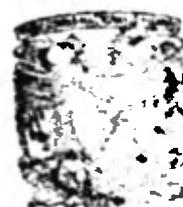




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Obtención de Biomasa y Endo - Poligalacturonasa de *Kluyveromyces fragilis* a partir de Suero de Queso



T E S I S EXAMEN ESPECIAL FAC. DE QUIMICA

mancomunada

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presentan:

JOSE MARIANO GARCIA GARBAY

LORENA DEL CARMEN GOMEZ RUIZ



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.

INDICE

| | |
|---|----|
| 1.- INTRODUCCION..... | 1 |
| 2.- GENERALIDADES | |
| 2.1.- El suero de queso | |
| 2.1.1.- Características..... | 3 |
| 2.1.2.- Utilización..... | 3 |
| 2.1.3.- Producción..... | 12 |
| 2.2.- Protefna unicelular | |
| 2.2.1.- Características generales..... | 13 |
| 2.2.2.- Protefna unicelular de <i>K. fragilis</i> | 23 |
| 2.3.- Enzimas pectinolfticas | |
| 2.3.1.- Clasificación..... | 39 |
| 2.3.2.- Distribución y obtención..... | 40 |
| 2.3.3.- Usos..... | 45 |
| 2.3.4.- Endo-poligalactouronasa de <i>K. fragilis</i> .. | 49 |
| 3.- MATERIALES Y METODOS | |
| 3.1.- Microorganismos..... | 54 |
| 3.2.- Medios y soluciones..... | 54 |
| 3.3.- Condiciones de cultivo..... | 55 |
| 3.4.- Parámetros de crecimiento..... | 56 |
| 3.4.- Actividad..... | 59 |
| 3.6.- Purificación de la enzima..... | 60 |
| 3.7.- Aplicación de la enzima en jugo de manzana..... | 61 |
| 3.8.- Secuencia experimental..... | 62 |
| 4.- RESULTADOS Y DISCUSION | |
| 4.1.- Comparación de las cepas..... | 63 |
| 4.2.- Influencia de la aireación en la producción de enzima..... | 70 |

| | |
|--|-----|
| 4.3.- Influencia de la pectina sobre la producción de enzima..... | 77 |
| 4.4.- Efecto del tratamiento térmico del suero sobre el crecimiento y la producción de enzima..... | 83 |
| 4.5.- Efecto de la suspensión de aire en la producción de enzima en medio con pectina..... | 88 |
| 4.6.- Consideraciones generales sobre las fermentaciones..... | 94 |
| 4.7.- Composición proteica de la biomasa..... | 99 |
| 4.8.- Estabilidad de la enzima..... | 99 |
| 4.9.- Purificación de la enzima..... | 99 |
| 4.10.-Aplicación de la enzima en la clarificación de jugo de manzana..... | 100 |
| 5.- CONCLUSIONES..... | 104 |
| 6.- BIBLIOGRAFIA..... | 107 |

1.- INTRODUCCION

El suero es el líquido resultante de la coagulación de la leche durante la elaboración del queso, tras la separación de la caseína y de la grasa. Debido a sus componentes, el suero de queso presenta una demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de 32 000 o más ppm (45), representando un serio problema de contaminación cuando es vertido al seno de cursos acuíferos. Si además consideramos que algunos de estos componentes poseen valiosas características nutricionales, a saber: proteínas de alta calidad, vitaminas y minerales, se hace comprensible el creciente interés en el aprovechamiento de este subproducto.

En los países altamente industrializados, los fabricantes de quesos se han visto obligados a encontrar alternativas de utilización del suero, debido a las rígidas legislaciones sobre el control de desechos. En México no hay aún restricciones tan severas para la emisión de este tipo de desperdicios al alcantarillado municipal, corrientes fluviales, lagos, etc., pero es muy probable que en un futuro no muy lejano llegue a haberlas. Sin embargo, dados los problemas nutricionales de nuestro país, es necesario encauzarse en la búsqueda de formas convenientes de utilización de este tipo de subproductos.

Una de las alternativas de utilización, que se realiza ya en los Estados Unidos y Europa en forma industrial, es la producción de proteína unicelular de *Kluyveromyces fragilis* (antes conocida como *Saccharomyces fragilis*). La fermentación del suero con esta levadura, permite la conversión de lactosa en biomasa rica en proteínas y vitaminas que puede ser usada, tanto en alimentación a-

nimal, como en la suplementación directa de alimentos de consumo humano, todo ello gracias a la total inocuidad de este microorganismo (79,82) y a la procedencia del sustrato. *K. fragilis* produce además endo-poligalactouronasa parcialmente constitutiva en forma extracelular (53,109). Esta enzima forma parte de las pectinasas, compuestos utilizados extensivamente en el procesado de jugos de frutas. Por todas estas razones, el objetivo de este trabajo es estudiar la obtención de la pectinasa de *K. fragilis*, con posibilidades de utilización comercial, paralelamente al proceso de obtención de proteína unicelular. La fermentación de suero de queso con esta levadura cuenta con un alto potencial de implementación; este potencial aumenta si, paralelamente a la fermentación básica, se recupera la endo-poligalactouronasa del líquido residual.

2.- GENERALIDADES

2.1.- El suero de queso

2.1.1.- Características

El suero de queso constituye aproximadamente el 90% del volumen de la leche, y contiene la mayor parte de la totalidad de los compuestos hidrosolubles de ésta. Su composición varía dependiendo de la composición de la leche y de las condiciones de elaboración del queso de que proceda, pero en términos generales podemos decir que el suero contiene: 4.9% de lactosa, 0.9% de proteína cruda, 0.6% de cenizas, 0.3% de grasa, 0.2% de ácido láctico y 93.1% de agua (107). Sólo aproximadamente el 50% del nitrógeno total (proteína cruda), corresponde a proteína verdadera, la que está compuesta por las globulinas y albúminas lácteas, las cuales tienen un valor nutritivo superior al de la caseína (78%), el resto forma parte de proteosa-peptona, aminoácidos, urea, creatina, amoníaco y ácidos nucleicos (82,102,2). Además, el suero contiene las vitaminas hidrosolubles de la leche.

El suero de queso, según su acidez, se divide en tres tipos: suero dulce, con un pH mayor que 5.8, suero medio ácido con un pH entre 5.8 y 5.0, y suero ácido, con un pH menor que 5.0 (45). En México, el suero de queso es principalmente dulce y medio ácido.

2.1.2.- Utilización

El primer uso que se dió al suero de queso fué en forma directa como alimento líquido para animales. Debido a que esta alternativa no involucra ninguna transformación, está aún ampliamente difundida en la alimentación

de cerdos, ganado vacuno y pollos, principalmente, pero está sujeto a la condición de que no tenga que transportarse a grandes distancias, ya que el suero líquido tiene una gran proporción de agua, lo que hace incosteable el transporte, y reduce mucho su capacidad de conservación (45,88). Sin embargo, este uso se ve limitado debido a que los animales tienen una tolerancia relativamente baja al suero, ya que la lactosa se acumula en el aparato digestivo de los mamíferos adultos, ante la incapacidad de éstos para hidrolizarla y asimilarla, provocándoles disturbios gastrointestinales severos. Esta incapacidad se presenta también en una proporción muy alta entre los humanos adultos, y en ocasiones en niños, principalmente entre los grupos étnicos que no son la raza caucásica (46,39). Otro inconveniente es el hecho de que los nutrientes se encuentran muy diluidos, teniendo el animal que consumir grandes cantidades de agua para poder llegar a ingerir una cantidad significativa de éstos. Por ello, generalmente se da en proporciones bajas, mezclado con otros forrajes o sustituyendo al agua de bebida (45,9).

Otro uso que se da al suero sin que medie una transformación, es en la fertilización de sembradíos. En este caso se tiene la limitación de que sólo se requiere en determinadas épocas del año, y el inconveniente de que se están subutilizando compuestos de alto valor nutritivo (45,9,88).

Un proceso simple y muy antiguo para la utilización del suero, es la recuperación de las proteínas por termocoagulación. Este proceso está ampliamente difundido en México a nivel rural; mediante él se obtiene el queso. Para obtenerlo, el suero se acidifica, generalmente dejándolo bajo la acción de las bacterias productoras de

ácido láctico, y se calienta a ebullición, con lo cual se obtiene un flóculo de proteínas que se separa por filtración a través de una tela. Una técnica muy similar a ésta, se emplea en los países balcánicos para la obtención del Urda, y en Italia para la obtención del Ricotta, sólo que en este último caso generalmente se adiciona un 10% de leche, y en ocasiones se acidifica con jugos de frutas. Otros "quesos" se obtienen a partir de suero condensado: Gjetost, hecho con suero de leche de cabra; Primost, similar al anterior, pero con crema adicionada; Mysost, hecho de suero de leche de vaca; y el Gudbrandsdalsost, que se obtiene de una mezcla de 88% de suero de leche de cabra y 12% de vaca (45,78). En ocasiones, la termocoagulación tiene como objeto simplemente recuperar las proteínas del suero con un valor nutritivo elevado, para utilizarlas en la suplementación de otros alimentos (88). Con estos procesos se recupera la porción más valiosa del suero, desde el punto de vista nutricional, pero la mayor parte de la lactosa y otros componentes permanecen aún en el líquido residual, con lo que el problema de contaminación no queda resuelto; sin embargo, en ocasiones este líquido es aprovechado como fuente de lactosa, o como medio de cultivo en distintos procesos fermentativos que se discutirán posteriormente. El líquido residual de la elaboración del Urda se consume como bebida refrescante, dulce o ligeramente fermentada (78).

El suero de leche entera se utiliza en ocasiones para la elaboración de bebidas refrescantes de alto nutritivo, mezcladas con azúcar y jugos de frutas o saborizantes, y para la elaboración de polvos para preparar bebidas, mezclado con soya (45,107,9); las primeras pueden además fermentarse con mezclas de microorganismos (107,39,44). Por lo general, la lactosa del suero en estas bebidas se hidroliza

con lactasa (78). En México hay una marca comercial de refresco enriquecido con suero.

El empleo de técnicas más sofisticadas permite una utilización más completa del suero de queso. La más utilizada a nivel industrial, es el secado por aspersion: el suero se concentra en un evaporador de doble o triple efecto, generalmente hasta obtener una concentración de 45% de sólidos totales, y después se pasa al secador. En algunas ocasiones se sustituye el secador de espaldas por uno de tambor rotatorio, el que tiene los inconvenientes de reducir la calidad del producto y de que el secado es más lento (45,9). El suero puede o no ser desmineralizado, por electrodiálisis o pasándolo a través de resinas de intercambio iónico, antes del secado (66). El suero en polvo se utiliza principalmente para sustituir a la leche descremada en polvo, como sólidos no grasos de leche en una gran variedad de alimentos como son: productos lácteos y sustitutos, productos de panadería, confitería, helados, bebidas, alimentos para mascotas y dietas para ganado. También se utiliza en la elaboración de leches maternizadas, ya que éstas requieren una mayor proporción de lactosa, lactoglobulinas y lactoalbúminas. El suero ácido en polvo puede ser utilizado como acidulante de productos lácteos (45). También es comercial la venta de suero condensado: esto se realiza en un evaporador de doble efecto, hasta una concentración de 62 a 64% de sólidos totales. El producto puede además alimentarse a un reactor de lactasa inmovilizada, para hidrolizar la lactosa y obtener así un jarabe más dulce que no provoca disturbios gastrointestinales (45, 79). El suero condensado, tanto el de lactosa hidrolizada como el original, se utilizan en varios productos alimenticios para humanos y para animales (45,88,39). El proceso de secado está bastante difundido en México, sin embargo es-

tá limitado a las grandes industrias queseras, ya que la inversión en equipo es cuantiosa.

Las técnicas más sofisticadas para la recuperación de los sólidos del suero de queso, son los procesos de membrana: ultrafiltración y ósmosis inversa. En la ultrafiltración se hace pasar el suero através de una membrana permeable a todos sus componentes, excepto las protefnas y sales insolubles. La presión requerida para forzar al líquido a pasar por la membrana es del orden de 20 a 50 psig, lograda con una bomba o con la ayuda de un gas inerte. Los productos de la ultrafiltración son: un concentrado proteico, del cual se ha eliminado entre el 75 y el 95% del agua total, y el ultrafiltrado, que contiene casi la totalidad del agua, la lactosa, sales solubles, nitrógeno no proteico soluble y ácido láctico. La DBO del suero desproteinizado por ultrafiltración, se reduce sólo en un 10 o 15%. En el proceso de ósmosis inversa se emplean membranas de poros con diámetro menor, por lo cual, las presiones requeridas son de 500 a 800 psig. Si el suero es procesado por ósmosis inversa, no sólo se retienen las protefnas, sino también la lactosa y otros compuestos de peso molecular medio. Con algunas membranas logran detenerse incluso hasta las sales y el ácido láctico. En el permeato de la ósmosis inversa la DBO se reduce hasta en un 99%. Lo usual en los procesos comerciales es que el suero se desproteinize por ultrafiltración, y luego sea tratado por ósmosis inversa; de esta manera se obtiene un concentrado proteico de gran aceptación en la industria alimentaria, y un concentrado de lactosa de gran valor comercial. Plantas industriales con este proceso están ya operando en E.U.A., Dinamarca, Nueva Zelanda, Francia, etc. (45, 81). Sin embargo, también hay la opción de dar al suero desproteinizado por ultrafiltración los mismos usos que al sue-

ro desproteínizado por termocoagulación, o sustituir el proceso de concentración del suero entero en evaporadores, por el de ósmosis inversa (45,66). A pesar de que parece un proceso atractivo, es todavía muy caro, debido a que las membranas tienen costos muy elevados, y a que su tiempo de vida es muy limitado; las elevadas presiones requeridas, encarecen aún más el costo; por eso, esta técnica sofisticada no ha encontrado aceptación en México.

El suero de queso es un excelente medio de cultivo, y es por esto que se utiliza como sustrato para la obtención de un buen número de productos obtenidos a través de fermentación. Siendo la lactosa la principal fuente de carbono, parecería que sólo pueden emplearse microorganismos capaces de utilizar este disacárido; pero no es así, ya que existe la posibilidad de utilizar lactasa, para hidrolizar la lactosa en sus componentes glucosa y galactosa, o mediante una hidrólisis ácida, y de esta manera las perspectivas son infinitas; cabe además la posibilidad de transformar la lactosa en ácido láctico mediante una primera fermentación, y en una segunda, utilizar este metabolito como fuente de carbono. Sin embargo, el suero es pobre en nitrógeno inorgánico que pueda ser utilizado por los microorganismos, por lo cual, frecuentemente es necesario añadirle sales de amonio (107). En ocasiones, el suero antes de ser fermentado, es desproteínizado por ultrafiltración o por termocoagulación. Algunas veces también se fermenta suero concentrado (107).

Es una práctica común en las cremerías e industrias afines utilizar al suero para la conservación y propagación de cultivos de bacterias lácticas o "starters"; estas bacterias pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* (45,107); también puede ser utilizado pa-

ra cultivar los granos de kefir, que son mezclas de bacterias y levaduras, y de *Penicillium roqueforti*, que se utiliza en la elaboración de quesos de pasta azul (107).

En el suero se cultivan también bacterias del género *Propionibacterium*, principalmente *P. shermanii*; su importancia se debe a que se utiliza en la elaboración de los quesos Gruyere y Emmental (45), y además es productora de vitamina B₁₂, que puede ser utilizada para enriquecer alimentos; también se puede producir ácido propiónico a partir de suero con esta bacteria (107). *P. shermanii* puede utilizar la lactosa directamente (107,18).

Un uso industrial importante del suero, es la obtención de ácido láctico a partir de él, a través de una fermentación anaerobia con bacterias. La especie más importante para esta fermentación es *Lactobacillus bulgaricus*, pero también pueden emplearse *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* (107,19). Esta fermentación se realiza con suero desproteinizado (107), aunque estas bacterias no pueden degradar las proteínas séricas (102); entre el 85 y 90% de la lactosa es convertida a ácido láctico en sólo 24 horas (107).

Una gran cantidad de enzimas pueden ser obtenidas de microorganismos utilizando el suero como sustrato. La más importante de todas, que cada día encuentra un mayor número de aplicaciones comerciales dentro de la industria de alimentos, es la β -D-galactosidasa o lactasa; los principales productores de la enzima comercial son: *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida pseudotropicalis* y *Aspergillus niger*. La lactasa es una enzima inducible, de ahí que sea necesario producirla en un medio que contenga lacto-

sa, y por lo tanto el suero es el sustrato ideal; la fermentación se realiza generalmente en suero desproteínizado. La enzima es intracelular, y debe separarse del resto de la célula, o destruir cualquier actividad fermentativa alcohólica residual; para ello hay varios procesos reportados (39,107, 79,45,85,108,91).

También ha sido estudiada la posibilidad de producir enzimas pectinolíticas de los hongos *Sclerotinia sclerotiorum* y *Aspergillus awamori*, utilizando suero como sustrato. *S. sclerotiorum* se creció tanto en cultivo sumergido, como en medio seco de suero, obteniéndose mejores resultados en este último; sus pectinasas son constitutivas y tienen aplicación en la industria vitivinícola (83,7). *A. awamori*, se cultivó en una dilución de suero con sacarosa, y en cultivo mixto con *S. sclerotiorum* en suero desproteínizado (8,6).

Otras posibilidades son: la obtención de proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* en medio de suero ácido (57), α -amilasa y proteasa también de esta bacteria en un medio de suero y soya (40), y enzimas celulolíticas del hongo *Trichoderma lignorum* en suero diluido (51).

En los E.U.A., está a punto de iniciarse la producción en una planta industrial para la obtención de levadura para panificación a partir de suero de queso. Debido a que *Saccharomyces cerevisiae* no puede utilizar la lactosa, este proceso incluye la hidrólisis de la misma, mediante un reactor de lactasa inmovilizada (13); esto mismo puede lograrse, si el suero desproteínizado se somete a una primera fermentación, para transformar la lactosa, en ácido láctico, y con éste como fuente de carbono se propaga la levadura para panificación (58,31).

Etanol puede ser producido a partir de suero por varias especies de levaduras capaces de fermentar la lactosa; al respecto existen numerosos estudios, generalmente en suero desproteínizado, y en ocasiones concentrado; también se han hecho estudios del proceso en continuo (80); las especies más adecuadas para la fermentación alcohólica del suero son: *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces bulgaricus*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida pseudotropicalis* y *Candida kefir* (antes conocida como *Torula cremoris*) (107,80,35,76,10,42). Ha sido también estudiada la posibilidad de utilizar *Saccharomyces cerevisiae* en suero con lactosa hidrolizada, pero el resultado no ha sido satisfactorio (67,68).

Cabe además la posibilidad de obtener bebidas alcohólicas a partir de suero, principalmente tipo cerveza y tipo vino (107,81,111,37).

El etanol obtenido del suero puede destinarse a la producción de vinagre mediante una segunda fermentación con bacterias productoras de ácido acético (36,81,107).

Otros productos que pueden ser obtenidos de la fermentación del suero incluyen: grasa, con hongos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* (107,23); aceite, de *Candida curvata* y *Trichosporon cutaneum* (59,60); riboflavina (vitamina B₂) de *Exotheceium ashbyii* (107,22); polisacáridos de bacterias (89); y penicilina de *Penicillium chrysogenum* (19).

Sin duda alguna, el uso fermentativo más importante que se ha dado al suero, y que ha tomado una especial relevancia en los últimos años, es la producción de proteína unicelular para la alimentación humana y animal. Esta forma de utilizar el suero presenta la gran ventaja, sobre las formas de

utilización no fermentativas citadas aquí, de que la lactosa se transforma en un alimento rico en proteínas y vitaminas, sin menoscabo de las proteínas propias del suero. Este proceso se revisará posteriormente.

2.1.3.- Producción

Los E.U.A., es el principal país productor de quesos del mundo y por lo tanto es el que más suero genera. Sólo alrededor de la mitad de las 13.6×10^6 toneladas de suero que anualmente se producen, son utilizadas de alguna manera; el resto es vertido al drenaje (13,12,67). La producción mundial de suero se estima en 50×10^6 toneladas al año, siendo los países productores más importantes en orden decreciente: E.U.A., Francia, Italia, U.R.S.S. y Holanda (82). Hay países que utilizan la totalidad del suero que producen, ya sea por suministro directo a los animales, o mediante un proceso industrial; por ejemplo, Holanda: donde se industrializa el 95%, y el resto se da a los animales; en Dinamarca las proporciones se invierten: el 90% se da a los animales y el 10% restante se industrializa. Otros países altamente industrializados aprovechan la mayor parte de su producción de suero (45), entre los cuales, E.U.A. es una excepción.

En México, hay aproximadamente 2 500 queserías donde se producen anualmente unas 146 000 toneladas de queso, de las cuales se puede estimar una producción de 1×10^6 toneladas de suero al año, si se considera un rendimiento del 12% (98). En 1980 la producción lechera fue de $6\,741.5 \times 10^6$ l en todo el país y la importación de productos como leche en polvo y caseína es considerable y aumenta año con año (41), lo cual implica que menos del 18% de la leche producida en México se destina a la producción de quesos.

Las principales cuencas lecheras de la República son: La Laguna en Coahuila y Durango, la región de Los Altos y La Ciénega de Chapala en Jalisco, el Estado de México, la zona norte de Veracruz, Ciudad Cuauhtémoc Chihuahua, el estado de Puebla y El Bajío en Guanajuato y Jalisco (41,98). La principal región productora de quesos es Cd. Cuauhtémoc Chih., en donde se utilizan unos 109.5×10^6 l de leche anualmente en las 40 queserías localizadas en este lugar, de donde se puede estimar una producción de aproximadamente 96 000 ton de suero por año. Los estados de Coahuila y Nuevo León son también importantes zonas productoras de queso, con una producción estimada de suero de 128 000 ton al año. Otras regiones productoras de quesos son: La Laguna, Tabasco y la costa de Chiapas, El Bajío, Tlaxcala y Tulancingo Hgo.

La proporción de suero utilizada en México es muy pequeña, y está comprendida sólo en las siguientes alternativas: sin ninguna transformación en la alimentación animal; en la producción de suero en polvo, la cual solamente se realiza por 15 empresas en todo el país, y el producto deshidratado se utiliza en la elaboración de leches maternizadas, productos lácteos, confitería y panificación, principalmente; y la elaboración de requesón, que sólo se realiza en pequeñas queserías (98).

2.2.- Proteína unicelular

2.2.1.- Características generales

El problema de la alimentación que aqueja sobre todo a los países en desarrollo, radica principalmente en que

las fuentes convencionales de proteínas: ganadería, pesca y agricultura, son insuficientes para cubrir la demanda. Este problema se ha agudizado por el acelerado incremento de la población mundial, por lo que se ha tenido que recurrir a la obtención de proteínas a partir de fuentes novedosas tales como: producción de proteína unicelular, extracción de proteínas de productos agrícolas y pesqueros no convencionales, y proteínas modificadas por adición de aminoácidos sintéticos. De éstas, la que sin duda alguna ha cobrado mayor importancia, es la proteína unicelular.

La proteína unicelular, biomasa microbiana o proteína microbiana, es el producto que resulta del crecimiento masivo de diversos microorganismos en diferentes sustratos.

La producción de biomasa microbiana presenta las siguientes ventajas sobre las fuentes convencionales de proteínas: se efectúa bajo condiciones controladas, no depende de las condiciones ambientales ni requiere de grandes espacios, los tiempos de duplicación de biomasa son mucho más cortos que los requeridos en el caso de productos agrícolas y pecuarios, se pueden utilizar sustratos que de otra manera no podrían ser aprovechados para la obtención de alimentos, y además la eficiencia de conversión con respecto a los productos pecuarios, es mucho mayor. Todos estos factores han hecho que la proteína microbiana sea considerada como la mejor alternativa para la sustitución de algunos productos proteicos tanto en alimentación humana como animal.

Sin embargo, para la implantación de un proceso para la obtención de proteína unicelular, se deben tomar en cuenta ciertos factores como: inocuidad, valor proteico, palatabilidad, digestibilidad y aceptación del producto; dispo

nibilidad del sustrato, inocuidad y técnicas de operación para su producción y cosecha.

Antes de poder considerar un microorganismo como adecuado para consumo humano y animal, deben hacerse pruebas exhaustivas para comprobar su completa inocuidad; estas pruebas son largas y costosas pero indispensables. La principal limitación que se ha tenido con el uso de proteína microbiana para consumo humano, ha sido el alto contenido de ácidos nucleicos; éstos son metabolizados por el hombre a ácido úrico, el cual es excretado en la orina; pero si el nivel de ácido úrico en la sangre aumenta (lo cual puede deberse a una elevada ingesta de ácidos nucleicos) puede precipitar debido a su baja solubilidad, en forma de uratos, y su acumulación y cristalización en el fluido sinovial alrededor de las articulaciones, son responsables de la dolorosa enfermedad conocida como gota; también pueden producir la formación de piedras en el tracto urinario (50,25). En el resto de los mamíferos, el ácido úrico, por acción de la uratoxidasas (uricasas), es convertido en alantoina, la que al ser mucho más soluble que el ácido úrico, es fácilmente excretada en la orina. No obstante, *Saccharomyces cerevisiae* crecida en mosto de cerveza o melazas, *Saccharomyces uvarum* (antes conocida como *Saccharomyces carlsbergensis*) crecida en mosto de cerveza, *Candida utilis* crecida en licor sulfitado y *Kluyveromyces* sp. crecidas en suero, han sido las únicas aceptadas para consumo humano por las autoridades sanitarias de los E.U. A. y han sido incluidas en la lista GRAS (Generally Recognized As Safe for human consumption) (79). Estas son frecuentemente incluidas en alimentos como: productos de panadería, alimentos para bebés, alimentos geriátricos, sopas, salsas y ampliaciones de productos cárnicos; a los que además de incrementarles su valor nutritivo les imparten un sabor a

gradable (79).

En muchos otros países sólo se permite el uso de *Saccharomyces* sp. (82), pero sería interesante saber la política que se sigue en el caso de especies como *Kluyveromyces fragilis* y *Kluyveromyces lactis*, que fueron recientemente reclassificadas, y que antes tenían como nombre genérico *Saccharomyces*. De cualquier modo, es un hecho que en E.U.A., Francia y la U.R.S.S. existen desde hace varios años procesos industriales de la producción de *Kluyveromyces fragilis* a partir de suero de queso para consumo humano; esto se debe al contenido notablemente bajo de ácidos nucleicos de esta levadura, que es de 12 g por 100 g de proteína (82). Esta relación puede variar según las condiciones de crecimiento, pues a mayor tasa de crecimiento, mayor es la cantidad de ácidos nucleicos. El uso de otros microorganismos para la obtención de proteína para alimentación humana, sólo puede hacerse si se reduce el contenido de estas biomoléculas. Existen diversos métodos para lograrlo: unos orientados a la producción de biomasa microbiana con bajo contenido de ácidos nucleicos (crecimiento a bajas velocidades), y otros orientados a la reducción de éstos en las biomásas obtenidas; estos últimos son los más prometedores, sin embargo, aún son considerados por algunos autores como económicamente prohibitivos (79).

La proteína microbiana en general, es considerada deficiente en aminoácidos azufrados, pero con un alto contenido de lisina, por lo que resulta un buen suplemento de cereales.

En cuanto a los sustratos, los más empleados para la obtención de proteína unicelular son: licor sulfitado de

papel, melazas, suero de queso, y en los últimos años, productos derivados del petróleo como n-alcanos, gasoleo, metano, metanol y etanol.

El licor sulfitado es un subproducto de la industria papelera, que contiene de 2 a 3% de azúcares fermentables entre hexosas y pentosas; también contiene algunos ácidos orgánicos tales como: acético, galactourónico y fórmico. Se utiliza desde hace varios años, para la producción comercial de *Candida utilis*. La mayor parte de la producida en E.U.A., es empleada en la elaboración de alimentos de conveniencia; en Europa del Este se utiliza en alimentos animales. En Finlandia, el licor sulfitado se utiliza en la producción de *Paecilomyces variotti* (Proceso Pekilo) (82,79) para alimentación animal.

Las melazas de caña o mieles incristalizables poseen alrededor de 56% de azúcares fermentables (78). El uso de este sustrato para obtención de proteína unicelular está determinado por su precio, pues se considera preferible utilizarlo en la obtención de productos más rentables, como: alcohol, antibióticos, etc.; sin embargo, en países con alta producción de caña de azúcar, como Cuba y Taiwán, se utiliza en la producción de *Candida utilis* para alimentación animal.

Los procesos que utilizan derivados del petróleo como sustrato, han sido fuertemente obstaculizados por consideraciones políticas y legales que han conducido, incluso, al cierre de plantas ya establecidas. Alfred Champagnat en 1957, bajo los auspicios de la British Petroleum, inició los estudios para la utilización de n-alcanos en la producción de *Saccharomycopsis lipolytica* (antes conocida como *Candida lipolytica*) y *Candida tropicalis*; estos trabajos son conside

rados como los pioneros en el aprovechamiento de derivados del petróleo para la producción de proteína unicelular (21, 82,79). También han sido estudiadas algunas bacterias como *Acinetobacter certificans* y *Pseudomonas* sp. (50). En vista de la naturaleza tóxica de estos sustratos, es necesario extraer con solventes los hidrocarburos adheridos a la biomasa obtenida. No obstante, dicha toxicidad ha sido el principal argumento para la oposición a estos procesos.

En el caso del metano, se ha probado que el microorganismo más adecuado para la utilización de éste como sustrato para la producción de proteína unicelular es *Methylococcus capsulatus* (82); éste es fácilmente inhibido por el metanol excretado, por lo que es necesario eliminarlo del medio a medida que es producido; la alternativa más viable es el uso de cultivos mixtos con microorganismos que asimilen el metanol (82); este tipo de dificultades, así como las derivadas del manejo de un gas como sustrato, además de la naturaleza explosiva de éste, han limitado el uso directo del metano con este fin; mejores resultados han sido obtenidos cuando se utiliza indirectamente vía metanol.

El metanol y el etanol tienen la ventaja de ser solubles en agua, y de que pueden ser obtenidos en forma relativamente pura. Entre los microorganismos que pueden utilizar el metanol como sustrato están: *Hansenula polymorpha* (50,79), *Candida boudini* (82), *Pseudomonas methylophila*, usado por la ICI en un proceso comercial en Inglaterra (78,79,82), y *Methylomonas clara* empleada en una planta de demostración de Hoechst (82). En Minnesota E.U.A., Amoco Petrochemical Co. produce comercialmente *Candida utilis* en etanol, el producto es vendido bajo el nombre de "Torutein" (79,50,82). En Japón, la Mitsubishi Petrochemical Co. (82) ha estudiado la obten-

ción de *Candida etanoothermophilum* crecida a 40°C, lo que reduce considerablemente el gasto por enfriamiento. Exxon y Nestlé, en un proyecto conjunto, han desarrollado un proceso a nivel de planta piloto, para la obtención de biomasa de *Acinetobacter calcoaceticus* a partir de etanol (82).

Para el aprovechamiento de productos amiláceos existen, al igual que en el caso de materiales celulósicos, tres caminos: utilizar microorganismos que puedan aprovechar directamente el sustrato; efectuar la hidrólisis, ya sea química o enzimática, para que pueda ser aprovechado por una variedad más amplia de microorganismos; y por último, el empleo de cultivos mixtos, en el que un microorganismo efectúe la hidrólisis y otro asimile los azúcares generados para producir la proteína unicelular. Debido a los precios de los almidones usados para alimentación humana, no se considera que éstos sean adecuados para la producción de biomasa; sin embargo, Dupont Corporation desarrolló un proceso para la obtención de *Fusarium graminearum* en almidón de trigo, maíz o papa, y se considera económicamente viable cuando se utiliza en la obtención de proteínas texturizadas para alimento humano (82). También se han realizado estudios para aumentar el contenido proteico de la cebada y yuca con *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus fumigatus* respectivamente para alimentación animal (82).

La Swedish Sugar Co., junto con la Chemap Co. implantó un proceso, conocido como proceso Symba, para el tratamiento de efluentes y desperdicios sólidos de procesadoras de alimentos amiláceos como papa, maíz, etc. Este proceso consiste en hacer crecer simbióticamente dos levaduras: *Saccharomycopsis fibuligera* (antes conocida como *Endomycopsis fibuligera*) y *Candida utilis*. La primera, es una leva-

dura productora de amilasas que degradan el almidón a azúcares que pueden ser aprovechados por *Candida utilis*, ésta asimila más rápidamente que la primera los azúcares generados debido a su mayor velocidad de crecimiento. Mediante este proceso se logra, además de la obtención de biomasa microbiana, la reducción de la DBO de las aguas de desecho de la planta (82,79).

En el caso de la levadura de cervecera, en la que los sustratos son también productos amiláceos (malta y adjuntos cerveceros), la hidrólisis del almidón es efectuada por las enzimas propias de la malta. La mayor parte de la biomasa obtenida es separada del mosto junto con los "granos gastados", este producto es secado y vendido como alimento para animales.

El uso de materiales celulósicos ha estado limitado principalmente, por las dificultades que presenta la hidrólisis de éstos, y por las bajas velocidades de crecimiento de los microorganismos que pueden utilizarlos directamente. Entre los trabajos más importantes está el proceso desarrollado por la Louisiana State University, que utiliza el bagazo de caña en la producción de proteína unicelular de *Cellulomonas* sp. (82,79,78).

La producción de algas microscópicas y cianobacterias nos brinda la posibilidad de obtener un producto con alto valor proteico, usando CO₂ como fuente de carbono y luz solar como fuente de energía. Sin embargo, su cultivo presenta serias desventajas con respecto a la producción de proteína unicelular de otros microorganismos, ya que, al igual que la agricultura, depende de la luz solar, y del clima, requiere grandes extensiones de terreno y gran cantidad de a-

gua. Esto, aunado a la dificultad de mantener un cultivo puro debido a la naturaleza abierta de estos sistemas, y a la falta de métodos económicos de recolección, ha hecho que el desarrollo de estos procesos se haya visto limitado. Sin duda alguna, el proyecto más importante realizado hasta ahora para la producción de este tipo de microorganismos es el llevado a cabo en México por Sosa Texcoco para la obtención de *Spirulina maxima*. La planta, que produce cinco toneladas por día (3), es actualmente la más grande del mundo. El producto encuentra su principal aplicación en la alimentación animal y de diversas especies marinas (82,79).

El suero ha sido usado como sustrato para la producción de biomasa de diversos microorganismos, principalmente levaduras. La levadura más ampliamente utilizada, con mucho, es *Kluyveromyces fragilis*, que se emplea en varios de los procesos comerciales para la obtención de protefna unicelular a partir de éste (107,82,50). Los datos sobre la producción y características de los productos son expuestos posteriormente.

El proceso Waldhof (29,82), en operación hasta hace algunos años, adaptó para su operación con suero, a la *Candida utilis* empleada en la obtención de levadura a partir de licor sulfitado. En este proceso, las proteínas del suero son parcialmente termocoaguladas, pero no separadas. En cultivo intermitente se obtienen mejores rendimientos que en continuo. Mediante el proceso Viena, *Candida intermedia* es cultivada en suero dulce sin ningún tratamiento previo; el producto completo es concentrado hasta un 12% de humedad (82). El proceso S.A.V. (Société des Alcohols du Verin), utiliza *Candida kefir* (antes conocida como *Torula cremoris*) o *Kluyveromyces fragilis* en un proceso comercial en continuo

(107,82). Tomisek y colaboradores (82,92) utilizaron una mezcla de *Candida utilis* y *Candida pseudotropicalis* en un cultivo semicontinuo. El cultivo de estas levaduras en suero también se ha realizado por separado (82,63,48,24). Otras levaduras estudiadas son: *Kluyveromyces lactis* (79,82,48), *Candida humicola*, *Torulopsis candida* (84), *Rhodotorula lactis* (112), *Torulopsis sphaerica* (63), *Candida krusei* (34,82), *Trichosporon cutaneum* (5,60), *Candida curvata* (84,60).

También se han hecho cultivos mixtos de bacterias y levaduras. El proceso Kiel, basado en los estudios de Lembke y colaboradores (82), utiliza *Lactobacillus bulgaricus* para fermentar la lactosa a ácido láctico, el cual es asimilado por *Candida krusei*. Este proceso puede llevarse a cabo en un sólo paso, cultivando ambos microorganismos juntos o efectuando una primera fermentación con la bacteria, donde el pH es controlado por la adición de NH_3 ; el lactato formado sirve como sustrato para la propagación de la levadura en un segundo fermentador. El proceso puede realizarse en forma continua o semicontinua. Otro proceso de este tipo es el desarrollado por Skupin y colaboradores (87), quienes cultivaron especies de propionibacterias, principalmente *Propionibacterium shermanii*, y *Kluyveromyces fragilis*, obteniendo una biomasa rica en vitamina B_{12} , y con un contenido de aminoácidos azufrados más alto que el de la biomasa de la levadura sola.

Entre las bacterias utilizadas para la producción de biomasa en suero tenemos: *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc cremoris* (antes conocido como *Leuconostoc citrovorum*), *Enterobacter liquefaciens* y *Enterobacter cloacae* (82). Sitt (86) fermentó el suero con microorganismos

mos de rumen, para la obtención de un producto para la alimentación animal, que concentrado por ultrafiltración contenía 78% de proteína. Bednarski y colaboradores (11), estudiaron el cultivo de los hongos: *Penicillium roqueforti*, *Oospora lactis*, *Zygorhynchus moelleri* y *Rhizopus oligosporus*; la producción de proteínas de éstos se incrementó con una fermentación previa del suero con *Propionibacterium shermanii* o *Escherichia coli*. Fabel (82) trabajó en la producción en gran escala de *Oidium lactis* en suero diluido.

A pesar de que la mayoría de los procesos descritos, tienden a la obtención de sustitutos proteicos para alimentación animal, y no de alimentos para consumo humano directo, el desarrollo de ellos contribuirá directamente a la solución del problema de la alimentación mundial, ya que además del incremento que se pueda obtener en la producción de proteína animal, permite que algunos de los cereales y oleaginosas que actualmente se emplean en alimentación animal sean liberados para consumo humano.

2.2.2.- Proteína unicelular de *Kluyveromyces fragilis*

Uno de los procesos industriales para la producción de *K. fragilis* en suero, es el proceso Wheast de la Knudsen Milk Products Co. en Los Angeles E.U.A. Este proceso está basado en los trabajos de Wasserman. En estudios de laboratorio, Wasserman estableció como medio óptimo para la propagación: suero suplementado con 0.5% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5% de K_2HPO_4 y 0.1% de extracto de levadura, con un pH entre 5.0 y 5.7, a una temperatura de 32°C. No encontró diferencias en el crecimiento entre suero crudo y suero estéril desproteinizado. Con el uso de inóculos altos (2×10^9 células/ml, aproximadamente la mitad de la cosecha final) la totalidad de

la lactosa es utilizada en tres o cuatro horas (99); esta velocidad tan alta de crecimiento y la poca duración de la fermentación, le permite trabajar en condiciones no estériles, con el consecuente beneficio económico (99,104). Bajo las condiciones de crecimiento mencionadas, la demanda máxima de oxígeno fué de 4.75 mM O₂/l de medio por min (100); suministros menores de oxígeno traen como consecuencia la obtención de rendimientos proporcionalmente más bajos (103,101). Wasserman reporta que, *K. fragilis* utiliza el ácido láctico presente en el suero antes que la lactosa, y comprobó que la asimilación de ésta es directa (sin hidrolizarla extracelularmente), ya que cuando la levadura es cultivada en una mezcla de glucosa y galactosa, presenta una curva tipo diauxia, no observable cuando es cultivada en lactosa pura; además, en este último caso no se encontró glucosa en el medio (99). Wasserman también estudió el metabolismo del nitrógeno, y encontró que esta levadura es incapaz de aprovechar el nitrógeno proteico del suero; pero aprovecha un 25% del nitrógeno total no proteico, proporción que es utilizada con o sin la adición de (NH₄)₂SO₄; sin embargo, cuando se añade NH₄⁺, éste es completamente consumido, además de que se obtiene el doble de células, de donde se concluye que el nitrógeno del suero que es aprovechado no es suficiente para lograr un crecimiento óptimo de la levadura, y por lo tanto surge la necesidad de suplementar el suero con (NH₄)₂SO₄ (102). Para la producción en gran escala, Wasserman se basó en sus trabajos previos, utilizando las condiciones de crecimiento antes descritas. La capacidad del fermentador usado fué de 6 000 l, y el volumen de trabajo fué de 3 000 l. Las limitaciones del sistema de agitación y aireación no permitieron suministrar más del 80% de la demanda máxima de oxígeno, a lo que se atribuye el menor rendimiento obtenido (0.42 g de lev./g de lactosa), comparado con el logrado en los estudios de

laboratorio (0.55 g de lev./g de lactosa) en los que sí se satisfacía dicha demanda (103,104,105).

Otro proceso en escala comercial, es el desarrollado por Bernstein y colaboradores (12) de Amber Laboratories Div. Milbrew Inc. en Wisconsin E.U.A. El fermentador empleado tenía una capacidad de 57 000 l. Partían de suero concentrado (45-50% de sólidos totales), que diluían hasta un 15% de sólidos totales con agua o suero fresco; una vez diluido el suero se suplementaba con NH_3 , H_3PO_4 y extracto de levadura; el pH se ajustaba a 4.5 con HCl. El medio era calentado a 80°C durante 45 min, y enfriado antes de alimentarlo al fermentador. Con un inóculo del 10%, con una concentración de 1×10^9 células/ml la lactosa es completamente utilizada en ocho horas; el caldo entero de fermentación es entonces concentrado y posteriormente secado por aspersion; si el agua evaporada en la concentración del producto es condensada, puede ser usada para diluir el suero concentrado, que se va a utilizar en el nuevo ciclo fermentativo, con lo que se logra un proceso sin efluentes. El producto obtenido (Amber YFS) es destinado a la alimentación animal, sin embargo, si la levadura es separada por centrifugación y lavada, puede usarse para alimentación humana (Amber Nutrex). Bernstein propone alternativamente, la obtención de alcohol paralela a la producción de biomasa, suspendiendo el suministro de aire después de una fase aerobia necesaria para la propagación celular. A pesar de que la obtención de alcohol es a expensas del rendimiento celular, esta alternativa puede ser la mejor opción, ya que, debido a la gran cantidad de oxígeno requerida, los costos de aireación pueden llegar a ser muy altos. El equipo puede ser operado en continuo, semicontinuo o intermitente.

En Francia, basado en los estudios de Blanchet, Biju-Duval y Vrignaud (82), el proceso de Bel Fromageries produce biomasa de *K. fragilis* en escala comercial. El suero es pasteurizado, desproteinizado y suplementado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y NH_4OH ; así preparado se almacena para ser alimentado en forma continua al fermentador. La fermentación se lleva a cabo a una temperatura de 38°C , un pH de 3.5 y con una aireación de 1.3 vvm. La levadura se separa por centrifugación, se lava y se concentra en filtros rotatorios. El producto es sometido a una plasmólisis térmica ($83-85^\circ\text{C}$) para inactivar las lipasas presentes y evitar el enranciamiento; finalmente se seca hasta aproximadamente 5% de humedad y se empaca.

Entre otros de los autores que han trabajado en la obtención de *K. fragilis* a partir de suero están: Amundson (4), quien utilizó suero calentado a 93°C durante 5 min suplementado con agua de remojo de maíz; la mezcla de levadura y proteínas del suero fue separada por centrifugación; el producto pasteurizado y deshidratado fue probado en dietas para visones y perros.

Lane (47) estudió la posibilidad de producir esta levadura dializando una suspensión de microorganismos contra suero ultrafiltrado. El consumo de los nutrientes por la levadura, establece el gradiente de concentración necesario para el paso de éstos a través de la membrana. Lane logró obtener hasta 90 g de levadura/l por lo que sugiere a este método, como una alternativa a los procesos hasta ahora desarrollados y que requieren de grandes instalaciones, pues debido a las bajas concentraciones celulares obtenidas, es necesario manejar grandes volúmenes de medio.

Castillo y colaboradores, en estudios de laboratorio, corroboró los resultados obtenidos por Wasserman en cuanto a la suplementación del suero con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Sin embargo, respecto a la adición de fósforo, no encontró diferencias significativas en la utilización de lactosa y concentraciones celulares a diferentes concentraciones de KH_2PO_4 , por lo que considera innecesaria esta suplementación. Esta discrepancia con los resultados reportados por Wasserman la atribuye a diferencias en la composición del suero utilizado (20). En el proceso de Bel Fromageries, el suero tampoco es suplementado con fosfato. La cepa de *K. fragilis* NCYC 587 utilizada por Castillo, requiere de inositol, pantotenato de calcio, tiamina y ácido nicotínico para su crecimiento (20). En cuanto al pH, estableció un óptimo de 5.0, y observó que no importando el pH inicial, éste se incrementaba al principio de la fermentación y bajaba a valores inferiores al inicial, al final de ésta. El control del pH a lo largo de la fermentación no incrementó el rendimiento celular (30).

Moresi y colaboradores, encontraron que el factor determinante en el rendimiento de biomasa, es el nivel de oxigenación en el medio, presentandose una relación lineal entre ellos (15,62,61), lo que concuerda con lo reportado por Wasserman (103,101). A altas concentraciones de lactosa observaron que había un decremento en el rendimiento, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Vananuvat y Kinsella (94) y Castillo y colaboradores (20). En un fermentador de 15 l encontraron que las condiciones óptimas de crecimiento son 31.8°C , pH de 5.0, aireación de 2.1 vvm y suplementación del suero prácticamente igual a la reportada por Wasserman; el rendimiento bajo estas condiciones es de 57.2% (61). Todas estas condiciones fueron obtenidas através de un profundo análisis estadístico. En base a estos estudios

escalaron el proceso a un fermentador de 100 l (15), y corroboraron que el nivel de aireación y la concentración inicial de lactosa determinan el proceso fermentativo.

Como ya se mencionó antes, el contenido de ácidos nucleicos de *K. fragilis*, es particularmente bajo en relación al de otros microorganismos utilizados como fuente de proteína unicelular; por este motivo, esta levadura no solamente es utilizada en la alimentación animal, sino que además las legislaciones de algunos países, entre ellos E.U.A., la permiten como alimento humano (82,12,79). No obstante, tanto el contenido de estas biomoléculas, como el de su composición en general, varían ampliamente de acuerdo a la cepa utilizada, la composición y suplementación del suero, el método de cultivo y la forma de recuperación de la biomasa.

Al igual que en cualquier microorganismo, el contenido de ácidos nucleicos de *K. fragilis*, tiende a incrementarse a medida que se incrementa la velocidad específica de crecimiento (82,93,79). Vananuvat y Kinsella reportaron que, en estudios en cultivo intermitente (93) de esta especie en medio de suero de queso desproteínizado por ultrafiltración, el contenido de ácidos nucleicos de las células es mayor a medida que es mayor la velocidad de agitación de cada fermentación; además, a lo largo de ésta, el contenido cambia alcanzando su máximo a la mitad de la fermentación para declinar continuamente hacia el final; por otro lado, en cultivo continuo, utilizando el mismo medio (94), encontraron que al aumentar la velocidad de dilución, el contenido de ácidos nucleicos variaba muy ligeramente en forma inversa; manteniendo una de estas velocidades de dilución y variando la concentración de lactosa del medio no había cambios en su contenido. La tabla 2.2.1 muestra el contenido de ácidos nucleicos

de la biomasa de *K. fragilis*, y la relación ácidos nucleicos/proteína cruda, de acuerdo con lo reportado por varios autores.

Al igual que la biomasa microbiana en general, la de esta levadura contiene una alta cantidad de proteínas, más que cualquier fuente convencional; además el balance de aminoácidos es bastante aceptable; por ello, para incrementar el valor proteico de un alimento con proteína unicelular de esta especie, es suficiente suplementar con bajas proporciones. La tabla 2.2.2 muestra las composiciones bromatológicas de este producto y otros relacionados, y la tabla 2.2.3 los aminogramas de sus proteínas, de acuerdo con diferentes reportes. Vananuvat y Kinsella también estudiaron la relación entre el contenido de proteína de las células así como su composición de aminoácidos, y las condiciones de cultivo. En cultivo intermitente de suero desproteinizado (93), el contenido de proteína verdadera celular era un poco menor a medida que era mayor la velocidad de agitación; no obstante, la concentración celular, la velocidad específica de crecimiento y el rendimiento de biomasa si se veían considerablemente aumentados al aumentar ésta, por lo que la cantidad total de proteína obtenida era mucho mayor. En cultivo continuo en el mismo medio (94), se encontró que, con una velocidad de dilución (D) de 0.18 hr^{-1} , el contenido de proteína celular y el rendimiento de biomasa eran mayores que para $D = 0.1$ y 0.23 hr^{-1} ; en cambio, la concentración celular decrecía a medida que se aumenta D , mientras que la productividad se incrementaba. Manteniendo $D = 0.18 \text{ hr}^{-1}$ y variando la concentración de lactosa del medio, se encontró que el contenido de proteína celular aumentó a medida que se incrementó la concentración del disacárido, así como la concentración de la levadura y la productividad, pero el rendimiento

TABLA 2.2.1

CONTENIDO DE ACIDOS NUCLEICOS REPORTADOS PARA *K. fragilis*

| | Carne | A | B | C | D | E | F | G |
|----------|-------|------|------|------|------|------|------|------|
| AN (%) | - | 6.3 | 5.7 | 9.3 | 8.6 | 10.0 | 5.7 | 1.4 |
| AN/prot. | 0.20 | 0.14 | 0.12 | 0.18 | 0.15 | 0.20 | 0.07 | 0.02 |

AN: ácidos nucleicos; prot.: proteína cruda

La carne es un alimento intermedio en cuanto a su contenido de ácidos nucleicos (73,82).

A: producto Bel; crecido en suero desproteínizado en cultivo continuo (25).

B: Delaney y col. (25); en suero desproteínizado por ultrafiltración; cultivo intermitente.

C: Castillo y col. (20); en suero desproteínizado; cultivo intermitente.

D: Vananuvat y Kinsella (93); suero desproteínizado por ultrafiltración; cultivo intermitente.

E: Vananuvat y Kinsella (94); suero desproteínizado por ultrafiltración; cultivo continuo.

F: proteína aislada extraída con NaOH y precipitada con HCl; Vananuvat y Kinsella (95).

D: proteína aislada extraída con NaOH y precipitada con calor; Vananuvat y Kinsella (95).

TABLA 2.2.2

COMPOSICION BROMATOLOGICA REPORTADA PARA PRODUCTOS DE *K. fragilis* (1)

| | A | B | C | D | E | F | G | H |
|------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|
| Proteína cruda (N X 6.25) | 46.5 | 54-58 | 58-60 | 45-55 | 35-50 | 49.5 | 25.9 | 54.4 |
| Proteína verdadera | 39.5 | - | - | - | - | 41.8 | - | - |
| Lípidos | 9.6 | 1-2 | 1-2 | 2 | 2-3 | 8.4 | 8.6 | 10.3 |
| Carbohidratos | 30.5 | 25-29 | 22-26 | - | - | 29.1 | - | - |
| Lactosa | - | - | - | - | - | - | 5.8 | 2.4 |
| Cenizas | 7 | 8-10 | 8-10 | 6-10 | 12-20 | 7.6 | 18.6 | 5.7 |
| Humedad | 6.4 | 5-7 | 5-7 | 3-4 | 3-4 | 5.4 | 2.0 | 2.6 |
| Ac. láctico | - | - | - | - | - | - | 0.8 | - |

A: producto Bel (25).

B: producto Wheast; biomasa seca (107).

C: producto Wheast; mezcla de biomasa y suero seco (107).

D: producto Amber Nutrex: biomasa sola; Bernstein y col. (12).

E: producto Amber YFS: biomasa más suero; Bernstein y col. (12).

F: Delaney y col. (25); biomasa sola.

G: biomasa más suero secado por aspersion y sin lavar; Amundson (4).

H: biomasa más suero secado por aspersion y lavado; Amundson (4).

TABLA 2.2.3

AMINOGRAMAS REPORTADOS PARA PRODUCTOS DE *K. fragilis*

| g/16 g N | Huevo | Patrón | A | B | C | D | E |
|---------------|-------|--------|------|------|------|------|-----|
| Isoleucina | 5.6 | 4.2 | 4.8 | 4.5 | 4.7 | 5.9 | 4.0 |
| Leucina | 8.3 | 7.0 | 8.1 | 7.4 | 8.1 | 10.6 | 7.0 |
| Lisina | 6.2 | 5.1 | 8.0 | 7.3 | 7.3 | 9.4 | 6.9 |
| Fenilalanina | 5.1 | - | 4.2 | 3.8 | 3.8 | 4.2 | 3.4 |
| Tirosina | 4.0 | - | 3.9 | 3.6 | - | 3.5 | 2.5 |
| Fen + Tir | 9.1 | 7.0 | 8.1 | 7.4 | - | 7.7 | 5.9 |
| Treonina | 5.1 | 3.5 | 5.5 | 5.9 | 4.5 | 5.9 | 5.8 |
| Triptófano | 1.8 | 1.1 | 1.7 | 1.4 | 1.1 | 1.6 | 1.4 |
| Valina | 7.5 | 4.8 | 5.6 | 5.3 | 5.9 | 7.1 | 5.4 |
| Metionina | 3.2 | - | 1.5 | 1.2 | 1.3 | 1.7 | 1.6 |
| Cisteína | 1.8 | - | 1.7 | 1.0 | - | 1.1 | - |
| Met + Cis | 5.0 | 2.6 | 3.2 | 2.2 | - | 2.8 | - |
| Arginina | 6.1 | - | 4.9 | 4.8 | 4.8 | 5.2 | - |
| Histidina | 2.4 | 1.7 | 2.0 | 1.9 | 1.9 | 2.6 | 2.1 |
| Ac. aspártico | 10.7 | - | 9.4 | 9.1 | - | - | - |
| Serina | 7.8 | - | 4.7 | 5.4 | - | 4.4 | - |
| Ac. glutámico | 12.0 | - | 13.8 | 14.7 | 15.7 | 18.0 | - |
| Glicina | 3.0 | - | 3.7 | 4.1 | - | - | - |
| Alanina | 5.4 | - | 5.8 | 5.5 | - | - | - |
| Prolina | 3.8 | - | 4.2 | 4.2 | - | - | - |

TABLA 2.2.3 (cont.)

AMINOGRAMAS REPORTADOS PARA PRODUCTOS DE *K. fragilis*

| g/16 g N | F | G | H | I | J | K | L |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Isoleucina | 6.0 | 6.1 | 5.1 | 6.0 | 4.3 | 4.4 | 3.8 |
| Leucina | 9.6 | 11.0 | - | 9.6 | 7.2 | 7.3 | 8.5 |
| Lisina | 11.1 | 10.4 | 11.1 | 10.2 | 8.5 | 8.3 | 8.3 |
| Fenilalanina | 5.1 | 4.4 | 5.1 | 5.4 | 3.6 | 3.7 | 3.6 |
| Tirosina | 3.4 | 4.1 | 4.6 | 3.4 | 4.5 | 4.5 | - |
| Fen + Tir | 8.5 | 8.5 | 9.6 | 8.8 | 8.1 | 8.2 | - |
| Treonina | 6.5 | 7.5 | 5.6 | 6.5 | 4.1 | 4.4 | 4.5 |
| Triptofano | - | 2.3 | - | - | 0.9 | 0.9 | 0.4 |
| Valina | 7.8 | 7.4 | 5.7 | 7.8 | 5.6 | 6.1 | 5.1 |
| Metionina | 1.6 | 2.0 | 1.6 | 1.2 | 1.5 | 1.5 | 1.4 |
| Cistefna | - | 3.8 | - | - | 1.9 | 1.6 | 1.2 |
| Met + Cis | - | 5.8 | - | - | 3.4 | 3.1 | 2.6 |
| Histidina | 4.0 | 3.0 | 4.0 | 2.0 | 4.0 | 4.0 | 0.7 |
| Arginina | 7.4 | 5.7 | 7.4 | 7.1 | 5.6 | 5.9 | 4.3 |
| Ac. aspártico | - | - | 10.4 | 11.2 | 9.6 | 9.9 | 11.5 |
| Serina | 7.0 | 6.8 | 5.2 | 7.0 | 4.7 | 4.8 | 5.8 |
| Ac. glutámico | - | - | 15.2 | 13.3 | 16.5 | 14.6 | 11.6 |
| Glicina | - | - | 4.2 | 4.6 | 5.1 | 5.0 | 4.6 |
| Alanina | - | - | 7.2 | 8.2 | 6.4 | 8.0 | 6.3 |
| Prolina | - | - | - | 4.3 | 3.7 | 3.8 | 3.7 |

ANEXO DE LA TABLA 2.2.5

El aminograma del huevo es de huevo entero (71).

El patrón fué establecido en 1973 por una comisión de expertos de la FAO y de la OMS (73).

A: Delaney y colaboradores (25); biomasa.

B: Producto Bel (25).

C: Producto Wheast; biomasa sola (107).

D: Producto Wheast; biomasa más suero (107).

E: Amber Nutrex; biomasa sola; Bernstein y col. (12).

F: Amundson (4); biomasa sola.

G: Amundson (4); biomasa más suero.

H: Wasserman (106); biomasa.

I: Wasserman (106); aislado de protefmas de la levadura.

J: Vananuvat y Kinsella (96); biomasa de cultivo intermitente: promedio de dos fermentaciones.

K: Vananuvat y Kinsella (96); biomasa de cultivo continuo: promedio de cinco fermentaciones.

L: Vananuvat y Kinsella (96); aislado de protefmas de la levadura: promedio de cuatro aislamientos.

Nota: los valores de tirosina, triptofano e histidina en J y K, son el promedio de dos determinaciones de cada uno, de biomasa mezclada obtenida de diferentes fermentaciones.

de biomasa decrecfa considerablemente. Los contenidos de protefna cruda y verdadera en la célula, eran mayores en cualquier caso de cultivo intermitente, que para cualesquiera condiciones de cultivo continuo.

En la tabla 2.2.3 puede verse que, en general, la protefna de *K. fragilis* está limitada en aminoácidos azufrados (metionina y cistefna); pero la adición de las protefnas del suero parece suplir esta deficiencia; el contenido de lisina, en cambio, es muy alto. Por este motivo esta protefna unicelular puede ser un excelente suplemento para las protefnas de los cereales. En la tabla 2.2.4 se muestran algunos parámetros nutricionales encontrados en la literatura para la protefna de *K. fragilis*; ahí se reafirma que los aminoácidos azufrados son los limitantes. Según los estudios de Vananuvat y Kinsella (96), las diferentes condiciones de cultivo prácticamente no alteran las proporciones de los aminoácidos; en los aislados en cambio, los distintos métodos mediante los que se obtuvieron, sí modifican estas proporciones: la precipitación por calor (pH = 6.0 y 80°C) de la protefna extrafda con agua permite una mejor recuperación de los aminoácidos que si la precipitación se hace con HCl (pH = 4.0); si la extracción se hace con NaOH al 0.41, también se obtiene mejor precipitación por calor. La extracción de la protefna parece ser desventajosa, en cuanto a las proporciones de aminoácidos esenciales, con respecto a las protefnas de la biomasa entera, y peor aún, las proporciones de aminoácidos azufrados se ven disminuidas aún más.

La biomasa de levadura siempre ha tenido gran importancia como complemento dietético por su contenido de vitaminas del complejo B; la tabla 2.2.5 muestra el contenido de vitaminas de la biomasa de *K. fragilis* reportado por dife

TABLA 2.2.4
ALGUNOS PARAMETROS NUTRICIONALES DE *K. fragilis*

| | NPU (25) | PER (32) |
|--------------------------------------|----------|----------|
| <i>K. fragilis</i> | 67 | 1.8 |
| <i>K. fragilis</i> + DL-metionina | 84.4 | 2.2 |
| Huevo | 98.4 | - |
| Caseína | 75.3 | 2.5 |

NPU: utilización neta de proteína.

PER: índice de eficiencia proteica.

TABLA 2.2.5
CONTENIDO VITAMINICO DE *K. fragilis*

| Vitamina ($\mu\text{g/g}$) | L.C. | A | B | C | D | E | F |
|---------------------------------|---------|------|------|------|-------|------|-----|
| Tiamina | 104-250 | 24.1 | 32.8 | 29.8 | 17.7 | 26.0 | 14 |
| Riboflavina | 25-80 | 36.0 | 57.5 | 42.5 | 56.0 | 51.0 | 66 |
| Piridoxina | 23-40 | 13.6 | 12.0 | 15.0 | 10.2 | - | - |
| B ₁₂ | - | - | - | - | 0.004 | - | - |
| Ac. nicotínico | 300-627 | 280 | 61 | 104 | 540 | 136 | 112 |
| Ac. fólico | 19-30 | 5.8 | 3.1 | 2.1 | 11.8 | - | 2 |
| Ac. pantoténico | 72-86 | 67.2 | - | - | 91.5 | - | - |
| Biotina | 1.1 | 2.0 | - | - | 0.22 | - | - |
| Colina | - | 6700 | - | - | - | - | - |

L.C.: levadura de cerveza (106).

A: Wasserman; biomasa sola (106).

B: Amundson; biomasa más suero sin lavar (4).

C: Amundson; biomasa más suero lavado (4)

D: producto Bel (107).

E: producto Wheast; biomasa sola (107).

F: producto Wheast; biomasa más suero (107).

rentes investigadores. Excepto por la tiamina, el contenido de vitaminas de *K. fragilis* es casi igual al de la levadura de cerveza.

La total ausencia de toxicidad, el bajo contenido de ácidos nucleicos, el alto valor proteico y vitamínico, y la naturaleza completamente segura del sustrato, i.e. un derivado de la leche, permiten que la biomasa de *K. fragilis*, sea un alimento con un gran potencial de implementación, tanto para animales como para humanos. Este producto ha sido recomendado y utilizado para una amplia variedad de especies animales: ganado, aves de corral, mascotas, caballos y visones. En estos últimos, los estudios de Amundson (4) señalan que los animales alimentados con la mezcla de levadura y sólidos del suero lavada alcanzaron su peso máximo un mes antes que los animales alimentados con la dieta control. El producto Wheast ha sido utilizado con éxito en la alimentación de pavos, peces, visones, becerros y animales convalecientes. Estudios en cerdos mostraron que éstos presentaban mayor velocidad y eficiencia en el crecimiento cuando se suplementaba su dieta con biomasa de *K. fragilis* crecida en suero, que cuando se hacía con harina de soya (1).

En alimentación humana, el producto Bel ha venido utilizándose desde hace más de diez años (82). Los productos Wheast (biomasa y biomasa con suero) también se han reportado como recomendables para este propósito (107), así como el producto Amber Nutrex de Bernstein y colaboradores (12). Stewart y colaboradores (16,90) utilizaron un producto de *K. fragilis* con los sólidos del suero parcialmente seco y prensado, y otro con la misma composición pero totalmente seco y finamente molido, para enriquecer galletas ("wafers") de chocolate y vainilla, galletas de avena y una

fritura ("cracker") de harina con queso; el primer producto fué totalmente inadecuado, pero con el segundo se obtuvieron magníficos resultados: las galletas de chocolate y vainilla permitieron hasta un 15% del suplemento sin que se notaran efectos en el sabor, apariencia y textura; las galletas de vainilla así elaboradas, tenían cuatro veces más proteína que las comerciales, y las de chocolate tres veces más; las galletas de avena permitieron 20% de producto adicionado, y su contenido proteico se incrementó tres veces; a la fritura de queso se le pudo adicionar hasta un 35% del suplemento, y el contenido de proteína del producto final fué dos veces mayor que en el producto comercial.

Vananuvat y Kinsella realizaron estudios de aislamiento de la proteína de *K. fragilis* (95), y de algunas de sus propiedades funcionales (97). La máxima recuperación de proteína verdadera (65%) la obtuvieron haciendo la extracción con una solución 0.4% de NaOH y precipitando con HCl (pH = 4.0). Estos aislados poseen un ligero color crema y poca intensidad de sabor. Las proteínas aisladas con cualesquiera de estas condiciones presentaban muy baja solubilidad a pH entre 3 y 6, lo que podría limitar su aplicación a ciertos alimentos; sin embargo, estos autores sugieren la formación de los proteínatos de sodio o calcio, los cuales sí son solubles. En cuanto a la propiedad de formar espuma al ser batida, la proteína de la levadura extraída con agua y precipitada con HCl, fué la única comparable a la proteína de soya; sin embargo, la estabilidad de la espuma era mucho menor en la proteína de la levadura que en la de soya. Fué mejor el poder emulsificante de la proteína de la levadura extraída con agua y precipitada con ácido, y extraída con NaOH y precipitada con ácido, que el de la proteína de soya; esta última sólo fué mejor en esta característica que la protef-

na extraída con NaOH y precipitada con calor. Los autores sugieren la aplicación de estos aislados de proteína en productos cárnicos y de panadería.

2.3.- Enzimas pectinolíticas

2.3.1.- Clasificación

Las sustancias pécticas son polisacáridos formados principalmente de unidades del ácido D-galactourónico, unidas mediante enlaces glicosídicos $\alpha(1+4)$, que se encuentran, o se obtienen, a partir de tejidos vegetales. Cuando los grupos carboxílicos de los ácidos D-galactourónicos que forman el polímero, se encuentran esterificados con metanol, se designa al compuesto pectina; dependiendo de la proporción esterificada, se reconocen las pectinas de alto o de bajo me toxilo. Si el grupo carboxílico de prácticamente todas las unidades, se encuentra libre de ésteres metílicos, el polímero se conoce como ácido péctico o ácido poligalactourónico.

Las enzimas que de alguna manera modifican la estructura de estos compuestos, se conocen como enzimas pectinolíticas o pectinasas, y se clasifican de la siguiente manera (33,79):

- A) Pectinestearasa o Pectinmetilestearasa: hidroliza el éster formado por el metanol y el grupo carboxílico del ácido galactourónico.
- B) Despolimerizantes: rompen el enlace glicosídico de las sustancias pécticas, y pueden subdividirse de la siguiente forma:
 - a) De acuerdo al sustrato sobre el que actúan: pectina o ácido péctico.
 - b) Según el mecanismo de ruptura del enlace: hidrolasas,

con inclusión de agua, o liasas, por un proceso de transeliminación.

- c) Según el punto de ataque a la cadena: exo, si rompe la cadena en un extremo, y endo, si la ruptura es al azar.

El cuadro 2.3.1, muestra todas las enzimas pectinolíticas que en teoría podrían existir, de acuerdo a la combinación de estos factores. La figura 2.3.1, da una idea más clara de la forma de actuar de las pectinasas.

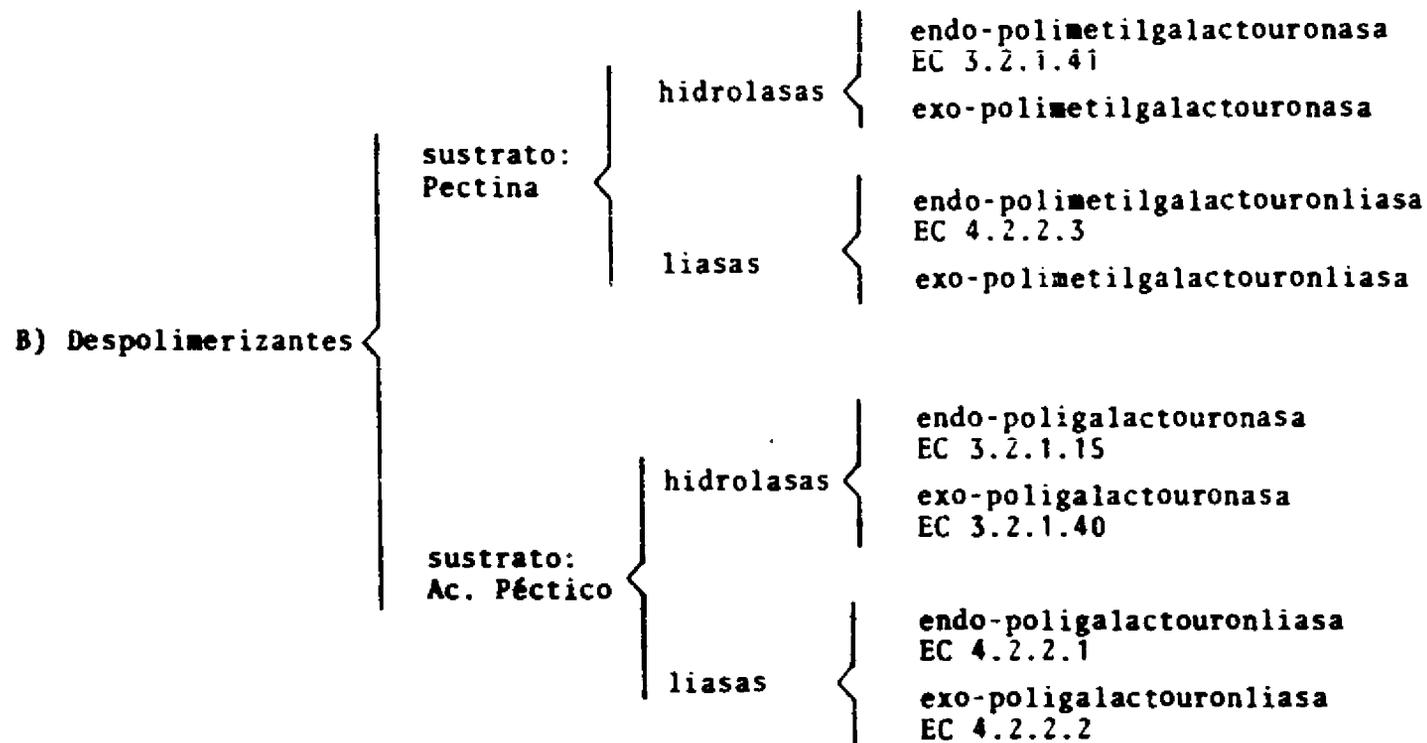
2.3.2.- Distribución y obtención

Las pectinasas se encuentran en una amplia variedad de especies del reino vegetal, principalmente en los frutos, donde juegan un papel importante en el estado de maduración; es más abundante en estas especies la pectinestearasa (PE), aunque también suelen encontrarse las poligalactouronidas (PG). Los vegetales rara vez son utilizados como fuente de pectinasas, aunque se puede citar el caso de la pectinestearasa obtenida del jitomate (*Lycopersicon esculentum*); para la mayoría de las aplicaciones industriales, las enzimas pectinolíticas se obtienen de hongos (33).

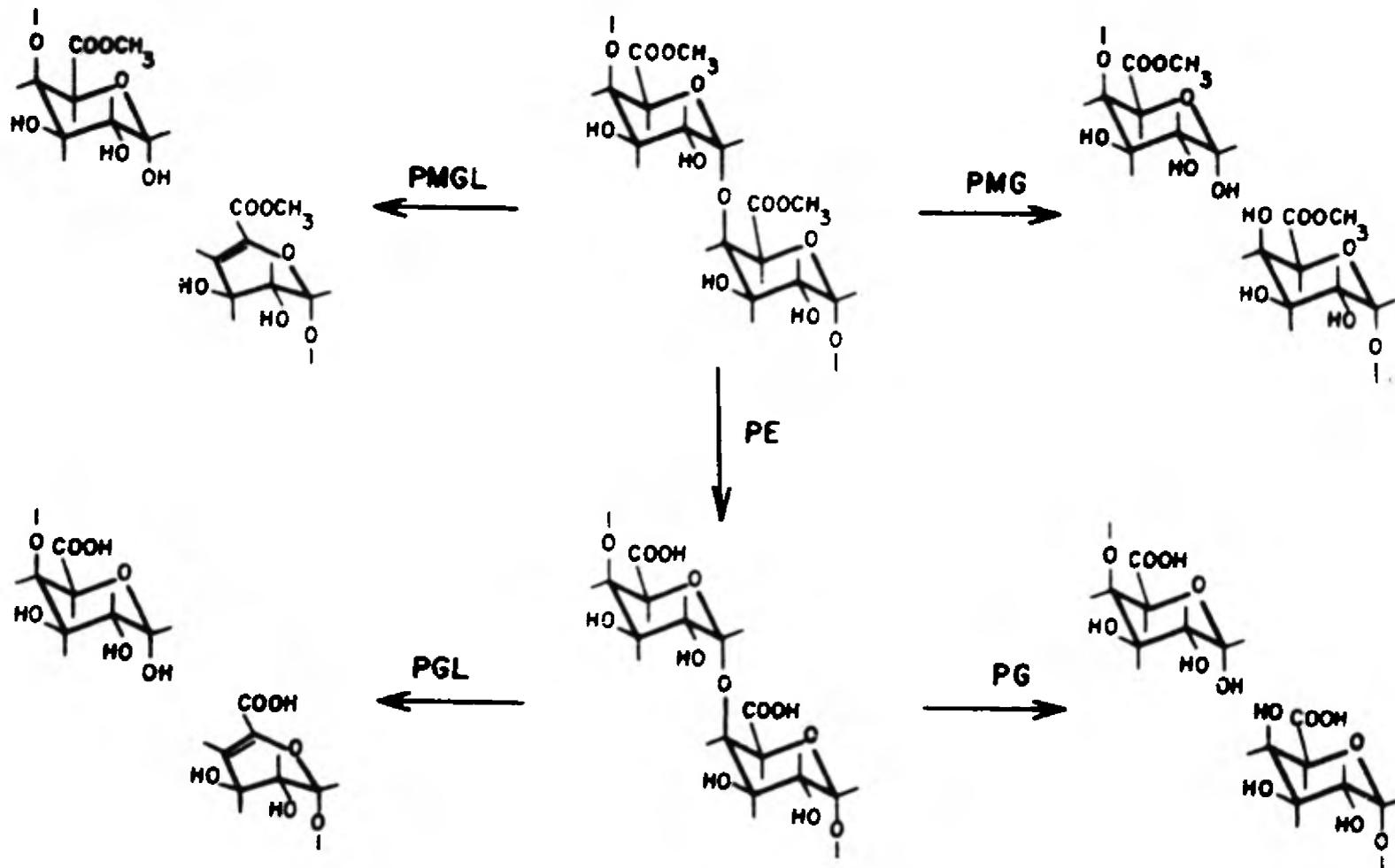
Los microorganismos producen una amplia variedad de pectinasas. La endo-poligalactouronidasa (PGL) es la enzima pectinolítica, por mucho, más comúnmente producida por las bacterias, aunque algunas especies también producen pectinestearasa, y algunas pocas poligalactouronidas y exo-poligalactouronidas (PGL); la endo-polimetilgalactouronidasa (PMGL) no es producida por ninguna bacteria, excepto por una especie de actinomiceto; la exo-polimetilgalactouronidasa no se ha encontrado en ningún organismo. La exo-oligogalactouronidasa (OGL) es producida por bacterias (38). La endo-po

CUADRO 2.3.1 (33)
CLASIFICACION DE PECTINASAS

A) Pectinestearasa EC 3.1.1.11



La exo-polimetilgalactouronasa y la exo-polimetilgalactouronliasa no existen(79,33,73).
También existen exo-oligalactouronliasas que muestran mayor actividad en oligómeros que en moléculas grandes de ácido pécico (38,73).



2 CH₃OH

FIG. 2.3.1

VIAS DE ACCION DE LAS PECTINASAS

ligalactouronasa en cambio, es la que principalmente producen los hongos; algunos hongos producen también exo-poligalactouronasa, pectinestearasa, endo-polimetilgalactouronliasa y endo-poligalactouronliasa; la exo-poligalactouronliasa no es producida por hongos. *Aspergillus niger* es la única especie entre todos los seres vivos, que produce endo-polimetilgalactouronasa (PMG); la forma exo de esta enzima nunca ha sido encontrada (33,73,79).

Los principales géneros de bacterias productoras de enzimas pectinolíticas son: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Clostridium*; mientras que los principales géneros de hongos son: *Aspergillus*, *Sclerotinia* y *Penicillium* (33,79). Varias especies de levaduras también producen pectinasas; entre ellas, la que mayor actividad pectinolítica presenta es *Kluyveromyces fragilis*, la cual sólo produce la endo-poligalactouronasa; *Candida pseudotropicalis*, que es la forma imperfecta de la primera, también tiene considerable actividad pectinolítica (53,109,54,55,56,77).

La producción a escala industrial de pectinasas, se realiza por dos métodos: en cultivo sumergido y en cultivo sólido. En el primero, se prepara un medio líquido que incluye los componentes básicos: carbohidratos, que pueden provenir de melazas, cereales, etc., fuente de nitrógeno, minerales y extracto de levadura; como generalmente estas enzimas son adaptativas, es necesario añadir al medio pectina o algún material que la contenga, como cáscara de cítricos, bagazo de manzana o pulpa de remolacha; también se adiciona antiespumante. En el cultivo sólido se utiliza salvado de trigo o de arroz como sustrato, y el resto de los nutrientes se adicionan disueltos en agua, de manera que sean absorbidos por el salvado; también se requiere la adición de subproductos con pectina pa

ra la inducción. El cultivo sólido se realiza ya sea en charolas perforadas, con una pequeña capa de salvado húmedo y aire circulante a través del sistema que provee de oxígeno al hongo y baja la temperatura, o en tambores rotatorios horizontales los cuales se enfrían con agua. Tanto en el cultivo sumergido como en el cultivo sólido, la inoculación se realiza con suspensión de esporas de la especie seleccionada; algunas especies utilizadas en la producción comercial de pectinasas son: *Aspergillus niger* (la más importante), *Aspergillus alliaceus*, *Sclerotinia libertiana* y *Coniothyrium diplodiella* (79, 33). Para recuperar la enzima del cultivo líquido se separa la biomasa del hongo por filtración o por centrifugación y el sobrenadante se puede utilizar como preparado crudo de pectinasas líquidas. También se pueden precipitar éstas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ u otras sales, o con solventes orgánicos y secarse a bajas temperaturas o por aspersion para obtener un preparado sólido; cabe la posibilidad de concentrar el sobrenadante en vacío o por ultrafiltración para obtener pectinasas líquidas con más actividad por unidad de volumen. Del cultivo sólido puede utilizarse la mezcla seca de hongo y salvado tal cual como preparado crudo de la enzima, o extraerse ésta con agua, y a la solución de enzima se le puede dar cualquiera de los tratamientos que se da al sobrenadante del cultivo sumergido. Los preparados sólidos se diluyen y estabilizan con agentes como: gelatina, almidón, etc. (79,33). Las pectinasas comerciales son una mezcla de diferentes enzimas pectinolíticas cuyo número y cantidades relativas dependen de la cepa, composición del medio y condiciones de cultivo (79); además se encuentran contaminadas con celulasas, amilasas, proteasas y otras enzimas (73). Como ya se mencionó antes, es factible la producción de pectinasas constitutivas utilizando suero de queso como sustrato y los hongos *Aspergillus awamori* y *Sclerotinia sclerotiorum* (83,6,7,8).

La producción mundial de pectinasas está estimada en 10 ton al año, calculadas éstas en cantidad de proteína como enzima pura. La tabla 2.3.1 muestra una estimación de la producción mundial y de los valores relativos de ventas de las principales enzimas de aplicación industrial. Se observa que la producción de pectinasas es relativamente baja en comparación con las tres primeras enzimas de la tabla (50, 30 y 30 veces menor respectivamente), no obstante, el valor relativo de ventas de las pectinasas es el 10% del total, de donde se deduce el alto valor que poseen (72).

TABLA 2.3.1
PRODUCCION DE ENZIMAS INDUSTRIALES (72)

| Enzima | Tons/año (en cantidad de proteína como enzima pura) | Valor relativo de ventas (%) |
|-----------------------------|---|------------------------------------|
| Proteasa de <i>Bacillus</i> | 500 | 40 |
| Glucoamilasa | 300 | 14 |
| Amilasa de <i>Bacillus</i> | 300 | 12 |
| Glucosa isomerasa | 50 | 12 |
| Cuajo microbiano | 10 | 7 |
| Amilasa fúngica | 10 | 3 |
| PECTINASAS | 10 | 10 |
| Proteasa fúngica | 10 | 1 |
| Otras | - | 1 |

2.3.3.- Usos

La pectinestearasa se utiliza en la producción de pectinas de bajo metoxilo, las cuales tienen la propiedad de formar geles en presencia de iones divalentes, y encuentran aplicaciones en un gran número de productos alimenticios. La

pectinestearasa puede ser fúngica, pero libre de pectinasas despolimerizantes, u obtenida del tomate (33). También se pueden obtener esta clase de pectinas de cáscaras de cítricos, aprovechando la pectinestearasa nativa de estas frutas (17).

El principal y más antiguo uso que se da a las pectinasas, es como coadyuvantes en la clarificación del jugo de manzana; también se utilizan en jugo de uva, vinos, sidras y vinagres, con el mismo propósito. Las sustancias pécticas se encuentran en estado coloidal en estos líquidos, y mantienen suspendidos otros compuestos, lo cual resulta en un alto grado de turbiedad del producto. En el caso del jugo de manzana, los compuestos responsables del oscurecimiento, ocasionado por la oxidación catalizada por las polifenoloxidasas, se mantienen en suspensión junto con las sustancias pécticas y el material de lastre, dándole una coloración café desagradable. Así, cuando las pectinasas que se añaden actúan despolimerizando la pectina, se destruye el coloide protector y todo el material indeseable se precipita por interacciones electrostáticas (110). Este es fácilmente retirado por filtración, quedando el producto claro y brillante; en el caso del jugo de manzana, su aspecto final es el de un líquido ambar claro, y el flóculo tiene un color café oscuro. Además, este tratamiento reduce considerablemente la viscosidad del producto, por lo cual, la operación de filtrado se ve facilitada. Algunos de los materiales utilizados para diluir los preparados sólidos de pectinasas, como la gelatina, también actúan como agentes clarificantes (33,65,73). En el proceso de clarificación por defecación del jugo de manzana se aprovecha la pectinestearasa nativa del fruto, para que desmetoxile la pectina, y con el calcio del jugo se forme pectato de calcio que precipita, arrastrando consigo el material de lastre; sin embargo, el proceso es menos efectivo que con la acción de pectinasas

despolimerizantes (77).

En la producción de jugos concentrados, es necesario evitar que éstos se gelifiquen debido a la presencia de las sustancias pécticas aunada a la alta concentración de sólidos del producto terminado; con la adición de enzimas pectinolíticas, este problema queda resuelto. En concentrados de jugo de tomate se aprovechan las pectinasas nativas del fruto para lograr este objetivo (33,79). La disminución de la viscosidad del jugo que se va a concentrar facilita la evaporación de agua, y por lo tanto su eliminación.

En ocasiones, el bagazo de las frutas resultante de producción de jugos recibe un tratamiento con pectinasas previo a un segundo prensado para la extracción de líquido residual; esto redundaría en un rendimiento mayor, ya que el tratamiento permite que se libere el agua retenida en la pulpa (33). En el caso de vinos rojos, o jugos de frutas rojas, la adición de pectinasas al mosto o a la pulpa, permite una extracción más efectiva de las antocianinas, por lo cual se logra un mayor rendimiento del color en el producto (33,73,79). En néctares y papillas para bebés, se obtiene además una mayor extracción de los sólidos de la fruta (73). Este mismo beneficio se obtiene en la industria de cítricos, en la operación de "lavado de pulpa", la cual tiene como objeto recuperar sólidos de la pulpa obtenida de la extracción del jugo; estos sólidos se recuperan con agua y luego se concentran en un evaporador y al producto final se le llama "concentrado de pulpa lavada" (17,73).

Otra aplicación de las enzimas pectinolíticas se tiene en la extracción de aceites esenciales de las cáscaras de cítricos: cuando la pectina se degrada, se facilita su ex-

tracción, se aumenta el rendimiento, y se obtiene un producto más claro (33,17).

Entre otros usos más recientes que se han dado a las pectinasas, se incluye la estabilización de la "nube" en jugos de cítricos; contrariamente al jugo de manzana y de uva, los jugos de cítricos se requieren turbios; las sustancias pécticas del jugo son responsables de la estabilización de la "nube" (turbiedad), al formar un coloide liófilo; cuando la pectinestearasa nativa del cítrico libera una gran cantidad de grupos carboxílicos, éstos reaccionan con el calcio presente, y forman grandes agregados que tienden a precipitar; para evitar esto, la pectinestearasa se desnaturaliza sometiendo a los jugos a un tratamiento térmico; sin embargo, recientemente se ha propuesto la utilización de pectinasas despolimerizantes, para obtener oligómeros pécticos, lo suficientemente grandes como para que no se pierda la "nube", pero lo suficientemente pequeños como para que se inhiba la pectinestearasa, ya que las cadenas pequeñas de ácido péctico inhiben competitivamente a esta enzima (17,73).

También se ha sugerido la utilización de pectinasas para macerar cáscaras de cítricos, con el objeto de obtener una suspensión de sólidos que se utilice como enturbiante en bebidas (17).

Otro posible uso es la sustitución del proceso fermentativo que sufren los granos de café y cacao, para eliminar el residuo mucilaginoso que los cubre, por un tratamiento con enzimas pectinolíticas (79).

2.3.4.- Endo-poligalactouronasas de *Kluyveromyces fragilis*

K. fragilis es, entre las levaduras, la que mayor actividad pectinolítica presenta; sin embargo, no produce pectinestearasa ni ninguna otra pectinasa despolimerizante que no sea la endo-poligalactouronasa; esta enzima se produce en forma extracelular y no requiere de metales como cofactores (53,109,54,55,56). La endo-poligalactouronasa de esta levadura es específica para los ácidos poligalactourónicos y oligogalactourónicos, teniendo preferencia por las cadenas más grandes (28); sin embargo, puede degradar la pectina limitadamente, con una velocidad y grado de hidrólisis que varían en relación inversa al grado de esterificación del sustrato con ésteres metílicos (54,74,56). Con la adición de pectinestearasa, el grado de hidrólisis de la endo-poligalactouronasa de *K. fragilis* sobre la pectina aumenta en relación directa a la cantidad de enzima desmetoxilante (54). También al actuar sobre la pectina, tiene preferencia por las cadenas más grandes (55).

La hidrólisis intensiva del ácido péctico por esta enzima, resulta en una mezcla de ácidos mono y digalactourónico en una relación 4 a 3, pero esta hidrólisis tiene tres etapas claramente diferenciadas. La primera es la más rápida de la hidrólisis: el aumento de grupos reductores es muy grande y aumenta en forma lineal hasta hidrolizar aproximadamente el 25% de los enlaces glicosídicos del ácido péctico; en esta fase la formación de ácido monogalactourónico es muy pequeña, lo cual confirma el carácter endo de la enzima (55). Esta etapa tiene sus condiciones óptimas a un pH de 4.4 y 50°C (54, 26). Las reacciones de esta primera fase son las siguientes (27,26):

ácido péctico + pentámero + tetrámero + trímero + dímero
ácido pentagalactourónico + tetrámero + monómero

ácido pentagalactourónico + trímero + dímero

En la segunda etapa el sustrato principal es el ácido tetragalactourónico (tetrámero) (28,55); esta etapa se inicia después de 25% de hidrólisis y alcanza hasta un 50% de la hidrólisis sobre los enlaces glucosídicos; es unas 26 veces más lenta que la primera fase, y su pH óptimo es de 3.5 (27,74, 26). La reacción es la siguiente (27,26):

ácido tetragalactourónico + trímero + monómero

El rompimiento del ácido tetragalactourónico es necesariamente en ácido trigalactourónico y ácido galactourónico, y nunca en dos moles del dímero; esto se demuestra por el hecho de que la aparición de grupos reductores es completamente paralela a la aparición de ácido galactourónico, en esta fase (27, 55). El rompimiento ocurre sólo en el enlace uno (cercano al extremo reductor) (70). La última etapa involucra la siguiente reacción (27,26):

ácido trigalactourónico + dímero + monómero

Esta etapa es todavía mucho más lenta: se realiza a una velocidad 50 veces menor que la anterior. El ácido digalactourónico ya no puede ser hidrolizado por esta endo-poligalactouronasa, por lo que aquí cesa la reacción, habiéndose alcanzado un 70% de hidrólisis de los enlaces glucosídicos, con una relación 4 a 3 del monómero y el dímero. El pH óptimo de esta etapa es también 3.5 (74,27,26).

Phaff y Demain (75) reportan que la endo-poligalactouronasa de esta especie es una sola enzima, y no un sistema multienzimático como sucede en endo-poligalactouronasas fúngicas, lo cual podría pensarse debido a las tres fases de reacción que presenta. Sin embargo, en una publicación muy reciente, de un estudio con técnicas más modernas, Lim y colaboradores (49) reportan haber encontrado tres formas de endo-poligalactouronasa en el sobrenadante del cultivo de *K. fragi*-

lis, a las que denominan enzima I, enzima II y enzima III, y sus propiedades son las siguientes:

| | pI | M (daltones) | pH | T (°C) | K _m |
|------------|-----|-----------------|-----|-----------|----------------|
| Enzima I | 6.1 | 46 000 | 4-5 | 50 | 0.313 |
| Enzima II | 6.1 | 50 000 | 4-5 | 50 | 0.227 |
| Enzima III | 5.8 | 30 000 | 4-5 | 50 | 0.500 |

Donde: pI es el punto isoeléctrico, M peso molecular, T y pH son los óptimos, y los valores de K_m dados son para ácido péctico.

Estos autores encontraron además que las tres enzimas son glicoproteínas, cuyo principal carbohidrato constituyente es la manosa; las tres son estables entre valores de pH de 3.5 y 6.0, y a temperaturas mayores que 50°C, pero pierden la mayoría de su actividad a 70°C. Para las tres enzimas, su acción sobre el ácido péctico es rompiéndolo al azar para generar ácidos oligogalactourónicos a las mismas velocidades, y muestran acción macerativa en tejidos de papa y zanahoria.

Luh y Phaff (53) reportan que la endo-poligalactouronasa de *K. fragilis* es constitutiva, pero Wimborne y Rickard (109) la definen como parcialmente constitutiva, ya que la adición de pectina al medio de cultivo duplica la producción de la enzima. En este último artículo se reporta además que, en estudios hechos en un fermentador en medio de glucosa y sin pectina, la síntesis de la enzima se reprime por completo en condiciones de alta aireación: sólo se produce si la fermentación es anaerobia, o desde el momento en que se interrumpe la condición aerobia por inyección al medio de N₂ o CO₂ en lugar de aire. En cultivo en matraces agitados sí hay produc

ción de enzima, lo que implica que condiciones moderadamente aerobias no reprimen la síntesis de la endo-poligalactouronasa (53,109).

Los estudios realizados sobre la posible utilización comercial de la endo-poligalactouronasa de *K. fragilis* son prácticamente nulos. Entre las pocas evidencias reportadas de que esta enzima puede tener alguna utilización, está el trabajo de Kobayashi y Matsuo (43), que la utilizaron para macerar el líber para la elaboración de pulpa de papel; otros autores han reportado que esta enzima es efectiva en su acción macerativa en tejidos de papa y zanahoria (49), y tan efectiva como la poligalactouronasa de *Aspergillus kawachi* y mejor que las poligalactouronasas de zanahoria y tomate para macerar papa y ramio (69); también se reporta que es capaz de degradar pectinas de cítricos, cáñamo y ramio (43). En cuanto a su capacidad para clarificar, Luh y Phaff (53) reportan que la endo-poligalactouronasa de *K. fragilis* fué capaz de hacerlo en una solución de 2% de pectina cítrica, alcanzando las máximas velocidades entre 55 y 60°C y a un pH entre 3.5 y 4.0. Por otra parte, Pollard y Kieser (77) reportan que en las sidras la pectina se encuentra ausente, lo cual, de acuerdo a sus investigaciones, se debe a la presencia de una levadura productora de poligalactouronasa que se desarrolla a lo largo de la fermentación; la acción combinada de esta enzima con la pectinestearasa de la manzana degrada al polímero dando como resultado un producto clarificado; sus estudios demostraron que esta poligalactouronasa era prácticamente idéntica a la endo-poligalactouronasa de *K. fragilis* estudiada por Phaff y colaboradores, aunque la cantidad de enzima que producía la levadura aislada del sedimento de la sidra era 10 veces menor que la cantidad producida por una cepa de *K. fragilis* contra la que ellos la compararon. Quedó totalmente claro de este

trabajo que es necesaria la presencia de ambas enzimas: pectinestearasa y poligalactouronasa, para que desaparezca la pectina del mosto; cuando la primera no se encontraba activa, la eliminación de la pectina era incompleta, y la ausencia de la segunda, producida por la levadura, resulta en una sidra no clarificada. Esto concuerda perfectamente con lo reportado por Yamasaki y colaboradores (110) para jugo de manzana, quienes encontraron que una pectinestearasa sola no es capaz de clarificar el jugo, mientras que una endo-poligalactouronasa sola produce una clarificación incompleta: solamente la co existencia de ambas enzimas, procedentes de cualesquiera fuentes, son capaces de clarificar el jugo por completo.

3.- MATERIALES Y METODOS

3.1.- Microorganismos

Se utilizaron las cepas *Kluyveromyces fragilis* L-278, de la colección de cultivos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, y *Kluyveromyces fragilis* C-351 proporcionada por el Dr. Bor S. Luh del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad de California en Davis. Ambas cepas fueron mantenidas en medio de papa dextrosa agar (Bioxon).

3.2.- Medios y soluciones

-Medio de glucosa: se preparó con agua destilada y desionizada con 2% de glucosa anhidra, 0.2% de extracto de levadura (Bioxon), 0.1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.05% de KH_2PO_4 y 0.05% de MgSO_4 .

-Medio de lactosa: se preparó de la misma manera, sustituyendo la glucosa por una cantidad igual de lactosa, a menos que se indique otra concentración.

Los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min, separando siempre el azúcar del resto de los nutrientes.

-Medio de suero: se preparó a partir de suero de queso en polvo proporcionado por Cremería La Fronteriza S.A., México D.F.; el polvo se resuspendió en agua destilada y desionizada en una concentración de 6.45%; se adicionó además 0.5% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5% de K_2HPO_4 y 0.1% de extracto de levadura (Bioxon). El pH se ajustó, cuando se requería, con

H₂SO₄. La esterilización del medio se realizó en autoclave a 121°C durante 10 min, y para la pasteurización se calentó en baño de agua hirviendo hasta 80°C durante 15 seg. El suero resuspendido se esterilizó o pasteurizó por separado del resto de los nutrientes. En todos los casos deberá asumirse que el suero es estéril, a menos que se indique que es pasteurizado.

En los casos correspondientes, se adicionó al medio 0.5% (a menos que se especifique otra cantidad) de pectina cítrica comercial, la cual se esterilizó o se pasteurizó junto con la fuente de carbohidrato (lactosa o suero según el caso).

-Solución de ácido péctico: el ácido péctico se preparó a partir de pectina cítrica comercial, hidrolizando con NaOH el éster metílico de los grupos metoxilados para formar el pectato de sodio; posteriormente el ácido péctico se formó agregando HCl. La técnica seguida fue la siguiente: 0.5 g de pectina se disolvieron en 100 ml de agua; la solución se enfrió a 4°C, se agregó NaOH al 10% (p/v) hasta que la solución se tornó transparente; se dejó reposar en el refrigerador durante 30 min, y se agregó HCl (1 parte de HCl conc. por 2.5 partes de agua) poco a poco hasta que se formó un precipitado gelatinoso. El precipitado se filtró a través de un filtro de vidrio poroso Pyrex ASTM 40-60 C, se lavó con agua destilada y desionizada, y se suspendió en agua; el pH se ajustó con NaOH a 5.0, pH al cual el ácido péctico se disuelve; finalmente se aforó con agua a 500 ml.

3.3.- Condiciones de cultivo

-En matraces: para los cultivos aerobios se utili-

zaron matraces erlenmeyer de 250 ml con "baffles" y tapados con algodón. Los cultivos anaerobios se realizaron en matraces erlenmeyer de 250 ml, y el medio se desoxigenó burbujear do N₂ durante 1 min, y tapando la boca del matraz con Parafilm (American Can Co.). Los cultivos microaerobios se realizaron como estos últimos pero sin desoxigenar. Para obtener varios puntos a lo largo de una fermentación, se tomaron muestras del matraz en condiciones estériles; en el caso del cultivo anaerobio, se burbujear N₂ nuevamente, cada vez que se destapaba el matraz para tomar una muestra. En todos los casos, los matraces se incubaron a 28°C con una agitación de 200 rpm en un agitador con incubadora ambiental New Brunswick modelo G24. Los volúmenes de trabajo fueron de 150 ml por matraz.

-En fermentador: se utilizó un fermentador New Brunswick BioFlo modelo C30. El volumen de trabajo fué de 500 ml, la temperatura de 28°C y la aireación, cuando era el caso, de 0.8 vvm; cuando la fermentación era o requería una etapa anaerobia, se burbujear N₂ constantemente, en lugar de aire; para controlar la espuma, en caso necesario, se agregaron unas gotas de antiespumante de silicón. La agitación, la cantidad y concentración del inóculo, y el pH inicial del medio se especifican para cada fermentación.

3.4.- Parámetros de crecimiento

-Concentración de biomasa: se determinó por turbidimetría, midiendo la absorbancia a 650 nm en un espectrofotómetro PYE UNICAM modelo SP 30 UV, utilizando agua destilada como blanco y para diluir las muestras; estas diluciones se efectuaron de tal manera que se evitó que la absorbancia excediera un valor de 1.300. Para el medio de suero se res-

tó a los valores de absorbancia de cada muestra el valor resultante de la turbiedad de las proteínas coaguladas, considerando que este valor no cambiaba a lo largo de la fermentación, ya que esta levadura es incapaz de degradar las proteínas séricas (102); de este modo, el resultado de la resta de la turbiedad de la muestra y la turbiedad del medio original, representaba la turbiedad debida a la concentración celular. A partir de los valores de absorbancia se determinó la concentración celular por comparación con una curva patrón, cuyos puntos se obtuvieron de la siguiente manera: se prepararon cinco diluciones a partir de un cultivo en matraz agitado de *K. fragilis* L-278 en medio de lactosa; se determinó la turbiedad de cada dilución, y se hizo pasar un volumen de 150 ml de cada una a través de membranas Millipore, con poros de 0.45 μ m de diámetro, previamente puestas a peso constante; la biomasa retenida en la membrana se lavó con agua destilada y desionizada y se secó en una estufa con vacío a 60°C hasta peso constante.

-Rapidez específica de crecimiento (μ): de acuerdo con la ecuación integrada para el crecimiento exponencial $\ln X = \mu t + B$, la rapidez específica de crecimiento (μ) está dada por la pendiente de la recta correspondiente a dicha ecuación, donde X es la concentración de biomasa en el tiempo t y B la constante de integración; esta ecuación sólo es válida durante la fase de crecimiento logarítmico. Para determinar la μ de cada fermentación, se ajustaron por regresión lineal los puntos experimentales comprendidos en la fase mencionada, y se determinó la pendiente de la recta ajustada a los puntos cuyo coeficiente de correlación fué el más alto.

-Contenido de proteína en biomasa: se determinó por el método de Kjeldahl (N X 6.25) reportado en el A.O.A.C.

utilizando para la digestión 25 ml de H_2SO_4 conc. y 6 g de mezcla reactiva de selenio para determinar nitrógeno según Weininger (Merck). Para la determinación, la muestra se secó a $90^\circ C$ en una estufa durante toda la noche, y después se mantuvo en un desecador durante 24 hrs.

-Lactosa en el medio: se determinó midiendo reductores directos por el método de Somogyi-Nelson (64), comparando con una curva patrón de glucosa; para hacer la determinación se separó la biomasa por centrifugación del medio a 3500 rpm durante 15 min para el medio de lactosa, y 30 min para el medio de suero. Las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro PYE UNICAM modelo SP 30 UV.

-pH: se determinó en las pruebas en el fermentador, con un potenciómetro New Brunswick modelo pH-40.

-Oxígeno disuelto: se determinó con un analizador de oxígeno disuelto modelo D.O.-50 con registrador, y se graficó a lo largo de la fermentación. Se ajustó el 100% de saturación de oxígeno disuelto con agua destilada y desionizada a $25^\circ C$.

Los electrodos de pH y oxígeno disuelto se esterilizaron bañándolos en solución de $NaClO$, y en segundo término en etanol, inmediatamente antes de introducirlos en el fermentador.

Para asegurar la pureza del cultivo, se observaron periódicamente a lo largo de la fermentación, muestras del medio al microscopio mediante una tinción de Gram.

3.5.- Actividad

Como solución de enzima se utilizó el sobrenadante resultante de la centrifugación del caldo de cultivo, a 3500 rpm, durante 15 min si la fermentación se hizo en medio sintético, o durante 30 min cuando se utilizó el medio de suero. Para determinar la actividad se utilizaron dos métodos.

- Disminución de viscosidad: en un viscosímetro Ubbelohde No. 2C de Cannon Instrument Co. se midió, a diferentes intervalos de tiempo, el tiempo de flujo de 12.6 ml de una solución de pectina cítrica comercial al 0.5% (p/v) con un pH de 5.0, y 1.4 ml de la solución de enzima (10% del volumen total); la reacción se efectuó a 30°C manteniendo el bulbo del viscosímetro en un baño de agua a temperatura constante. Las medidas se compararon con un testigo en las mismas condiciones, pero en el cual se utilizó una solución de enzima inactivada térmicamente (92°C durante 40 min).

- Aumento de reductores: el método empleado para la determinación de reductores fué el de Somogyi-Nelson (64). Los valores se obtuvieron por comparación con una curva patrón de glucosa; las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro PYE UNICAM modelo SP 30 UV. Para medir la actividad se determinó el aumento de reductores provocado por 0.1 ml de solución de enzima en 9.9 ml de una solución de ácido pectico al 0.1% (p/v) con un pH de 5.0; de la mezcla enzima-sustrato, que permanecía en un baño a 30°C, se tomaron alícuotas para determinar reductores a tiempos de reacción de: menos de 1, 5, 10 y 15 min, considerando como tiempo de reacción el transcurrido desde que la enzima entraba en contacto con el ácido pectico hasta que la alícuota se mezclaba con el reactivo I de Somogyi-Nelson, momento en el cual la reacción se detenía.

Se definió como unidad de actividad de endo-poliga lactouronasa (uPG), a la cantidad de enzima que produce una μmol de grupos aldehído por minuto, a 30°C y pH 5.0.

La razón de haber utilizado dos métodos para la de terminación de actividad es que el método de disminución de viscosidad es más sensible que el de aumento de reductores, por tratarse de una endo enzima; esto se comprobó al detectar actividad por disminución de viscosidad en muestras en las que no se detectó por aumento de reductores; sin embargo, con fines cuantitativos este último es más preciso. Cuando la actividad es muy alta, el método de disminución de viscosidad es menos preciso aún, ya que esta enzima hidroliza a la pectina solamente entre dos grupos carboxílicos libres, teniendo preferencia por las cadenas más grandes (54), de ahí que la hidrólisis sobre la pectina sea limitada; cuando la actividad de una muestra es alta, este límite es alcanzado rápidamente, entonces no pueden cuantificarse las actividades que excedan un cierto valor.

-Actividad específica: la actividad se determinó por aumento de reductores, y la proteína por el método de Lowry y colaboradores (52), comparando con una curva patrón de albúmina bovina. Las lecturas se hicieron en un espectro fotómetro PYE UNICAM modelo SP 30 UV.

3.6.-Purificación de la enzima

La enzima se obtuvo por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, obteniéndose en la fracción que precipita al agregar a la solución, entre el 35 y 65% (p/v) de esta sal.

A 108 ml de solución de enzima, se le agregaron 35 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por cada 100 ml de solución; el precipitado hasta aquí formado fué separado por centrifugación a 8 000 rpm durante 20 min; este precipitado no presentó actividad enzimática. Al sobrenadante se le agregó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta 65 g por 100 ml de solución, y el precipitado se separó por centrifugación a 10 000 rpm por 30 min; el sobrenadante de esta segunda precipitación tampoco presentó actividad enzimática. El precipitado obtenido se aforó a 20 ml con solución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH 5.0. La solución anterior se dializó en una bolsa de celofán para diálisis, contra una solución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH 5.0; esta solución se cambió una hora después y se dejó doce horas más.

3.7.- Aplicación de la enzima en jugo de manzana

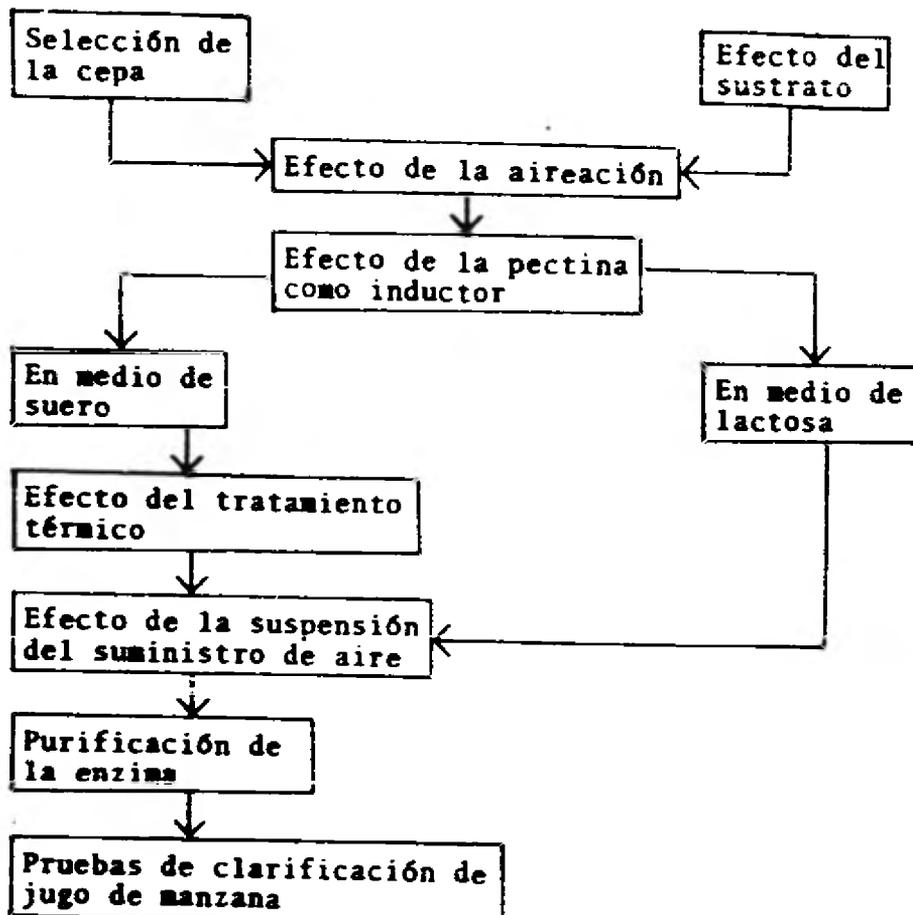
Se evaluó la posibilidad de aplicar la endo-poliglactouronasa de *K. fragilis* en la clarificación de jugo de manzana; para ello se utilizó la solución dializada de enzima, y se comparó su capacidad para clarificar con una enzima comercial en polvo: Irgazyme 100 de Ciba-Geigy; para efectuar las pruebas, se disolvieron 6.07 mg de la enzima comercial en 50 ml de agua y se aforó a 100 ml.

El jugo de manzana se preparó en un extractor de jugos Turmix; el jugo obtenido se filtró através de una manta de cielo para separar las partículas gruesas. Volúmenes iguales del jugo así preparado se colocaron en tres matraces; a uno se le agregó la solución de enzima comercial necesaria para obtener una concentración final en el jugo de 75 ppm (proporción recomendada por el fabricante), al siguiente se le agregó el equivalente en UPG de la solución de enzima de *K. fragilis*, y el tercero se utilizó como control; los tres

matraces se mantuvieron en un baño a 50 o 30°C; posteriormente se filtraron através de un papel Wattman No. 1, y a los tres filtrados obtenidos se les determinó la turbiedad contra un blanco de agua a 650 nm en un espectrofotómetro PYE UNICAM modelo SP 30 UV.

3.8.- Secuencia experimental

A continuación se muestran las etapas del presente trabajo.



4.- RESULTADOS Y DISCUSION

4.1.- Comparación de las cepas

Para seleccionar entre las dos cepas con las que se contaba, utilizando la producción de enzima y el crecimiento de biomasa como parámetros, se hicieron varias pruebas: en la gráfica 4.1.1 se muestra la actividad medida por disminución de viscosidad que mostraron cada una de las cepas en cultivo microaerobio en matraces, con un crecimiento de cuatro días, tanto en medio de glucosa como de lactosa; en vista de que todos los estudios reportados de la producción de esta enzima fueron realizados en medio de glucosa, y además debido a que existe un estudio reportado por Luh y Phaff (54) en el que encontraron que al agregar lactosa a la enzima producida en medio de glucosa había una ligera disminución de la actividad enzimática, fué necesario estudiar la factibilidad de producir la endo-poligalactouronasa utilizando lactosa como fuente de carbono y observar si en este caso se presentaba una pérdida considerable de actividad. Por tal razón, se comparó la actividad mostrada por las cepas cultivadas en ambos sustratos. La gráfica 4.1.2 muestra las curvas de crecimiento y de actividad medida por aumento de reductores de ambas cepas crecidas en matraces en medio de lactosa en condiciones microaerobias; en las gráficas 4.1.3 y 4.1.4 se puede observar el efecto de la aireación en la producción de enzima en ambas cepas, crecidas en matraces en medio de lactosa; la primera muestra la actividad medida por disminución de viscosidad a las 95 hrs de cultivo, y en la segunda la actividad se midió por aumento de reductores. La tabla 4.1.1 resume estas pruebas.

Los resultados muestran que ambas cepas presentan mayor actividad enzimática en cultivo de glucosa que en cul-

tivo de lactosa; sin embargo, ya que las diferencias mostradas no son importantes, es factible la producción de la enzima utilizando lactosa como sustrato.

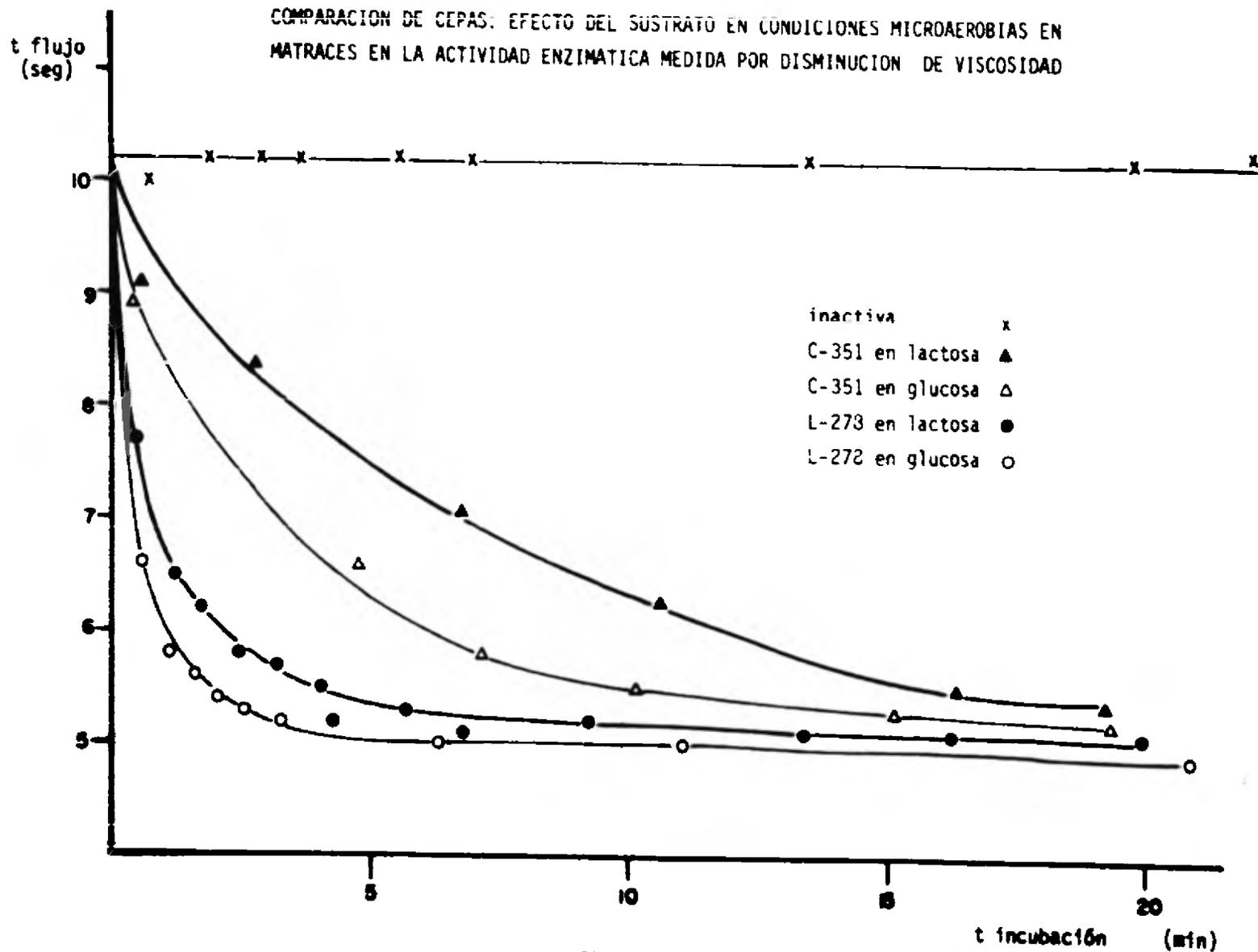
La cepa C-351 es la misma que utilizaron Phaff y colaboradores (53,54,55,28,27,75,70) en sus estudios de la endo-poligalactouronasa de *K. fragilis*, de ahí que la mayor parte de la información que se tiene de esta enzima sea de la producida por dicha cepa; sin embargo, es evidente al observar los resultados, que la cepa L-278 presenta mayor actividad enzimática que la cepa C-351 en condiciones análogas de cultivo, es decir, independientemente del sustrato y las condiciones de aireación, la primera cepa produce mayor cantidad de enzima que la segunda. En la gráfica 4.1.2 se observa que la producción de biomasa para ambas cepas es similar.

Con base en estos estudios se seleccionó para las pruebas posteriores a la cepa *K. fragilis* L-278.

TABLA 4.1.1
COMPARACION DE CEPAS

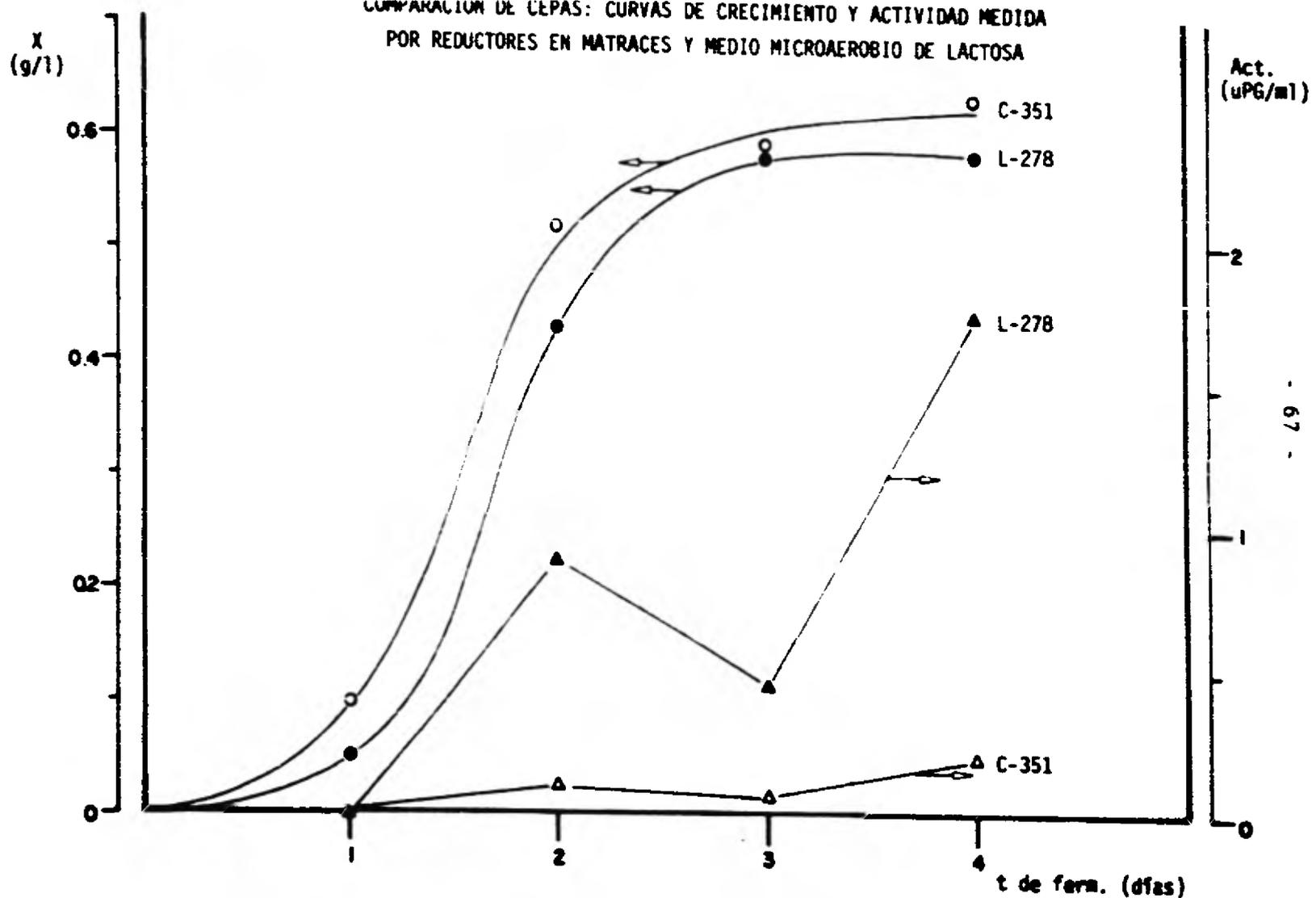
| Gráfica | Medio | Condición | Determinación de Actividad | En orden decreciente según actividad | Crecimiento |
|---------|-------------------|---------------------|----------------------------|--|-----------------|
| 4.1.1 | Glucosa y Lactosa | microaerobia | viscosidad | L-278 en glucosa L-278 en lactosa C-351 en glucosa C-351 en lactosa | no se determinó |
| 4.1.2 | Lactosa | microaerobia | reductores | L-278 C-351 | similar |
| 4.1.3 | Lactosa | aerobia y anaerobia | viscosidad | L-278 anaerobia C-351 anaerobia L-278 aerobia C-351 aerobia | no se determinó |
| 4.1.4 | Lactosa | aerobia y anaerobia | reductores | L-278 anaerobia C-351 anaerobia L-278 aerobia C-351 aerobia | no se determinó |

COMPARACION DE CEPAS. EFECTO DEL SUSTRATO EN CONDICIONES MICROAEROBIAS EN MATRACES EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA MEDIDA POR DISMINUCION DE VISCOSIDAD

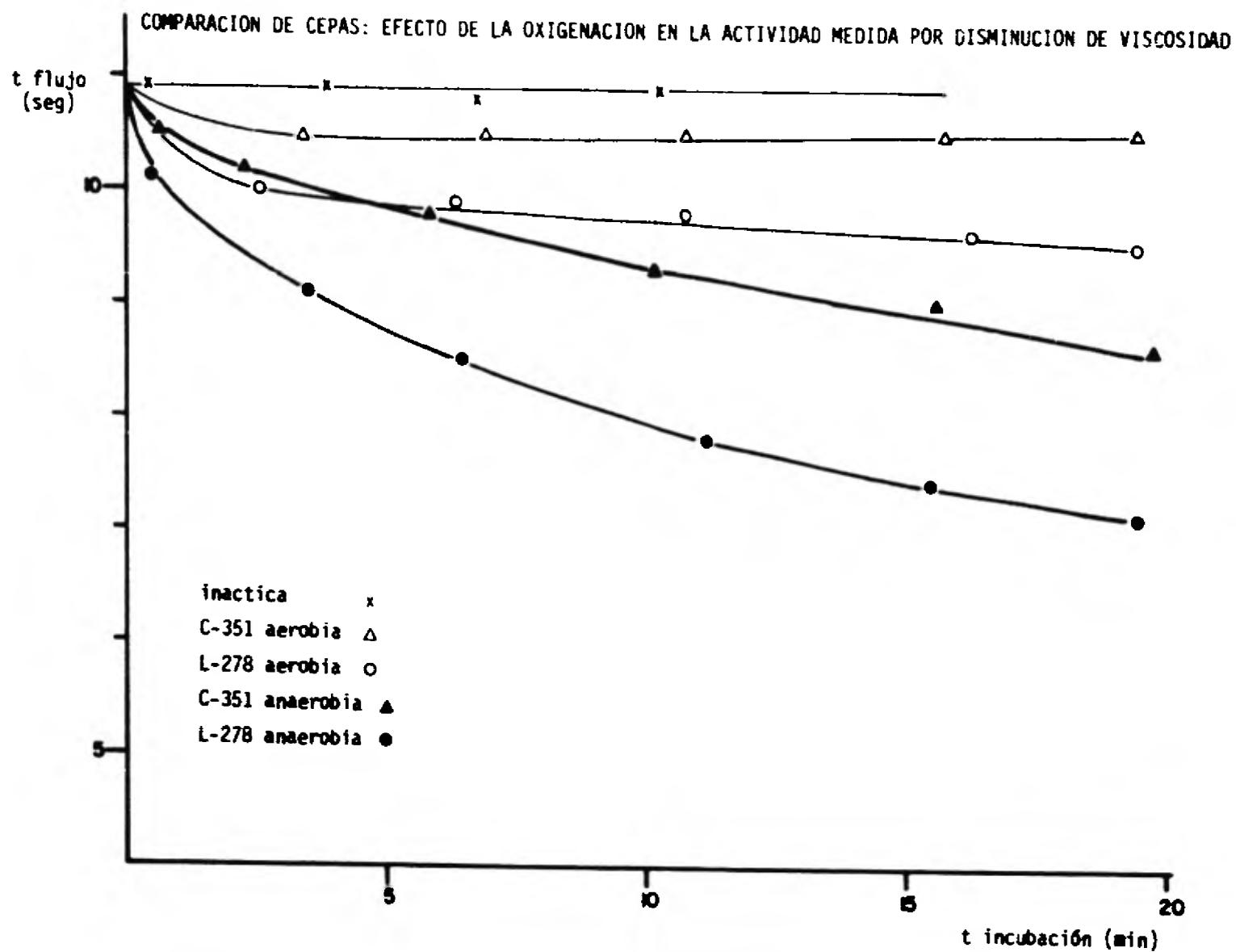


GRAFICA 4.1.1

COMPARACION DE CEPAS: CURVAS DE CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD MEDIDA
 POR REDUCTORES EN MATRACES Y MEDIO MICROAEROBIO DE LACTOSA

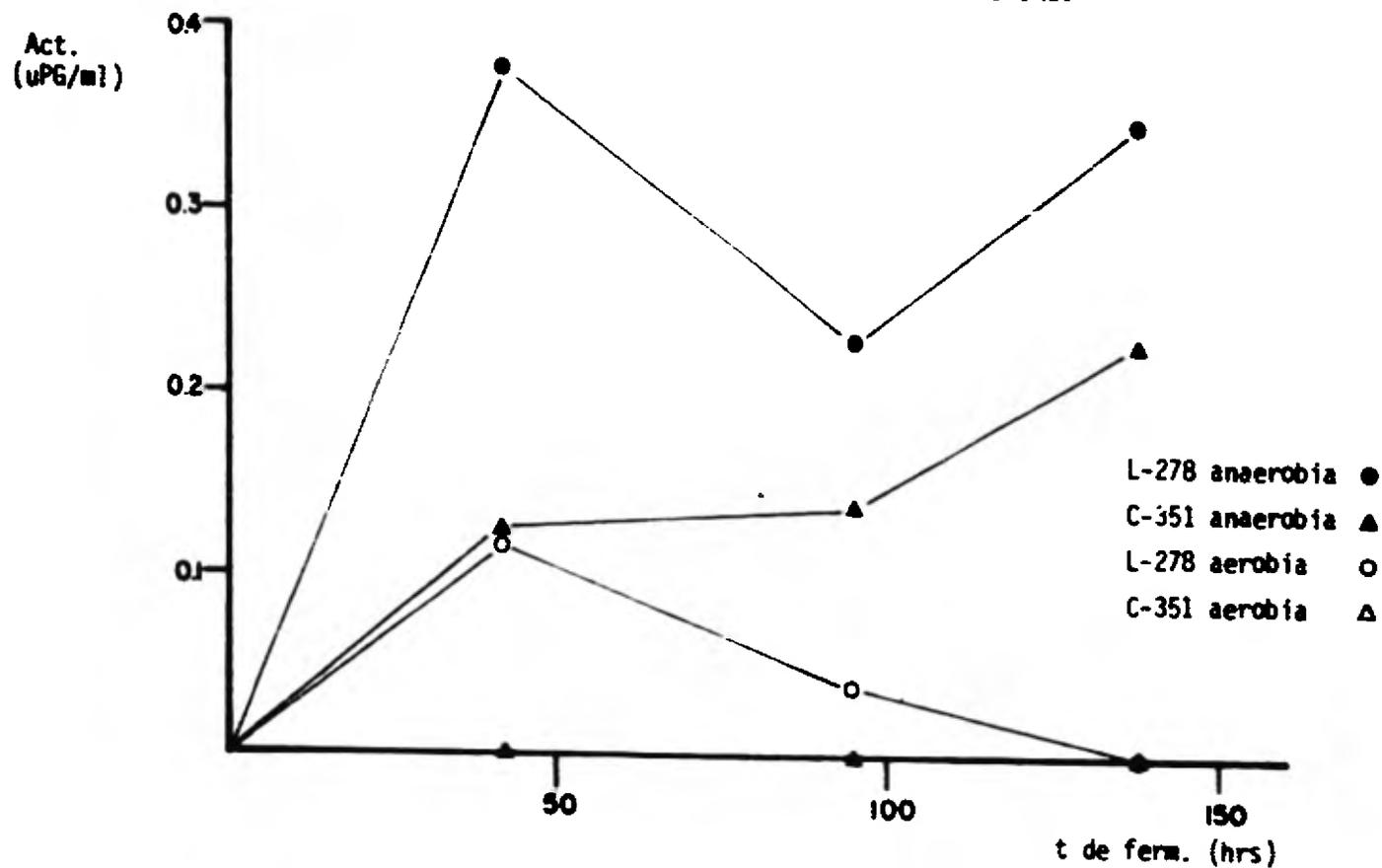


GRAFICA 4.1.2



GRAFICA 4.1.3

COMPARACION DE CEPAS: EFECTO DE LA OXIGENACION EN
LA ACTIVIDAD ENZIMATICA MEDIDA POR REDUCTORES



GRAFICA 4.1.4

4.2.- Influencia de la aireación en la producción de enzima

En un cultivo en matraces con medio de lactosa en condiciones anaerobias, se estudió el crecimiento, el consumo de lactosa, y la actividad por aumento de reductores de la cepa L-278; la determinación se hizo a partir de tres matraces idénticos de los que se tomaba una muestra de cada uno al mismo tiempo; los resultados se promediaron y con los valores promedio se trazó la gráfica 4.2.1.

Se realizaron estudios en el fermentador en medio de lactosa para dos niveles de aireación: aerobio y totalmente anaerobio, y en medio de suero en condiciones aerobias. La gráfica 4.2.2 muestra los resultados de la fermentación anaerobia en medio de lactosa, y la gráfica 4.2.3 los resultados de la fermentación aerobia en suero. En la tabla 4.2.1 se muestran las condiciones y los valores obtenidos de concentración máxima de biomasa, máxima actividad enzimática, rendimiento de biomasa, y velocidad específica de crecimiento en la fase logarítmica, de cada una de las fermentaciones. La actividad pectinolítica se midió por aumento de reductores, y el método de disminución de viscosidad se usó para corroborar cualitativamente los resultados.

A lo largo de todo el estudio se encontraron varias evidencias de la influencia del oxígeno en la producción de enzima. El hecho más obvio es que a niveles altos de aireación, la producción de la enzima es completamente reprimida, tanto en medio de lactosa como en suero; si se comparan los resultados de las fermentaciones en medio de lactosa realizadas en idénticas condiciones en el fermentador, se puede observar que la enzima sólo se produce en la fermentación anaerobia, a pesar de que la cantidad de biomasa producida en ésta es siete veces menor que en la fermentación aerobia; en

esta última no se detectó actividad ni aún por el método de disminución de viscosidad. En la fermentación anaerobia la cantidad de biomasa obtenida y la velocidad específica de crecimiento, como era de esperarse, fueron mucho menores que las obtenidas en la fermentación aerobia, como puede verse en la tabla 4.2.1; esto obviamente contraviene el objetivo del trabajo, ya que representa un sacrificio considerable en la obtención de biomasa, no obstante que hay una buena producción de enzima. En la fermentación aerobia en medio de suero, tampoco se detectó actividad pectinolítica por ninguno de los dos métodos. Wimborne y Rickard (109), en un estudio similar pero en medio de glucosa, encontraron este mismo efecto.

En los cultivos en matraces, cuyos resultados se muestran en el inciso anterior se encontró actividad enzimática tanto en condiciones aerobias como anaerobias; en la gráfica 4.1.3 se muestra que las dos cepas produjeron enzima en ambas condiciones, aunque el cultivo aerobio de la cepa C-351 presentó tan baja actividad, que no fué detectada por el método de aumento de reductores (gráfica 4.1.4); esto es debido a que las condiciones de aireación en los cultivos en matraces, son muy difíciles de regular, lo que no sucede en el fermentador; por lo tanto, en matraces aún los cultivos aerobios se ven limitados en oxígeno. También se puede observar que a medida que aumenta la oxigenación del cultivo, se inhibe la producción de enzima, y aparentemente existe un umbral, sobrepasado el cual la inhibición es total. Por otro lado, la actividad de los cultivos microaerobios en matraces (gráfica 4.1.1) es mayor que la presentada por los cultivos anaerobios en matraces (gráfica 4.1.3); esto puede explicarse, a pesar de que no se dispone de datos de concentración celular para estos experimentos, asumiendo que las condicio-

nes microaerobias permitieron un mayor desarrollo celular, sin inhibir la producción de enzima, permitiendo así una mayor producción total de ésta, mientras que en la fermentación anaerobia de la gráfica 4.1.3, aunque se favorece la producción de enzima, se reprime la propagación celular. Esto puede apoyarse en los resultados obtenidos en la fermentación en matraces mostrada en este inciso (gráfica 4.2.1): aunque esta fermentación se pretendió realizar en condiciones anaerobias, comparando los parámetros de crecimiento celular con los de las otras fermentaciones en la tabla 4.2.1, es evidente que esta fermentación no estuvo muy limitada en oxígeno, y por lo tanto, tuvo una alta producción de biomasa, que a su vez dió origen a una producción muy alta de enzima. Estos resultados también concuerdan con los de Wimborne y Rickard (109) y Luh y Phaff (53), quienes reportan haber encontrado producción de enzima en cultivos en matraces agitados en medio de glucosa.

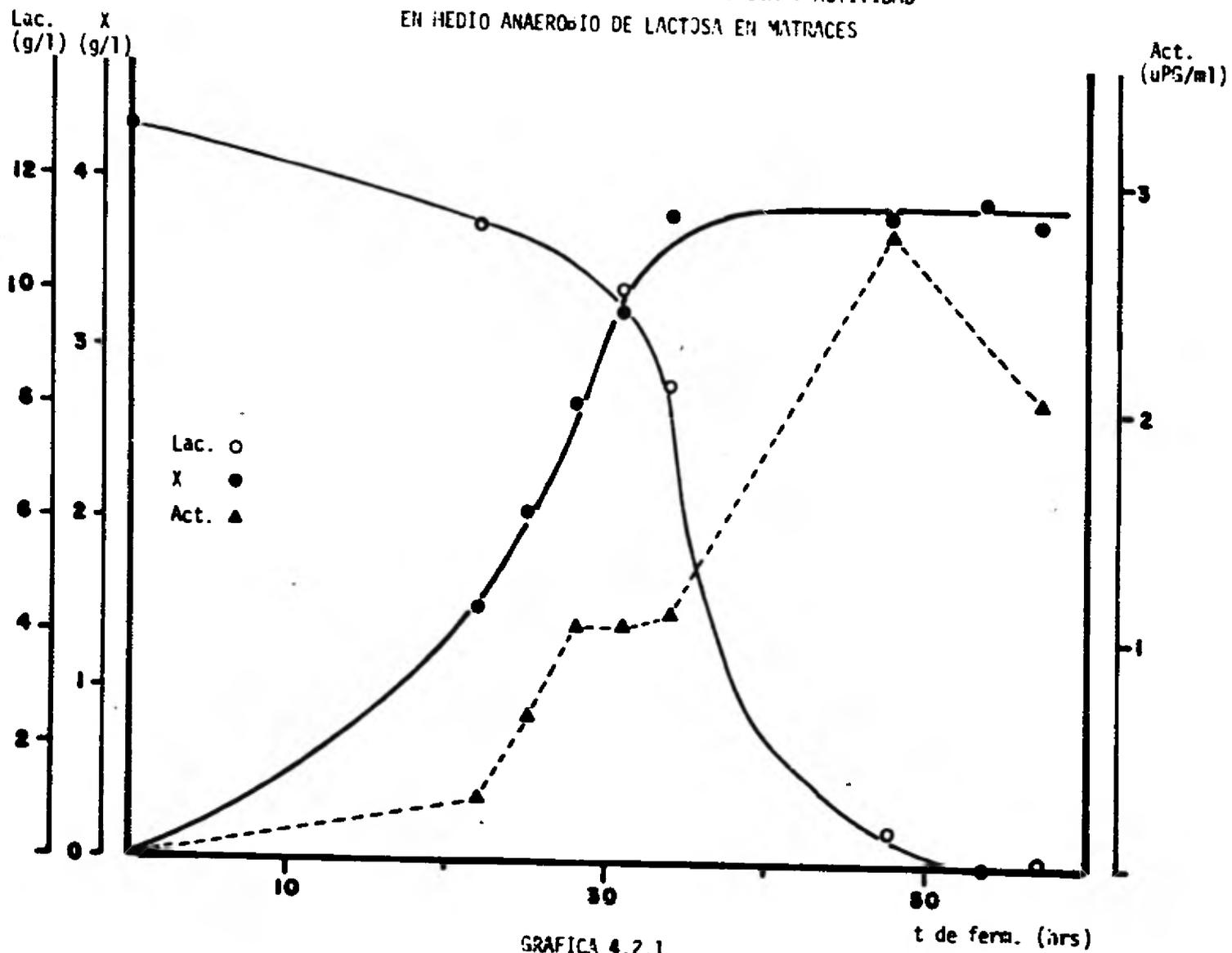
De todo lo anterior se concluye que: la producción de enzima está estrechamente relacionada con el nivel de oxigenación del medio, reprimiéndose completamente cuando éste es muy alto; sin embargo, en condiciones completamente anaerobias, debido a la poca producción de biomasa, la producción total de enzima no es muy alta y por lo tanto, la mayor productividad de enzima se da en condiciones microaerobias.

TABLA 4.2.1

INFLUENCIA DE LA AIREACION EN LA PRODUCCION DE ENZIMA

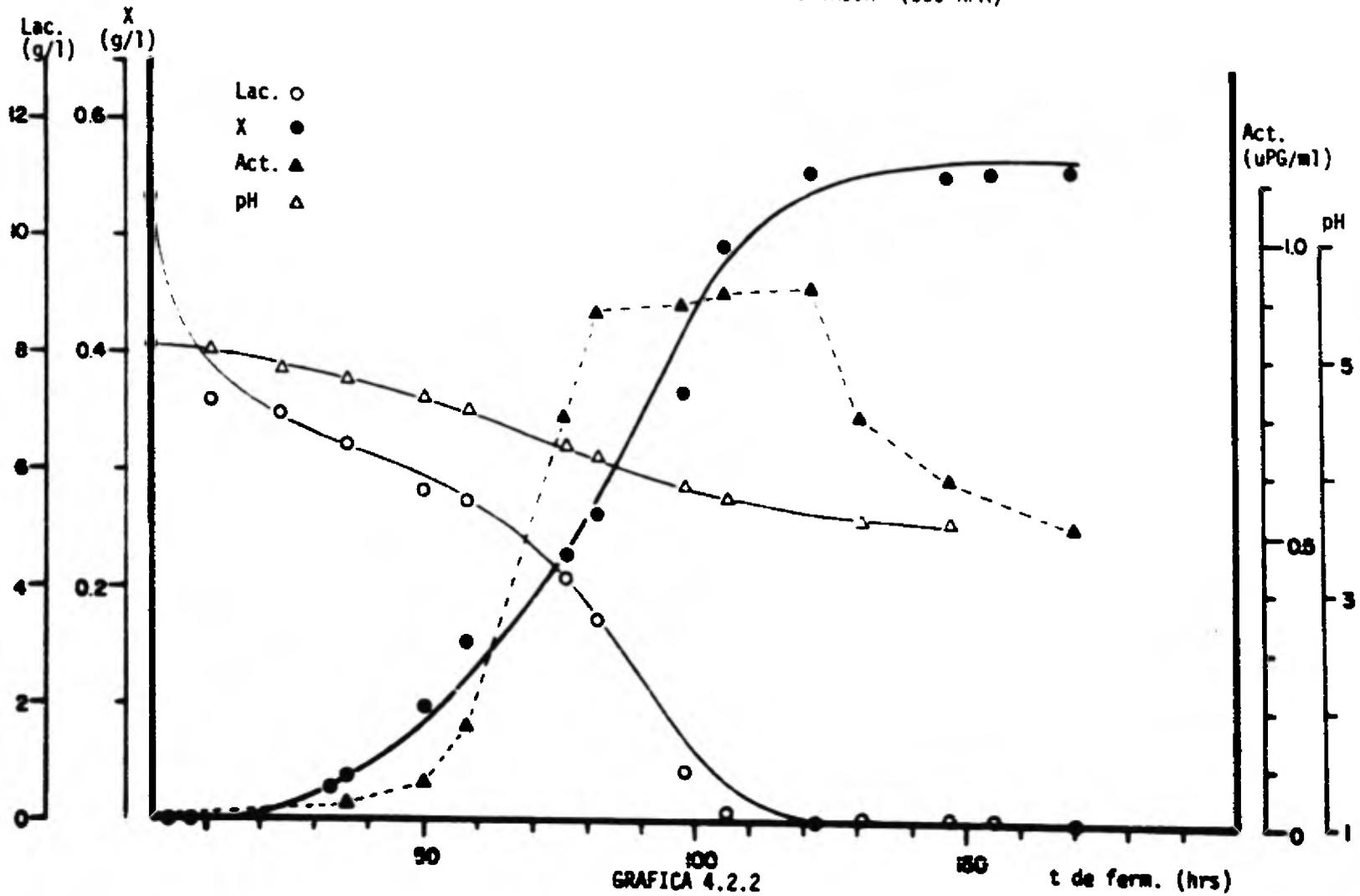
| | | CONDICIONES | | | | RESULTADOS | | | | |
|---------|--------------------------|-------------|--------------------|---------------------|------------|---------------|--------------------|-------------------------|-----------|------------------------------|
| Gráfica | Medio | Aireación | Agitación (rpm) | Inóculo V (%) | C (g/l) | pH inicial | X_{max} (g/l) | Act_{max} (uPG/ml) | $Y_{X/S}$ | μ (hr ⁻¹) |
| 4.2.1 | lactosa (matraces) | anaerobia | - | - | - | - | 3.90 | 2.78 | 0.30 | 0.09 |
| - | lactosa (fermentador) | aerobia | 300 | 5 | 0.08 | 5.2 | 3.99 | 0 | - | 0.10 |
| 4.2.2 | lactosa (fermentador) | anaerobia | 300 | 5 | 0.08 | 5.1 | 0.56 | 0.92 | 0.05 | 0.03 |
| 4.2.3 | suero (fermentador) | aerobia | 400 | 5 | 0.08 | 6.25 | 12.72 | 0 | 0.39 | 0.11 |

CURVAS DE CRECIMIENTO, CONSUMO DE LACTOSA Y ACTIVIDAD
EN MEDIO ANAEROBIO DE LACTOSA EN MATRACES



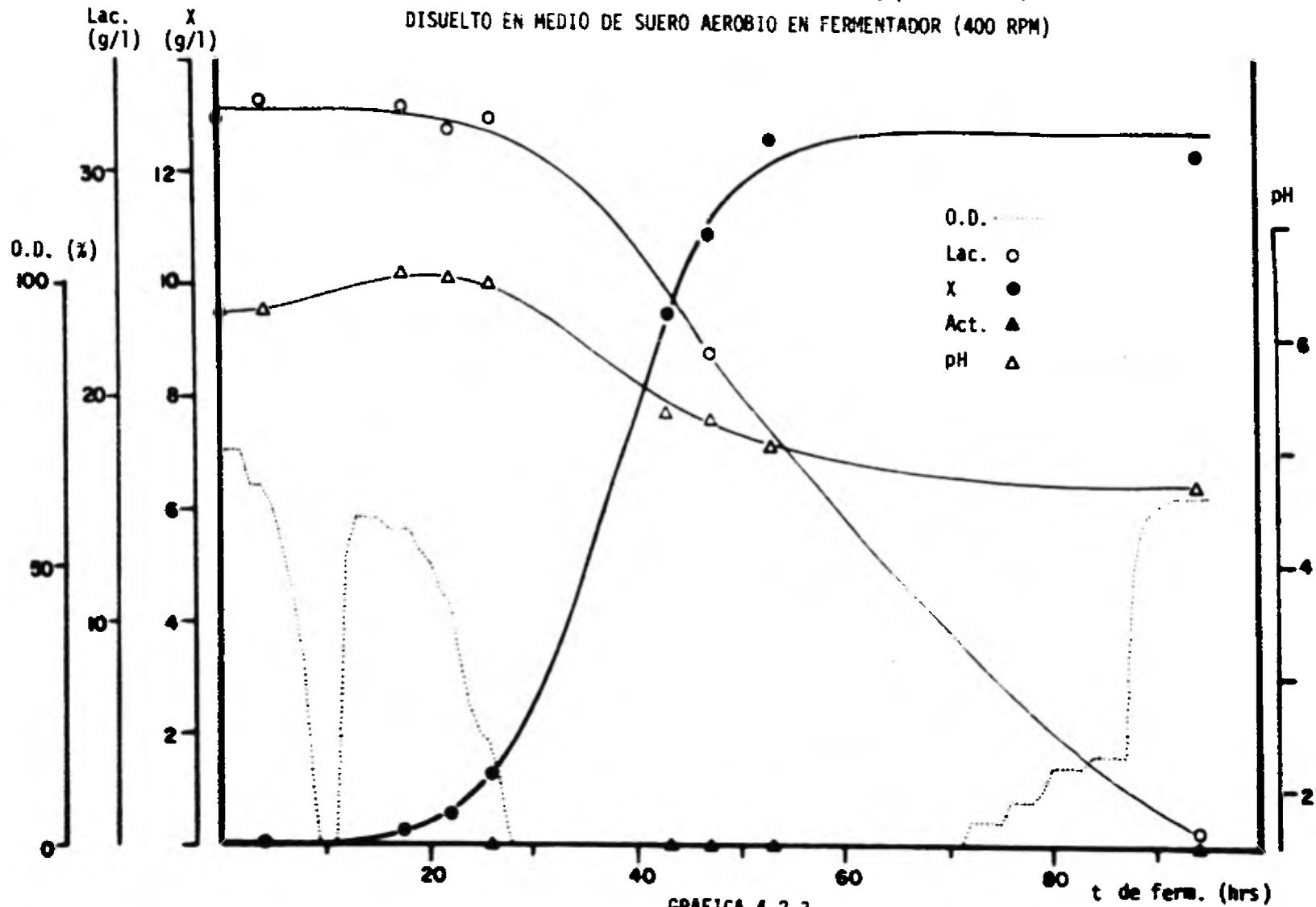
GRAFICA 4.2.1

CURVAS DE CRECIMIENTO, CONSUMO DE LACTOSA, ACTIVIDAD Y pH
 EN MEDIO ANAEROBIO DE LACTOSA EN FERMENTADOR (300 RPM)



GRAFICA 4.2.2

CURVAS DE CRECIMIENTO, CONSUMO DE LACTOSA, pH Y OXIGENO
 DISUELTO EN MEDIO DE SUERO AEROBIO EN FERMENTADOR (400 RPM)



GRAFICA 4.2.3

4.3.- Influencia de la pectina sobre la producción de enzima

Para investigar si la pectina en el medio muestra un efecto inductor sobre la pectinasa en condiciones altamente aerobias, se realizó una fermentación en medio de lactosa (1%) con pectina en el fermentador (gráfica 4.3.1), y se comparó con la fermentación aerobia en lactosa mencionada en el inciso anterior; este mismo estudio se realizó en suero, efectuando una fermentación aerobia en medio de suero con pectina en el fermentador (gráfica 4.3.2), comparándola con la fermentación aerobia en suero del inciso anterior (gráfica 4.2.3); las condiciones y los resultados de estas cuatro fermentaciones se resumen en la tabla 4.3.1.

La tabla 4.3.1 muestra claramente que cuando se adiciona pectina al medio, aún en condiciones altamente aerobias, sí hay producción de endo-poligalactouronasa; este efecto se observa tanto en medio de lactosa como en medio de suero, sin embargo, la producción de enzima es menor en suero que en el medio sintético.

El hecho de que la pectina induzca la producción de enzima en condiciones aerobias, es de suma importancia en vista de que el objetivo de este trabajo es producir endo-poligalactouronasa paralelamente al proceso de producción de biomasa a partir de suero, y este mecanismo permite lograrlo sin detrimento del rendimiento de este último producto; por esta razón, en todas las fermentaciones siguientes se adicionó pectina al medio con objeto de obtener la máxima producción posible de enzima.

La gráfica 4.3.3 muestra la actividad pectinolítica medida por disminución de viscosidad, producida en condiciones microaerobias en cultivos en matraces con medio de

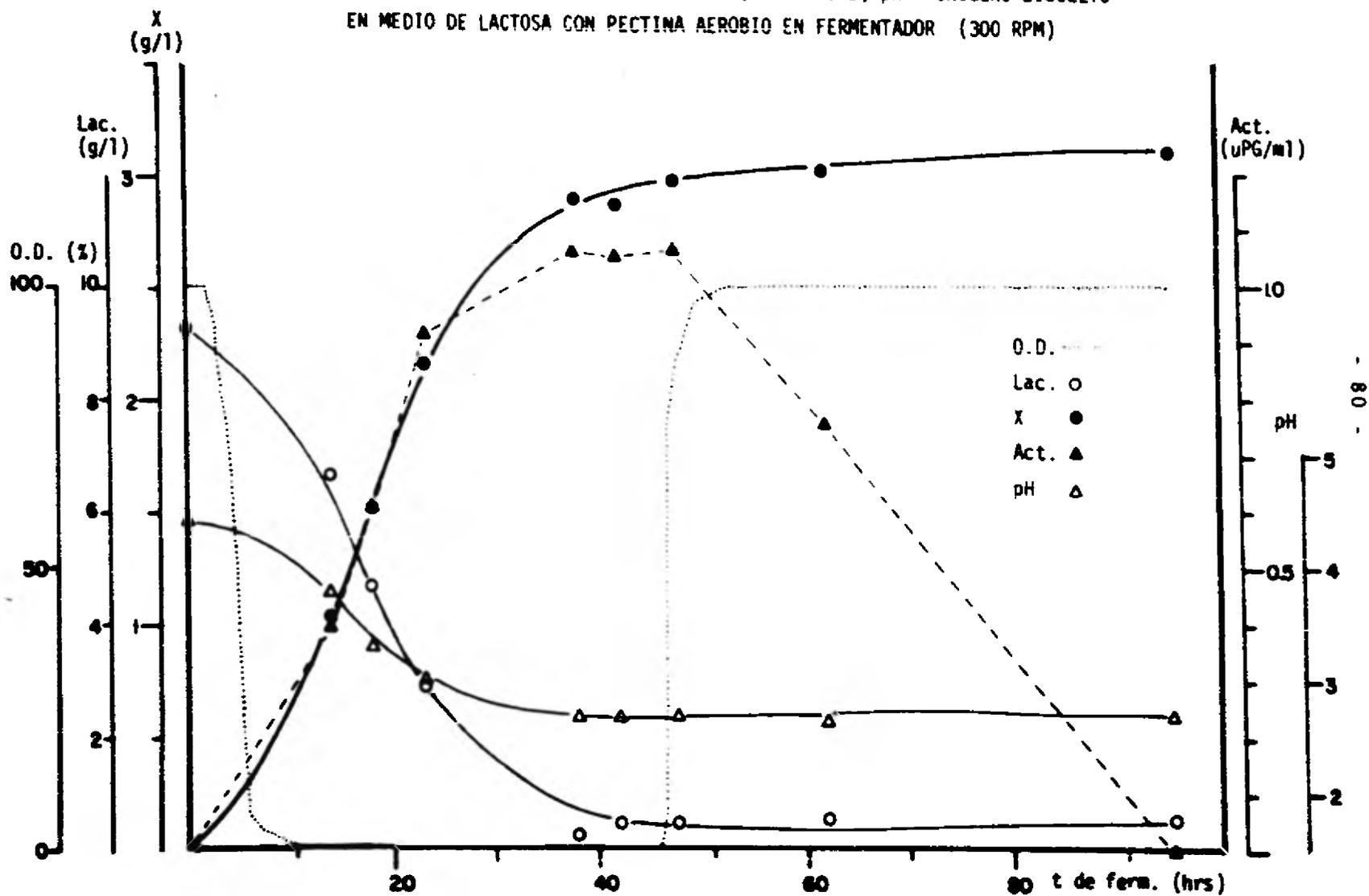
lactosa y con medio de lactosa (1.8%) con pectina (0.2%). En esta gráfica no se observa un efecto evidente de inducción por la pectina, lo cual parece indicar que la actividad enzimática obtenida gracias a las condiciones de baja oxigenación, no se ve mejorada al agregar pectina al medio de cultivo; sin embargo, debe considerarse que ya que el método de disminución de viscosidad no es muy preciso para cuantificar actividad enzimática, principalmente cuando ésta es muy alta, esta gráfica no es determinante para asegurar lo antes propuesto.

TABLA 4.3.1

INFLUENCIA DE LA PECTINA SOBRE LA PRODUCCION DE ENZIMA

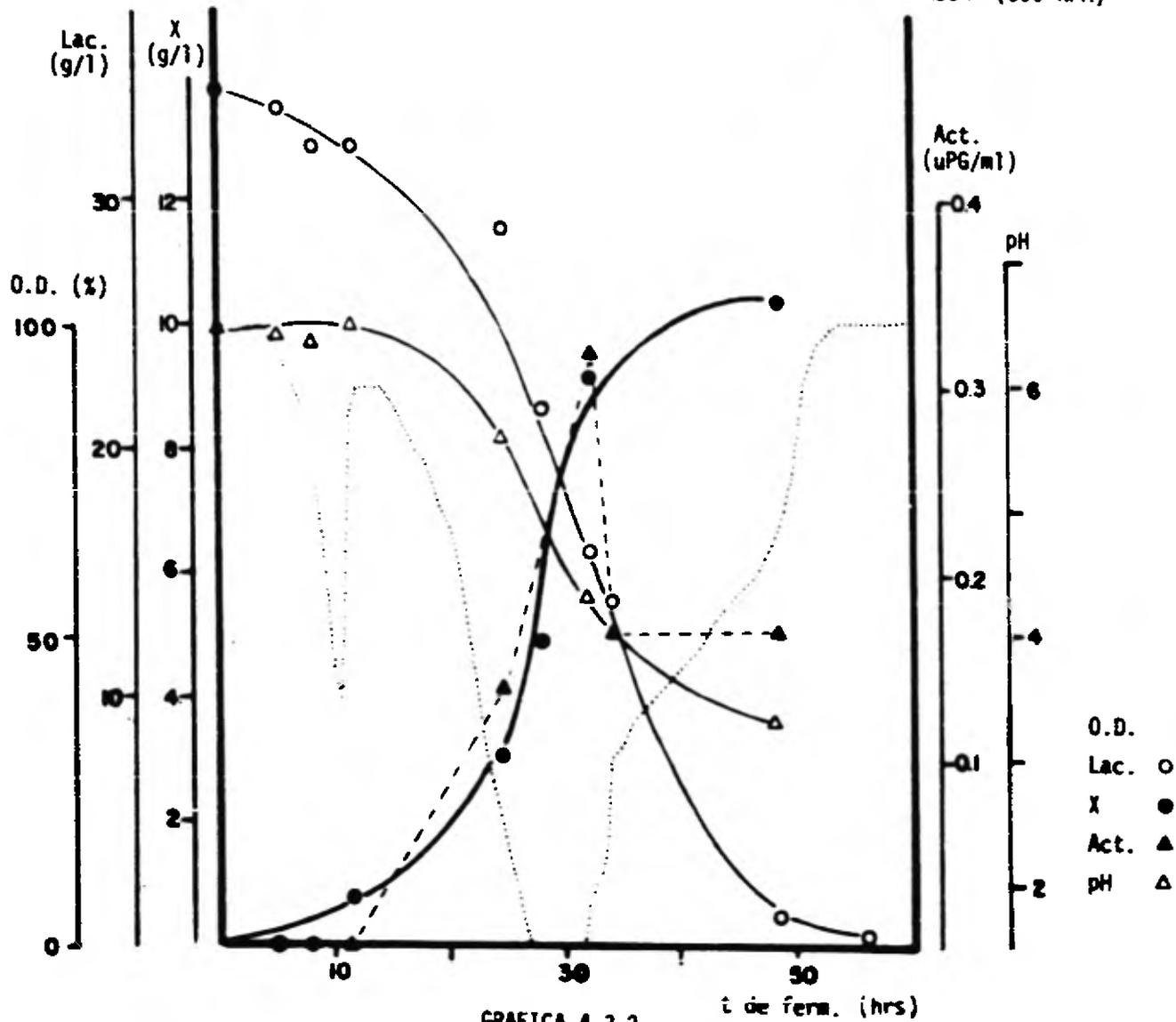
| Gráfica | CONDICIONES | | | | | RESULTADOS | | | | |
|---------|---------------------------|-----------|--------------------|---------------------|-----------------------|---------------|---------------------------|--------------------------------|------------------|--------------------------|
| | Medio | Aireación | Agitación (rpm) | Inóculo V (l) | Inóculo C (g/l) | pH inicial | X _{max} (g/l) | Act _{max} (uPG/ml) | Y _{X/S} | μ (hr ⁻¹) |
| - | lactosa | aerobia | 300 | 5 | 0.08 | 5.2 | 3.99 | 0 | - | 0.10 |
| 4.3.1 | lactosa con pectina | aerobia | 300 | 5 | 0.08 | 4.4 | 3.18 | 1.07 | 0.37 | 0.08 |
| 4.2.3 | suero | aerobia | 400 | 5 | 0.08 | 6.25 | 12.72 | 0 | 0.39 | 0.11 |
| 4.3.2 | suero con pectina | aerobia | 500 | 10 | 3.18 | 6.45 | 10.43 | 0.32 | 0.31 | 0.15 |

CURVAS DE CRECIMIENTO, CONSUMO DE LACTOSA, ACTIVIDAD, pH Y OXIGENO DISUELTO
 EN MEDIO DE LACTOSA CON PECTINA AEROBIO EN FERMENTADOR (300 RPM)



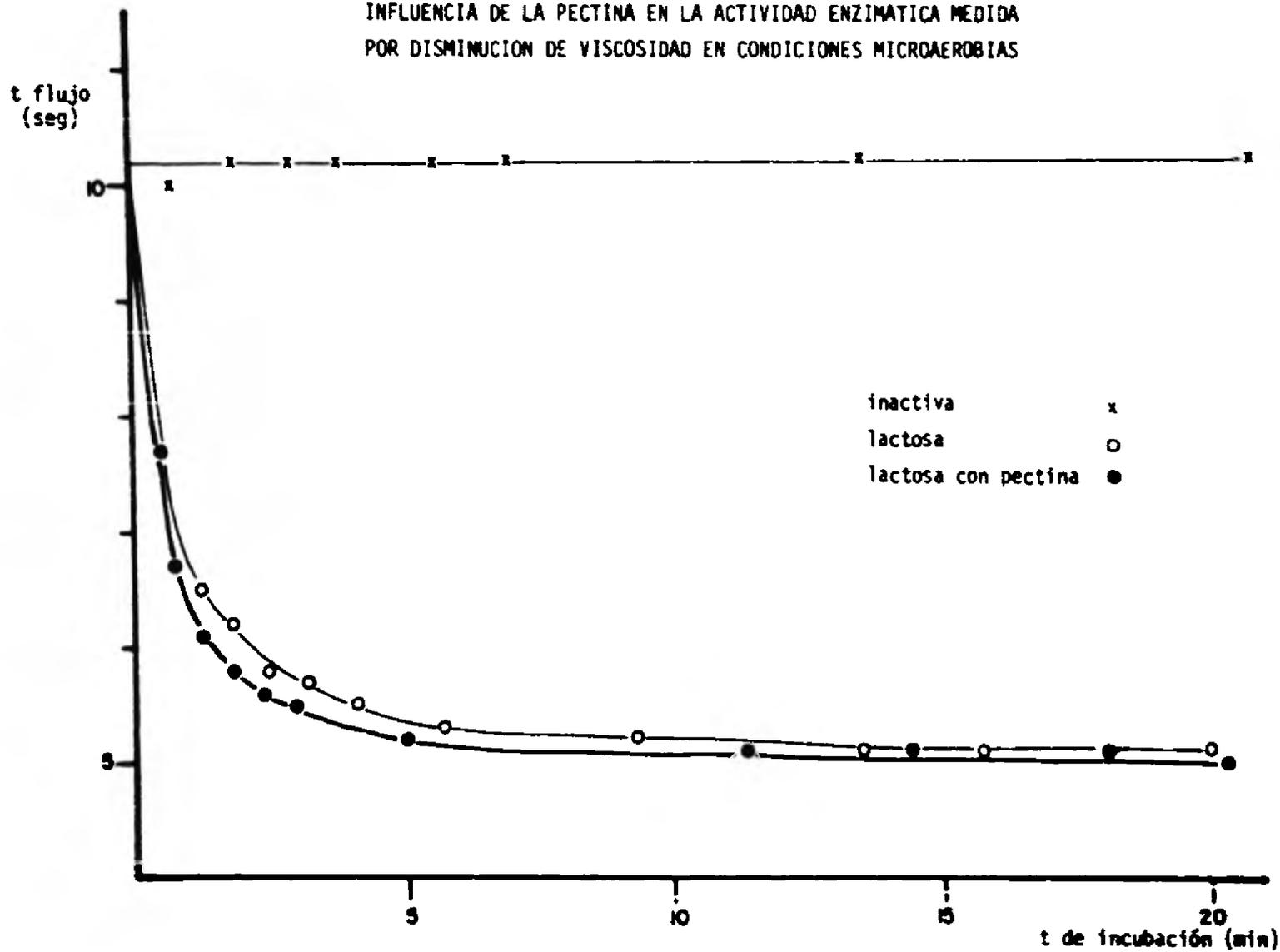
GRAFICA 4.3.1

CURVAS DE CRECIMIENTO, CONSUMO DE LACTOSA, ACTIVIDAD, pH Y OXIGENO
 DISUELTO EN MEDIO DE SUERO CON PECTINA AEROBIO EN FERMENTADOR (500 RPM)



GRAFICA 4.3.2

INFLUENCIA DE LA PECTINA EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA MEDIDA
POR DISMINUCION DE VISCOSIDAD EN CONDICIONES MICROAEROBIAS



GRAFICA 4.3.3

4.4.- Efecto del tratamiento térmico del suero sobre el crecimiento y la producción de enzima

Se decidió estudiar si el tratamiento térmico drástico de la esterilización sobre el suero, tenía algún efecto adverso sobre el crecimiento y la producción de enzima. Para ello se efectuó una fermentación en medio pasteurizado de suero con pectina en condiciones aerobias; se decidió tener un pH inicial más bajo en el medio para protegerlo de una posible contaminación con algunas bacterias; la gráfica 4.4.1 es el resultado de esta fermentación; las condiciones y los resultados se muestran en la tabla 4.4.1, y con fines comparativos también se muestran en ésta las condiciones y resultados de la fermentación aerobia de suero con pectina del inciso anterior (gráfica 4.3.2), en el cual el medio fué esterilizado.

La actividad enzimática obtenida en la fermentación de suero pasteurizado se vió claramente mejorada con respecto a la fermentación de suero estéril, efecto que puede observarse en la tabla 4.4.1. Sin embargo, no se puede asegurar si este incremento se debe a la sustitución del tratamiento de esterilización por el tratamiento menos drástico de pasteurización, ya que en este último caso también se modificó el pH inicial del medio. De haber influencia del pH inicial en la producción de enzima, ahí podría radicar la diferencia obtenida en actividad entre el medio sintético de lactosa y el medio de suero (tabla 4.3.1). Por otro lado, si se comparan los patrones de comportamiento del pH del medio a lo largo de la fermentación, con los valores de actividad en las gráficas 4.3.2 y 4.4.1 en las que la caída del pH es muy pronunciada, se puede notar que aparentemente existe una relación entre los valores de pH y los de actividad: a medida que el primero disminuye el segundo se incrementa.

En las gráficas 4.3.1 y 4.2.2 esta relación, aunque es menos evidente, también parece existir, sin embargo, en estos casos la caída de pH es mucho menos pronunciada, pero el pH inicial del medio es más bajo y a su vez, la actividad enzimática empieza a incrementarse grandemente desde el inicio de la fermentación. De todo esto se puede concluir que es probable que exista una relación entre el pH del medio y la producción de enzima, sin embargo, no hay evidencias sólidas para asegurarlo; en la literatura tampoco se encontraron estudios al respecto para esta especie, sin embargo, se sabe que el pH es determinante en la producción de pectinasas de especies del género *Aspergillus* (79).

En relación a la producción de biomasa, los resultados de concentración final y rendimiento obtenidos en la fermentación de suero pasteurizado, fueron un poco mayores que los resultados obtenidos en fermentaciones de suero estéril anteriores, pero de ninguna manera se puede asegurar que estas diferencias sean significativas, y si lo fueran tampoco es posible saber si se debieron a las condiciones del tratamiento térmico o al pH inicial del medio; no obstante, sobre la relación entre el pH inicial del medio de suero y la producción de biomasa sí existen reportes en la literatura para esta especie: Wasserman y colaboradores (99) reportan que con un pH inicial entre 5.0 y 5.7 se obtienen concentraciones de biomasa significativamente mayores que partiendo de un pH diferente, y reportan además que no encontraron diferencias importantes en el crecimiento en suero estéril y en suero sin esterilizar; de Sánchez y Castillo (107) reportan 5.0 como el pH óptimo para la producción de biomasa, si se iniciaba la fermentación con un valor diferente a éste, la concentración final de biomasa obtenida y la proporción de lactosa utilizada disminuyen considerablemente; Moresi y

colaboradores (62) en cambio, encontraron através de un profundo análisis estadístico que el efecto del pH inicial era poco importante.

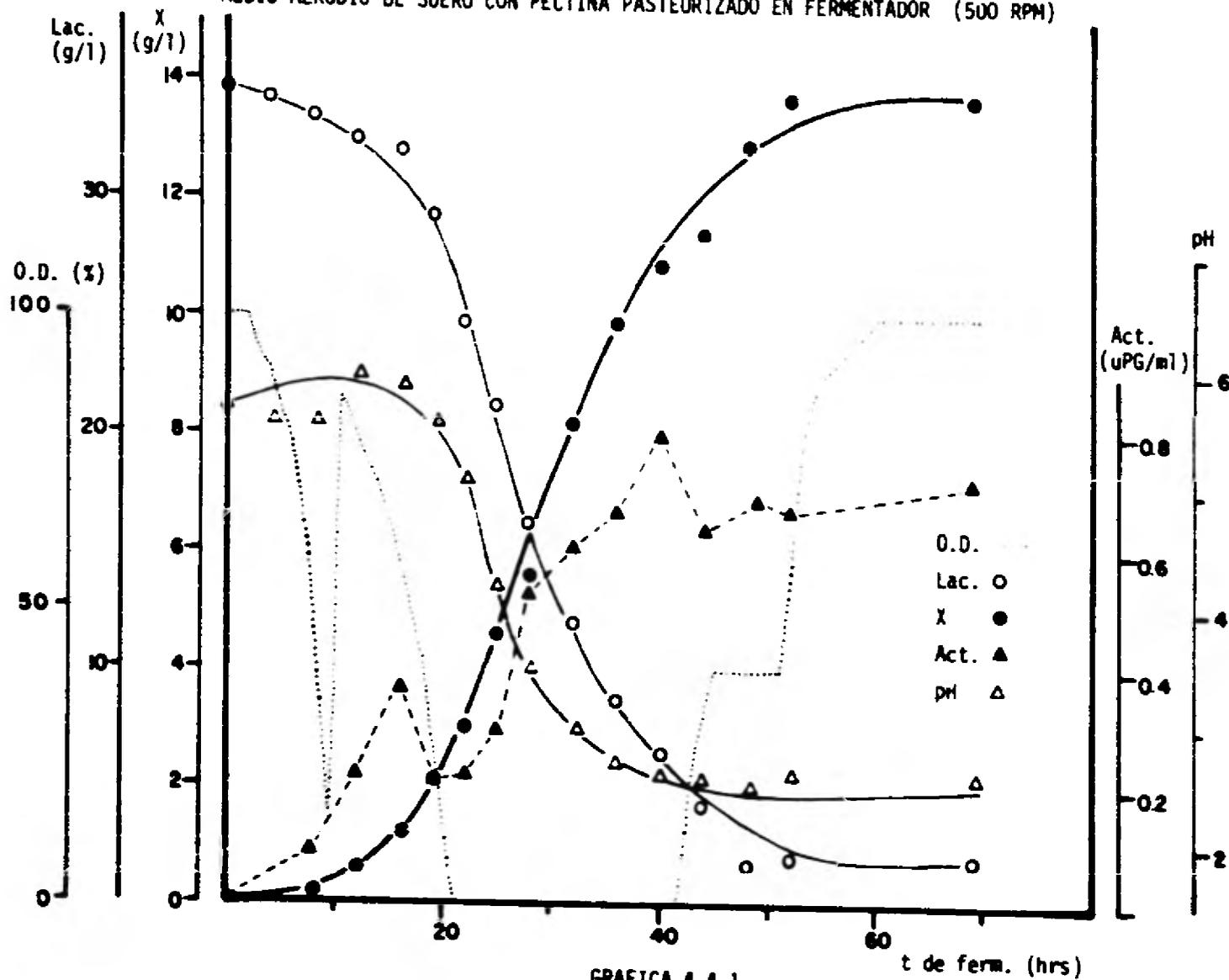
En consecuencia, con la discusión anterior se puede señalar que de este estudio y los reportes señalados, no puede aún establecerse una correlación definitiva entre pH inicial y su patrón de cambio a lo largo de la fermentación con el rendimiento de biomasa y, mucho menos, con la producción de endo-poligalactouronasa. Para llegar a una propuesta sería necesario efectuar un estudio experimental detallado del efecto del pH. De igual manera, los efectos del tipo de suero y el tratamiento térmico merecen un estudio más profundo por separado. Tal dependencia, seguramente, es particular para cada cepa y cada medio de cultivo. En primera instancia, y en general, sin embargo, un pH inicial entre 5.0 y 5.7 promueve la propagación de la levadura y la síntesis enzimática.

TABLA 4.4.1

EFFECTO DEL TRATAMIENTO TERMICO DEL SUERO SOBRE EL CRECIMIENTO
Y LA PRODUCCION DE ENZIMA

| Gráfica | CONDICIONES | | | | | RESULTADOS | | | |
|---------|---|--------------------|-----------------------------|---------------|---------------------------|--------------------------------|------------------|--------------------------|--|
| | Medio | Agitación (rpm) | Inóculo V (%) C (g/l) | pH inicial | X _{max} (g/l) | Act _{max} (uPG/ml) | Y _{X/S} | μ (hr ⁻¹) | |
| 4.4.1 | suero con pectina pasteurizado | 500 | 10 0.29 | 5.7 | 13.68 | 0.80 | 0.42 | 0.08 | |
| 4.3.2 | suero con pectina esteril | 500 | 10 3.18 | 6.45 | 10.43 | 0.32 | 0.31 | 0.15 | |

CURVAS DE CRECIMIENTO, CONSUMO DE LACTOSA, ACTIVIDAD, pH Y OXIGENO DISUELTO EN MEDIO AEROBIO DE SUERO CON PECTINA PASTEURIZADO EN FERMENTADOR (500 RPM)



GRAFICA 4.4.1

4.5.- Efecto de la suspensión de aire en la producción de enzima en medio con pectina

Para tratar de aumentar la producción de enzima, se estudió una fermentación en medio de lactosa (1%) con pectina, donde aproximadamente la mitad de la fermentación se realizó en condiciones aerobias, y el resto bajo condiciones anaerobias. En la gráfica 4.5.1 se muestran los resultados de esta fermentación.

El mismo estudio se realizó en medio pasteurizado de suero con pectina: en una fermentación se realizaron dos etapas, la primera aerobia y la segunda anaerobia, y en otra fermentación se efectuaron tres etapas, la primera aerobia, la segunda anaerobia y la última nuevamente aerobia. Los resultados de la primera fermentación se presentan en la gráfica 4.5.2; esta fermentación no se concluyó debido a que espumó y posteriormente se contaminó; los datos reportados son los obtenidos hasta antes de que espumara. La gráfica 4.5.3 muestra la segunda fermentación.

La tabla 4.5.1 resume las condiciones y los resultados de las tres fermentaciones anteriores; en esta tabla se dan resultados parciales para cada una de las fases y los resultados de cada fermentación completa.

En estas fermentaciones podemos observar que no hay una evidencia clara de que la anaerobiosis incremente el efecto inductor de la pectina sobre la producción de enzima. No puede asegurarse, debido a la poca claridad de los resultados, que la combinación de ambas condiciones, anaerobiosis y presencia de pectina en el medio, incrementen la producción de enzima con respecto al efecto de una sola de las condiciones; sin embargo, en caso de haber tal incremento éste

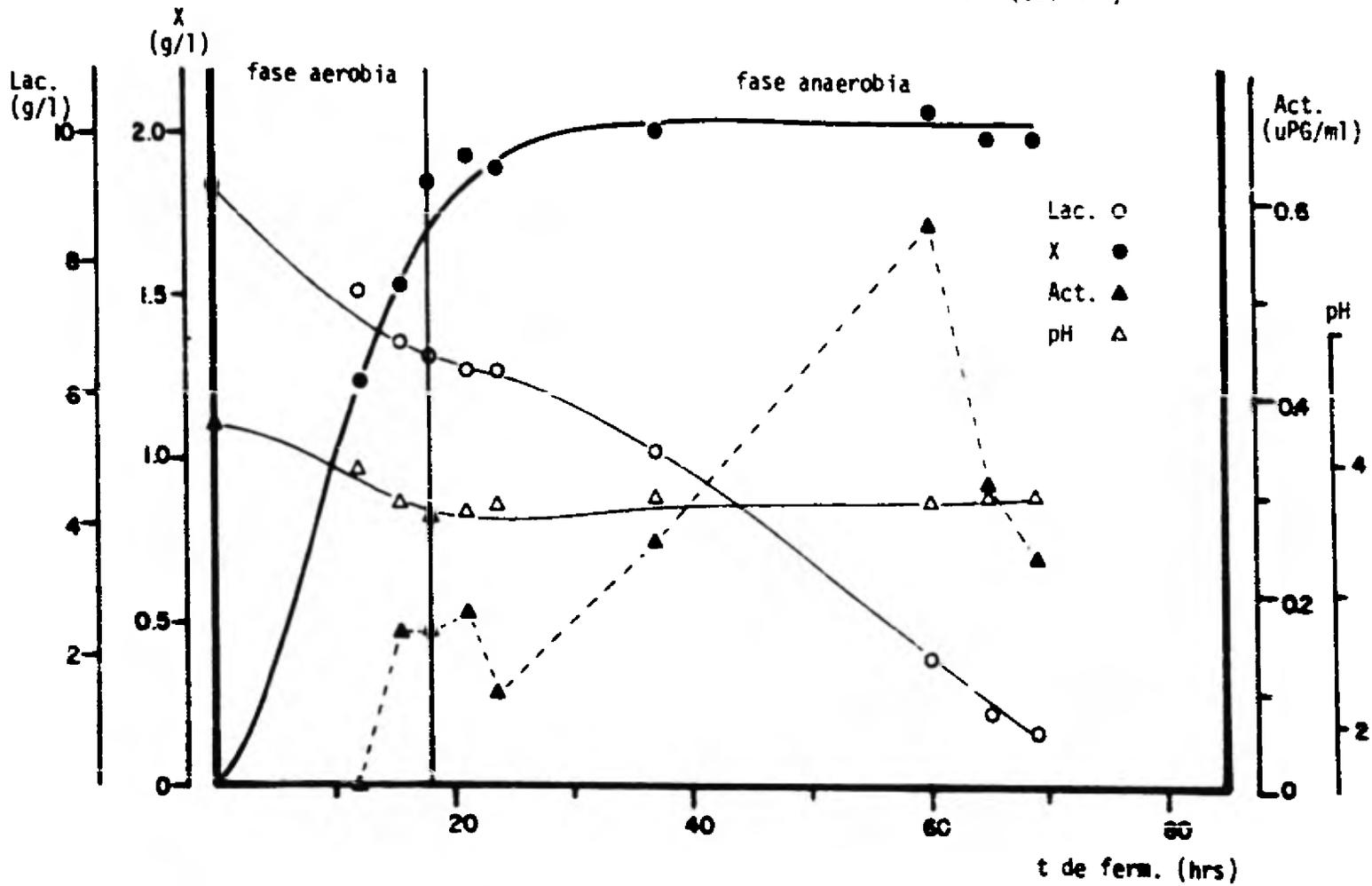
parece no ser significativo, y en cambio, disminuye considerablemente la producción de biomasa. Esto concuerda con el resultado reportado en la gráfica 4.3.3, en donde los resultados muestran que la actividad producida en medio de lactosa sin pectina en condiciones microaerobias, es igual a la actividad producida en medio de lactosa con pectina en las mismas condiciones; no obstante, hay que tener presentes las limitaciones del método de disminución de viscosidad.

TABLA 4.5.1

EFFECTO DE LA SUSPENSION DE AIRE EN LA PRODUCCION DE ENZIMA EN MEDIO DE PECTINA

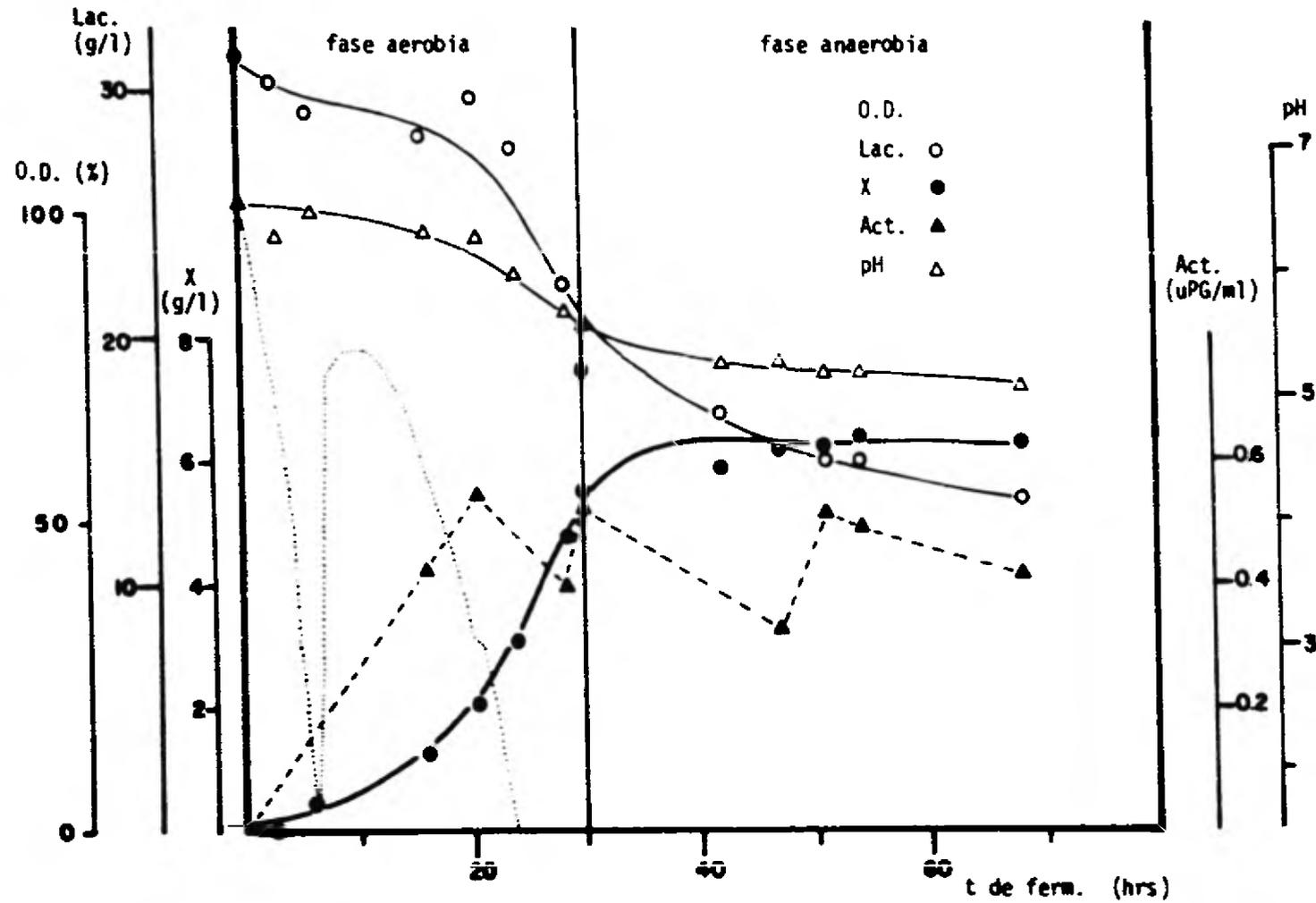
| Gráfica | Medio | CONDICIONES | | | | RESULTADOS | | | |
|---------|---|--------------------|------------------|------------|---------------|------------|---------------------|--------------------------------|------------------|
| | | Agitación (rpm) | Inóculo V (%) | C (g/l) | pH inicial | Fase | ΔX (g/l) | Act _{max} (uPG/ml) | Y _{X/S} |
| 4.5.1 | lactosa con pectina | 500 | 5 | 0.18 | 4.3 | aerobia | 1.86 | 0.16 | 0.71 |
| | | | | | | anaerobia | 0.23 | 0.58 | 0.02 |
| | | | | | | Total | 2.09 | 0.58 | 0.25 |
| 4.5.2 | suero con pectina pasteurizado | 500 | 10 | 0.16 | 6.6 | aerobia | 5.51 | 0.55 | 0.44 |
| | | | | | | anaerobia | 0.82 | 0.52 | 0.16 |
| | | | | | | Total | 6.33 | 0.55 | 0.36 |
| 4.5.3 | suero con pectina pasteurizado | 500 | 10 | 0.30 | 5.6 | aerobia | 6.77 | 0.49 | 0.41 |
| | | | | | | anaerobia | 0.06 | 0.53 | 0.02 |
| | | | | | | aerobia | 4.15 | 0.33 | 0.25 |
| | | | | | | Total | 10.96 | 0.53 | 0.30 |

CURVAS DE CRECIMIENTO, CONSUMO DE LACTOSA, ACTIVIDAD Y pH EN MEDIO DE LACTOSA CON PECTINA AEROBIO-ANAEROBIO EN FERMENTADOR (500 RPM)



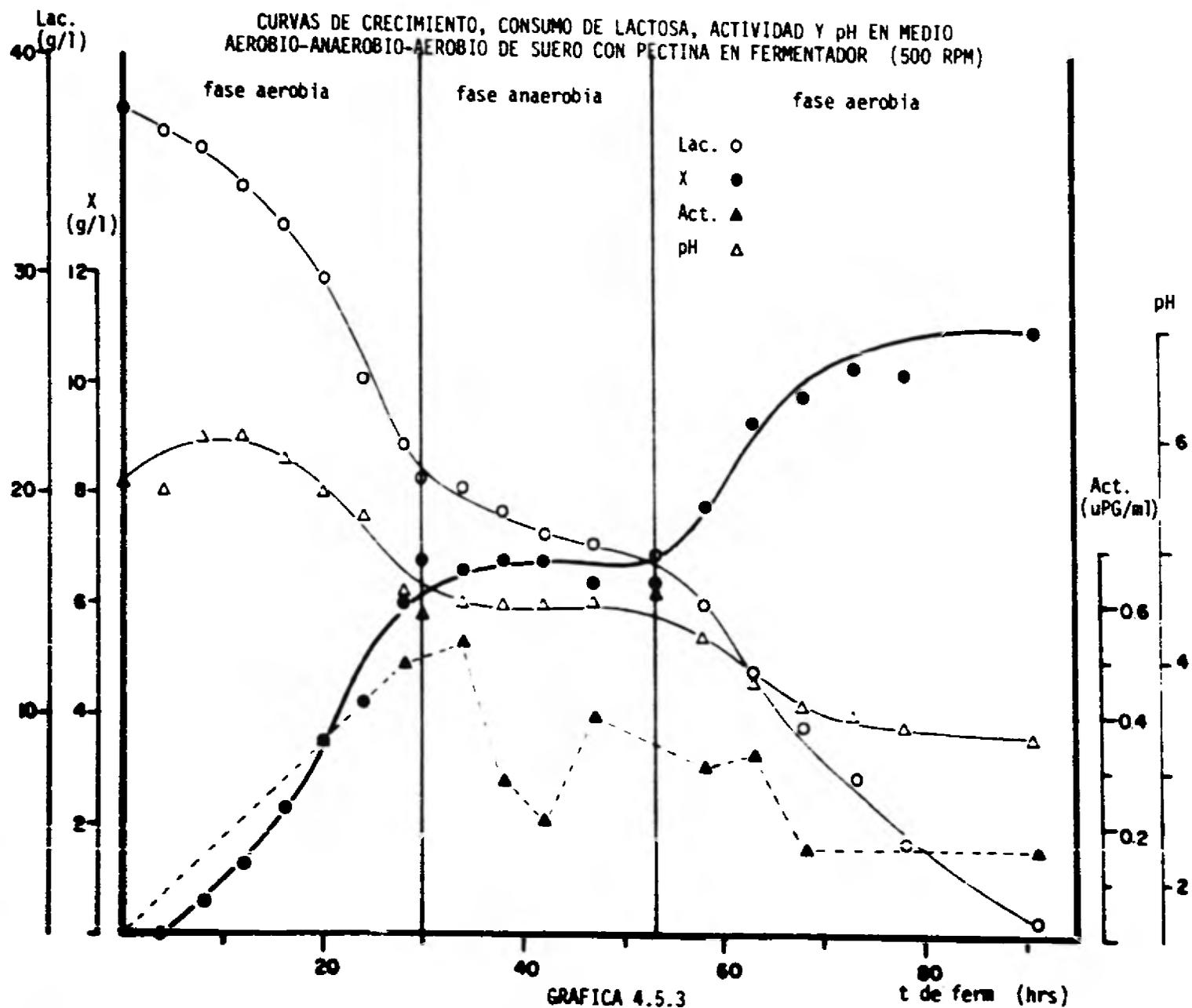
GRAFICA 4.5.1

CURVAS DE CRECIMIENTO, CONSUMO DE LACTOSA, ACTIVIDAD, pH Y OXIGENO DISUELTO EN MEDIO DE SUERO CON PECTINA AEROBIO-ANAEROBIO EN FERMENTADOR (500 RPM)



GRAFICA 4.5.2

CURVAS DE CRECIMIENTO, CONSUMO DE LACTOSA, ACTIVIDAD Y pH EN MEDIO AEROBIO-ANAEROBIO-AEROBIO DE SUERO CON PECTINA EN FERMENTADOR (500 RPM)



GRAFICA 4.5.3

4.6.- Consideraciones generales sobre las fermentaciones

Las tablas 4.6.1 y 4.6.2 resumen las condiciones más importantes y los resultados de las fermentaciones presentadas en los incisos anteriores; las columnas de "tiempo de fermentación" se refieren al tiempo en el que la lactosa alcanzó su nivel más bajo, es decir, el tiempo en que la fermentación pudo haberse considerado concluida. La primera tabla se refiere a las fermentaciones en medio de lactosa, y la segunda, en medio de suero.

En general, como muestran las gráficas de las fermentaciones presentadas en los incisos anteriores, las curvas de crecimiento y consumo de lactosa tienen un comportamiento perfectamente paralelo, coincidiendo en cada una de las fases.

La producción de enzima, como puede observarse en todas las fermentaciones presenta una curva que puede considerarse asociada al crecimiento, y por lo general, la actividad empieza a decaer en la fase estacionaria.

Puede observarse en las tablas de este inciso, que las fermentaciones anaerobias, o con una fase anaerobia, vieron disminuida su concentración máxima de biomasa, y en cambio, no se obtuvo ningún beneficio en la producción de enzima, además esta condición prolongó el tiempo de fermentación; en cambio, la cantidad de actividad enzimática producida en las fermentaciones aerobias con pectina, igualó a la producida en condiciones anaerobias pero mejoró considerablemente los parámetros de crecimiento.

El rendimiento de biomasa más alto que se obtuvo en suero fué de 0.42, el cual es inferior a los rendimientos

reportados en la literatura para fermentaciones efectuadas en condiciones de laboratorio: Wasserman y colaboradores (105) reportan 0.55, Moresi y col. (61) 0.57 y Castillo y col. (20) 0.55; para fermentaciones en gran escala, Wasserman y col. (105) reportan un rendimiento de 0.42, esta baja la atribuyen a que en estas condiciones, no se puede satisfacer la demanda de oxígeno de la levadura como se hace en las condiciones de laboratorio; Bernstein y col. (12), también en fermentación a gran escala, obtuvieron rendimientos de entre 0.45 y 0.52, y también hacen mención a la dificultad de oxigenar adecuadamente una fermentación de grandes dimensiones. Moresi y col. (15,61,62) reportan que una de las condiciones más determinantes en el rendimiento de biomasa, es la aireación del medio; Wasserman y col. (103,101) coinciden en esto. Lo más probable es que el bajo rendimiento obtenido en este estudio, se haya debido a una limitación en la capacidad del equipo para proporcionar un buen coeficiente de transferencia de masa a velocidades apropiadas de agitación, ya que, durante la mayor parte de la fase de crecimiento exponencial, el oxígeno disuelto en el medio de suero bajaba hasta cero, como se ve en las gráficas 4.2.3, 4.3.2 y 4.4.1. Esta deficiencia no pudo ser corregida, debido a que al aumentar la aireación se producía espuma en una cantidad que era muy difícil de controlar.

Cabe hacer notar que, en todas las fermentaciones de suero (gráficas 4.2.3, 4.3.2, 4.4.1, 4.5.2 y 4.5.3) al inicio de la fermentación el pH sufría un ligero aumento para después descender; aunque en algunos casos este aumento no es muy obvio, es evidente que al menos no descendía desde el inicio de la fermentación. Esto coincide con lo reportado por Castillo y col. (30); este fenómeno no se observaba en el medio sintético de lactosa. Otro fenómeno que sólo

se observó en las fermentaciones de suero, es el pico de demanda de oxígeno que se presentó entre la fase de acostumbramiento y la fase de crecimiento logarítmico (gráficas 4.2.3, 4.3.2, 4.4.1 y 4.5.2). Wasserman y col. (99) reportan que *K. fragilis* al fermentar el suero, consume rápidamente el ácido láctico presente en el medio, antes de consumir la lactosa; este hecho puede explicar la razón de que los dos fenómenos observados en el inicio de las fermentaciones de suero (aumento del pH y pico de demanda de oxígeno), sólo se presentan en suero y no en el medio sintético, en vista de que el primero contiene ácido láctico y el segundo no; por esta razón, la levadura al inicio de la fermentación posiblemente consume el ácido láctico, disminuyendo la acidez del medio y por lo tanto el pH se ve incrementado; en lo referente al pico de demanda de oxígeno, el consumo rápido del ácido láctico al inicio de la fermentación, provoca una alta demanda de oxígeno momentánea, y posteriormente se presenta una fase de acostumbramiento necesaria para iniciar el consumo de lactosa; esta fase de acostumbramiento está acompañada de una disminución de la actividad metabólica y por lo tanto, la demanda de oxígeno se ve disminuida momentáneamente, para incrementarse a medida que la capacidad de metabolizar la lactosa va en aumento.

TABLA 4.6.1

TABLA COMPARATIVA DE LAS FERMENTACIONES EN MEDIO DE LACTOSA

| Gráfica | Condiciones | X_{\max} (g/l) | Act_{\max} (uPG/ml) | $Y_{X/S}$ | μ (hr ⁻¹) | t de ferm † (hrs) |
|---------|----------------------------------|---------------------|--------------------------|-----------|------------------------------|----------------------|
| 4.2.1 | anaerobia matraces | 3.90 | 2.78 | 0.30 | 0.09 | 53.5 |
| 4.2.2 | anaerobia | 0.56 | 0.92 | 0.05 | 0.03 | 105.5 |
| - | aerobia sin pectina | 3.99 | 0 | - | 0.10 | - |
| 4.3.1 | aerobia con pectina | 3.18 | 1.07 | 0.37 | 0.08 | 38 |
| 4.5.1 | aerobia-anaerobia con pectina | 2.09 | 0.58 | 0.25 | - | 69 |

† Tiempo en el que se alcanzó la mínima concentración de lactosa.

TABLA 4.6.2
TABLA COMPARATIVA DE LAS FERMENTACIONES EN MEDIO DE SUERO

| Gráfica | Condiciones | X_{\max} (g/l) | Act_{\max} (uPG/ml) | $Y_{X/S}$ | μ (hr ⁻¹) | t de ferm † (hrs) |
|---------|--|---------------------|--------------------------|-----------|------------------------------|----------------------|
| 4.2.3 | aerobia sin pectina | 12.72 | 0 | 0.39 | 0.11 | 94 |
| 4.3.2 | aerobia con pectina | 10.43 | 0.32 | 0.31 | 0.15 | 56 |
| 4.4.1 | aerobia pasteurizada con pectina | 13.68 | 0.80 | 0.42 | 0.08 | 48 |
| 4.5.2 | aerobia-anaerobia pasteurizada con pectina | 6.33 | 0.55 | 0.36 | - | * |
| 4.5.3. | aerobia-anaerobia- aerobia pasteurizada con pectina | 10.96 | 0.53 | 0.30 | - | 91 |

* Esta fermentación no se concluyó

† Tiempo en el que se alcanzó la mínima concentración de lactosa.

4.7.- Composición proteica de la biomasa

De la fermentación en medio pasteurizado de suero con pectina (gráfica 4.4.1), se recuperó la mezcla de biomasa y proteínas del suero y se le determinó proteína cruda (N X 6.25); el resultado, promedio de dos determinaciones, fué 45.58%. Este valor es similar a los reportados en la literatura (tabla 2.2.2).

4.8.- Estabilidad de la enzima

El producto final de la fermentación de medio pasteurizado de suero con pectina (gráfica 4.4.1), se guardó en congelación durante dos meses. La actividad enzimática al suspender la fermentación fué de 0.72 uPG/ml; al cabo de los dos meses se determinó nuevamente la actividad y el resultado fué 0.76 uPG/ml, lo cual implica que se conservó íntegra la actividad en este lapso de tiempo, y por lo tanto, la endo-poligalactouronasa de *K. fragilis* es una enzima muy estable. Esto coincide con lo reportado por Luh y Phaff (54).

4.9.- Purificación de la enzima

Del caldo de la fermentación de medio pasteurizado de suero con pectina (gráfica 4.4.1), el cual tenía una actividad enzimática de 0.76 uPG/ml y una actividad específica de 0.13 uPG/mg de proteína, se recuperó la endo-poligalactouronasa por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; el volumen original era de 108 ml y la enzima precipitada se redisolvió para obtener un volumen total de 20 ml con una actividad de 2.49 uPG/ml, lo que implica que se recuperó el 60.67% de la actividad total; finalmente esta solución se dializó y se obtuvo una solución con 2.18 uPG/ml y una actividad específica de 0.50 uPG/mg de proteína, lo que implica que la enzima se pu-

rificó 3.85 veces utilizando un método sencillo y barato.

4.10.- Aplicación de la enzima en la clarificación de jugo de manzana

La solución dializada de enzima con una actividad de 2.18 uPG/ml del inciso anterior, se utilizó para las pruebas de clarificación de jugo de manzana. La solución de enzima comercial que se preparó para comparar la endo-poligalactouronasa de *K. fragilis*, tenía una actividad de 2.17 uPG/ml.

En la tabla 4.10.1 se muestran los valores de turbiedad en unidades de absorbancia de los jugos filtrados, después de incubarse a diferentes tiempos y temperaturas con las enzimas.

La figura 4.10.1 muestra el aspecto de los jugos después de clarificados.

De la tabla 4.10.1, resulta evidente que la enzima probada es prácticamente tan efectiva como la comercial; aunque la turbiedad es en todos los casos menor para el jugo tratado con pectinasa comercial, que la del jugo tratado con la endo-poligalactouronasa, estas diferencias no son importantes. La diferencia visual como muestra la figura 4.10.1 es también despreciable. En cualquiera de los casos, la turbiedad del jugo tratado con la enzima probada, es bastante menor que la del jugo de marca comercial, y por lo tanto su aplicación en el proceso industrial es factible. El proceso industrial de clarificación a 50°C, se realiza en un lapso de tiempo de 3 a 6 hrs (14). A esta misma temperatura y en una hora se alcanzó la máxima clarificación lograda con la

endo-poligalactouronasa. Sin embargo, queda por aclarar si la enzima tiene la capacidad de clarificar por sí misma, o requiere de la ayuda de la pectinestearasa nativa de la manzana; si esto último sucede, la clarificación no se vería afectada por el proceso industrial normal, ya que la clarificación del jugo de manzana se efectúa antes de la pasteurización (65), la cual podría inactivar a la pectinestearasa.

El hecho de que la pectinasa de *K. fragilis*, sea una enzima de tipo endo y que por lo tanto pueda disminuir rápidamente la viscosidad de una solución de pectina, hace factible el uso de esta enzima en la fabricación de concentrados de jugos de frutas. Su capacidad macerativa (43,49, 69) hace factible su aplicación en varios procesos industriales como: extracción de aceites esenciales, obtención de jugos, néctares y papillas de frutas, etc.

TABLA 4.10.1

RESULTADOS DE LA CLARIFICACION DE JUGO DE MANZANA

| t incubación (hrs) | T (°C) | Absorbancia a 650 nm | | Control |
|------------------------------------|-----------|---|----------------------------------|---------|
| | | Jugo con endo-PG de <i>K. fragilis</i> | Jugo con pecti nasa comercial | |
| 0.5 | 50 | 0.023 | 0.017 | 1.679 |
| 1 | 50 | 0.016 | 0.013 | - |
| 2 | 50 | 0.029 | 0.009 | 1.699 |
| 2 | 30 | 0.047 | 0.014 | 1.303 |
| 4 | 30 | 0.022 | 0.011 | - |
| JUGO DE MANZANA DE MARCA COMERCIAL | | 0.081 | | |

FIGURA 4.10.1

APLICACION DE LA ENZIMA EN LA CLARIFICACION
DE JUGO DE MANZANA



5.- CONCLUSIONES

- La cepa L-278 presentó mayor actividad enzimática que la cepa C-351 en condiciones análogas de cultivo.

- Ambas cepas presentaron mayor actividad enzimática en cultivo de glucosa que en cultivo de lactosa, lo cual concuerda con lo reportado por Luh y Phaff (54). Sin embargo, las diferencias no son importantes y por lo tanto, es factible la producción de la enzima utilizando lactosa como sustrato.

- La producción de enzima está estrechamente relacionada con el nivel de oxigenación del medio, reprimiéndose completamente cuando éste es muy alto tanto en medio de lactosa como en suero; este mismo efecto fué reportado por Wimborne y Rickard (109) para medio de glucosa. Sin embargo, en condiciones completamente anaerobias, debido a la poca producción de biomasa, la producción total de enzima no es muy alta; por lo tanto, la mayor productividad de enzima se da en condiciones microaerobias.

- La pectina muestra un claro efecto inductor sobre la producción de la enzima en condiciones altamente aerobias, tanto en medio de lactosa como en suero.

- El efecto de la anaerobiosis aunado al efecto inductor de la pectina, no mejora la producción de enzima con respecto a una sola de las condiciones, y en cambio, la anaerobiosis reduce de manera importante la producción de biomasa y el rendimiento, y prolonga el tiempo de la fermentación. En vista de que, el objetivo de este trabajo es producir endo-poligalactouronasa, paralelamente al proceso de produc-

ción de biomasa a partir de suero sin detrimento de su rendimiento, entonces es evidente que la mejor opción para lograrlo es a través de una fermentación totalmente aerobia con pectina en el medio.

- El tipo de tratamiento térmico preparativo del medio de suero parece afectar la producción de enzima. Este punto merece un estudio más detallado.

- Es probable que exista una relación entre el pH del medio y la producción de enzima, sin embargo, con los resultados obtenidos en este estudio no es posible asegurarlo. Se recomienda efectuar un estudio posterior que permita una mayor definición.

- Los rendimientos de biomasa obtenidos fueron menores que los reportados en la literatura debido a que no fué posible satisfacer la demanda de oxígeno del cultivo.

- Se comprobó que la endo-poligalactouronasa de *K. fragilis* es una enzima estable al almacenamiento, lo cual concuerda con lo reportado por Luh y Phaff (54).

- La pectinasa obtenida mostró ser tan efectiva en la clarificación de jugo de manzana, como la pectinasa comercial. Es factible que su aplicación se pueda extender a otros usos como: elaboración de jugos concentrados, extracción de aceites esenciales y obtención de jugos, néctares o papillas por su actividad macerativa.

- De este estudio se concluye que: es factible producir una pectinasa de aplicación industrial paralelamente a la obtención de un producto de alto contenido proteico, con

la utilización de materia prima de origen completamente alimenticio y una levadura que no representa ningún riesgo toxicológico.

6.- BIBLIOGRAFIA

- 1 .- Ajeani Y.J., Maxwell C.V., Owens F.N., Holbert D., Poling K.B., Achooley J.S. "Whey-Grown Yeast as a Protein Source for Baby Pigs". Chemical Abstracts 91, 209891q (1979).
- 2 .- Alais Ch. Ciencia de la Leche. 2a. Ed. C.E.C.S.A. (1980).
- 3 .- "Algas Alimenticias". Información Científica y Tecnológica 4(62), 20-23 (1982).
- 4 .- Amundson C.H. "Increasing Protein Content of Whey". Am. Dairy Rev. 29(7), 22-23, 96-99 (1967).
- 5 .- Andrezejewski W., Surazynski A., Chonjnowski W., Koziak W. "Protein Biosynthesis by the *Trichosporon cutaneum* Yeast on a Whey Medium". Chemical Abstracts 82, 15213p (1975).
- 6 .- Astapovich N.I., Babitskaya V.G., Grel M.V. "Change of Lactose Content in Whey During Biosynthesis of Pectolytic enzymes and β -Galactosidase by *Sclerotinia sclerotiorum* and *Aspergillus awamori* strain 16". Chemical Abstracts 81, 62089s (1974).
- 7 .- Astapovich N.I., Snigireva S.G., Grel M.V. "Formation of Pectolytic Enzymes by *Sclerotinia sclerotiorum* in Dry Whey Media". Chemical Abstracts 83, 204796n(1975).
- 8 .- Babitskaya V.G., Grel M.V. "A Culture Medium Based on Whey for the Synthesis of Pectolytic enzymes by the Mold *Aspergillus awamori*". Chemical Abstracts 80, 58357q (1974).
- 9 .- Badui S. "Propiedades y Usos del Suero de Leche". Rev. Tecnol. Aliment. (Mex) 12(1), 5-10 (1977).
- 10 .- Beach A.S., Holland J.W. "Alcoholic Fermentation of Whey". Chemical Abstracts 53, P6525f (1959).
- 11 .- Bednarski W., Jakubowski J., Poznanski S., Surazinski A. "Protein Biosynthesis by Bacteria and Molds Cultivated

- on Whey Medium". Chemical Abstracts 77, 3773e (1972).
- 12 .- Bernstein S., Tzeng Ch., Sisson D. "The Comercial Fermentation of Cheese Whey for the Production of Protein and/or alcohol". Biotechnol. Bioeng. Symp. No.7,1-9 (1977).
 - 13 .- Biotechnology News 1(22) (1981).
 - 14 .- Birch G.G., Blakebrough N., Parker K.J. Enzymes and Food Processing. Applied Science Publishers Ltd. (1981).
 - 15 .- Blakebrough N., Moresi M. "Scale-up of Whey Fermentation in a Pilot-Scale Fermenter". European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 12, 173-178 (1981).
 - 16 .- Bostian M., Smith W., Gilliland S.E. Stewart C.F. "Snack Foods Provide Natural Target for Supplementation with Yeast-Whey Proteins". Food Product Development 12(9), 68,70 (1978).
 - 17 .- Braddock R.J., Kesterson J.W. "Use of Enzymes in Citrus Processing". Food Technol. 33(11), 78-83 (1979).
 - 18 .- Bullerman L.B., Berry E.C. "Use of Cheese Whey for Vitamin B₁₂ Production. I.- Whey Solids and Yeast Extract Levels" Appl. Microbiol. 14(3), 353-355 (1966).
 - 19 .- Casida L.E. Industrial Microbiology. John Wiley and Sons Inc. (1968).
 - 20 .- Castillo F.J., De Sánchez S.B. "Studies on the Growth of *Kluyveromyces fragilis* in Whey for the Production of Yeast Protein". Acta Cient. Venez. 29(2), 113-118 (1978).
 - 21 .- Champagnat A. "Protein from Petroleum". Food: Readings from Scientific American. W.H. Freeman and Co. (1973).
 - 22 .- Cjostrom G., Britt E. "The Production of Riboflavin in Whey by *Eremothecium ashbyii*". Chemical Abstracts 47, 11591e (1953).
 - 23 .- Cook D.J. "Microbiological Utilization of Whey". Chemical Abstracts 52, 4879i (1958).
 - 24 .- Davidov R.B., Gul'ko L.E., Faingar B.I. "Enrichment of Whey with Protein and Vitamins". Chemical Abstracts 60,

- 15051h (1964).
- 25 .- Delaney R.A.M., Kennedy R., Walley B.D. "Composition of *Saccharomyces fragilis* Biomass Grown on Lactose Permeate" J. Sci. Food Agric. 26(8), 1177-1186 (1975).
 - 26 .- Demain A.L., Phaff H.J. "Composition and Action of Yeast Polygalactouronase". Nature 174,515 (1954).
 - 27 .- Demain A.L., Phaff H.J. "Hidrolysis of the Oligogalactouronides and Pectic Acid by Yeast Polygalactouronase" J. Biol. Chem. 210, 381-393 (1954).
 - 28 .- Demain A.L., Phaff H.J. The Preparation of Tetragalactouronic Acid". Arch. Biochem. Biophys. 51, 114-121 (1954).
 - 29 .- Demmler G. "Yeast Production in Whey Acording to the Waldhof Process". Chemical Abstracts 44,4195b (1950).
 - 30 .- De Sánchez S.B., Castillo F.J. "Effect of pH on the Growth of *Kluyveromyces fragilis* on Deproteinized Whey" Acta Cient. Venez. 31, 24-26 (1980).
 - 31 .- Dion P., Goulet J., Lachance R.A. "Conversion of Protein Free Whey in a Culture Medium for Baker's Yeast". Chemical Abstracts 89, 58330m (1978).
 - 32 .- Feldheim W., Elmadfa I., Mueller C., Bauer-Saeb G. Gaschen M. "Evaluation of the Protein Efficiency Ratio (PER) of the Processed Yeast *Saccharomyces fragilis*". Chemical Abstracts 84, 104202t (1976).
 - 33 .- Fogarty W.M. Ward O.P. "Pectinases and Pectic Polysaccharides". Prog. Ind. Microbiol. 13, 59-119 (1974).
 - 34 .- Graham V.E., Gibson D.L., Klemmer H.W., Naylor J.M. "Increasing the Food Value of Whey by Yeast Fermentation" I.- Preliminary Studies on the Suitability of Various Yeasts". Can. J. Technol. 31, 85-91 (1953).
 - 35 .- Grawel J., Kosikowski F.V. "Improving Alcohol Fermentation in Concentrated Ultrafiltration Permeates of Cottage Cheese Whey" J. Food Sci. 43(6), 1717-1719 (1978).

- 36 .- Hadron H., Zuercher K. "Preparation, Analysis, and Evaluation of Whey Vinager". Chemical Abstracts 81, 76627c (1974).
- 37 .- Harju M., Heidonen M., Kreula M., Pajunen E., Linko M. "Industrial Alcohols and Alcoholic Beverage Production". Chemical Abstracts 90, 4388p (1979).
- 38 .- Hatanaka Ch., Ozawa J. "Pectolytic Enzymes of Exo-Types. I.- Oligogalactouronide Transeliminase of a *Pseudomonas*". Agr. Biol. Chem. 33(10). 1617-1624 (1971).
- 39 .- Holsinger V.H. "Applications of Lactose-Modified Milk and Whey". Food Technol. 32(3), 35-38 (1978).
- 40 .- Horvath I. Mrs., Horvath I., Inczeffi I., Istvan S., Jaray M., Piukovics S., Szakacs G., Vakaliosz T. Mrs., Stadler I. "Alpha-Amilase and Protease by Fermentation". Chemical Abstracts 81, 48556k (1974).
- 41 .- Instituto Nacional de la Leche. S.AR.H. (1982).
- 42 .- Jabarit A. "Effect of Some Growth Factors and Various Treatments of Whey on the Alcoholic Fermentation of Lactose". Chemical Abstracts 74, 110484w (1971).
- 43 .- Kobayashi Y., Matsuo R. "Biochemical Pulping.III.- Macerating Activity of Endo-Polygalactouronase Produced by *Saccharomyces fragilis*". Agric. Biol. Chem. 43(6), 1369-1370 (1979).
- 44 .- Kobzo P.M., Len' N.T. "Beverage from Whey". Chemical Abstracts 74, 75213h (1971).
- 45 .- Kosikowski F.V. Cheese and Fermented Milk Foods. 2nd. Ed. F.V. Kosikowski and Associates (1977).
- 46 .- Kretschmer N. "Lactose and Lactase". Food: Readings from Scientific American. W.H. Freeman and Co. (1973).
- 47 .- Lane A.G. "Production of Food Yeast from Whey Ultrafiltrate by Dialysis Culture" J. Appl. Chem. Biotechnol. 27(3), 165-169 (1977).
- 48 .- Lefrancois L., Naiditch V. "Food Products by Fermenta-

- tion of Whey". Chemical Abstracts 76, P32902f (1972).
- 49 .- Lim J., Yamasaki Y., Suzuki Y., Ozawa J. "Multiple Forms of Endo-Polygalactouronase from *Saccharomyces fragilis*". Agric. Biol. Chem. 44(3), 473-480 (1980).
- 50 .- Litchfield J.H. "Single-Cell Proteins". Food Technol. 31(5), 175-179 (1977).
- 51 .- Lobanok A.G., Pavlovskaya Zh. I., Ivlicheva A.M. "Synthesis of Cellulolytic Enzymes by the Mold *Trichoderma lignorum* on Whey". Chemical Abstracts 80,58355n (1974).
- 52 .- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent". J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951).
- 53 .- Luh B.S., Phaff H.J. "Polygalactouronase of certain Yeasts". Arch. Biochem. Biophys. 33, 212-227 (1951).
- 54 .- Luh B.S., Phaff H.J. "Properties of Yeast Polygalactouronase". Arch. Biochem. Biophys. 48, 23-37 (1954).
- 55 .- Luh B.S., Phaff H.J. "End Products and Mechanisms of Hidrolysis of Pectin and Pectic Acid by Yeast Polygalactouronase (YPG)". Arch. Biochem. Biophys. 51, 102-113 (1954).
- 56 .- Makoto F., Okamoto T. "Yeast Pectic Enzymes". Chemical Abstracts 51, 16686h (1957).
- 57 .- Massucco A.E., Mazza L.A., Balatti A.P. "Production of Alkaline Protease from Acid Cheese Whey". Chemical Abstracts 90, 37613m (1979).
- 58 .- Moebus O., Kiesbye P. "Production of Protein and Baker's Yeast by a Lactic Acid Fermentation". Chemical Abstracts 87, P182616g (1977).
- 59 .- Moon N.J., Hammond E.G. "Oil Production by Fermentation of Lactose and the Effect of Temperature on the Fatty Acid Composition". J. Am. Oil Chem. Soc. 55(10), 683-688 (1978).
- 60 .- Moon N.J. Hammond E.G., Glatz B.A. "Conversion of Cheese

- Whey and Whey Permeate to Oil and Single Cell Protein"
J. Dairy Sci. 61(11), 1537-1547 (1978).
- 61 .- Moresi M., Colcchio A., Sansorini F. "Optimization of
Whey Fermentation in a Jar Fermenter". European J.
Appl. Microbiol. Biotechnol 9, 173-183 (1980).
- 62 .- Moresi M., Nacca C., Nardi R., Palleschi C. "Factor
Analysis in a Whey Fermentation by *Kluyveromyces fragi-
lis*". European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 8, 49-
61 (1979).
- 63 .- Nakanishi T., Arai I. "Lactose-Fermenting Yeast. V.-
Changes in Viable Cell Counts, Protein and Lactose
Consumptions in Lactose-Containing Media Inoculated
with Lactose Fermenting Yeast". Chemical Abstracts 77,
112489m (1972).
- 64 .- Nelson N. "A Photometric Adaptation of the Somogyi
Method for the Determination of Glucose". J. Biol.
Chem. 153(2), 375-380 (1944).
- 65 .- Nelson P.E., Tressler D.K. Fruit and Vegetable Juice
Processing Technology. 3th. Ed. The Avi Pub. Co. (1980).
- 66 .- Nieto F.J. "Suero de Queserfa: Orientación Sobre su
Aprovechamiento y Revalorización ". Industrias Lácteas
24(6), 22-29 (1975).
- 67 .- O'Leary V.S., Green R., Sullivan B.C., Holsinger V.H.
"Alcohol Production by Selected Yeast Strains in Lacta-
se-Hidrolysed Acid Whey". Biotechnol. Bioeng. 19,
1019-1035 (1977).
- 68 .- O'Leary V.S., Sutton C., Bencivengo M., Sullivan B.,
Holsinger V.H. "Influence of Lactose Hydrolysis and
Solids Concentration on Alcohol Production by Yeast
in Acid Whey Ultrafiltrate". Biotechnol. Bioeng. 19,
1689-1702 (1977).
- 69 .- Ozawa J., Okamoto K., Hayashi T. "Pectin Polygalacto-
uronase of *Saccharomyces fragilis*". Chemical Abstracts

- 55, 2799d (1961).
- 70 .- Patel D.S., Phaff H.J. "On the Mechanism of Action of Yeast Endo-Polygalactouronase on Oligogalactouronides and Their Reduced and Oxidized Derivatives". J. Biol. Chem. 234, 237-241 (1959).
- 71 .- Paul A.A., Southgate D.A.T. Mc Cance Widdowson's The Composition of Foods". 4 th. Ed. Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1978).
- 72 .- Peppler H.J. Microbial Technology. Vol I. 2nd. Ed. Academic Press (1979)'
- 73 .- Peterson M.S., Johnson A.H. Encyclopedia of Food Science The Avi Pub. Co. (1978).
- 74 .- Phaff H.J. " $\alpha(1\rightarrow4)$ Polygalactouronide Glycanohydrolase (Endo-Polygalactouronase) from *Saccharomyces fragilis*". Meth. Enzymol 8, 636-641 (1966).
- 75 .- Phaff H.J., Demain A.L. "The Unienzymatic Nature of Yeast Polygalactouronase". J. Biol. Chem. 218, 875-884 (1956).
- 76 .- Philliskish G., Yates H.J. "A Method of Producing Ethyl Alcohol". Chemical Abstracts 90, P150301w (1979).
- 77 .- Pollard A., Kieser M.E. "Pectin Changes in Cider Fermentations". J. Sci. Food Agric. 10, 253-260 (1959).
- 78 .- Quintero R. Ingeniería Bioquímica. Editorial Alhambra Mexicana S.A. (1981).
- 78' .- Racotta V. "Posibilidades para el Aprovechamiento del Suero Lácteo". Rev. Tecnol. Aliment. (Mex) Nov.-Dic., 6-14 (1979).
- 79 .- Reed G. Prescott and Dunn's Industrial Microbiology. 4th. Ed. The Avi Pub. Co. (1982).
- 80 .- Reesen L., Strube R. "Complete Utilization of Whey for Alcohol and Methane Production". Process Biochem. 13(11) 21-22, 24 (1978)
- 81 .- Roland J.F., Alm W.L. "Wine Fermentations Using Membra

- ne Processed Hidrolyzed Whey". Biotechnol. Bioeng. 17, 1443-1453 (1975).
- 82 .- Rose A.H. Microbial Biomass. Economic Microbiology. Vol. 4. Academic Press (1979).
- 83 .- Samtsevich S.A., Astapovich N.I., Snigireva S., Babitskaya V.G., Grel M.V. "Formation of Pectolytic Enzymes by the Mold *Sclerotinia sclerotium* During Cultivation on Whey by a Submerged-Cultivation Method". Chemical Abstracts 80, 94248p (1974).
- 84 .- Samtsevich S.A., Zalasko L.S. "Synthesis of Aminoacids and Vitamins by Some Species of Yeasts in Whey". Chemical Abstracts 74, 63142w (1971).
- 85 .- Sánchez F.L., Castillo F.J. "Producción, Extracción y Caracterización Parcial de β -D-Galactosidasa de *Kluyve romyces fragilis* Crecida en Suero de Leche". Acta Cient. Venez. 31, 154-159 (1980).
- 86 .- Sitt P.A. "Fermentation of Cheese Whey for Feed" Chemical Abstracts 86, P42090k (1977).
- 87 .- Skupin J., Pedziwilk F., Giec A., Nowakowska K., Trojanowska K., Vaszewski B., Alford V.A. "Nutritive Value of Propionibacteria and Lactose-Fermenting Yeast Grown in Whey". J. Food Process. and Preservation 1(3), 207-216 (1977).
- 88 .- Spreer E. Lactologia Industrial. 2a. Ed. Editorial Acribia (1975).
- 89 .- Stauffer K.R., Leeder J.G., "Extracellular Microbial Polysaccharide Production by Fermentation on Whey or Hidrolyzed Whey". J. Food Sci. 43(3), 756-758 (1978).
- 90 .- Stewart C.F., Gilliland S.E. "Utilizing Yeast-Whey Proteins to Improve the Nutritional Value of Snack Foods". Am. Dairy Rev. 41(4), 30A-30B (1979).
- 91 .- Stimpson E.G. "Lactose-Active Zymase-inactive Yeast Product". Chemical Abstracts 49, 1989f (1955).

- 92 .- Tomisek J., Gregr V. "Manufacturing Yeast Protein from Whey". Chemical Abstracts 55, 19129h (1961).
- 93 .- Vananuvat P., Kinsella J.E. "Production of Yeast Protein from Crude Lactose by *Saccharomyces fragilis*. Batch Culture Studies". J. Food Sci. 40(2), 336-341 (1975).
- 94 .- Vananuvat P., Kinsella J.E. "Protein Production from Crude Lactose by *Saccharomyces fragilis*. Continuous Culture Studies". J. Food Sci. 40(4), 823-825 (1975).
- 95 .- Vananuvat P., Kinsella J.E. "Extraction of Protein, Low in Nucleic Acid, from *Saccharomyces fragilis* Grown Continuously on Crude Lactose". J. Agric. Food Chem. 23(2), 216-221 (1975).
- 96 .- Vananuvat P., Kinsella J.E. "Aminoacid Composition of Protein Isolates from *Saccharomyces fragilis*". J. Agric. Food Chem. 23(3), 595-597 (1975).
- 97 .- Vananuvat P., Kinsella J.E. "Functional Properties of Protein Isolates from Yeast *Saccharomyces fragilis*". J. Agric. Food Chem. 23(4), 613-616 (1975).
- 98 .- Villicaña J. Cámara Nacional de Productos Alimenticios Elaborados con Leche. Comunicación Personal (1981).
- 99 .- Wasserman A.E., Hopkins J., Porges N. "Whey Utilization. Growth Conditions for *Saccharomyces fragilis*". Sewage and Ind. Wastes 30, 913-920 (1958).
- 100.- Wasserman A.E. "Whey Utilization. II.- Oxygen Requirements of *Saccharomyces fragilis* Growing in Whey Medium".
- 101.- Wasserman A.E., Hampson J.W. "Whey Utilization. III.- Oxygen Absorption Rates and the Growth of *Saccharomyces fragilis* in Several Propagators". Appl. Microbiol. 8, 293-297 (1960).
- 102.- Wasserman A.E. "Whey Utilization. IV.- Availability of Whey Nitrogen for the Growth of *Saccharomyces fragilis*". J. Dairy Sci. 43, 1231-1234 (1960).
- 103.- Wasserman A.E., Hampson J., Alvare N.F. Alvare N.J.

- "Whey Utilization. V.- Growth of *Saccharomyces fragilis* in Whey in a Pilot Plant". J. Dairy Sci. 44, 387-392 (1961).
- 104.- Wasserman A.E. "Rapid Metabolism of Whey by Yeast". Dairy Eng. 77, 374-379 (1960).
- 105.- Wasserman A.E., Hampson J.W., Alvare N.F. "Large-Scale Production of Yeast in Whey". J. Water Pollution Control Federation 33, 1090-1094 (1961).
- 106.- Wasserman A.E. "Aminoacid and Vitamin Composition of *Saccharomyces fragilis* Grown in Whey". J. Dairy Sci. 44, 379-386 (1961).
- 107.- Webb R.H. Byproducts from Milk. 2nd. Ed. The Avi Pub Co. (1970).
- 108.- Wendorff W.L., Amundson C.H., Olson N.F., Garver J.C. "Use of Yeast Galactosidase in Milk and Milk Products". Chemical Abstracts 75, 75030s (1971).
- 109.- Wimborne M.P., Rickard P.A.D. "Pectinolytic Activity of *Saccharomyces fragilis* Cultured in Controlled Enviroments". Biotechnol. Bioeng. 20, 231-242 (1978).
- 110.- Yamasaki M., Kato A., Shang-Young Ch., Arima K. "Pectic Enzymes in the Clarification of Apple Juice. II.- The Mechanism of Clarification". Agr. Biol. Chem. 31(5), 552-560 (1967).
- 111.- Yang H.Y., Bodyfelt F.W., Berggren K.E., Larson P.K. "Utilization of Cheese Whey for Wine Production". Chemical Abstracts 87, 3974c (1977).
- 112.- Zalashko L.S., Chaika L.L., Chizhova Z.P. "Conditions for the Growth and Carotenoid Formation by the Yeast *Rhodotorula lactis* on Whey". Chemical Abstracts 80, 94263m (1974).