosus*, *L. fusiformis*, *L. tolerans*, *L. plantarum* y *L. curvatus*

- c) Lactobacilos, bacterias que realizan fermentaciones heterolácticas

*Lactobacillus fermentum*, *L. cellobiosus*, *L. brevis*, *L. hilgardii*, *L. vermiformis*, *L. reuteri*

- d) *Streptococcus thermophilus*, *S. faecium*, *L. lactis*, *L. cremoris*

- e) *Leuconostoc cremoris*, *L. mesenteroides*, *L. dextranicum*, *L. lactis*

Específicamente se utilizan dos especies bien definidas de bacterias lácticas termófilas: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, las dos especies son usadas juntas por varias razones tecnológicas como la velocidad de acidificación, consistencia, cantidad de ácido láctico producido e intensidad de sabor, la primera especie se encuentra frecuentemente en la leche y los productos lácteos por lo que deben ser sujetos a pasteurización o tratamiento a altas temperaturas para evitar acidificaciones espontáneas fuera de control, también se puede encontrar en el intestino, mientras que es muy raro en otros nichos ecológicos, su temperatura óptima es de 38 a 45 °C pero puede crecer a 50 °C pero no por debajo de los 15°C, crece rápidamente a un pH de 5.5 pero su reproducción se detiene a un pH 4.2. Mientras que la segunda especie tiene un crecimiento óptimo entre 42 y 45 °C al mezclarse estos cultivos generalmente el primero tiene a dominar y posteriormente el segundo desaparece.

Para las leches ligeramente ácidas la microflora relevante son streptococos mesofílicos como:

#### 14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

---

- a) *Streptococcus lactis*, su temperatura óptima es de 30 °C y la mínima de 10 °C esta especie frecuentemente contamina la leche y se encuentra libre en productos lácteos
- b) *Streptococcus cremoris* su temperatura óptima esta entre los 28 y 30 °C mínima de 10 °C y máxima de 38 °C no es termoresistente, es un contaminante común de la leche
- d) *Leuconostoc cremoris* son bacterias capaces de realizar fermentaciones heterolácticas su temperatura optima es de 20 a 25 °C mínima de 10 °C y máxima de 38°C, es un microorganismo facultativo pero prefiere las condiciones anaerobias se le puede encontrar en la leche y sus derivados.

Long milk.- La microflora de estos productos consiste en Streptococos mesofilicos como *Streptococcus* y *Leuconostoc* sinembargo difieren de los productos anteriores por sus propiedades que lo hacen más espeso.

Kefir.- Todavía en la actualidad se desconoce gran parte de la microflora, para su producción se utilizan granos de Kefir que son de forma irregular, entre los microorganismos que se han encontrado están: *Streptococcus lactis* y *Lactobacillus bulgaricus* en unión con levaduras capaces de fermentar la lactosa.

Leches fermentadas de larga duración.- Están caracterizado por el desarrollo de microflora mixta por la asociación de *Streptococcus thermophilus* y *Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus acidophilus* y levaduras que pueden ser identificadas como *Kluyveromyces fragilis* y *Saccharomyces cerevisiae* y *S. diacetylactis*.

#### 14.3.4 Producción

Basicamente se realizan los siguiente pasos

- a) Selección de la leche
- b) Estandarización
- c) Tratamiento térmico
- d) Homogeneización

- e) Adición del inóculo
- f) Incubación
- g) Enfriamiento
- h) Envasado y comercialización

**Selección de la leche.-** La leche se selecciona por características como que este libre de patógenos, y que no provenga de animales que tengan mastitis, que no contenga malos olores o sabores originalmente presentes o que se originen por el subsecuente crecimiento de bacterias que tienen una acción altamente proteolítica y lipolítica, la leche en cuestión también debe tener una gran cantidad de proteínas que tienen un efecto positivo en la consistencia del yogur y mantienen un alto valor nutritivo del producto, además la leche debe estar libres de antibióticos, derivados del tratamiento de mastitis o del crecimiento de bacterias que producen antibióticos.

**Estandarización.-** El contenido de la grasa en la leche se estandariza, con fines primeramente económicos, cualitativos y legislativos, entre mayor grasa tenga la leche, mejor consistencia y sabor tendrá el yogur, si se tienen menos grasa se puede compensar con sólidos no grasos, la homogeneización de la grasa tiene un efecto positivo.

Para incrementar la cantidad de sólidos no grasos se utilizan los siguientes métodos:

- **Evaporación.-** Normalmente se evapora del 10 al 20 % de agua lo que corresponde a un incremento del 1.5 % a 2.5% en sólidos.
- **Adición de leche en polvo sin grasa.-** La adición de .5 a 2.5 % es suficiente.
- **Adición de leche concentrada.**

El método que tiene un mayor efecto en la calidad es la evaporación, el uso de leche en polvo se debe tener en cuenta la solubilidad, color y homogeneidad del producto, la leche en polvo cuando no se disuelve bien da un sabor arenoso que no es muy agradable y popular.

#### 14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

No es muy recomendable aumentar mucho la cantidad de sólidos totales pues produce una textura granosa y un sabor salado, con un incremento en el pH, requiriendo una mayor producción de ácido láctico para obtener una buena coagulación.

Tratamiento térmico.- Normalmente se mantiene la leche a 80-90 °C por 20 a 30 minutos para:

- 1.- Destruir las bacterias patógenas y otras indeseables, no esporuladas
- 2.- Mejorar a la leche como sustrato de crecimiento de cultivos ácidos resultado de la desnaturalización de albúmina y otras proteínas solubles, la formación de sulfhidrilos y dipeptidos, la liberación de aminoácidos y otros factores que contribuyen al crecimiento y reducción del potencial redox y la eliminación de sustancias inhibitorias
- 3.- Dar consistencia al producto y reducir la separación del suero que resulta de la desnaturalización del producto.

Un resultado de los cambios más importantes se dan en la siguiente

Cuadro 14.1 Cambios importantes en la producción de yogurt

Componente	Efectos bioquímicos	Efecto en la producción del yogurt
a) Microorganismos	Destrucción	Reducción de efectos microbiológicos
b) Enzimas	Destrucción	Reducción del sabor amargo y la tendencia a la rancidez
c) Proteínas del suero	Destrucción de inmunoglobulinas Formación de grupos SH activos Interacción entre alfa-lactoalbumina y beta-globulina. Interacción entre beta- y Kapa caseína	Reducción de la capacidad cremosa, del sabor a cocido, Alta estabilidad del gel Menor sinéresis y alta estabilidad del gel.
d) caseína	Hidrólisis parcial y menor fósforo	Ligero incremento en aminoácidos libres y mejor crecimiento del inóculo
e) Lactosa	Descomposición con la formación de ac. fórmico, furfural e hidroximetilfurfural	Mejor crecimiento del inóculo y mejor sabor
f) Grasa	Formación de lactonas y metilcetonas	Mejor sabor
g) Vitaminas	Reducción de vitamina C, B, B6, B12	Menor valor nutricional

---

h)Minerales	y ac. fólico. Redistribución de partículas solubles y coloidales de Ca y Mg.	Menor tiempo para la coagulación y disminución del pH
-------------	--	--

---

Vittorio Bottazzi 1983

Homogeneización.- Cuando es utilizada una alta temperatura de tratamiento la homogeneización de la grasa es indispensable, previene la formación de agregados de la grasa y combinado con la alta temperatura da consistencia al producto optimiza la estabilidad y reduce la sinerisis durante el almacenamiento, los mejores resultados se obtienen con una homogeneización a 100- 200 Kg/cm<sup>2</sup> a 50-60 °C seguido por un tratamiento a 85 °C por 30 minutos. Este efecto es atribuido por el incremento del número de glóbulos, la forma de membranas de caseína y la liberación de fosfolípidos resultante del espumado y un incremento en la viscosidad.

Los fosfolípidos libres actúan como antioxidantes y reducen el sabor a oxidado y el menor diámetro de los glóbulos tienen un efecto blanqueador en la leche, además de que destruye los agregados de caseína.

Adición del inóculo.- El inóculo son los microorganismos que se utilizan en la fermentación, para conseguir los mejores resultados estos solo deben ser los microorganismos adecuados, para la preparación de cultivos se siguen estos pasos:

I.- Cultivo maestro, es un cultivo comercial proveído por laboratorios que puede estar liofilizado o en nitrógeno líquido.

II.- Cultivo Madre.- Es un cultivo en leche obtenido del cultivo maestro.

III.- Cultivo intermediario.- Este cultivo se obtiene en grandes cantidades del cultivo madre, para esta etapa el cultivo ya se ha adaptado y se encuentra en óptimas condiciones

IV.- Cultivo de uso.- Es el cultivo que se usa directamente en la producción, generalmente este cultivo se queda en el producto y no se recoge.



#### 14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

---

Incubación - Los tanques donde se realiza la fermentación deben estar completamente aislados y equipados con aparatos de chequeo si la fermentación ocurre a 19-20 °C la variación de la temperatura no debe ser mayor de .25 °C al principio y de 1.0 a 1.5 °C hacia el final de la fermentación.

Enfriamiento.- Cuando la fermentación se termina se procede al enfriamiento, el objetivo es reducir la actividad metabólica es para controlar la acidez del producto e iniciar el proceso de gelificación de la cuajada.

La selección del momento de enfriamiento es un punto crítico en la producción, si se realiza antes de tiempo, se obtiene un sabor débil, y pobre consistencia y la posible separación del suero, si se realiza tarde el sabor puede ser amargo o excesivamente ácido. El momento más apropiado para enfriar es cuando el pH es de 4.70 a 4.50. Si el enfriamiento es lento el yogur sufre supermaduración y muy rápidamente se contrae la cuajada.

Envasado y comercialización.- Una vez enfriado el producto se puede envasar en recipientes asépticos generalmente de plástico, varios de los tipos de leches fermentadas pueden considerarse como alimentos no perecederos, sin embargo como el ácido láctico tiene un efecto inmediatamente estabilizador y preservador, el olor, sabor, consistencia y en general las características físicas se alcanzan en un óptimo de 24 a 40 horas después de la finalización de la fermentación láctica, conforme el tiempo pasa las características del producto tienden a deteriorarse por la propia acción de las enzimas que proviene de las bacterias ácido lácticas del cultivo. Esta actividad puede ser detenida por la conservación apropiada a bajas temperaturas, la mayoría de las leches fermentadas pueden durar 20 días a temperaturas de 4 a 5 °C sin cambios apreciables en la calidad.

##### 14.3.5 Contaminación

Puede ocurrir la infección por bacteriofagos o levaduras, hongos y bacterias heterolacticas y también se puede presentar contaminación por metales La infección por bacteriofagos es más común entre fermentaciones a bajas temperaturas Hongos y levaduras crecen fácilmente

cambiando el sabor y calidad, los puntos de contaminación están en la preparación de la leche o en la adición de frutas o en el envasado. La contaminación por hierro y cobre causa cambios en el sabor haciéndolo metálico u oxidado.

#### 14.3.6 Productos del metabolismo

Una de las partes más interesantes de estos productos son la acumulación de metabolitos en la leche, algunos de los cuales son importantes debido al mantenimiento y desarrollo de las asociaciones bacterianas y la inhibición del crecimiento de microorganismos indeseables, también optimiza la digestión y aumenta las propiedades nutritivas del producto, los metabolitos producidos en las leches fermentadas se pueden dividir en tres grupos:

- a) Metabolitos que tienen una acción antibiótica y/o bactericida
- b) Metabolitos que actúan como reguladores del desarrollo de microorganismos
- c) Metabolitos con efectos probióticos y terapéuticos

a) Hay varios metabolitos que tienen actividad antibiótica, produciendo compuestos de bajo peso molecular algunos de ellos son:

nisina de *S. lactis*                      lactolina de *L. plantarum*    ácidofilina de *L. acidophilus*

lactobrevina de *L. brevis*      bulgicana de *L. bulgaricus*

b) El ácido láctico es el metabolito más abundante y regula el crecimiento de los microorganismos, también el ac. acético que limita el crecimiento de microorganismos indeseables, el peróxido de hidrogeno inhibe la contaminación bacteriana en el almacenamiento y ayuda a bajar progresivamente la presencia de bacterias ácido lácticas.

c) El consumo de bacterias lácticas producen la acumulación de metabolitos capaces de inhibir el crecimiento de bacterias indeseables, con un beneficio en la digestión al estimular las funciones intestinales y de que varias especies de bacterias lácticas son capaces de adaptarse y crecer en el intestino modulando el crecimiento de otras bacterias y creando condiciones de equilibrio. Además la producción de ácidos orgánicos, causa acciones preventivas en la

#### 14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

---

acumulación de colesterol. La presencia de algunas sustancias de la pared celular de *L. bulgaricus* determinan acciones anticancerígenas contra tumores de Ehrlich y sarcomas. Además de que los ácidos inhiben el crecimiento de bacterias Gram negativas y patógenas. Algunas enzimas intervienen en la disociación de ácido biliar, la degradación de nitrosaminas, Hidrólisis de lactosa, la producción *in situ* de enzimas capaces de hidrolizar compuestos de la dieta que permite un uso más completo de los alimentos, además de que puede recubrir la pared intestinal protegiendo de ataques de otras bacterias.

##### 14.3.7 Cambios bioquímicos

El aroma del yogur es producido por compuestos carbonilos incluyendo el acetaldehído, acetona, acetoina, y diacetilo. Las proteínas y los lípidos se hidrolizados lo que hace que su digestión se vea mejorada, por ejemplo un volumen de yogur es digerido en una hora y un volumen igual de leche requiere de tres horas, aproximadamente el 15% de las proteínas de la leche permanecen sin digerir y se pueden encontrar en forma de pequeñas partículas.

Durante la producción del yogur los aminoácidos son liberados y el porcentaje de aminoácidos libres es mucho mayor que en la leche, se pueden encontrar todos los aminoácidos con excepción de la arginina y la cisteína. La histidina, serina, prolina, leucina, tirosina, y ácido glutámico son particularmente abundantes. La actividad lipolítica que presenta se atribuye exclusivamente a las enzimas lipolíticas del cultivo, en el yogur los ac. grasos libres son los compuestos volátiles aromáticos.

#### 14.4 FERMENTACIÓN LÁCTICA DE HORTALIZAS

##### 14.4.1 Introducción

Históricamente la fermentación de hortalizas como la col y los pepinillos tienen su origen en el lejano oeste, particularmente en China y la India. Como civilizaciones que empezaron a desarrollarse y expandirse en nuevos hemisferios, el arte de usar las

fermentaciones lácticas se arraigó firmemente como el método ideal para preservarlas.

El uso de estas fermentaciones se ha perpetuado debido a las propiedades de sabor único y distintivo, además de que permite almacenar largos periodos de tiempo sin implicaciones serias en la calidad física y nutricional del producto, además de que se puede fermentar una gran variedad de productos como frijoles verdes, remolacha, col de Bruselas, zanahorias, coliflor, apio, pepinillos, aceitunas, cebollas, tomates, rábanos, etc, aun cuando solo unos cuantos se producen industrialmente.

14.4.2 Producción de col, fermentada





Los tanques de fermentación tradicionalmente son de madera pero pueden hacerse de otros materiales, para mantener condiciones anaerobias se rellena de líquido que puede ser agua o salmuera, en caso de no producir las decoloración y daños en la textura.

Se puede aprovechar la microflora natural de la col fresca que por lo general contienen *Pseudomonas*, *Flavobacterium* spp, *Acetobacter* hongos y levaduras oxidativas.

Las bacterias lácticas responsables de la fermentación heteroláctica son *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus brevis* del cual el primero es el más prominente y activo en la fase inicial de la fermentación, el pH va de 6.2 a 4.2 después de 48 horas de iniciada la fermentación y puede llegar hasta 3.7 después de este tiempo. La temperatura debe estar a 21 °C, si excede de 30 °C se nota un deterioro en el color y la textura y el sabor resultado del predominio de especies heterolácticas.

Los cambios en la composición de ácidos durante la fermentación se atribuye a las diferentes vías metabólicas usadas por las bacterias, para asimilar los carbohidratos.

El empaque se realiza en caliente de 74 a 79 °C y posteriormente se sella y se enfria, algunas veces se le añade benzoato de sodio como conservador.

#### 14.4.3 PRODUCCIÓN

A 40 °C en una solución saturada de sal (40 %) se fermenta en tanques de madera, el tanque se llena y las hortalizas deben estar totalmente sumergidos, los tanques generalmente se encuentran abiertos dejando que los gases que se forman puedan escapar, se debe mantener la concentración de sal y al final de la fermentación esta aumenta hasta 60 % de saturación de la

#### 14. ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

sal, este elevado nivel de sal permite un almacenamiento seguro por un año y previenen el congelamiento en áreas frías.

A) Desarrollo de la flora.- Es una población diversa que puede crecer a concentraciones de sal altas y en condiciones anaerobias. Basicamente se componen de tres grupos activos: i) coliformes ii) bacterias lácticas y iii) levaduras, los coliformes consisten basicamente en 2 tipos que son tolerantes a niveles bajos de sal 5%, y otros halofílicos como el *Acetobacter* que es capaz de resistir de 10 a 15 % de sal, si el crecimiento de estos microorganismos no es retringido por la producción de ácido láctico se producen gases indeseables como CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>

B) Control de la fermentación.- usando este procedimiento la fruta fresca es lavada con agua y cubierta por salmuera que contienen ácido acético. La salinidad se mantiene a una concentración predeterminada, la cantidad de sal depende del tamaño. Después de 2 días de incubación y un incremento en los niveles de sal, se le agrega acetato de sodio este buffer se inocula con *L. plantarum* y *S. cerevisiae* que degrada rápidamente los carbohidratos. El resultado es la fermentación con producción de Bióxido de Carbono.

C) La temperatura óptima es de 20 a 26 °C y requiere un tiempo de fermentación total aproximado de 8 semanas con un pH de 3.2 a 3.6. Durante el almacenamiento la concentración de ácido acético se eleva poco a poco.

Después de la fermentación los encurtidos son objeto de una serie de cambios en el agua para remover la sal, después de lo cual son enfriados rápidamente y se pueden almacenar a una temperatura de 4 a 7 °C.

#### 14.5 FERMENTACIÓN DE ACEITUNAS

##### 14.5.1 Introducción

El fruto del olivo es un fruto verde, amargo, que contiene grandes cantidades de aceite, desde la antigüedad encontramos referencia de su consumo, en la Biblia por ejemplo en Génesis donde el ave que sale del arca de Noé trae una rama de olivo para anunciar el fin del diluvio.

#### 14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

El origen del cultivo de los árboles de olivo es una leyenda y tradición que probablemente se inicio en España, durante el siglo 15 los colonizadores Españoles Franciscanos, extendieron el cultivo del árbol y el procesamiento de las aceitunas en varios puntos del Nuevo Mundo. De la misma manera los inmigrantes italianos y españoles llevaron el árbol a Australia Sudáfrica y Japón.

El sabor amargo natural de este fruto puede ser eliminado en parte por el proceso de fermentación de las aceitunas, el método más antiguo del que se tiene noticia data del siglo primero de esta era.

##### 14.5.2 Producción

Los métodos tradicionales de proceso derivan de la clasificación y principalmente de la maduración del fruto para obtener el color final del producto.

Existen cuatro tipos principalmente:

- 1.- Verde
- 2.- Turning color
- 3.- Negro natural
- 4.- Negro

Esta clasificación se refiere al color de la fruta como materia prima, es un color que se obtiene al final del proceso, en el caso de las verdes, no sufre cambios, el último es cosechado durante el cambio de estación y se vuelve negro debido a la oxidación en un medio alcalino.

El sabor amargo de la fruta puede ser eliminado completa y rápidamente por hidrólisis alcalina, esto es por tratamiento a las aceitunas con NaOH antes de la fermentación y en el almacenamiento en salmuera o en seco. El sabor amargo tambien puede ser eliminado lenta y parcialmente sin el tratamiento primario alcalino, durante la fermentación se pone la fruta directamente en la salmuera o por preservación con sal seca. El proceso de producción sigue básicamente los pasos de la fermentación láctica de hortalizas.

---

## 14. ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

Las variaciones de estos procesos están de acuerdo con los requerimientos del producto final deseado.

### 14.5.3 Cambios bioquímicos

Una serie de cambios bioquímicos ocurren durante el proceso, que pueden dividirse en tres categorías:

- a) Compuestos los cuales se pierden durante las varias fases y operaciones
- b) Compuestos transformados por reacciones químicas simples o por la acción de enzimas originalmente presente en la fruta o producidas por microorganismos
- c) Compuestos producidos durante la fermentación por los microorganismos.

## 14.6 *PRODUCCIÓN DE EMBUTIDOS*

### 14.6.1 Introducción

Los embutidos fermentados y el jamón no cocido son productos fermentados a partir de la materia prima que en este caso es la carne, la actividad enzimática de algunos microorganismos, transforma y modifica la carne durante el proceso de producción. Los microorganismos son ingredientes esenciales en la fabricación de estos alimentos. Una mezcla de carne estéril con sal y especias nunca se convertirá en un embutido de este tipo. Solo después del descubrimiento de los microorganismos se pudieron realizar nuevos productos, ahora es posible entender los procesos de fermentación y maduración de productos cárnicos embutidos.

Un producto tradicional es el Salami Italiano. En 1851 Piazzoni produjo Salami Hungaro hecho con carne de puerco en intestinos de burro o caballo. Las características especiales de este salami son la selección de la carne, el largo periodo de secado por aire, el ahumado en la primeras etapas de maduración y la característica superficie de hongos.

La palabra salami en Italiano "salame" es derivada de sale (sal) y es seguro que el hombre en tiempos antiguos se haya dado cuenta del efecto preservativo de la sal y el sacado y a través de



## 14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

---

los siglos vino a desarrollar una gran variedad de productos curados.

Para el desarrollo de la tecnología del curado se necesita de microorganismos que produzcan la fermentación, estos pueden ser cultivos de uno o varios microorganismos no peligrosos o cultivos seleccionados por su actividad enzimática para producir las modificaciones deseadas en la carne bajo condiciones controladas, en la actualidad el uso de microorganismos es de manera sistemática.

### 14.6.2 Características

Los embutidos fermentados pueden ser almacenados sin refrigeración o congelación y se pueden consumir crudos, se pueden pelar fácilmente o pueden estar firmes después del curado, a través de una desecación.

El embutido fermentado normalmente se hace de puerco y/o res con tocino de puerco. Los aditivos son sal de mesa, pimienta o sales de nitrato, azúcar y cultivos. Es difícil generalizar la manufacturación por que existe una gran variedad en todo el mundo por ejemplo en Francia el Pur Porc, en España el Chorizo, en Alemania el Westfalian Schinkenplockworst, en Norte América el Genoa, en Rusia el Turkish, en Hungría en Salami, etc.

### 14.6.3 Métodos de producción

A) Embutidos fermentados.- Una mezcla de carne y tocino con especias y aditivos se fermenta para hacer un producto de fina apariencia y sabor, el embutido debe tener una apariencia agradable, color característico y estable, un moldeado impecable y textura uniforme para tener un gusto agradable.

El proceso se divide en los siguientes pasos:

- a) Selección y pretratamiento de la carne
- b) Eliminación de huesos y tendones
- c) Cortado y molido de la carne
- d) Mezclado
- e) Adición de aditivos y adjuntos

- f) Llenado de la pasta en tripas (natural o sintética) o por medio de moldeado a presión, que no usa tripas.
- g) Acondicionamiento climático y maduración
- h) Ahumado o secado por aire
- i) Maduración y añejamiento.

La producción de embutidos fermentados y especialmente el proceso subsecuente de maduración involucra reacciones muy complejas, algunas de las cuales pueden ser simultáneas o pueden ser independientes. Algunos de estos parámetros pueden ser medidos, como la reducción en el pH, cambios en el potencial de oxidación-reducción de la actividad de agua, la reducción de nitrato/nitrito, la formación de aroma, la degradación de azúcares son algunos de los parámetros que se pueden usar para controlar la fermentación.

#### 14.6.4 Efectos de la fermentación de embutidos

Durante el madurado del embutido fermentado ocurren dos reacciones microbiológicas simultáneas, las cuales tienen influencia una de la otra y son directamente dependientes

1.- La producción de óxido nítrico por bacterias reductoras de nitrato y nitrito

2.- La reducción del pH de la emulsión del embutido vía glucólisis por medio de microorganismos ácidosgenicos.

Ambas reacciones están interconectadas por dos factores, que son la competición de los microorganismos por los carbohidratos fermentables y la dependencia del pH de la reducción del nitrito y nitrato.

La formación de óxido nítrico y el descenso del pH son dos puntos cruciales de la fermentación

<i>Lactobacillos/Pediococos</i>	pH	<i>Stafilococos/Micrococos</i>
↓		↓
Reducción de glucosa	6.0-5.8	Pequeña producción de ácido

## 14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

---

y glicogeno

Producción de ácido

láctico

Construcción del gel

5.3

Construcción de nitromioglobina

NO<sub>3</sub> NO<sub>2</sub>

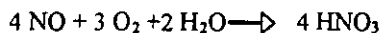
Desarrollo de la consistencia 5.0-4.8

Formación de compuestos derivados  
de nitrógeno de color rosado

### 14.6.5 Microorganismos involucrados y reacciones

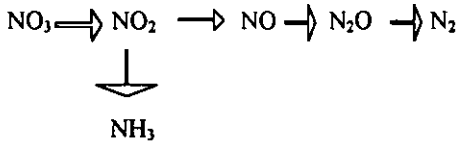
Bacterias que reducen el Nitrato/Nitrito.- La carne fresca obtiene su color rosado del contenido de mioglobina, este compuesto esta formado por una combinación de proteínas sin color y un compuesto de color rojo debido a su grupo hemo, después del cortado de las piezas, la mioglobina reacciona químicamente y se vuelve café. Por razones estéticas los productos cárnicos aparecen de color rosado, esto se logra añadiendo compuestos nitrogenados, la formación del color rojo en los productos curados resulta de la inclusión de óxido nítrico en la mioglobina natural por una serie de reacciones utilizando agentes reductores se mantiene el color rosado.

Todos los agentes químicos reductores incluyendo aquellos que se encuentran en la carne misma tienen una desventaja, la carne no puede absorber el óxido nítrico al mismo tiempo que es producido. Aproximadamente el 50 % del ácido nítrico formado reacciona con la carne, sin embargo, arriba del 19 % del nitrito que entra es transformado vía óxido nítrico a ácido nítrico.



Predominantemente estos microorganismos son *Micrococcus* y *Staphilococcus*, estos se pueden desarrollar normalmente en la carne o inocularse. En constante con los agentes

químicos las bacterias primero transforman los nitratos en nitritos y luego en monóxido de nitrógeno y finalmente en nitrógeno elemental, pero solo bajo condiciones anaerobias.



**Bacterias ácidogenicas.-** Especialmente *Lactobacillus* y *Pediococcus* se usan en los cultivo iniciales, ambas especies transforman la carne y los carbohidratos en ácido láctico por homofermentación el cual tienen un efecto en el color de la carne. La actividad bacteriana permite la formación del gel dando al producto consistencia y firmeza, además de la formación de compuestos formadores del aroma.

**Hongos.-** La superficie de los embutidos fermentados se cubre con una capa de molds o levadura las cuales le dan al producto su apariencia específica y su aroma. Desde el descubrimiento de las aflatoxinas ha habido una gran discusión. Algunos quitan la capa externa, sin embargo las micotoxinas pueden penetrar en el producto, entre los géneros de hongos que se pueden encontrar están: *Penicillium*, *Nagiovense*, *Candidum*, *Expansum*, estos tienen un gran uso en la producción.

Los embutidos fermentados se mantienen secos, adhesivos, uniformes y con una apariencia, brillante-gris, guardando el olor y sabor y una mayor vida de anaquel. El rápido crecimiento de hongos cultivados inactiva el desarrollo de otros microorganismos indeseables, protege el embutido de la luz, del oxígeno. Finalmente previenen la rancidez debido a la producción de catalasa, pero lo más importante es el uso de hongos certificados para garantizar un producto no tóxicos.

14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES  
14.7 PRODUCTOS TRADICIONALES FERMENTADOS

---

14.7.1 Introducción

Los alimentos fermentados ya sea que provengan de plantas o animales, forma parte de una intrínseca parte de la dieta en todas partes del mundo. Existe una gran variedad de materias primas usadas como sustratos, métodos de preparación y cualidades sensoriales del producto final.

A lo largo de las épocas la humanidad en distintas partes del mundo ha utilizado a microorganismos para el beneficio de su alimentación y aunque no siempre lo supo si supo como usarlos para obtener alimentos de mayor duración o de mejor sabor, en la actualidad muy pocos de estos productos se producen de manera industrial, como la salsa de soya, debido quizá tal vez a su comercialización y a que el consumidor no siempre gusta de los sabores fuertes.

Todos los países y todas las culturas, alguna vez tuvieron sus productos fermentados, en el cuadro 14.2 se hace un resumen de los productos fermentados tradicionales.

A. Salsa de soya.-

La preparación básica de la salsa de soya se lleva a cabo de la siguiente manera:

- |                            |   |                |
|----------------------------|---|----------------|
| 1a.- soya remojada en agua | 1b.- Arroz o trigo inoculado<br>con <i>Aspergillus oryzae</i> | 1c.- Trigo     |
| 2a.- Cocimiento            | 2b.- Madurado 3 a 5 días                                      | 2c.- Tostado   |
| 3a.- Enfriado              |   | 3c.- Triturado |
|                            | 4.- Mezclado (50%a, .2% b, 50% c)                             |                |
|                            | 5.- Incubado 25-30°C 2 a 3 días                               |                |
|                            | 6.- Periodo de Mash   |                |
|                            | 7.- Fermentación láctica                                      |                |
|                            | 8.- Fermentación por levaduras                                |                |
|                            | 9.- Prensado  |                |

Cuadro 14.2 ALIMENTOS Y BEBIDAS TRADICIONALES FERMENTADAS

Producto	País	Substrato	Microorganismo	Naturaleza del producto	Uso del Producto
Ang-kak (anka, arroz rojo)	China, sureste de Asia, Siria.	Arroz	<i>Monascus purpureus</i>	Polvo rojo	Colorante
Bagoog	Filipinas	Pescado	Desconocido	Pasta	Sazonador
Bangi	Caucaso	Mijo	Desconocido	Líquido	Bebida
Banku	Ghana	Maíz, cassava	Bacterias ácido-lácticas levaduras	Pasta	Alimento básico
Bonkrek	Java central	Pastel comprimido de coco	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Sólido	Tostado o frito en aceite, usado como sustituto de carne.
Bouza	Egipto	Trigo	Desconocido	Líquido	Ligeramente ácido
Braga	Rumania	Mijo	Desconocido	Líquido	Bebida
Burukutu	Nigeria	Sorgo y cassava	Bacterias ácido-lácticas <i>Candida</i> spp <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Líquido	Bebida cremosa con sólidos suspendidos
Busa	Crimea, Egipto	Arroz o Mijo, azúcar	<i>Saccharomyces</i> spp y <i>Lactobacillus</i> spp	Líquido	Bebida
Chee-fan	China	suero de soya	<i>Mucor</i> spp. <i>Aspergillus glaucus</i>	Sólido	Se come fresco, tipo queso
Chicha	Perú	Maíz	<i>Aspergillus, Penicillium</i> spp. levaduras y bacterias	Esponjoso	Se come combinado con vegetales
Chickwangue	Congo	Raíz de cassava	Bacterias	Pasta	Alimento básico
Levadura China	China	Frijol de soya	Hongos Mucoraceos levaduras	Sólido	Usado como plato con arroz
Darassum	Mongolia	Mijo	Desconocido	Líquido	Bebida
Dawadawa (daddowa, uri, kupalugu, kiinda, neteton)	Nigeria, este de África	Garbanzo Africano	Bacterias ácido-lácticas levaduras	Sólido secado al sol	Se consume fresco, suplemento de sopa.
Dhokla	India	Grano de Bengala	Desconocido	Esponjoso	Condimento

Dozai (doza)	India	y trigo Grano negro y arroz	Levaduras, <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Esponjoso, pastel	Alimento de desayuno
"Salsa de pescado (nuoc-mam, patis, mampla, ngam-pya -ye)	Sureste de Asia	Pescado	Bacterias	Líquido	Sazonador
Gari	Oeste de Africa	Raíz de cassava	<i>Corynebacterium manihot</i> <i>Geotrichum candidum</i>	Pasta humeda	Alimento básico con vegetales
Hamanatto	Japon	Soya entera harina de trigo	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Streptococcus</i> spp. <i>Pediococcus</i> spp	Frijoles con	Saborizante de carne y pescado, su forma se consume como botana original
Idli	Sur de India	Arroz y grano negro	Bacterias lacticas <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Torulopsis candida</i> <i>Trichosporum pullulans</i> <i>Candida guilliermondii</i>	Esponjoso,	Substituto de pan
Injera	Etiopia	Maíz, trigo cebada, sorgo		Sólido	Substituto de pan
Jalebies	India, Nepal, Pakistan	Harina de trigo	<i>Saccharomyces bayanus</i>	Relleno de miel	Dulce
Jamin-bag	Barsil	Maíz	Levaduras y bacterias	Sólido	Substituto de pan
Kaanga-kopuwai	Nueva Zelanda	Maíz	Bacterias y levaduras	Sólido suave	Se consume como vegetal
Kanji	India	Arroz y zanahorias	<i>Hansemula anomala</i>	Líquido	ácido, añadido a los vegetales
Katsuobushi	Japon	pescado	<i>Aspergillus glaucus</i>	Sólido, seco	Sazonador
Kecap	Indonesia	Frijol de soya, trigo	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Lactobacillus</i> , <i>Hansemula</i> <i>Saccharomyces</i> spp	Líquido	Condimento
Kenima	Nepal, India	Frijol de soya	Desconocido	Sólido	Botana
Kenkey	Ghana	Maíz	Desconocido	Suave	Se consume al vapor con vegetales
Ketjap	Indonesia	Frijol de soya negro	<i>Aspergillus oryzae</i>	Jarabe	Sazonador

Khama	India	Grano de Bengala	Desconocido	Sólido,	Alimento de desayuno
Kimichi (kimi-chee)	Korea	Vegetales, algunas veces mariscos	Bacterias acido-lacticas	Sólido y líquido	Condimento
Kishk (kushuk, kushik)	Egipto, Siria Mundo Arabe	Trigo, leche	Bacterias acido-lacticas <i>Bacillus</i> spp.	Sólido	Esferas secas que rapidamente se disuelven en agua
Lafun	Nigeria, oeste de Africa	Raiz de cassava	Bacterias	Pasta	Alimento básico
Lao-chao	China, Indonesia	Arroz	<i>Rhizopus oryzae</i> <i>R. chinensis</i> <i>Chlamydomucor oryzae</i> <i>Saccharomycopsis</i> sp.	Gelatinoso Suave Jugoso	Aderezo o combinada con huevo
Mahewu (magou)	Sur de Africa	Maíz	Bacterias acido-lacticas <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Líquido	Bebida
Meitauza	China, Taiwan	Torta de frijol de soya	<i>Actinomucor elegans</i>	Sólido	Freido en aceite o cocinado con vegetales
Meju	Corea	Frijol de soya	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Rhizopus</i> spp.	Pasta	Sazonador
Merissa	Sudan	Sorgo	<i>Saccharomyces</i> spp.	Líquido	Bebido
Minchin	China	Gluten de trigo	<i>Paecilomyces, Aspergillus, Cladosporium, Fusarium, Syncephalastrum Penicillum, Trichothecium</i> spp.	Sólido	Condimento
Miso (chiang, jang, doenjang, tauco, tao chieo)	Japon, China	Arroz y frijol de soya o arroz y otro cereal como la cebada	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Torulopsis eichellsii</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Saccharomyces rouxii</i>	Pasta	Base para sopa, Sazonador
Munkoyo	Africa	Mijo, maiz o maiz kaffir más las raíces de munkoyo	Desconocido	Líquido	Bebida
Nan (khab-z)	India, Pakistan Afganistan, Iran	Harina de trigo sin blanquear	Desconocido	Sólido	Botana
Natto	Norte de	Frijol de soya	<i>Bacillus natto</i>	Sólido	Pastel, como sustituto de carne



Ogi	Japon Nigeria, este de Africa	Maíz	Bacterias lacticas <i>Aspergillus, Penicillum</i> <i>Cephalosporium, Fusarium</i> <i>Saccharomyces cerevisae</i> <i>Candida mycoderma</i>	Pasta	Alimento básico, alimento de desayuno
Oncom (ontjom, lontjom)	Indonesia	Torta de cacahaute	<i>Neurospora intermedia</i> <i>Rhizopus oligosporus</i>	Sólido	Tostado o frito en aceite, usado como sustituo de carne
Papadam	India	Garbanzo negro	<i>Saccharomyces</i> spp.	Sólido,	Condimento
Peujeum	Java	Platano	Desconocido	Sólido	Fresco o frito
Pito	Nigeria	Maíz de guinea o maíz o ambos	Desconocido	Líquido	Bebida
Poi	Hawaii	Taro corms	<i>Lactobacillus, Candida vini</i> <i>Mycoderma vini</i> <i>Geotrichum candidum</i>	Semi-sólido	Plato básico con pescado o carne
Pozol	Sureste de México	Maíz	Bacterias, levaduras y hongos	Masa esponjosa	Diluido con agua, se toma como alimento
Prahoc	Cambodia	Pescado	Desconocido	Pasta	Sazonador
Puto	Filipinas	Arroz	Bacterias acido-lacticas <i>Saccharomyces cerevisae</i>	Sólido	Botana
Rabdi	India	Maíz y mantequilla	Desconocido	Semi-sólido	Con verduras
"Arroz sierra	Ecuador	Arroz con cascarilla	<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. candidus, Bacillus subtilis</i>	Sólido	Sazonador, cafe- amarillo
"Cerveza de sorgo (Cerveza lbantu Kaffir, leting, joala, utshivala, mqomboti, igwelel)	Sur de Africa	Sorgo, maíz	Bacterias acido-lacticas levaduras	Líquido	Bebida, ligeramente alcohólica
"Leche de soya	China, Japon	Frijol de soya	Bacterias acido-lacticas	Líquido	Bebida
Salsa de soya (Chiang-yu, shoyu, toyo, kanjang, kecap, seeieu)	Japon, China Filipinas, otras partes de oriente	Frijol de soya y trigo	<i>Aspergillus oryzae, A. soyae</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Saccharomyces rouxii</i> <i>Saccharomyces</i> spp.	Líquido	Sazonador de carnes, pescado, cereales, y verduras

Sufu (tahuri, taokaoan, tao-hu-yu)	China, Taiwan	Frijol de soya suero de soya	<i>Actinomucor elegans</i> <i>Mucor hiemalis</i> <i>M. silvaticus</i> <i>M. subtilissimus</i>	Sólido	Queso de frijol soya, Condimento
Tao-si	Filipinas	Frijol de soya y harina de trigo	<i>Aspergillus oryzae</i>	Semisólido	Sazonador
Taotjo	Este de India	Frijol de soya y trigo tostado o arroz aglutinado	<i>Aspergillus oryzae</i>	Semisólido	Condimento
Tapé	Indonesia	Cassava o Arroz	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Hansenula anomala</i> <i>Rhizopus oryzae</i> <i>Chlamydomucor oryzae</i> <i>Mucor sp.</i> <i>Endomycopsis fibuliger</i>	Sólido suave	Alimento básico
Tarhana	Turquia	Trigo, sancochado y yogurt	Bacterias acido-lacticas	Sólido	Sazonador seco para sopas
Tauco	Java del este	Frijol soya, celeales	<i>Rhizopus oligosporus</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	Líquido	Bebida
Tempeh (tempe kedeke)	Indonesia	Frijol soya	<i>Rhizopus oligosporus</i> <i>Rhizopus spp.</i>	Sólido	Frito en aceite, tostado usado como carne en sopas
Thumba (bojah)	Surinam				
Torani	Este de Bengal	Mijo	<i>Endomycopsis fibuliger</i>	Líquido	Bebida, medianamente alcoholica
	India	Arroz	<i>Hansenula anomala</i> <i>Candida guilliermondii</i> <i>C. tropicalis</i> <i>Geotrichum candidum</i>	Líquido	Sazonador para verduras
Waries	India	Harina de Garbanzo	<i>Saccharomyces spp</i> <i>Candida spp</i>	Esponjoso	Condimento para verduras, legumbre o arroz.

10.- Pasteurizado

11.- Embotellado

Preparación del frijol.- En las primeras etapas del proceso se remoja y cocina la soya y por separado se tuesta y granula el trigo, por separado pero simultáneamente. Se pueden usar granos enteros o hojuelas de soya desgrasadas, si se utiliza el frijol, el aceite eventualmente será removido en la fermentación, la presencia de aceite modifica el tiempo de fermentación haciéndolo más largo en presencia de aceite. Al usar el grano entero existe una resistencia física al acceso de enzimas y organismos a los componentes durante la fermentación. Los frijoles son remojados por 12 a 15 horas a temperatura ambiente o preferentemente a 30 °C hasta que alcancen 2.1 veces su tamaño inicial. El remojo debe hacerse con agua corriente o cambiar el agua por lo menos cada 2 a 3 horas, si el agua no se cambia se pueden presentar *Bacillus* a niveles que finalmente deterioran la calidad final del producto. Los frijoles hinchados se escurren, se cubren con agua y se cocinan hasta su suavización y pasteurización, si se utiliza presión se obtienen mejores resultados por la desnaturalización de las proteínas, este proceso tiene influencia en la digestibilidad de enzimas durante la fermentación y en la turbidez final del producto.

Preparación el trigo.- El trigo se tuesta y se muele, se puede usar también harina de trigo integral, el tostado del trigo contribuye al aroma y sabor de la salsa. El tostado causa la formación de una reacción que origina un color pardo deseable para las propiedades visuales en el producto final.

Proceso de Koji.- La palabra Koji significa " Florecimiento de hongos", refiriéndose a la preparación de la enzima presente en los cereales usadas para preparar el sustrato, para un número de alimentos tradicionales fermentados, en el caso de la salsa de soya el proceso koji se produce por el cultivo de *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus sojae*.

Los hongos usados como cultivos iniciales tienen un alto poder proteolítico y

#### 14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

aminolítico y contribuye a las características deseables de la salsa de soya, se produce lipasa y celulasa.

El control de las temperaturas ( 25 a 30 °C ) y la humedad es importante en el desarrollo del proceso koji, una cantidad alta de humedad se requiere durante los primeros tres días cuando hay crecimiento micelial, después se baja la humedad en las últimas etapas donde se producen las esporas, se necesita un contenido de 27 a 37% de humedad para mantener una buena actividad enzimática. El periodo de incubación debe ser lo suficientemente largo para que se produzca y acumulen las enzimas pero no lo suficiente para que exista un exceso de esporulación lo cual impartirá un sabor desagradable al producto final, maduro es de un color amarilla a amarillo verdoso

Periodo de remojo.- Cuando el producto está listo para la salmuera, se mezcla con un volumen igual de agua con sal del remojo o moromi, el contenido de sal que puede tener está en el rango de 17 a 19%. El micelio se destruye durante las primeras etapas de la preparación del remojo.

Si la fermentación se lleva a cabo de una manera natural, sin un control de temperatura, se necesita un periodo de 12 a 14 meses para el proceso de la fermentación y el añejamiento, si el fermento se mantiene en tanque y se controla la temperatura entre 35° C y 40 °C, el periodo de fermentación y añejamiento se reduce a unos 2 a 4 meses.

Durante las primeras etapas de la fermentación, las enzimas que provienen del proceso koji hidrolizan las proteínas en aminoácidos y pequeños péptidos, el almidón se hidroliza en azúcares simples, los cuales son fermentados por los microorganismos para obtener, ácido láctico, glutámico y otros ácidos, así como alcoholes y dióxido de carbono. Como consecuencia el pH de las mash pasa de un punto cercano a la neutralidad hasta 4.5 o 4.8.

La aireación del medio es importante, si no hay oxígeno suficiente se lleva a cabo un crecimiento anaeróbico, que imparte un sabor indeseable al producto, si existe demasiada aireación, la fermentación se entorpece.

Una gran variedad de compuestos producidos principalmente por las levaduras son los que dan

#### 14. ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

su características propiedades organolépticas a la salsa de soya, entre los compuestos que se producen se encuentran: 4-etilguaiacol, 4-etilfenol 2-feniletanol, alcohol furfural, pirazinas y acetato de etilo. Al final del añejamiento el líquido es removido mecánicamente por presión.

Pasteurización.- La salsa de soya es pasteurizada de 70°C a 80 °C para eliminar las células vegetativas de los microorganismos, desnaturalizar las enzimas y coagular las proteínas, para clarificar se puede usar kaolin, la salsa se filtra entonces, se envasa y se comercializa.

En las fermentaciones industriales se puede obtener una consistencia en la calidad del producto, usando un cultivo del inóculo, se reduce el riesgo de tener contaminaciones de una fase a otra del proceso, sin embargo debido a la predominancia de varias especies es necesario mantener un balance en cada fase de la fermentación.

##### B. Miso

Las masas fermentadas de soya, se pueden preparar de muchas maneras, el prototipo de estas pastas se cree que se introdujo en China en el año 600 después de Cristo, hoy las pastas fermentadas tienen diferentes nombres dependiendo del lugar, Chiang en China, Jang en Corea, Miso en Japón, Tauco en Indonesia, Tao chieo en Tailandia, Tao-si en Filipinas.

Además de la soya y sal, muchos de estos productos también contienen cereales, como arroz o cebada, en China, gran parte de estos son preparados en casa, sin embargo en Japón se puede obtener de forma comercial. Se puede consumir de varias formas, como base para salsa con carne, pollo, pescados y mariscos.

##### C. Fermentaciones de soya entera (productos Natto)

Natto es el nombre japonés que se le da a las fermentaciones de frijol de soya entero, productos similares son usados en diferentes partes de oriente, el aroma, color y sabor depende de los microorganismos utilizados en la fermentación, sin embargo son generalmente oscuros de color y tienen un sabor áspero debido al alto contenido de ácidos grasos libres.

Se consume junto con arroz o puede ser usado para sazonar carne, mariscos y pescado y

vegetales.

El proceso de producción es similar a los anteriores, se remoja el frijol, se cocer, se inocula con *Bacillus natto* y se fermenta, durante la fermentación se produce polímeros de ácido glutámico, lo que provoca un producto final con una apariencia densa, entre mayor sea esta cubierta mayor será la calidad del producto.

#### D. Sufu

Es un producto fermentado por medio de hongos, en forma de cuajada, la preparación del sufu consiste de tres fases importantes:

- 1.- Preparación de la cuajada de la leche de soya
- 2.- Fermentación de la cuajada con los hongos
- 3.- Salado de la cuajada fermentada.

1.- Para preparar la cuajada la soya se remoja en agua, se cuece por 20 a 30 minutos, la masa se cuela en una tela metálica fina para separar la leche de soya de los residuos insolubles, a la cual se le añade calcio o magnesio.

2.- La fermentación se realiza en la cuajada, que previamente se remojo en una salmuera de 6% se sal y 2.5 % de ácido cítrico por 1 hora, este tratamiento retarda o previene el crecimiento de hongos indeseables. La cuajada se inocula con un cultivo incubado durante 2 a 7 días a 12-25°C, y se deja fermentar hasta que se encuentra cubierta de una capa amarillenta de micelio

3.- La última etapa involucra el salado y el añejamiento, dependiendo del sabor deseado, puede ser sumergido en salmuera (5 -12 %), arroz rojo, o alcohol, el sabor puede ser modificado por la adición de condimentos o esencias al caldo de añejamiento, el tiempo de añejamiento dura de 1 a 12 meses, tiempo en el cual el sufu puede ser consumido como condimento o en la preparación de carnes y verduras.

En una escala comercial, el sufu es empaquetado en la misma salmuera y esterilizado para su comercialización.

### E. Meitasua

El sólido obtenido del desecho de la preparación de la leche de soya, puede ser fermentado para dar un producto conocido como Meitauza, que se comprimen en forma de pastel de 10 a 14 cm de diámetro por 2 a 3 cm de espesor, se fermentan por 10 a 15 días con aireación moderada, de preferencia se prepara durante los meses fríos, pues el calor puede favorecer el crecimiento de bacterias indeseables.

Durante el periodo de fermentación el pastel se cubre con un micelio blanco de *Mucor meitauza*, al final de la fermentación el pastel es parcialmente secado al sol y se vende en los mercados, se puede cocinar en aceite o con verduras como agente saborizante.

### F. Lao-chao

Es un producto fermentado de arroz, primeramente el arroz se coce y se mezcla con una pequeña cantidad de cultivo iniciador conocido por los Chinos como chiu-yueh.

La masa es incubada a temperatura ambiente por 2 a 3 días durante los cuales las levaduras hidrolizan el almidón, con lo que se obtienen un producto suave, jugoso, dulce y ligeramente alcohólico. Se puede consumir directamente, o cocinado con huevos, debido a que se cree que da fuerza tiene un lugar especial en la dieta de las madres primerizas.

### G. Ang-kak

El Ang-kak (arroz rojo) puede ser usado en las fermentaciones industriales para la preparación de vino de arroz rojo y productos como el sufu, salsa de pescado y muchos otros productos, los pigmentos producidos por *Monascus purpureus*, pueden ser usados en el hogar y en la industria de los alimentos como colorante, el Ang-kak, se vende en muchos países de oriente en los mercados como polvo o como arroz rojo seco.

El proceso de manufactura consiste en poner al arroz, previamente lavado a remojar en agua durante 1 día y luego escurrirlo, el arroz luego es transportado a un contenedor donde puede tener suficiente aireación y pueda ser sometido a esterilización de 121°C por 30 minutos,

#### 14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

---

después de lo cual se enfría y se inocula con una suspensión incubada por 25 días de *M. purpureus*, al tiempo de la inoculación el arroz debe aparecer casi seco, posteriormente se incuba a 25-32 °C por 3 días, Durante este tiempo el arroz toma un color rojo y puede ser removido para obtener una fermentación uniforme, durante la fermentación se puede agregar agua estéril para remplazar el agua perdida, después de tres semanas el arroz toma un color púrpura en el fondo, después de lo cual se seca a 40 °C y se puede reducir fácilmente a polvo para ser usado.

#### H. Tempeh

El tempeh es un producto de soya descascarada, fermentado con varios géneros de *Rhizopus*, la soya se lava y se deja remojar durante toda una noche en agua a temperatura ambiente, después de que la cascara pueda ser removida, se mezcla con pequeñas cantidades de tempeh de un cultivo anterior, los frijoles inoculados se colocan en ramas de bambú, tapadas con hojas de plátano y se deja fermentar por 1 o 2 días, en este punto la soya ya se ha cubierto de un micelio blanco.

El valor nutritivo de este producto es muy alto, debido a la degradación de los carbohidratos en azúcares simples que luego son fermentados, se reducen los problemas de flatulencia y de digestibilidad, contiene una gran variedad de vitaminas, producto del desarrollo microbiano natural, también produce cierta clase de antibióticos que controla el crecimiento de flora intestinal, razón por la cual tampoco presenta problemas de flatulencia.

#### I. Oncom

Es un producto fermentado de cacahuete, se consume como parte del desayuno o como botana, su sabor es parecido al de fruta y algunas veces ligeramente alcohólico, pero toma un sabor a almendra si se fríe. También puede ser tostado, cocido en agua y sazonado con sal o azúcar.

Para preparar el Oncom se hace de la siguiente manera:

1 - Presionar los cacahuates, para extraer la materia grasa



- 2.- La masa presionada se remoja en agua por 24 horas
- 3.- Se escurre y se puede agregar materia con alto contenido de almidón
- 4.- Se cocina
- 5.- Se inocula con *Rhizopus oligosporus*
- 6.- Se coloca en hojas de plátano y se deja fermentar por 1 a 2 días a 25- 30°C

#### J. Productos de pescado

La salsa de pescado es un producto muy popular en el Oriente, el pescado entero o el camarón se sala con aprox 30 % o más de sal, y se envuelve en paquete para su fermentación por unos días, se le pueden añadir, cereales tostados, arroz rojo, harina etc.,

El proceso es esencialmente anaerobio e involucra el rompimiento autolítico de proteínas y lípidos en el tejido del pescado que resulta en un producto altamente saborizado. Entre los productos de este tipo se encuentran: Bagoong, Prahoc Phaak y el Katsubushi, que dependiendo de cada región tienen diferentes características.

#### K. Kimichi

Es una designación de productos salados y fermentados, los cuales pueden ser producidos a base de col, rábanos largos, cebollas, ajos pimienta roja, jengibre y sal. La fermentación de la mezcla se hace bajo fermentación láctica por varias semanas o meses. Es un alimento que presenta una buena fuente de vitamina C y B12.

#### L. Idli

Es una pasta fermentada hecha de varias porciones de arroz y garbanzo negro y otras especias que se le pueden agregar para dar sabor especial. La textura esponjosa se atribuye a la proteína y a los polisacáridos del garbanzo, El proceso más importante que se lleva a cabo durante la fermentación es la acidificación

#### M. Waries

Es una especia para condimentar usada en forma de bola de 3 a 8 cm de diámetro que se usa en el cocido de verduras y legumbre o arroz. Para obtener este producto se remojan granos de legumbre en agua hasta obtener una pasta suave y se mezclan con especias como jengibre, clavo, pimienta roja etc., y una pequeña cantidad de un cultivo anterior, después de la fermentación de la masa, por 4 a 10 días a temperatura ambiente, la pasta en forma de bola se seca al sol, las superficies de las bolas se recubren de una capa mucilaginosa durante el secado.

#### N. Papadam

Este producto es similar al Waries pero no contiene jengibre, su forma es de tortilla circular y su fermentación dura de 4 a 6 días, las levaduras responsables de la fermentación son las mismas que el caso anterior. Se puede servir tostado o frito en aceite.

#### Ñ. Dhokla

Es un alimento cocido y fermentado preparado de la mezcla de semolina de trigo y harina de garbanzo de bengala, la harina con una cantidad de 3% de sal se fermenta por 14 horas, después de lo cual se le agregan especias antes del cocimiento con aceite por 20 minutos, el producto es cortado en piezas y sazonado con semillas de mostaza antes de comer.

#### O. Khaman

Es un alimento cocido fermentado preparado basándose en harina de garbanzo, las semillas se lavan y se remojan por 4 horas luego se sazona y se le añade sal y se fermenta por 12 horas, también se sazona con semillas de mostaza antes de comer.

#### P. Kanji

Es una bebida fermentada tipo cerveza que se consume en la India, se puede preparar a base de zanahorias, especias, agua y una porción de kanji de un cultivo anterior, su producción se divide en dos partes a) la preparación del licor de arroz fermentado y b) la fermentación de este

licor y su mezcla con vegetales, especias y agua

#### Q. Dawadawa

Es un alimento tradicional a partir de algarrobo que se consume en varias partes de África con varios nombres, se prepara de la siguiente manera: el polvo amarillo de la pulpa de la semilla de algarrobo se cocen las semillas en agua durante toda la noche, al siguiente día se remueve la cascara exterior y los cotiledones se lavan en agua por 30 minutos después de los cuales se deja fermentar por 2 a 3 días a temperatura ambiente, aunque no se ha determinado con certeza que tipo de microorganismos llevan a cabo esta fermentación indudablemente se encuentran del género de bacterias lácticas y probablemente levaduras.

#### R. Gari

Es un alimento fermentado que se utiliza como base de la alimentación, se hace con la raíz de tapioca las cuales se pelan y se colocan en bolsas de yute y se apilan para poder extraerles el jugo, la fermentación se realiza en 3 a 4 días, después de los cuales se calientan las bolsas en un horno hasta reducir su humedad a un 10 a 15 % para obtener finalmente el gari.

#### S Banku

Es un alimento fermentado preparado basado en maíz, el cual se remoja en agua tibia durante 3 días, después de lo cual se le agrega mijo humedecido para ayudar a eliminar las partículas sobrantes, el filtrado se fermenta hasta obtener un sedimento conocido como "ogi" que se vende en el mercado en hojas, antes de consumirlo se puede cocinar en agua y se vuelve un gel, es un alimento básico para bebés y el mayor alimento en el desayuno de los adultos.

#### T. Cerveza de Kaffir

Es una bebida Africana hecha basado en maíz, sorgo, el malteado se prepara remojando el grano entero en agua por 1 o 2 días después de lo cual se secado al sol para dejarlo madurar, posteriormente se calienta con una pequeña porción de malta cruda durante toda la noche, al día

#### 14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

---

siguiente la mezcla se enfría, y se deja reposar al cuatro día cuando el grano malteado se agrega se deja reposar y se filtra, el filtrado esta listo para ser consumido.

##### U. Merissa

Es una bebida que se prepara a base de sorgo, de una manera similar al la anterior, los principales microorganismos en la fermentación son bacterias lácticas y *Saccharomyces* spp.

##### V. Pozol

El pozol es una bebida fermentada de maíz, su método de producción no difiere mucho del usado por los antiguos Mayas. El maíz blanco se calienta por 1 a 2 horas en agua con cal hasta que se desprenda el pellejo, luego se enfría y se exprime, esta masa es llamada nixtamal.

El nixtamal se hace una masa y se pone en rollos de 6 a 12 centímetros y se envuelve en hojas de plátano y se deja fermentar a temperatura ambiente por 5 a 8 días.

Durante el proceso de nixtamalización los microorganismos y células se destruyen, por lo tanto las medidas sanitarias son mínimas ya que el agua, los utensilios las manos y el aire son la fuente de microorganismos, por lo tanto existe una gran variedad de microorganismos y de tipos de productos, entre los microorganismos más comunes que se incluyen están *Geotrichum candidum*, *Trichosporun cutaneum*, y varias especies de *Candida*, Hongos como *Cladosporium cladosporioides* y *Mucor rouxianus* se encuentran comúnmente en el pozol, las bacterias son predominantes durante las primeras etapas de la fermentación, también se puede encontrar *Agrobacterium azotophilum*, un fijador del nitrógeno libre que contribuye al incremento del nitrógeno en comparación con el maíz sin fermentar.

##### X. Pulque

El pulque se puede considerar como el vino mexicano, se obtiene del maguey, es rico en elementos nutritivos. Considerada como una bebida de moderación el pulque se obtiene del

jugo fermentado espontáneamente de varias especies de maguey o *Agave agrovidens* y *Agave americano*.

En el altiplano mexicano abunda el maguey, pues es nativo de las zonas tropicales y subtropicales del continente, sus hojas o pencas de color verde oscuro son muy gruesas y llegan a medir de 30 a 40 cm de ancho por 2 a 3 metros de largo, sus orillas presentan una especie de dientes con espinas y una espina muy gruesa y dura remata su final.

La planta florece una sola vez en su vida, entre los 8 y 10 años de su vida y después mueren. Su inflorescencia llega a medir de 6 a 9 metros, conocida con el nombre de quiote, en su interior guarda el aguamiel, de la que se obtiene el pulque.

Esta bebida parece haber sido usada por los otomíes desde la antigüedad, los aztecas conocieron al maguey al pasar por Chalco, en el año 1172 de nuestra era, pero no aprendieron a extraer su sabia o aguamiel hasta el año de 1187. Lo llamaron ocotli, que quiere decir vino, o wistli por lo picante y espumoso, al aguamiel lo llamaban mecutli. Según el historiado del siglo XVIII, Francisco Javier Clavijero, señala que la sabia fermentada del maguey se usaba como ingrediente de diversas medicinas que servían para la maternidad, agentes lactógenos, diuréticos o antidiarreicos. Al ocotli se le llamo pulque desde el año 1521 cuando los españoles escuchaban a los indígenas pronunciar la palabra poliutli que quiere decir descompuesto, para designar la bebida en estado de fermentación pútrida y acética y como se les dificultaba la pronunciación lo llamaron pulque, nombre que perdura. A la caída de Tenochtitlán, el pulque perdió su condición de bebida ceremonial para pasar a ser bebida popular, existen varias haciendas pulqueras en el estado de Hidalgo.

Sin embargo sus propiedades biológicas no se conocen sino hasta el presente siglo, gracias a los estudios del doctor Alfredo Sánchez Marroquí, no solo el agua miel revela su riqueza alimentaria sino que se implemente toda una técnica para producirse industrialmente

Al aparecer el quiote, se corta, a esta operación se le llama castración, entonces se empieza a acumular el jugo del aguamiel en el centro, esta etapa puede durar de 6 meses a 1 año, después

## 14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

---

que aparecen manchas en las hojas de la planta se procede a la picazón, que consiste en abrir una cavidad en el centro del maguey en la que se acumula el aguamiel, después de 3 o 4 días comienza a cicatrizar y entonces se raspan los tejidos blandos para que no se detenga la salida de aguamiel

La recolección de aguamiel se realiza diariamente por la mañana o por la tarde, se efectúa un guaje llamado acocote, la parte más delgada de este se coloca en la cavidad y el tlachiquero lo saca por succión, esta aguamiel es un líquido claro, de color amarillo paja, azucarado y ligeramente ácido, con sabor amargo dulzón y olor a hierba fresca, aunque algunas veces es de color blanquisco y de consistencia mucilaginosa, según el agave productor, un maguey puede producir hasta 6 litros de aguamiel diariamente durante 3 meses y después se agota.

La fermentación se realiza en tinacales, una pequeña parte se transfiere a un recipiente de cuero donde se fermenta espontáneamente con sus propios microbios, que por lo general son *Lactobacillus* ssp., *Leuconostoc mesenteroides* y *Leucorostoc dextranicum*, que producen principalmente ácido láctico, un poco de bióxido de carbono y dextranas que producen un aumento en la viscosidad, estos microorganismos se dejan crecer durante 10 o 15 días este producto se le llama madre del pulque, este se inocula y se deja fermentar hasta que aparezca en la superficie de la tina una capa llamada surrón, que tarda en aparecer de 8 a 30 días, luego se agrega otra porción de aguamiel cuidando de no destruir el surrón. Después se pueden desarrollar la levaduras *Saccharomyces carbayali* que determinan la fermentación alcohólica.

El pulque provee de proteínas de las levaduras, minerales y cantidades adecuadas de vitaminas, sobre todo del complejo B.

### 14.8 FERMENTACIÓN DE COCOA

#### 14.8.1 Introducción

La fermentación de la cocoa es necesaria para la formación de los precursores del sabor, sin embargo el sabor típico del chocolate se desarrolla en el tostado, la fermentación además

también previene la degradación de la manteca de cacao destruyendo el grano antes de que se presente la germinación y la pulpa del fruto sea degradada, haciendo el secado mucho más fácil.

La fermentación de cacao es una mezcla de procesos microbiológicos externos, principalmente caracterizados por la producción de etanol y ácido acético de los carbohidratos y de un proceso de autólisis que involucra a las enzimas naturalmente presentes en el cacao.

El término fermentación del cacao, es un proceso microbiano, con acción enzimática y que imparte sabor.

#### 14.8.2 Producción

El proceso de producción de la cocoa se realiza como sigue

1.- Cosecha

2.- Geminación (remojo)

3.- Fermentación

La cosecha se realiza del árbol manualmente para no dañar el árbol. La germinación juega un papel importante en el desarrollo de los sabores, y aunque solo se desea la parte inicial de la geminación de 1 a 2 días, se requieren de 1 a 2 semanas para que empiecen a brotar las primeras raíces.

Durante las primeras etapas de la germinación baja el nivel de inhibidores, represores de genes y se incrementa la concentración de enzimas, si la germinación se llega a presentar se reduce el valor de la cocoa debido a que se reduce la cantidad de grasa y se abre el grano

#### 14.8.3 Métodos de fermentación

Para realizar la fermentación existen varios métodos a) secado en plataforma b) Secado en montones c) fermentación en canastas d) fermentación en cajas

a) Se utiliza principalmente en Ecuador, las vainas se rompen y el grano fresco se pone a secar en una plataforma, los granos son extendidos durante el día y durante la noche,

#### 14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

---

- b) Este método se usa principalmente en Africa, los frijoles húmedos se ponen en canastas y se cubren con hojas de palma, por los lados de las canastas se da la transpiración, usando lotes de 20 a 200kg la temperatura satisfactoria se alcanza al tercer día de fermentación, la fermentación continua por 6 a 7 días y la cocoa se mezcla diariamente o transfiriendo cada día la cocoa de una canasta a otra.
- c) Este método es el más usado en las pequeñas granjas, el grano humedecido se coloca en hojas de plátano y se cubre con el mismo material. Dejando crecer los hongos presentes, los montones se remueven cada día para obtener una masa homogénea. Este método produce una de las cocoas más finas del mundo.
- d) Este método es generalmente usado en las granjas o plantaciones grandes, las cajas se construyen de maderas duras, las cajas deben tener hoyos en el fondo para poder dejar escapar la transpiración. La caja se llena en un día para prevenir una fermentación desigual. La duración de la fermentación varía de 4 a 7 días, los granos se pasan de una caja a otra, este método produce cocoa de fina calidad.
- e) Fermentación en bandejas, en este caso los granos de la superficie se vuelven cafes más rápidamente, que los que se encuentran en el centro, las bandejas tienen fisuras en el fondo y están divididas en dos secciones, tratando de que no queden muy amontonados para propiciar la aereación adecuada. La parte superior se cubre con hojas de plátano y se dejan por 3 días.

#### 14.8.4 Enzimas usadas

Las 3 principales enzimas en la fermentación son a) glucosidasa b) oxidasa y c) proteasas

- a) el resultado de estas enzimas es un color café en el producto
- b) De estas enzimas la más conocida es la polifenol oxidasa que tiene una gran importancia en la preparación, manejo, e investigación.
- c) El cambio de proporciones entre proteínas y aminoácidos indican la presencia de proteasa durante la fase anaerobia-hidrolítica



Todas estas enzimas producen reacciones que son responsables de la producción de pigmento café, la remoción de la astringencia y de los taninos.

#### 14.8.5 Cambios durante la fermentación

**Azúcares.**- Se realiza la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa, el contenido de azúcares totales decrece durante la fermentación y el contenido de azúcares reductores incrementa durante los primeros 4 días de la fermentación y luego baja lentamente, aproximadamente el 70 % de los azúcares totales permanecen después de la fermentación.

**Polisacaridos.**- Aparentemente algunos cambios fermentativos ocurren durante la fase de secado pues no queda sacarosa en los granos, aparte de esto no hay evidencia de cambio en otros carbohidratos como almidones, pectinas, fibra celulosa, pentosanas mucilagos y gomas durante la fermentación.

**Proteínas.**- Un ligero incremento en el nitrógeno total se observa durante los 2 primeros días de la fermentación seguido por un decremento. La proteólisis empieza poco después de iniciada la fermentación y continúa durante todo el periodo de la fermentación, la baja en la cantidad de proteínas se acompaña de un aumento de péptidos y aminoácidos libres. Durante la fermentación las enzimas de la cocoa progresivamente se inactivan, pero retienen una pequeña cantidad de actividad.

**Lípidos.**- La manteca de cacao es una grasa relativamente simple, compuesta principalmente de ácidos palmítico, estearico y oleico con pequeñas cantidades de ácido mirístico, linoleico y linolenico, formados en triglicéridos de los cuales 2 son saturados y 1 insaturado, pero su contenido en la fermentación no cambia.

**Ácidos.**- El principal ácido volátil encontrado es el ácido acético con una media en las muestras estudiadas de .30 % , el ácido no volátil que más se encuentra es el ácido cítrico con pequeñas cantidades de ac. tartárico, láctico y fosfórico. Entre los ácidos orgánicos que contiene se encuentran el ácido glucurónico, láctico, oxálico, succínico, málico, tartárico, y cítrico dependiendo de la localización geográfica del origen del grano. La producción de ácidos grasos

## 14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

---

volátiles se realiza en cantidades moderadas durante el periodo de 6 días de secado al sol.

Durante la temporada seca los ácidos grasos volátiles tienden a producirse al principio de la fermentación y durante el secado.

### 14.9 FERMENTACIÓN DE TÉ

#### 14.9.1 Introducción

El té es una bebida que se obtiene de las hojas del árbol *Camellia sinensis*, estas hojas deben sufrir ciertos cambios endógenos bioquímicos, en los cuales intervienen cierta cantidad de enzimas, entonces se puede decir que la producción de té es una de las fermentaciones industriales desarrolladas e inducidas por el hombre.

#### 14.9.2 Manufactura del té

1) Cosecha de las hojas del té, se usa de preferencia los pequeños brotes.

2) Marchitado.- Después de que las hojas se cosechan se transportan al centro de acopio donde se induce una pérdida de humedad por abajo del 78 % en base húmeda, este proceso se llama marchitamiento, se lleva a cabo bajo condiciones que evitan la respiración de las hojas, aproximadamente 24°C, toma de 4 a 8 horas y su objeto es destruir las propiedades semipermeables de las células membranosas sin causar el rompimiento de los tejidos. Esto permite que la fermentación del té sea uniforme iniciándose en las hojas más tiernas, los cambios bioquímicos que se llevan a cabo son importantes para producir sustratos para el proceso de fermentación.

3) Maceración del tejido.- La maceración provoca que las células de los tejidos se mezclen los tejidos, para esta operación requiere de aireación y causa un incremento de temperatura, dura de 30 a 90 minutos e inicia el proceso de la fermentación.

4) Fermentación.- La fermentación es la oxidación de las catequinas del tejido mediante la enzima catecol-oxidasa y todas las reacciones secundarias asociadas con esta oxidación primaria, en esta reacción todos los reactivos excepto el oxígeno provienen de las hojas de té,

#### 14. ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

bajo condiciones ideales todos los reactivos permanecen separados hasta antes de la fermentación, una vez que las enzimas son liberadas en presencia del oxígeno se inicia la fermentación. La reacción central de la fermentación es la oxidación de la catequina 1-4 ortoquinona V-VIII, que después se condensan unas con otras para formar los sabores del té.

Actúan como agentes oxidantes causando que otras sustancias presentes en la masa de la fermentación empiecen a oxidarse. Cuando el ácido gálico es oxidado, y condensado con otras catequinas oxidadas se forman ácidos que finalmente dan el sabor del té, estas reacciones determinan el color y sabor final del té negro y también producen compuestos volátiles presentes en el aroma. Los grupos de compuestos que constituyen estos aromas son aminoácidos, carotenos y ácidos grasos insaturados. El proceso de fermentación se lleva a cabo normalmente a temperatura ambiente y el proceso toma de 1 a 5 horas. Durante este tiempo la planta cambia de color desde verde a rojo cobre y el aroma cambia de un aroma a hierba hasta un aroma dulce. Además del rol crítico de la catequina-oxidasa en la formación del sabor del té negro, existe evidencia de que la reacción biosintética es importante en la formación de compuestos terpenoides y metaloproteínas que forman los aromas del té por catálisis directa.

5) Secado.- Después de la fermentación el macerado se seca aproximadamente durante 20 minutos usando secadores de aire caliente con temperaturas de entre 90 °C y 52 °C, la humedad final llega a 2 a 4%. La enzima catecol-oxidasa se inactiva y no hay más oxidación que produce el color característico del té negro y que finalmente dan el color característico del té negro.

6) Almacenamiento - El té se criba para separar las partículas grandes y se tamiza para obtener diferentes grados de partículas. Esta operación mecánica produce un té de características particulares que ya se puede envasar y almacenar para su venta.

14.10 FERMENTACIÓN DE CAFÉ

14.10.1 Introducción

El café ha venido a ser una bebida utilizada mundialmente, tienen un efecto estimulante debido principalmente a su aroma. Sin embargo es curioso no encontrar pruebas de su uso en el mundo antiguo como Grecia, Roma y Bizancio.

Una de las cosas interesantes de la historia del café es la legendaria historia de su introducción en Yemen, después de la conquista por Sarracenos. Otra fuente de información del primer uso del café fue encontrada entre los aborígenes de África.

Los primeros granos de café de consumo humano indudablemente fueron masticados. Una leyenda dice que un pastor de cabras encontró a sus animales danzando y retozando después de comer las frutas y los brotes de cierto tipo de plantas, por curiosidad también probó y fue estimulado a bailar con las cabras, después de esto pasó un mono soñoliento el cual se quedó admirado del pastor que bailaba, el cual le dijo su secreto y entonces el mono comió las frutas, las semillas y todo lo demás rápidamente se revigorizó y quedó por largo tiempo sin sueño.

Una de las propiedades principales del café fue la de que quitaba el sueño, y empezó a ser usada en las ceremonias religiosas Musulmanas, la bebida llegó a ser popular a pesar del hecho de que los sacerdotes Musulmanes la prohibieron y finalmente quedó prohibida por el Corán.

Al principio de su comercialización todo el café provenía de Yemen, en la actualidad Brasil y Colombia son los países de mayor producción de café en el mundo, sin embargo las primeras plantaciones existieron en Indonesia en el siglo 18, la bebida se introdujo a Inglaterra en el siglo 17. El nombre oficial del café originalmente fue la palabra árabe "kahwa", café fue el nombre que se dio a los establecimientos que expendían la bebida y finalmente tomó este nombre.

La planta de café es un pequeño arbusto de hoja de mucho follaje, el fruto es una baya carnosa aproximadamente del tamaño de una pequeña pelota, cuando el fruto madura cambia de color verde a rojo, cada fruta contiene 2 frutos embebidos en varias capas protectoras.

14.10.2 Proceso de fermentación

El proceso de fermentación del café consiste principalmente en la remoción de las diferentes capas que rodean el grano

Se usan comúnmente dos métodos:

1) Método seco.- Este es el más aplicado para los cafés de Brasil y Africa, la ruta primero se seca al aire durante 2 o 3 semanas, las frutas ya estando secas son tratadas mecánicamente, para remover las capas que rodean al grano, estos granos son cocidos como café verde y se seleccionan de acuerdo al tamaño. Este método produce un grano de menor calidad que el método húmedo y en realidad no implica ningún proceso de fermentación

2) Método húmedo.- La finalidad de este proceso es retirar las capas que rodea al grano, pero también presenta una pequeña mejoría en la calidad final, el proceso general es el siguiente:

La pulpa se retira de la fruta fresca por estrujamiento y luego la fruta estrujada se humedece, este parte generalmente dura 12 horas. Se lleva a cabo una fermentación natural en el medio húmedo de la fruta sin pulpa, esta se lleva a cabo en tanques abiertos donde los granos son sumergidos en agua, otra alternativa de fermentación interesante desde el punto de vista de las fermentaciones industriales es utilizar una cama de fermentación donde el nivel del agua es menor a la que se utiliza un tanque, esta agua se recircula por goteo, y se tiene un mayor contacto con el aire para que se realice la fermentación, de esta manera se obtiene un medio rico en enzimas y microorganismos. El pH óptimo durante la fermentación es de 5 a 6, pero generalmente al final ocurre una baja, lo que permite la producción de ácidos orgánicos que enriquecen el sabor del producto final, en este caso la fermentación es básicamente un paso técnico y no un paso necesario para la calidad del producto final como en el caso del té.

La fermentación involucra la digestión de la pulpa de mesocarpio que es de una naturaleza pectina, por lo tanto la fermentación involucra enzimas pectolíticas que dejan libres las semillas, después de la fermentación el mesocarpio puede ser removido por lavado con agua.

#### 14 ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

---

La fermentación se termina cuando por inspección la pulpa no se puede hacer más viscosa, es muy importante tener cuidado con la calidad del agua para no inducir defectos en producto por procesos de putrefacción, los microorganismos involucrados en esta fermentación aparte de las enzimas que naturalmente se encuentran presentes en el fruto son *Bacterium campestris*, *B. lactis* y levaduras pectinolíticas que son parte de la flora natural del fruto. La mitad de la producción se procesa por este método húmedo, requiere de 24 a 90 horas dependiendo de las condiciones climáticas, el grado de madurez y el tipo de microorganismos presentes. Los granos fermentados se lavan al final de la fermentación esta operación es necesaria para facilitar el secado posterior y la remoción mecánica de la cascarilla del grano, finalmente se dejan secar al sol o con aire caliente.

Entonces está listo para su almacenamiento, este método presenta la ventaja de que es sencillo y barato, razón por la cual no ha podido ser sustituido por otros más complejos.

## 15 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

### 15.1 COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Dependiendo del tipo de microorganismo que se desee desarrollar se necesitan diferentes medios de cultivo por ejemplo, existen, bacterias, hongos, levaduras, y otros microorganismos que tienen diferentes necesidades.

Todos los microorganismos excepto los virus, contienen aproximadamente el 80 % de agua, las bacterias, las levaduras y las algas unicelulares son muy similares en su contenido de proteína, aproximadamente el 50% del peso seco, este se compone principalmente de enzimas, por ejemplo se ha llegado a encontrar hasta 2,000 enzimas diferentes en la *E. coli*, como potencial genético para adaptarse al medio que le rodea.

La estructura más compleja de otros organismos, como los hongos, contienen menos proteínas activas para el metabolismo, y tienen mayor cantidad de componentes polisacáridos, que constituyen gran parte de su pared celular y de su peso total sea,

Aproximadamente un 10 % del peso seco de las levaduras, bacterias y algas unicelulares se compone de nitrógeno, pero solo el 5% en los hongos .

Los lípidos son esenciales en todos los microorganismos, y son vitales para la composición de la pared celular y la formación de membranas semi permeables. El contenido de ácidos grasos es variable, pero es rico particularmente en ácido palmitico, oleico y estearico.

En el Cuadro 15.1 se muestran las diferentes proporciones de cada organismo

Cuadro 15.1 Composición de microorganismos

Organismo	Composición % peso seco			Población en cultivo	Peso seco del cultivo
	Prot.	Acid. Nuclei.	Lípidos		
Virus	50-90	5-50	1	$10^8$ - $10^9$ .0005	

## 15. MEDIOS DE CULTIVO

---

Bacteria	40-70	13-34	10-15	$2 \cdot 10^8$ - $2 \cdot 10^{11}$	.02-2.9
Hongos filamentosos	10-25	1-3	2-7		3-5
Levaduras	40-50	4-10	1-6	$1-4 \cdot 10^3$	1-5
Algas unicelulares	50	3	10	$4 \cdot 10^7$	.4-.9

---

Aiba,

### 15.2 FORMULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO:

Para cada microorganismo y cultivo se requiere una investigación para determinar que medio es el más económico para el crecimiento, dependiendo de lo que se desea obtener y de los recursos disponibles, en general los requerimientos básicos para lograr el crecimiento son los siguientes:

✓ Fuente de energía.- Debido a que el crecimiento es un proceso endergónico, esto es que la energía para el crecimiento debe venir de una fuente como la luz o la oxidación de los componentes del medio. El ATP es el compuesto más importante en la transformación de la energía en las células, las bacterias autótrofas producen ATP de la oxidación de compuestos inorgánicos, mientras que las bacterias heterótrofas, las levaduras y los hongos forman su ATP de la oxidación de compuestos orgánicos y las bacterias fotosintéticas pueden utilizar la energía que proviene de la luz para formar su ATP necesario.

En la actualidad la fuente de energía más común para el desarrollo de microorganismos son los almidones o melazas, aunque el uso de otras fuentes de energía también se ha desarrollado, como el uso de petróleo

#### 15.2.1 Fuente de carbono.

Frecuentemente el carbono que se necesita se obtiene de la fuente de energía, pero las bacterias autótrofas y las fotosintéticas utilizan bióxido de carbono, en cambio las



heterotrofas metabolizan el carbono dependiendo de su forma de metabolismo depende el aprovechamiento del carbono, los organismos facultativos incorporan aproximadamente el 10 % del sustrato de carbono en material celular cuando su metabolismo es anaerobio, pero del 50 a 55% del sustrato cuando su metabolismo es aerobico. Sobre la base de que el 50 % del peso seco de las células es carbono, es posible calcular que tanto carbono se necesita en el medio para obtener un determinado peso de células. Por ejemplo si se desean 40 g por litro de peso seco de células en un metabolismo aeróbico, entonces el carbono que se necesita en el medio debe ser de  $(40/2) \cdot (100/50)$  que son 40 g. Si se agrega hexosa al medio, entonces  $40 \cdot (180/72)$  son 100g de hexosa que se requieren

#### 15.2.2 Fuente de nitrógeno

Para la mayoría de los microorganismos el nitrógeno se añade en forma de amoníaco o sales de amonio, sin embargo para un crecimiento más rápido se puede usar nitrógeno orgánico.

Algunos microorganismos, sin embargo requieren en su totalidad de nitrógeno orgánico, estos requerimientos varían desde un aminoácido hasta un rango entero de aminoácidos, como purinas, pirimidinas y vitaminas. Algunos organismos complejos, tienen requerimientos no totalmente conocidos en su composición particular.

Los compuestos orgánicos nitrogenados son relativamente caros. Los productos como el frijol soja, cacahuete, pescado o alimentos cárnicos, extractos de levadura, trigo, caseína y varios productos más ricos en proteínas pueden ser utilizados

El nitrógeno constituye el 10 % del peso seco de la mayoría de los organismos, es por esto que el mínimo contenido de nitrógeno en el medio puede ser calculado en base a la masa celular final, pero la forma en que se añada al medio siempre dependerá del organismo, el costo, y el propósito de la fermentación.

#### 15.2.3 Fuente de minerales:

La siguiente tabla muestra el rango de concentración de algunos elementos encontrados en las

15. MEDIOS DE CULTIVO

bacterias, hongos y levaduras.

Cuadro 15.2 Concentración de elementos en microorganismos

Elemento	Bacteria	Hongos (g/100g peso seco)	Levaduras
Fósforo	2.0-3.0	0.4-4.5	0.8-2.6
Azufre	0.2-1.0	0.1-0.5	.01-.24
Potasio	1.0-4.5	0.2-2.5	1.0-4.0
Magnesio	0.1-0.5	0.1-0.3	0.1-0.5
Sodio	0.5-1.0	.02-0.5	.01-0.1
Calcio	.01-1.1	0.1-1.4	0.1-0.3
Hierro	.02-0.2	0.1-0.2	.01-0.5
Cobre	.01-.02		.002-.01
Manganeso	.001-.01		.0005-.007
Molibdeno			.0001-.0002
Cenizas Totales	7-12	2-8	5-10

De esta tabla claramente se ve que los compuestos más abundantes son el fósforo, potasio, azufre y magnesio, y los demás solo están presentes en pequeñas cantidades en el medio. Los elementos traza como el hierro, el cobre, el cobalto, el manganeso el zinc y el molibdeno son esenciales pero usualmente estén presentes como impurezas en otros ingredientes en el medio.

---

## 16 CRECIMIENTO MICROBIANO

### 16.1 INTRODUCCIÓN

Los microorganismos crecen de manera natural en muchos lugares lo único que necesitan es tener una fuente de donde alimentarse y las condiciones adecuadas para su reproducción y crecimiento, en términos de fermentaciones industriales, es necesario conocer el desarrollo de los microorganismos para poder tener un control sobre estos y obtener los productos deseados.

El microorganismo requiere para su crecimiento una fuente de energía que sea capaz de transformar y otros nutrientes, dependiendo del microorganismo utilizado la fuente de energía puede variar, lo más fácil de utilizar para un microorganismo es la glucosa, aunque existen algunos que pueden transformar muchas otras fuentes de carbono si no existe glucosa disponible en el medio

La figura 16.1 presenta las diferentes fases del crecimiento microbiano, el primer periodo llamado "lag" es una fase de adaptación del microorganismo al medio ambiente en que se desarrolla en esta parte el crecimiento es moderado y las células son jóvenes, después de esto se presenta un periodo de crecimiento acelerado hasta alcanzar una velocidad máxima de crecimiento y finalmente cesa, ya sea por falta de un nutriente, caso más común en las fermentaciones industriales, o por acumulación de un producto inhibitorio o algún cambio en el ambiente, después de que la biomasa alcanza el máximo, aparece generalmente una fase estacionaria durante la cual la biomasa permanece constante y es en esta fase donde se sintetizan los productos de mayor interés, llamados también metabolitos secundarios. Normalmente un microorganismo está ajustado para producir solamente un mínimo necesario de metabolitos, el éxito de una fermentación consiste en interferir en la regulación metabólica y provocar una sobre producción del compuesto deseado.

En una fermentación industrial la duración de la fase exponencial depende

---

## 16. CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS

principalmente de la concentración inicial del sustrato limitante, Esto implica que el cultivo pasa de un estado de crecimiento rápido a otro donde la velocidad disminuye de una manera drástica, de manera que los periodos a velocidades menores que la máxima no son suficientes para permitir al organismo ajustar su estructura interna a las nuevas condiciones.

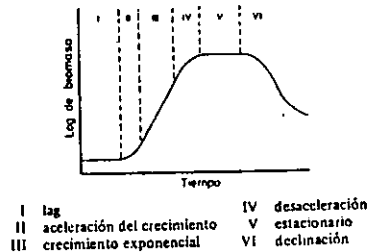


Figura 16.1 curva de crecimiento Quintero 1981

### 16.2 CURVA DE CRECIMIENTO

Cuando el crecimiento de un medio sólo está limitado por la cantidad inicial de sustrato, la curva de crecimiento puede expresarse en términos de los parámetros de crecimiento, una ecuación que describe la relación entre la velocidad específica de crecimiento y la concentración del nutriente limitante, es la ecuación de Monod, esta ecuación expresa la aparición de un producto con respecto al tiempo como una función de la velocidad específica:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

donde el valor de  $\mu$  está dado por:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S}$$

Esta ecuación es análoga a la de Michaelis-Menten pero su derivación fue empírica y no teórica. En general se considera que la expresión de Monod, es una sobre simplificación del problema, pero adecuada como una primera aproximación. A medida que el valor de  $K_s$  es

mayor en una gráfica de la concentración contra la velocidad específica de crecimiento, la curva se aplana cada vez más; también cuando S es menor que K<sub>s</sub> existe una relación lineal entre la velocidad de crecimiento y la concentración de sustrato. Cuando S es mucho mayor que K<sub>s</sub> se alcanza la velocidad específica de crecimiento máximo.

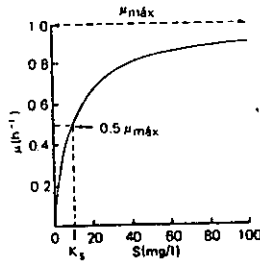


Figura 16.2 gráfica de K<sub>s</sub> vs. μ Quintero 1981

En muchos casos, cuando la concentración de sustrato es muy grande suele producirse una inhibición y la velocidad específica de crecimiento disminuye la integración de la primera ecuación

$$\int_{x_0}^{x_1} \frac{1}{x} dx = \int_0^t \mu dt$$

para el caso de que la velocidad específica de crecimiento sea constante:

$$x_1 = x_0 e^{\mu t}$$

Esta ecuación es la expresión del crecimiento exponencial.

La determinación de la concentración celular, x, se puede hacer de diversas maneras, dependiendo de las características físicas de los microorganismos, se usa en particular su tamaño y peso, físicamente se puede determinar el número por medio de un microscopio, pero no ofrece la posibilidad de saber si las células se encuentran vivas o muertas, otra formas de hacerlo es tomar una muestra de volumen conocido que después se siembra e incuba en una caja de petri para después hacer un conteo de colonias, otro método es centrifugar un volumen

## 16. CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS

conocido en condiciones específicas de tiempo y velocidad y medir el volumen sólido.

El tiempo de duplicación, que es el tiempo que una célula tarda en reproducirse se puede obtener por medio de la primera ecuación, si esta se integra en los límites de la aparición del doble del producto  $2x$

$$\int_{x_1}^{2x} \frac{dx}{dt} = \int_0^t \mu dt \quad x_2 = 2x_1$$

se obtienen que

$$dt = \ln 2 / \mu$$

Esta ecuación es importante pues si se tabulan los tiempos de duplicación máximos para bacterias, levaduras y mohos se observa que estos tiempos se agrupan, siendo las bacterias las que tienen un tiempo de duplicación menor y los mohos un tiempo mucho mayor.

### 16.2.1 Efectos de la temperatura

Efectos de la temperatura afecta el crecimiento de manera notable, principalmente por que los microorganismos solo pueden crecer en cierto rango de temperatura dependiendo de sus características, existen organismos que pueden crecer a temperaturas entre 5 y 15 °C, que se conocen como psicófilos, los mesófilos pueden crecer entre 25 a 40 °C y los termófilos entre 45 a 60 °C, de estos tres los termófilos presentan mayores ventajas pues tienen una mayor transferencia de calor, velocidad de reacción mayor y menor posibilidad de contaminación, sin embargo la mayoría de los microorganismos usados en fermentaciones industriales pertenecen al grupo de los mesófilos.

La dependencia de la velocidad específica de crecimiento con respecto a la temperatura se expresa por medio de la ecuación de Arrhenius:

$$\mu = A e^{E_a/RT}$$

donde  $E_a$  es la energía de activación y  $A$  es una constante, si se gráfica el logaritmo de la velocidad de crecimiento contra el inverso de la temperatura se obtienen una línea recta de

cuya pendiente se puede obtener el valor de  $E_a$

### 16.2.2 Efectos del pH

El pH es la medida de concentración de los iones de hidrogeno en el medio, y tienen un efecto directo en la velocidad de crecimiento, el valor de pH en el que el organismo presenta una mayor velocidad se le denomina pH óptimo y cada microorganismo tiene un pH óptimo diferente, en las bacterias este va de 6.0 a 8.0 y en las levaduras de 4.0 a 6.0

Las ecuaciones que se han desarrollado para el efecto del pH no son simple acertada y no necesariamente se cumplen, por lo general cuando el pH se encuentra entre 5 y 6, cercano a la neutralidad, la velocidad específica de crecimiento es casi independiente, más bien es el cambio en los valores óptimos de pH lo que puede afectar al microorganismo, afectando su naturaleza al disociarse ácidos y bases.

### 16.2.3 Efecto de los nutrientes

El efecto de los nutrientes sobre la velocidad de crecimiento esta dado principalmente por el agotamiento de un nutriente lo que detiene la fermentación, aun cuando también existen otras relaciones para el mayor rendimiento, la relación de carbono/nitrógeno y la presencia de otros nutrientes en el medio, cada microorganismo presenta necesidades diferentes y algunos tienen necesidades especiales de minerales o compuestos.

El oxígeno es uno de los elementos que tienen una gran importancia, ya que su presencia o ausencia puede determinar una fermentación aeróbica o anaerobia o el desarrollo o no de ciertos microorganismos

Si la fermentación es anaerobia la mayor parte del carbono se emplea como energía y sólo el 2% se asimila como material celular, mientras que en las fermentaciones aeróbicas la energía que se obtiene de la fuente de carbono es mucho mayor pues el compuesto se oxida totalmente.

## 16. CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS

### 16.3 CLASIFICACIÓN

Los procesos de fermentación han sido clasificados bajo diversos criterios. Deindoerfer se basa en el proceso de fermentación y se considera útil particularmente en los procesos batch, básicamente se divide en dos las fermentaciones asociadas al crecimiento y no asociadas a este, la reacción simultanea se refiere a las fermentaciones con más de un producto, a las velocidades relativas y a su variación con respecto a la concentración del nutriente. Las reacciones de tipo consecutivo son aquellas en las que un intermediario se acumula hasta cierta concentración antes de que se forme l producto. En las reacciones por pasos se efectúan dos reacciones simples, que pueden ser reguladas por inducción enzimática.

Cuadro 16.1 Clasificación según Deindoerfer

Tipo	Descripción
Simple	Nutrientes convertidos en productos con una estequiometría fija, sin acumulación de intermediarios.
Simultaneo	Nutrientes convertidos en productos con una proporción de la estequiometría variable, sin acumulación de intermediarios.
Consecutiva	Nutrientes convertidos en producto, con acumulación de un intermediario.
Por pasos	Nutrientes convertidos en un intermediario antes de conversión en producto ó Nutrientes selectivamente convertidos en producto en un orden preferencial.

Quintero 1981

Gaden sugirió que se relacionase la formación del producto con la utilización del sustrato; en esta clasificación se presentan tres casos

1. -Crecimiento asociado con la utilización del sustrato en este caso las curvas de sustrato utilizado, producto y biomasa son muy similares en forma y pendiente, la productividad especifica muestra la misma tendencia, la conversión de sustrato en producto es estequiométrica y solo hay un producto, en este caso la tasa de formación está en relación con la velocidad de crecimiento por



$$\frac{dB}{dt} = \alpha \frac{dx}{dt}$$

donde alfa es la constante estequimétrica, este es el modelo asociado con el crecimiento.

2.- Crecimiento no asociado con la utilización del sustrato. en este caso la producción esta asociada a la utilización del sustrato aunque en forma indirecta, la curva de productividad y la productividad específica indican un desfaseamiento entre la síntesis del producto y el consumo de carbohidrato, los máximos no coinciden en su posición relativa respecto al tiempo.

Para este caso tenemos la ecuación

$$\frac{dB}{dt} = \beta x$$

donde beta es la constante de proporcionalidad. La constante beta es similar a la actividad enzimática (la célula tiene un sistema enzimático constitutivo que controla la tasa de formación del producto) y representa la unidad de actividad formadora del producto por masa de células

3.- Crecimiento con la combinación de los tipos anteriores: Aquí la formación del producto ocurre en la llamada fase estacionaria. A este tipo de productos que aparecen en la fase que sigue a la del crecimiento se les denomina generalmente metabólicos secundarios, este tipo de crecimiento tiene un modelo combinado que expresa la producción como la suma de ambas ecuaciones

$$v = \frac{1}{x} \frac{dB}{dt} = \alpha \mu + \beta$$

donde v es la tasa específica de formación de producto.

Se considera que los modelos más útiles para describir el crecimiento, serán aquellos que consideren otros factores como la temperatura el pH, el oxígeno disuelto, el sustrato limitante etc. pues además de representar mejor el sistema pueden usarse para controlar la fermentación por computadora

---

## 17 EQUIPO PARA LAS FERMENTACIONES INDUSTRIALES

### 17.1 TANQUES DE FERMENTACIÓN

**E**l principal punto de atención del equipo para las fermentaciones industriales es el fermentador, este recipiente puede ser de vidrio o de acero inoxidable, se usa vidrio cuando el recipiente es menor de 20 a 30 litros, hay dos tipos: a) Recipientes de vidrio redondos con fondo plano y la parte superior rebordeada con cabeza de plástico o acero inoxidable. y b) Cilindros de vidrio equipados en ambos finales con platos.

Los recipientes de 40 litros y más tienen todas sus partes en contacto con la estructura que debe ser de acero inoxidable, algunas veces para economizar la chaqueta exterior se hace de acero ordinario, algunas veces este revestimiento es de acero inoxidable, a lo largo del tiempo los problemas de corrosión y el mantenimiento causados por el uso de diferentes materiales, representa un problema por lo que es una garantía usar desde el principio materiales de calidad en todas sus partes.

#### 17.1.1 Tamaño

El tamaño del fermentador depende de las siguientes consideraciones:

- a) Volumen total de fermentación proyectado
- b) El grave riesgo de que se contamine el fermentador
- c) La capacidad de construcción del fabricante
- d) Restricciones por tamaño en cuanto a su transportación

#### 17.1.2 Buenas practicas de diseño

Las buenas practicas de diseño deben tener en cuenta las siguientes reglas:

- i) No debe haber conexiones directas entre partes estériles y no estériles
  - ii) Las conexiones en rebordes deben ser las menos posibles
  - iii) No se debe usar soldaduras
-

## 17. EQUIPO PARA LAS FERMENTACIONES INDUSTRIALES

- iv) El fermentador debe ser capaz de operar bajo condiciones de presión positiva
- v) En lo posible que cada parte pueda ser esterilizable
- vi) Las válvulas deben ser de fácil limpieza y mantener
- vii) Todas las conexiones al fermentador deben tener sellos de vapor
- viii) Los espacios muertos deben ser evitados.

### 17.1.3 Tipos de fermentadores

Existen varios tipos de fermentadores, la diferencia básicamente se encuentra en la forma de hacer pasar el aire a través del fermentador en la figura 17.1 se pueden ver diversos tipos de fermentadores.

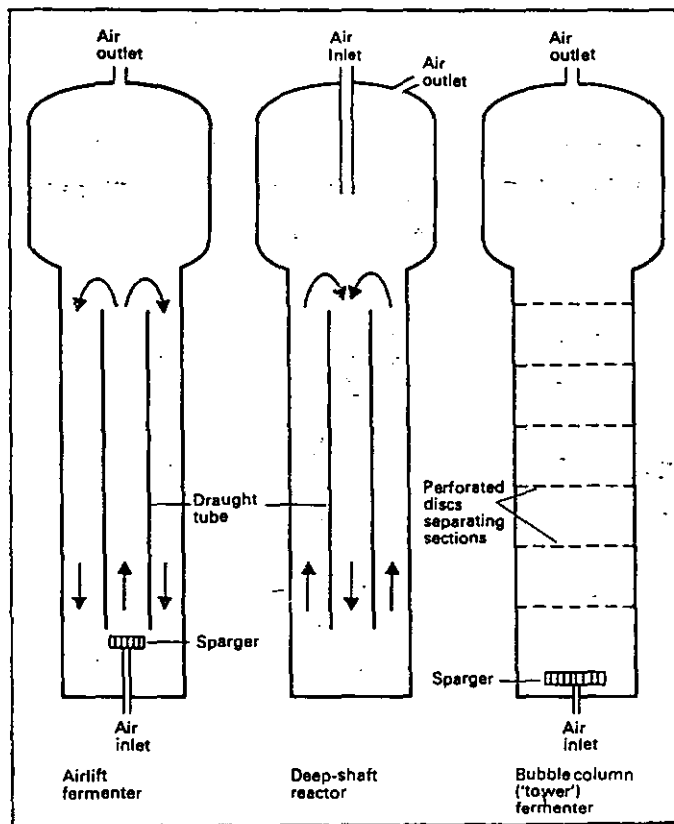


Figura 17.1 Tipos de fermentadores

**17.2 MOTORES**

La potencia del motor para los fermentadores es de acuerdo a la siguiente forma:

Tamaño	Potencia (W/l)
Laboratorio	8-10
Planta piloto	3-5
Planta	1-3 (equivalente a 1-4 HP/m <sup>3</sup> )

Para las fermentaciones industriales la potencia de entrada referida anteriormente entra en la categoría de agitación fuerte, usada en los procesos químicos, una agitación media equivaldría a una potencia de .3 a 1.0 HP/m<sup>3</sup>.

Para fermentadores de pequeña escala, los motores eléctricos con rectificadores de velocidad y control de potencia pueden ser ideales, los motores controlados por reostatos no son muy recomendados pues están sujetos a grandes variaciones en la velocidad.

**17.3 AGITADORES**

Los agitadores consisten de una flecha, impulsores, sellos asépticos y un motor, esta flecha esta diseñada para trabajar a altas velocidades y para su fácil montaje que permita limpiarlo si es necesario, los impulsores más comúnmente usados son del tipo de turbina, otros tipos son las propelas marinas, y discos también pueden ser empleados de los diferentes tipos de impulsores Rushton, realizo un estudio del efecto de los diferentes impulsores, entre ellos las de paletas, de propelas y de plato plano, lo interesante de este estudio fue el hecho de que cuando el régimen es laminar la necesidad de potencia va creciendo mientras que el número de Reynolds aumenta, pero al llegar a régimen turbulento no importa el numero de Reynolds la necesidad de potencia es la misma, pero diferente para cada tipo de impulsor, para mayor referencia se puede consultar su trabajo, los impulsores también pueden ser dispuestos de manera que se hallen dos o tres niveles de impulsores instalados en la misma flecha.

**17.4 TUBERIAS Y VALVULAS**

Las tuberías transportan aire estéril, cultivo, y otros materiales que para su uso deben ser

## 17. EQUIPO PARA LAS FERMENTACIONES INDUSTRIALES

esterilizados previamente con vapor, usualmente a 120°C por 20 a 30 minutos, es importante que las tuberías, estén libres de vapor condensado después de la esterilización, por lo tanto la línea debe estar construida lo más simple posible, exento para algunas fermentaciones el material más comúnmente empleado es acero.

Usualmente es necesario poner válvulas en las tuberías, se recomiendan válvulas de diafragma y de bola para mantener la esterilidad.

La válvula de diafragma no tiene casquillo y hay menor riesgo de contaminación, las válvulas de bola con doble sello minimizan la posibilidad de contaminación.

### 17.5 SENSORES

Existen otros muchos factores que se deben controlar durante el transcurso de la fermentación, para los cuales se necesitan una variedad de instrumentos para controlar estos factores como son, la temperatura, la presión, la agitación, la espuma, la cantidad de flujo (gas y líquido), turbidez, la viscosidad, el pH, el potencial de oxidación-reducción, el oxígeno disuelto, el dióxido de carbono disuelto, el nivel de carbono disponible, la cantidad de proteína disponible entre otros.

- ✓ Temperatura.- Puede ser monitoreada por medio de Termómetros de bulbo (hg en acero), termopares, termoresistores y termómetros metálicos de resistencia, los cuales se encuentran conectados a una válvula que pueda permitir el paso de vapor a la chaqueta o el cierre de la misma.
- ✓ Presión.- Esta puede ser monitoreada por manómetros, y puede ser regulada por una válvula de salida en una línea de salida de gas.
- ✓ Agitación - Por lo general en los fermentadores a gran escala esta se mide con un voltímetro conectado al motor.
- ✓ Espuma.- La espuma puede ser detectada y controlada por medio de la destrucción mecánica y por medio de agentes químicos o la combinación de ambos, los sistemas mecánicos se componen de un sistema centrifugo que automáticamente elimina la espuma, los sistemas químicos se encuentran conectados a un electrodo que abre paso a una válvula selenoide la cual da paso a un agente antiespumante estéril, el cual es dispersado de forma

## 17. EQUIPO PARA LAS FERMENTACIONES INDUSTRIALES

uniforme sobre la superficie espumosa, la cantidad de agente antiespumante generalmente es controlada por el sistema de la válvula selenoide, el agente antiespumante más utilizado son los elaborados a base de aceite, para esterilizarlos se requiere de someterlos a condiciones de 160°C por 2 a 6 horas para asegurar su esterilidad.

- ✓ Flujo de gas y aire.- Para el flujo de gas y aire generalmente se usan rotámetros pues son prácticos y económicos.
- ✓ Turbidez.- La medición de la turbidez dentro del fermentador presenta algunas dificultades, sin embargo es importante por que es una medida del crecimiento de las células, el principal problema representa el obtener una muestra representativa, posteriormente se utiliza un espectofotometro para medir la turbidez.
- ✓ pH.- El pH se mide por medio de electrodos compuestos de vidrio, que en su interior están compuestos de Ag/AgCl que en la punta tienen KCl sólido el cual tienen una duración aprox. de 200hr, después de lo cual debe ser esterilizado con vapor para volver a ser utilizado.
- ✓ Potencial de oxidación.- Este puede ser medido por la presencia de nitrógeno u oxígeno o por el control químico de la cisteína, ácido ascórbico, o tioglicolato de sodio, se mide con un sistema de referencia de platino
- ✓ Oxígeno disuelto.- Este se mide por medio de electrodos que se encuentran cubiertos de una membrana de un polímero y un electrolito que se encuentra entre un cátodo y la membrana. El electrodo es sumergido en el medio líquido y el oxígeno reducido en la superficie del cátodo es el que entra del exterior del electrodo.

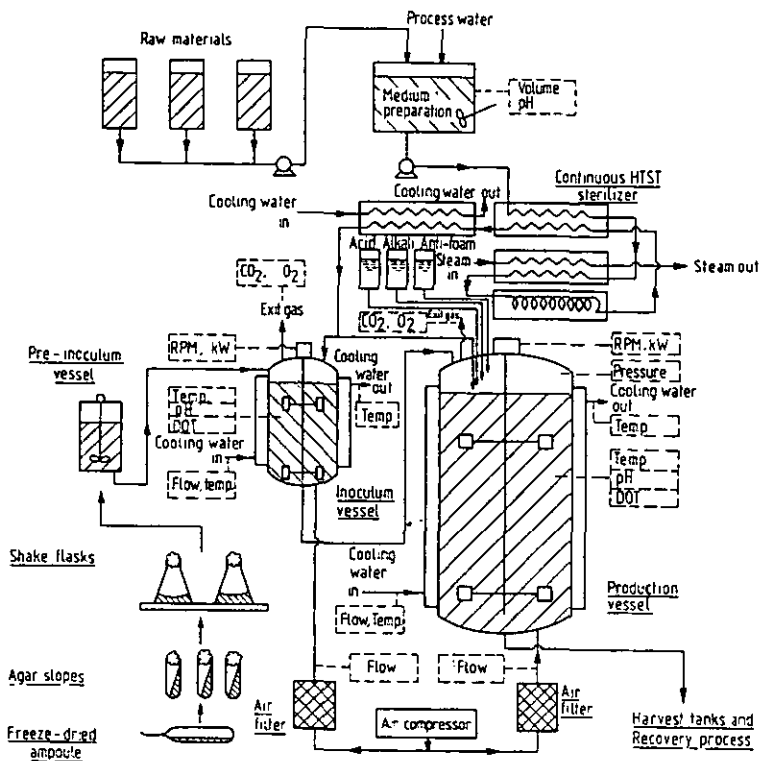
Todos estos sistemas de medición pueden ser controlados por medio de una computadora, de esta manera se mantiene un control estricto sobre el desarrollo de la fermentación haciendo posible cualquier corrección que fuera necesaria en caso de que existiera un contratiempo.

En la actualidad se usan computadoras para monitorear y controlar estos procesos via apagadores que actúan en válvulas o bombas, y para asegurar un control correcto, el operador puede determinar los puntos de control deseados, aunque esto significa un alto

17. EQUIPO PARA LAS FERMENTACIONES INDUSTRIALES

costo por la inversión en tecnología y operación de programas.

En la figura 17.2 se puede ver el esquema de una planta de fermentación industrial. Reed 1982



## CONCLUSIONES

El presente trabajo cumple con los objetivos propuestos de elaborar una recopilación de la información básica en el área de las fermentaciones industriales, describiendo los procesos y presentando las aplicaciones de los productos en la industria alimenticia y otros campos.

Aún cuando el tema es muy extenso se presentó una breve perspectiva del uso de los microorganismos a nivel industrial, este trabajo puede servir como acercamiento al estudiante o primera fuente al investigador.

Haciendo énfasis de que las fermentaciones industriales tienen un gran campo de desarrollo, en el presente trabajo se tratan temas que en el futuro serán muy importantes, y que ahora solo se empiezan a desarrollar.



## BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

## Bibliografía General Recomendada

- Bo'lock J., Kristiansen B., 1987, *Biología básica*, Ed. Acribia, España.
- Dekker, M. Editor, 1987, *Food Biotechnology, Vol I-VII*, D. Knorr USA.
- García Garibay; Quintero, R.; López Mungía, 1993, *Biología Alimentaria*, Limusa, México.
- Harlander, K.; Labuza, T.P., 1986, *Biotechnology in food Processing*, Noyes Publications, USA.
- Hoban T.J., Kendall P.A., 1994, The consumer connection: what biotechnology needs to succeed, *Food Processing*, 55 (9)
- Jia- Ling Lu, Lioa J.C., 1997, Metabolic engineering and control analysis for production of aromatics, role of transaldolase, *Biotechnology and Bioengineering* 53 (2)
- Knorr D., 1995, Improving food biotechnology resources and strategies in developing countries, *Food technology* 49 (1)
- Knorr D., 1987, Food biotechnology It's organization and potencial, *Food Technology* 41 (4)
- Lelieveld H.L.M., et al 1995, Safe biotechnology VI Safety assesment, in respect of human healt, of microorganisms used in biotechnology (review), *Applied Microbiology and Biotechnology* 43 (3)
- PUAL, 1987, Tecnología enzimatica Aplicaciones en alimentos y medicina, UNAM, México.
- Sraagg, A., 1996, *Biología para Ingenieros*, Limusa, México.
- Smith, C.A.; Wood, E.J. et al, 1991, *Molecular Biology and Biotechnology*, Chapman and Hall, USA.
- Reed G, Rehm H.J. copm. 1982, *Biotechnology*, VCH, USA
- Tuker G., 1996, Biotechnology and enzymes in the food industry, *British Food Journal* 98 (45)
- Zimmerman L., Kendall P., Stone M., Hoban T., 1994, Consumer knowledge and concern about biotechnology and food safety, *Food technology* 48 (11)

## CAPITULO 1 Producción de Biomasa

- Ghaly A.E, Ben-Hassan R.M., 1995, Kinetics of batch production of single-cell protein from cheese whey, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 50 (1)
- Litchfield J.H., 1983, Single cell Proteins, *Science*, V.219
- Malatgan M.N., Parongan A.K., 1997, Biomass production by phototrophic bacteria grown on whey, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 33 (2)
- Ramesh Chander Kuhad, Ajay Singh, Tripath K.K., et al, 1997, Microorganisms as an alternative source of protein, *Nutrition Reviews* 55 (3)
- Shay L.K., Wegner G.H., Improved Fermentation process for production torula yeast, *Food technology* 39 (10)
- Vazquez D., Lage M.A., Parajo J.C., 1993, Evaluación de un microorganismo para la producción de proteína unicelular, *Alimentaria No. 244*

## CAPITULO 2 Producción de Alcohol, Vinos y Licores

- Amerinc, M.A. Ph.D.; Kunkee, R.E. Ph.D.; et al, 1980 *Technology of wine making*, 4 ed, AVI, USA.
- Hough J.S., 1990, *Biología de la cerveza y de la malta*, Acribia, España

## BIBLIOGRAFIA

- IngledeW W.M., Jones A.M., BhattY R.S., et al, 1995, Fuel alcohol production from hull-less barley, *Cereal Chemistry* 72 (2)
- Kavanagh K., Whittaker P.A., 1994, Application of the Melle-Boinot Process to the fermentation of xylose by *Pachysolen tannophilus*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 42 (1)
- Pascal F., Dagot C., Pinagaud H., 1995, Modeling of the plant by a process simulator, *Biotechnology and Bioengineering* 46 (3)

### CAPITULO 3 Producción de Antibióticos

- Bergoglio Rerno M., 1985, *Antibióticos*, Panamericana, México.
- Hash J.H., 1975, *Antibióticos, Methods in enzymology V. 43*, Academic USA
- Hash, H.J., *Antibióticos, Methods in Enzymology V.43*, Academic Press, USA.
- Sebek O.K., 1982, *Antibióticos, Biotechnology Vol 6b*, Comp Rehm H.J.VCH, USA
- Vandamme, E.J., 1984, *Biotechnology of industrial Antibiotics*, Marcel Dekker Inc., USA.

### CAPITULO 4 Producción de Ácidos Orgánicos

- Abelyan V.A., Abelyan L.A., 1996, Production of lactic acid by immobilized cells in stirred reactors, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 32 (5)
- Banik, A.K., 1975, Fermentative production of citric acid by *Aspergillus niger* strain selection and optimum cultural conditions for improved citric acid production, *J. Food Science Technology V 12*
- Boyaval P., Cornel, Madec M.M., 1994, Propionic acid production in a membrane bioreactor, *Enzyme and Microbial Technology* 16 (10)
- Elankovan P., et al, Purification process for succinic acid produced by fermentation, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 51/52
- Hofaendahl, K., Hahn-Hagerdahl, B., L-Lactic acid production from the whole wheat flour hydrolysate using strains of Lactobacilli and Lactococci, *Enzyme and Microbiology Technology* 20 (4)
- Rane K.D., Sims K.A., Acid Production by *Candida lipolitica* Y1095 in cell recycle and fed-batch fermentors, *Biotechnology and Bioengineering* 46 (4)
- Sanjay Gupta, Sharma C.B., 1995, Citric acid fermentation by the mutant strain of the *Aspergillus niger* resistant to manganese ions inhibition, *Biochemical Letters* 17 (3)
- Schrickx J.M., et al, 1995, Organic acid production by *Aspergillus niger* in recycling culture analyzed by capillary electrophoresis, *Analytical Biochemistry* 231 (1)

### CAPITULO 5 Producción de Vitaminas

- Blakebrough, N., 1967, *Biochemical and Biological Engineering Science Vol I*, Academic Press, UK.
- Schmidt G., Stahmann K.P., et al, 1996, Correlation of isocitrate lyase activity and riboflavin formation in the riboflavin over producer by *Ashbya gossypii*, *Microbiology* 142 (2)
- Takeyama, H., Kanamaru A., Yoshino Y., et al, 1997, Production of antioxidant vitamin Beta-Carotene, Vitamin E, Vitamin C by two step culture of *Euglena gracilis*, *Biotechnology and Bioengineering* 53 (2)

### CAPITULO 6 Hidrólisis de Almidón

- Compagno C., Poro D., Smeraldi C., Ranzi B.M., 1995, Fermentation of whey and starch by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cell, *Applied Microbiology*

*and Biotechnology 42 (5)*

- Nigam P., Singh Dalel, 1995, Enzyme and microbial systems involve starch processing, (review), *Enzyme and Microbiology Technology 17 (9)*
- Schenck, F.W.; Hebede, R.E., 1992, *Strach Hidrolysis Products*. VCH, USA.
- Tae-Jong Kim; Bong-Chan Kim; Hyun-Soo Lee, 1997, Production of ciclodextrin using raw corn strach without a pretreatment, *Enzyme and Microbial Techology 20 (7)*

## CAPITULO 7 Utilización de Desechos Agroindustriales

- Hong Chua , Cheng C.C.N., 1996, Operation of a novel annerobic biofilter for treating food processing waste water, *Applied Biochemistry and Biotechnology 57/58*
- Karam J.; Nicel J.A., 1997, Potencial applications of enzymes in waste treatment, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology 69 (2)*
- Smith J.F.S.,Spencer D.M.,1976, Rapid preparation of compost suitable for the prodiction of the cultivated mushroom, *Science Hort (5)*
- Tentscher W.A.K., 1995, Biogas technology as a component of food procesing systems, *Food tecnology 49 (1)*
- Tlan C.T. Mitchell D.A., 1996, Pineapple waste- a novel substrate for citric acid production by solid-state fermentation, *Biotechnology Letters 17 (10)*
- Xu P., Quian X.M., Wang Y.X., Xu Y.B., 1996, Modelling for wastw water treatment by *Rhodopseudomonas palustris* Y6 immobilized on fibre in a columnr bioreactor, *Applied Microbiology and Biotechnology 44 (5)*

## CAPITULO 8 Producción de Enzimas

- Balcao V.M., Paiva A.L., Malcata F.X., 1996, Bioreactors with immobilized lipases state of the art, *Enzyme and Microbiology Technology 18 (6)*
- Bodalo A., Gomez J.L., Gomez E., et al, 1995, Fluidized bed reactors operating with immobilized enzyme systems design model and its experimental verification, *Enzyme and Microbiology Technology 17 (10)*
- Bohdziewicz J., 1996, Ultrafiltration of technical amylolytic enzymes, *Process Biochemistry 31 (2)*
- Chaplin, M.F.; Bucke, D.R., 1990, *Enzyme Technology*, Cambridge University Press, USA.
- D'Conha, G.B. et al, 1996, Stabilization of phenylalanine ammonia lyasa containing *Rhodoturda glutinis* cells for the continuous synthesis of L-phenilalanine methyl ester, *Enzyme and Microbiology Technology*
- Doilt Kawakmi, M., 1996, Purification of aminopeptidasa from Japanese classified barley flour, *Journal of Food Biochemistry 19 (6)*
- Gacesa, P.; Hubble, J., 1990, *Tecnología de las enzimas*, Acribia, España.
- García Garibay M., Lopez Munguía C.A.,1984, Enzimas inmovilizadas y su aplicación en la industria alimentaria, *Ciencia y Desarrollo 10 (54)*
- Gerhartz, W., 1990, *Enzymes in Industry Products and Aplications*, VCH, USA.
- Jain A., 1995 Production of xylanase by thermophilic melano carpos albomyces, *Process Biochemistry 30 (8)*
- McArdle R.N., Coulver C.A., 1994, Enzyme Infusion: a developing technology, *Food tecnology 48 (11)*
- Ovsejevi K., Brena B., Batista V.F., Carlsson J., 1995, Immobilization of B-galactosidase on thio sulfonate-agarose, *Enzyme and Microbiology Technology, 17 (2)*
- Parrado, J. Millan F., Bautista, Kerase immovilization by covalent attachment to

## BIBLIOGRAFIA

---

- porous glass, *Process Biochemistry* 30 (8)
- Pellerin P., Brillovet J.M., 1994, Purification and properties of an exo-(1-3) B-D-galactanase from *Aspergillus niger*, *Carbohydrate Research* 264 (2)
- Reed, G., 1975, *Enzymes in food processing*, 2 ed., Academic Press, USA
- Rul F., Monet V., Gripon J.L., 1994, Purification and characterization of general amino peptidase (st-pep N) from *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, *Journal of Dairy Science* 77(10)
- Shan B., Kumar S.R., Devi S., 1995, Immobilized proteolytic enzymes on resinous materials and their use in milk-clotting, *Process Biochemistry* 30 (1)
- Takagi M., Nishio Y., et al, 1996, Control of L-phenylalanine production by dual feeding of glucose and L-tyrosine, *Biotechnology and Bioengineering* 52 (6)
- Tuker G., 1996, Biotechnology and enzymes in the food industry, *British Food Journal* 98 (45)
- Varfolomeyev S.D., Zaitseva E.A., Osipova T.A., 1996, Research activities in the field of enzyme engineering in the framework of the Russian state scientific program (Novel methods in Bioengineering), *Applied Biochemistry and Biotechnology* 61 (1/2)
- Wiseman, A. Ph.D., 1991, *Manual de Biotecnología de las enzimas*, Acribia, España,

### CAPITULO 9 Producción de aminoácidos

- Eggeling L., Morbach S., Sahn H., 1997, The fruits of molecular physiology engineering the L-isoleucine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum* (review), *Journal of Biotechnology* 56(3)
- Hashiguchi K. Kojima H., et al., 1997, Effects of an *E. coli* *ilvA* mutant gene encoding feedback-resistant threonine deaminase on L-isoleucine production by *Brevibacterium Flavum*, *Bioscience, Biotechnology and biochemistry* 61 (1)
- Kenji S. et al, 1982, Amino acids, biotechnology V. 3, comp Dellweg H. VCH, USA
- Krämer R., 1996, Genetic and physiological approaches for the production of aminoacids Review, *Journal of Biotechnology* 45 (1)
- Mizukami T, Hamu A, Ikeda M., 1994, Cloning of the ATP phosphoribosyl transferase gene of *Corynebacterium glutamicum* and application of the gene to L-histidine production, *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 58 (4)
- Morbach S., Sahn H. et al, 1995 Use of feed back resistant threonine dehydratases of *Corynebacterium glutamicum* to increase carbon flux towards L-isoleucine, *Applied and Environmental Microbiology* 61 (12)
- Takagi M. Nishio Y, Yosida T., 1996 Control of L-Phenylalanine production by dual feeding of glucose and L-tyrosine, *Biotechnology and Bioengineering* 52(6)

### CAPITULO 10 Producción de Gomas Microbianas

- Clementi F., Fantozzi P., et al, 1995, Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii*, *Enzyme and Microbiology Technology* 17 (11)
- Dikinson E., 1991, *Food polymers gels and colloids*, The royal Society of Chemistry, UK
- Dlamini A.M., Peiris P.S., 1996, Production of exopolysaccharide by *Pseudomonas SPATCC 31461* using whey as fermentation substrate, *Applied Biochemistry and Microbiology* 47 (1)
- García-Ochoa F., Santos V.E., Alcon A., 1995, Xanthan gum production an unstructured kinetic model, *Enzyme and Microbiology Technology* 17 (3)
- Gasseem M.A.A., 1995, Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria (abstract tesis), *Dissertation Abstracts International* 56 (2)

- Gebelein, C.G., 1990, *Biotechnology and Polymers*, Plenum Press, USA.  
 Glicksman, M., 1969, *Gum Technology in the food industry*, Academic Press, USA.  
 Glicksman, M., 1986, *Food Hydrocolloids Vol I, II, III*, CRC Press, USA

## CAPITULO 11 Producción de Aditivos

- Abraham B.G., Berger R.G., Higer fungi for generating aroma components through novel biotechnologies, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (10)  
 Anon., 1996, Taumatin- the sweetest substance know to man has a wide range of food applications, *Food tecnology* 50 (1)  
 Gerhardt, U. Dr., 1980, *Aditivos*, Acribia, España  
 Hagedon S., Kaphammer B., 1994, Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals, *Annual Review of Microbiology* 48, 773  
 Newsome R.L. 1986, Food colors, *Food technology* 40 (7)  
 Pommer K., 1995, New proteolytic enzymes in production of savory ingredients, *Cereal Food Wold* 40 (10)

## CAPITULO 12 Recominación Genetica

- Anon. 1997, Genetic modification and food, *Food technologist* 26 (4)  
 Cguardida J., Iborra J.L., Canovas M., 1995 A model that links growth and secondary metabolite production in plant cell suspension cultures, *Biotechnology and Bioengineering* 46 (3)  
 Chavez F.P., Rodriguez L., Diaz J., Delgado J.M., et al, 1997, Purification and characterization of an invertase from *Candida utilis* comparision with natural and recombinant yeast invertases, *Journal of Biotechnology* 53 (1)  
 Dong Seok Lee, Hun Gil Chang, 1995, Cloning and expression of a B-1,3, glucanase gene from *Bacillus circulans* KCTC3004 in *E. coli*, *Biotechnology Letters* 17 (4)  
 Ellahi B., 1994, Genatic engineering for food production- what is it all about, *British Food Journal* 96 (8)  
 Grossman, L. et al, 1989, *Recombinant DNA Methodology*, Academic Press, USA.  
 Ibragimova S.I., Kozolv D.G. et al, 1995 A strategy for construction of industrial strains of destillers yeast, *Biotechnology and Bioengineering* 46 (3)  
 Heard G.M., Fleet G.H., 1987, Ocurrence and grow of killer and its breeding with an industrial baking strain protoplast fusion, *Applied environmental microbiology* 53 (9)  
 Jones L., 1996, The gene scene, *Food Manufacture* 71 (2)  
 Karl, D., 1992, *Understanding DNA gene cloning*, J. Wiley, USA.  
 Lelieveld H.L.M., et al, 1995, Safe biotechnology VI. Safety assessment in respect of human health of microorganisms used in biotechnology (review), *Applied Microbiology and Biotechnology* 43 (3)  
 O'Kennedy R., Houghton C.J., Patching J.W., 1995 Effects of growth environment on recombinant plasmid stability in *Saccharomyces cerevisiae* grow in continuos culture, *Applied Microbiology and Biotechnology*  
 Pellon, J.R., 1986, *La Ingeniería Genética y sus aplicaciones*, Acribia, España.  
 Perry, H.B., 1988, *An Introduction to recombinant DNA tecniques: Basic experiments in gene manipulation*, Benjamin Cummings, USA.  
 Prave P., 1989, *Basic biotechnology: a student's guide*, VCH, USA  
 Stephenson J.R., Warnes A., 1996, Release of genetically modified micro-organism in to the environment (review), *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 65 (1)

## BIBLIOGRAFIA

---

- Walsh, S.; Headon, D.R., 1994, *Protein Biotechnology*, John Wiley and Sons, UK.  
Whitelam G.C., 1995, The production of recombinat proteins in plants, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 68 (1)

### CAPITULO 13 Cultivo de Tejidos Vegetales

- Cguardida J., Iborra J.L., Canovas M., 1995 A model that links growth and secondary metabolite production in plant cell suspension cultures, *Biotechnology and Bioengineering* 46 (3)  
Dörnenburg H., Knorr D., Strategies for the improvement of secondary metabolite product in plant cell cultures, *Enzyme and Microbiology Technology* 17 (8)  
Dow-Shain, Kung, 1989, *Plant Biotechnology*, Boston Potterwoths, USA.  
Hiatt A., Cafferkey R., Bowdish K., 1989, Production of antibodies in trasgenic plants, *Nature* 324  
Walden, R., 1989, *Genetic transformation in plants*, Prentice Hall, USA.  
Wei Wen Son, 1995, Bioprocessing technology for plant cell suspension cultures (review), *Applied Biochemistry and Biotechnology* 50 (2)  
Whitelam G.C., 1995, The production of recombinat proteins in plants, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 68 (1)  
Wilson, M.A., Davies, J.W., 1992, *Genetic Engineering with plant viruses*, CRC, USA., 1989, *Genetic Engineering of plants: Agricultural oportunities and Polyci concerns*, National Academy, USA.

### CAPITULO 14 Alimentos Fermentados Tradicionales

- Bekett, S.T., 1994 *Fabricación y utilización industrial del chocolate*, Acribia, España.  
Beuchart L.R., 1995, Application of biotechnology to indigenous fermented foods, *Food tecnology* 49 (1)  
Blanc P.J., 1996, Characterization of the tea fungus metabolites, *Biotechnology Letters* 18 (2)  
Bottazi V., 1982, Other fermented dairy foods, *Biotechnology*, Reed comp. VCH, USA  
García P. Sanchez A., Rejano L., Brenes M., Garrido A., 1995, The effects of acidification and temperature during washing of Spanish-style greena olives on the fermentation process, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 68 (2)  
Kwak H.S., Park S.K., Kim D.S., 1996, Bioestabilization of Kefir with a nonlactase fermenting yeast, *Journal of Dairy Science* 79 (6)  
Luh B.S.Ph.D., Woodroof, J.G.Ph.D., 1982, *Commercial vegetable processing*, 4ed, AVI, USA  
Meuser F., 1995, Development of fermentation technology in modern bread factories, *Cereal foods World* 40 (3)  
Owvor P.O., McDowell I., 1994, Changes in the thea flavin composition and astringency during black tea fermentation, *Food Chemistry* 51 (3)  
Price, J.F. Ph.; Schweigert, B.S. Ph.D., 1987, *The science of meat and meat products*, 3ed, Food and Nutrition Press, USA.  
Quaglia, G., 1991 *Ciencia y tecnología de la panificación*, 2 ed, Acribia, España  
Sarkar P.K., Jones L.J., Craven G.S., et al, 1997, Amino acid profiles of a soy bean fermented food, *Food Chemistry* 59 (1)  
Sivetz M. Ch. E., Desrosier N.W. Ph D. 1979, *Coffe technology*, AVI Publishing Company USA  
Souza Pereira R., 1996, Baker's yeastt some biochemicals aspects and their influence

in biotrasformations, *Applied Microbiology and Biotechnology* 55 (2)

#### CAPITULO 15 Medios de cultivo

- Ceballos-Pinto L., Martinez-Jeronimo F., 1995, Mass production of *Scenedesmus incrassatulus* in a 8 and 40 liter disposable polyethylene bags with diferent culture media, *Revista Latinoamericana de Microbiología* 37 (2)
- Rajeshwari K.V., Prakash G., Ghosh P., 1995, Improved process for xanthan production using modified media and intermittent feeding strategy, *Letters in Applied Microbiology* 21(3)
- Webb, F.C.Ph.D., 1966, *Ingeniería Bioquímica*, Acirbia, España.

#### CAPITULO 16 Crecimiento Microbiano

- Bailey, J.E.; Ollis,D.F., 1977, *Biochemical Engineering Fundamentals*, Mc Graw-Hill, USA.
- Davies R.J.,Kennedy M.J.,Reader S.L., 1994, The kinetics of developing fermentation media, *Process Biochemistry* 29 (7)
- Ghaly A.E, Ben-Hassan R.M., 1995, Kinetics of batch production of single-cell protein from cheese whey, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 50 (1)
- Guardida J., Iborra J.L., Canovas M., 1995 A model that links growth and secondary metabolite production in plant cell suspension cultures, *Biotechnology and Bioengineering* 46 (3)
- Quintero, R., 1981, *Ingeniería Bioquímica Teria y Aplicaciones*, Alhambra, México
- Trevan, S.; Boffey, S., et al, 1990, *Biotecnología: Principios Biologicos*, Acirbia, España
- Yakovenko V.L., et al, 1996, Kinetics of biomass synthesis in various microorganisms, *Applied Biochemistry and Microbiology* 32 (6)

#### CAPITULO 17 Equipo para Fermentaciones Industriales

- Atkinson, B., 1986, *Reactores Bioquímicos*, Reverté, España.
- Jimenez Albo-Joglar R., 1996, Conceptos y métodos para el escalamiento de procesos fermentativos, *Alimentaria No. 272*
- Gooijer C.D., Bakker W.A., et al, 1996, Bioreactor inseries: an overview of design procedures and practical applications, *Enzyme and Microbiology Technology* 18 (3)
- Maher M., Roux G., Daanhou B., 1995, Amethod for estimating the state variables and parameters of fermentation system, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 63 (2)
- McMillan, G.K., 1987, *Biochemical Measurement and Control*, Instrument Society of America, USA.
- Miskiewicz T., Wiczynski S., 1995, Areal-time rate control system for pilot plant baker's yeast production, *Biotechnology Letters* 18 (1)
- Pascal F., Dagot C., Pinagaud H., 1995, Modeling of the plant by a process simulator, *Biotechnology and Bioengineering* 46 (3)
- Relm H.J., Reed G., 1991, *Biotechnology measuing modelling and control Vol. 4*, VCH, 2ed, USA
- Solomons,G.L. 1969, *Material and methods in Fermentation*, Academic Press, USA.
- Torres N.V., Voit E.O., Gonzalez-Alcon C., 1996, Optimization of nonlinear biotechnological process whith linear programming application to citric acid production by *A. niger*, *Biotechnology and Bioengineering* 49(3)

## BIBLIOGRAFIA

Bibliotecas en donde existe bibliografía del tema:

### *Bibliotecas dependientes de la UNAM*

#### *Ciudad Universitaria*

Biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Circuito interior

Process Biochemistry	Nature
Biotechnology Letters	Microbiology
Enzyme and Microbiology Technology	Food Technology
Journal of the Science of Food and Agriculture	
Biotechnology and Bioengineering	
Journal of Dairy Science	
Journal of Agricultural and Food Chemistry	
Applied and Environmental Microbiology	
Applied Microbiology and Biotechnology	
Applied Biochemistry and Biotechnology	
Applied Biochemistry and Microbiology	
Trends in Biotechnology	
Letters in applied Microbiology	
Journal of Biotechnology	
Journal of Fermentation Technology	

Biblioteca del Instituto de Biología Instituto de Biología, Circuito exterior

Biotechnology Letters	Nature
-----------------------	--------

Biblioteca Jesus Romo Armeria, Instituto de Química, Circuito exterior

Journal of Chemical Technology and Biotechnology

Biblioteca de la Facultad de Química, División de Estudios Profesionales Edificio A, Planta baja. Circuito interior

Journal of Chemical Technology and Biotechnology

Microbiology

Journal of Fermentation Technology

Biblioteca de la Facultad de Química, División de Estudios de Posgrado, Circuito interior

Journal of Food Biochemistry

Biblioteca de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, División de Estudios Profesionales y de Posgrado, Circuito exterior

Journal of Dairy Science

Applied and Environmental Microbiology

International Journal of Dairy Science

Hemeroteca de Investigaciones Dr. Jose Joaquín Izquierdo, División de investigaciones, Facultad de Medicina

Nutrition Review

Hemeroteca Nacional, Instituto Nacional de Investigaciones Bibliográficas

Process Biochemistry

*Otras dependencias*

Hemeroteca de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlan, Av. Quetzacoalt s/n Cuautitlan Izacalli

Biotechnology and Bioengineering	Cereal Chemistry
Carbohydrate Research	Cereal Food World
Food Technology	Nature
Journal of the Science of Food and Agriculture	

### *Bibliotecas dependientes del Poli*

*CINVESTAV (Av. Politecnico Nacional 2508 San Pedro Zacatenco)*



- Biblioteca de la Sección de Servicio de Control Analítico y Evaluación de Calidad  
 Biotechnology and Bioengineering  
 Applied and Environmental Microbiology
- Biblioteca del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería  
 Process Biochemistry  
 Biotechnology Letters  
 Enzyme and Microbiology Technology  
 Journal of the Science of Food and Agriculture  
 Journal of Chemical Technology and Biotechnology  
 Journal of Dairy Science  
 Applied Microbiology and Biotechnology  
 Food Processing  
 Cereal Chemistry  
 Cereal Food World  
 Journal of Fermentation Technology
- Biblioteca del departamento de Química  
 Journal of Agricultural and Food Chemistry
- Biblioteca del Departamento de Bioquímica  
 Nutrition Review

*Bibliotecas dependientes de la UAM*

- Coordinación de servicios documentales Unidad Iztapalapa  
 Av. Michoacan y Purisima Vicentina Iztapalapa
- |  |                  |
|--|------------------|
| Food Processing                                  | Food Technology  |
| Cereal Chemistry                                 | Food Manufacture |
| Nature   | Microbiology     |
| Nutrition Review                                 |                  |
| International Journal of Dairy Science           |                  |
| Journal of the Science of Food and Agriculture   |                  |
| Journal of Chemical Technology and Biotechnology |                  |
| Biotechnology and Bioengineering                 |                  |
| Journal of Agricultural and Food Chemistry       |                  |
| Applied and Environmental Microbiology           |                  |

- Coordinación de servicios de Información Unidad Xochimilco  
 Calz. del Hueso 1100 Villa Quietud Coyoacan  
 Meat Processing International

*Otras Bibliotecas*

- Biblioteca Lanfi, Departamento de Investigación, Documentación y estudios. Dirección de promoción y planeación Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial.  
 Av. de la Industria Militar 261 Lomas de Sotelo Delg. Miguel Hidalgo
- |  |                      |
|--|----------------------|
| Food Technology                                | British Food Journal |
| Cereal Food World                              | Process Biochemistry |
| Journal of Fermentation Technology             |                      |
| Enzyme and Microbiology Technology             |                      |
| Journal of the Science of Food and Agriculture |                      |
| Journal of Food Biochemistry                   |                      |
| Journal of Agricultural and Food Chemistry     |                      |

## **BIBLIOGRAFIA**

---

- Biblioteca Infotec ( Fondo de información y documentación para la industria)  
San Fernando 37 Toriello Guerra  
Journal of Dairy Science      Food Manufacture  
Cereal Food World  
Journal of the Science of Food and Agriculture  
Journal of Agricultural and Food Chemistry
- Biblioteca del Instituto Nacional de Perinatología Instituto Nacional de Perinatología,  
Secretaría de Salubridad y asistencia.  
Montes Urales 800 Lomas Virreyes Cuahutemoc.  
Process Biochemistry
- Departamento de documentación científica y tecnologica, Vocalia Pecuaria Instituto  
Nacional de Investigaciones forestales y agropecuarias, Seccion de Agricultura y Recursos  
Hidraulicos.  
Carretera México-Toluca Km. 15.5, Palo Alto  
Journal of Dairy Science
- Biblioteca central Unidad Academica Chapingo  
Domicilio Conocido Chapingo Texcoco  
Food Processing
- Centro de documentación y Biblioteca del colegio de postgraduados,  
Domicilio Conocido Montecillos Texcoco.  
Journal of Dairy Science  
Applied and Enviromental Microbiology  
Cereal Food World  
Annual Review of Microbiology
- Biblioteca "Daniel Cosío Villegas" Colegio de México  
Camino al Ajusco 20 Santa Teresa  
Dissertation Abstracts International
- Biblioteca de México  
Plaza de la ciudadela 6, centro