

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



“Obtención de metabolitos de alto valor mediante un proceso tipo biorrefinería a partir de *S. cerevisiae* (Mayen Ex E. C. Hansen) generada como subproducto del proceso cervecero”

Por:

L.C.A. ARNULFO RICARDO GARCÍA ARELLANO

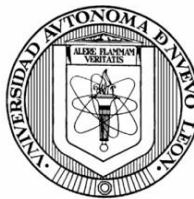
Como requisito parcial para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

con Acentuación en Microbiología

Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L.

Septiembre de 2014



“Obtención de metabolitos de alto valor mediante un proceso tipo biorrefinería a partir de *S. cerevisiae* (Mayen Ex E. C. Hansen) generada como subproducto del proceso cervecero”

Por:

L.C.A. ARNULFO RICARDO GARCÍA ARELLANO

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

COMISIÓN DE TESIS

Dra. Katiushka Arevalo Niño
DIRECTOR

Dr. Luis C. Damas Buenrostro
DIRECTOR EXTERNO

Dra. Martha Guerrero Olazarán
VOCAL 2

Dr. Carlos A. Amaya Guerra
SECRETARIO

Dra. M. Guadalupe Alanís Guzmán
VOCAL 3

Dr. Carlos E. Hernández Luna
VOCAL 1

Dr. Juan Gabriel Báez González
SUPLENTE

Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L.

Septiembre de 2014.

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo se realizó en las instalaciones y con los equipos del Departamento de Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en colaboración con el Laboratorio de Microbiología de Cuauhtémoc Moctezuma Heineken México.

AGRADECIMIENTOS

A mi *Alma mater*, la Universidad Autónoma de Nuevo León, en especial a la subdirección de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas y a todos sus integrantes por su apoyo para lograr mi desarrollo académico.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo sin el cual no hubiese sido posible este logro.

A Cuauhtémoc Moctezuma Heineken por permitirme colaborar con su equipo de trabajo.

A la empresa Grupo Plasset en especial a Analy Ruvalcaba por su apoyo para la realización del proyecto.

A mis maestros que con sus lecciones y experiencias me han ayudado a formarme en la ciencia con ética y profesionalismo.

A las personas involucradas de alguna u otra forma en la realización de esta tesis, especialmente al M.C. Juan Antonio Rodríguez Arzave, a la QBP Cristina González, la LCA Minerva Bautista y al MC José Rodríguez Rodríguez.

A mis amigos y compañeros que me aguantaron y bien aconsejaron cuando las cosas no salían como planeaba.

Gracias a esas personas importantes en mi vida, que siempre estuvieron listas para brindarme toda su ayuda
JGT'M.

DEDICATORIA

A mis padres con todo mi cariño, a ustedes que hicieron todo para que yo pudiera lograr mis sueños por estar siempre conmigo, por motivarme y guiarme con enteresa por la vida a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS.....	xi
1 RESUMEN	1
1.1 ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES.....	5
3.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
3.1.1 Generalidades.....	5
3.1.2 Proceso Fermentativo	6
3.2 Biorrefinerías	7
3.3 Tecnologías de secado	9
3.3.1 Generalidades.....	9
3.3.2 Secador de dos plantas.....	9
3.3.3 Secador de túnel	9
3.3.4 Secador de tambor.....	10
3.3.5 Liofilización	10
3.4 Lípidos	10
3.4.1 Generalidades.....	10
3.4.2 Ácidos grasos de las series omega	11
3.4.3 Ácido linoleico.....	13
3.4.4 Ácido docosahexaenoico	14
3.4.5 Esteroles.....	15
3.4.6 Fosfolípidos.....	16
3.5 Pared Celular.....	18
3.5.1 Generalidades.....	18
3.5.2 Polisacáridos	19
3.5.3 Mananos.....	20
3.5.4 β -Glucanos.....	20
3.5.5 Quitina.....	21
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	24
5.1 Objetivo General.....	24
5.2 Objetivos Específicos.....	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS	26

6.1 Material biológico.....	26
6.2 Tratamientos de lisis celular.....	26
6.2.1 Choque térmico.....	26
6.2.2 Congelado Rápido.....	26
6.2.3 Congelado Lento.....	26
6.2.4 Ultrasonido.....	27
6.3 Secado.....	27
6.3.1 Secado en secador de dos plantas.....	27
6.3.2 Secado en secador de túnel.....	27
6.3.3 Secador de tambor.....	27
6.3.4 Liofilización.....	28
6.4 Extracción de lípidos.....	28
6.4.1 Extracción cruda método de Soxhlet.....	28
6.4.2 Hidrólisis ácida.....	29
6.4.3 Vía saponificación acidificación.....	29
6.4.4 Hidrólisis alcalina.....	29
6.4.5 Extracción directa cloroformo metanol.....	30
6.5 Separación de Familias lipídicas.....	30
6.5.1 Obtención de Fosfolípidos.....	30
6.5.2 Separación según carga eléctrica.....	30
6.6 Caracterización fisicoquímica.....	31
6.6.1 Humedad.....	31
6.6.2 Índice de acidez.....	31
6.6.3 Índice de peróxido.....	32
6.6.4 Índice de yodo.....	32
6.6.5 Índice de saponificación.....	32
6.6.6 Materia Insaponificable.....	32
6.7 Identificación y cuantificación de compuestos lipídicos.....	33
6.7.1 Cuantificación de ácidos grasos y esteroides.....	33
6.7.2 Cuantificación de fosfolípidos.....	33
6.8 Obtención de polisacáridos.....	33
6.8.1 Obtención de paredes celulares.....	34
6.8.2 Obtención de Mananos.....	34
6.8.2.1 Extracción hidrolítica.....	34
6.8.2.2 Extracción conservativa.....	34
6.8.3 Obtención de B-Glucanos.....	35
6.8.3.1 Extracción hidrolítica.....	35
6.8.3.2 Extracción conservativa.....	35
6.8.4 Obtención de Quitina.....	36
6.8.4.1 Desmineralización.....	36
6.8.4.2 Desproteínización química.....	36
6.8.4.3 Blanqueado.....	36

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
7.1 Impacto de la integridad celular sobre la extracción de lípidos.	37
7.1.1 Porcentaje de muerte	37
7.1.2 Efecto del daño celular sobre extracción lipídica.....	38
7.2 Efecto del método de secado sobre la extracción de lípidos.	40
7.3 Efecto del método de extracción sobre la recuperación de lípidos.	42
7.4 Separación de las familias lipídicas.	46
7.4.1 Fosfolípidos.....	46
7.4.2 Caracterización y cuantificación de fosfolípidos	47
7.4.3 Separación según carga eléctrica.....	49
7.4.4 Caracterización Fisicoquímica	50
7.4.5 Perfil de ácidos grasos	52
7.4.6 Esteroles.....	54
7.5 Obtención y cuantificación de polisacáridos.	56
7.5.1 Mananos.....	56
7.5.3 β -Glucano.....	58
7.5.4 Quitina	60
7.6 Evaluación de la factibilidad	61
8 CONCLUSIONES	66
9 PERSPECTIVAS FUTURAS	67
10 LITERATURA CITADA	68

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Caracterización fisicoquímica del aceite.	50
Tabla 2. Contenido de ácidos grasos en los lípidos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	53
Tabla 3. Rendimiento de las fracciones de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en base seca.	64

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Porcentaje de mortalidad contra tratamientos de lisis celular.....	38
Figura 2. Porcentaje de lípidos obtenido por cada tratamiento de lisis.	39
Figura 3. Recuperación de lípidos totales contra método de secado.....	42
Figura 4. Obtención de lípidos totales por diferentes metodologías.....	45
Figura 5. Porcentaje de fosfolípidos totales con respecto a los lípidos totales	47
Figura 6. Porcentaje de fracciones de fosfolípidos.	48
Figura 7. Relación de lípidos polares y neutros según el tipo de extracción.....	50
Figura 8. Relación del contenido de manano contra el peso de la pared.....	57
Figura 9. Relación del contenido de β -glucano contra el peso de la pared celular.	59
Figura 10. Esquema de procesamiento obtención de β -glucano.	62
Figura 11. Esquema de procesamiento obtención de Quitina	62
Figura 12. Esquema de procesamiento obtención de Mananos	62
Figura. 13. Esquema integrado para obtención de metabolitos.	63

ABREVIATURAS

Símbolo	Significado
HCL	ácido clorhídrico
DNA	ácido desoxirribonucleico
DHA	ácido docosaheptaenoico
EPA	ácido eicosapentaenoico
AF	ácido fosfatídico
PUFAs	ácidos grasos poliinsaturados
AOAC	asociación de las comunidades analíticas
NaHCO ₃	bicarbonato de sodio
cm	centímetros
HPLC	cromatografía líquida de alta eficiencia
CO ₂	dióxido de carbono
FC	Fosfatidilcolina
FE	Fosfatidiletanolamina
FI	Fosfatidilinositol
°C	grado centígrado
°P	grado plato
G	Gramos
G	Gravedades
KOH	hidróxido de potasio
NaOH	hidróxido de sodio
Kg	Kilogramos
LDL	lipoproteínas de baja densidad
mBar	milibares
meq	Miliequivalente
mg	Miligramos
ml	Mililitro
mm	Milímetros
M.	Molar
N.	Normalidad
FAO	organización de alimentos y agricultura
%	Por ciento
pH	potencial de hidrógeno
rpm	revoluciones por minuto
AOCS	sociedad americana de química de aceites
v/v	volumen por volumen

1 RESUMEN

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* se utiliza industrialmente para la producción de cerveza, siendo el segundo subproducto por volumen generado por esta industria, si bien las partes internas de las células se aíslan y se utilizan posteriormente como complementos alimenticios y potenciadores del sabor debido a sus altas cantidades de proteínas y nucleótidos; las partes externas de las células, quedan como residuos, de los que hasta el momento ningún uso comercial se ha establecido, excepto como un suplemento para la alimentación animal. El presente trabajo se centra en el estudio de esa fracción poco explotada, por lo que se busca encontrar procesos que sea factible concatenar para obtener el mayor provecho de este subproducto. Se analizaron pre-tratamientos de lisis celular, diferentes procesos de secado y métodos de extracción lipídica, para posteriormente caracterizar las grasas obtenidas, y de igual forma se analizaron los polisacáridos encontrados en la pared celular. Los resultados obtenidos demuestran que la letalidad de los pre-tratamientos varía significativamente, sin embargo a pesar de las diferencias en la letalidad, no se aprecian diferencias significativas en la extracción de lípidos por el método soxhlet de las muestras de los diferentes tratamientos. Al comparar diferentes procesos de secado contra la extracción de lípidos por el método soxhlet se observa que de la muestra deshidratada mediante secador de tambor y por liofilización no presentan diferencia significativa entre sí, pero si es un incremento notorio respecto a los otros tratamientos. Posteriormente se compararon metodologías de extracción obteniendo rendimientos mayores por las técnicas destructivas en este caso la hidrólisis alcalina, mientras que de las metodologías que conservan la muestra, el método soxhlet fue el que presentó mayor recuperación. Se seleccionó la metodología soxhlet por y de esta grasa total se realizó un HPLC para obtener el perfil de ácidos grasos encontrando que los presentes en mayor concentración fueron el ácido palmítico en 32.5%, el ácido palmitoléico en 15.82%, el ácido oleico con 15.49%, el ácido esteárico con 13.61% y el ácido linoleico 7.56%, de igual forma se observó que el esteroles más abundante fue el escualeno representando el 2.99% de los lípidos totales. Posteriormente se separaron los fosfolípidos resultando en un 37.36%±1.66 de los lípidos totales, de dichos fosfolípidos se observó que el 20.48%±0.51 es fosfatidiletanolamina, el 23.07±1.12 fosfatidilinositol, el 6.17%±0.25 ácido fosfatídico y el 34.42% fosfatidilcolina. Siguiendo una metodología integrada se purificaron paredes celulares representando 35% de la masa desgrasada de levadura, de esta fracción se obtuvieron 13.49%±0.92 de mananos y 25.13%±1.47 de β-glucano, valores inferiores a las metodologías destructivas que permiten recuperar 20.72%±0.89 y 45.88%±2.35 para cada biomolécula respectivamente. Se evaluó el contenido de quitina y se observó que está presente en un 2.99% del peso seco de la pared celular. Los rendimientos obtenidos aunados a la alta generación del subproducto lo vuelven una buena fuente de estas moléculas para futuras aplicaciones industriales.

1.1 ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae is used industrially for beer production, being the second most important byproduct generated by this industry. The inner parts of the cells are isolated and then used as dietary supplements and flavor enhancers because of their high amounts of nucleotides and protein; the external parts of the cells are left as waste, of which so far no commercial use has been established, else than supplement for animal feeding. This paper focuses on the study of this unexploited fraction, so it seeks to find feasible concatenated process to get the most out of this product. Pretreatments that cause cell lysis, different drying methods and lipid extraction methods were analyzed, also characterized the fat and polysaccharides found in the cell wall. The results demonstrate that the lethality of the pretreatments varies significantly, however, despite the differences in the mortality; there was no significant difference in lipid extraction by the Soxhlet method. When comparing different drying processes against lipid extraction by Soxhlet method shows that the sample dehydrated by drum dryer and lyophilization are not significantly different from each other, but they have a significant increase compared to the other treatments. Later we compared extraction methodologies for obtaining higher yields, destructive techniques such as alkaline hydrolysis shown to be better, while the methodologies that preserve the sample, the Soxhlet method presented the highest recovery. HPLC was performed to obtain the profile of fatty acids finding that higher concentrations were 32.5 % palmitic acid, palmitoleic acid in the 15.82 %, oleic acid 15.49 % was selected, stearic acid with 13.61 % and 7.56 % linoleic acid, likewise observed that the most abundant sterol was squalene representing 2.99 % of the total lipids. Subsequently, the phospholipids were separated resulting in a 37.36 % \pm 1.66 of total lipids, of said phospholipids was found that 20.48 % \pm 0.51 is phosphatidylethanolamine, 23.07 \pm 1.12 phosphatidilinositol, 6.17% \pm 0.25 phosphatidic acid and 34.42% phosphatidylcholine. Cell walls were purified from of defatted yeast representing 35 % of the weight. Of this fraction were obtained 13.49 % \pm 0.92 of mannans and 25.13 % \pm 1.47 of β -glucan following an integrated approach being values below destructive methodologies that recover 20.72 % \pm 0.89 and 45.88 \pm 2.35 % respectively for each biomolecule. The chitin content was evaluated and found to be present in a 2.99 % dry weight of the cell wall. The obtained yields coupled with high generation of the byproduct become a good source of these molecules for future industrial applications.

2. INTRODUCCIÓN

Durante la elaboración de la cerveza el segundo subproducto de mayor generación es la pasta de levadura, ya que en el proceso cerca del 10 % de los carbohidratos del mosto se convierten en biomasa de levadura (Ward, 1991). Es decir por lo general se producen de 1.7 a 2.3 gramos por litro de cerveza (Pinto *et al.*, 2014). Para 1996 la producción mundial anual de cerveza ascendía a 720 millones de hectolitros, lo que implicaba la generación de 12.6 millones de hectolitros de pasta de levadura (Burgstaller, 1997), ya para el 2009 la producción mundial de cerveza era de más de 1800 millones de hectolitros (Plato, 2010) y se espera que esta industria continúe creciendo, lo que por consiguiente provocará la generación de mayores cantidades de este subproducto.

Las plantas de elaboración de la cerveza en todo el mundo generan gran cantidad de subproductos sólidos en forma de salvado de malta y levadura. Estos residuos son a menudo transformados en alimento para ganado, fertilizantes o como materia prima para algunos aditivos. Estos subproductos están disponibles en grandes cantidades, por lo que la combinación de su gran suministro continuo, costo relativamente bajo y potencial valor nutricional lo hacen complemento atractivo para la alimentación humana. La disposición inadecuada de estos residuos produce contaminación ambiental y la pérdida de útiles recursos biológicos como proteínas, enzimas y lípidos. Los métodos de utilización que aprovechan de estos componentes biológicos para la generación de productos de valor añadido en lugar de la utilización directa del

material de desecho real podría ser otra opción viable para hacer frente a estos residuos. Esta línea de pensamiento en consecuencia, ha dado lugar a investigaciones sobre estos residuos como fuente de ácidos grasos poliinsaturados, otros compuestos de naturaleza lipídica así como polisacáridos, por su amplia capacidad de aplicación en múltiples ramas de la ciencia y la industria. Esta levadura tiene la categoría generalmente reconocidos como seguros (García-Garibay et al., 2005) por lo que sus derivados son fácilmente comercializables en las industrias alimentaria, farmacológica y cosmética. Este estudio se centra en los compuestos encontrados en la pared y la membrana celular de *S. cerevisiae* y busca seleccionar e integrar metodologías que permitan el aprovechamiento de compuestos con alto valor. Sin embargo uno de los principales problemas que dificultan su utilización es el hecho de que la pasta de levadura contiene una muy alta concentración de agua, por lo que su estabilidad y vida de anaquel se ven muy reducidas, a la vez que se disminuye la eficiencia de los procesos de extracción de compuestos a partir de ella.

Las biorefinerías que utilizan biomasa residual como materia prima para la producción de combustibles y productos químicos podría ser la única solución para la sostenibilidad del ser humano en el futuro.

3. ANTECEDENTES

3.1 *Saccharomyces cerevisiae*.

3.1.1 Generalidades

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo ascomiceto que ha sido ampliamente estudiado debido a su importancia en la industria cervecera, panadera y vitivinícola, se utiliza industrialmente para obtener enzimas invertasas, glicerol (Folch-Mallol *et al.*, 2004), así como etanol; aproximadamente el 96% del etanol obtenido por fermentación se lleva a cabo mediante cepas de *S. cerevisiae* o especies relacionadas, particularmente *S. uvarum*. (Varnam y Sutherland, 1994).

En la elaboración de cerveza, la levadura es fácilmente separada ya que ésta flocula al final del proceso, sin embargo la pasta que se obtiene es muy fluida ya que contiene aún un gran volumen de cerveza, por lo que debe centrifugarse para concentrarla (Bairgian, 2006). Incluso la levadura concentrada cuenta con un alto contenido de agua, lo que provoca dificultades técnicas para su utilización. El secado de la levadura de cerveza debe realizarse cuidadosamente, para no dañar las vitaminas termolábiles o a algunos aminoácidos. Un color claro indica casi siempre un secado cuidadoso. La levadura es altamente higroscópica; así que requiere de un almacenamiento adecuado para poder conservarse. La levadura de cerveza deshidratada ha sido durante mucho tiempo un ingrediente de los alimentos fabricados industrialmente para aves y cerdos.

De esta manera fue incluido no solamente como ingrediente proteico en las fórmulas, sino que su valor nutritivo-fisiológico también se basaba en el alto contenido de vitaminas del complejo B (Romanin *et al.*, 2010). Sin embargo se ha observado que no puede utilizarse únicamente la pasta de levadura en sus dietas ya que se asocia con desnutrición y raquitismo debido al efecto quelante que posee el ácido fítico que se encuentra en alta concentración (Ferket *et al.*, 2002). Por lo que es preferible obtener aislados de los compuestos de interés.

Las partes internas de las células se aíslan y se utilizan posteriormente como complementos alimenticios y potenciadores del sabor debido a sus altas cantidades de proteínas y nucleótidos. Las partes externas de las células de levadura, las paredes de las células, quedan como residuos de los que hasta el momento ningún uso comercial se ha establecido, excepto como un suplemento para la alimentación animal. (Freimud *et al.*, 2003).

3.1.2 Proceso Fermentativo

En la elaboración de cerveza *S. cerevisiae* utiliza los azúcares sacarosa, fructosa, maltosa y maltotriosa en este orden. Son incapaces de hidrolizar el almidón y las dextrinas por lo que el mosto pasa por procesos anteriores como el de malteo que debe volver disponibles los azúcares, por la acción de enzimas exógenas.

Los azúcares fermentables del mosto constituyen entre el 70 y el 80% de los carbohidratos totales, y serán transformados a etanol, dióxido de carbono y biomasa,

el porcentaje restante consiste principalmente en dextrinas superiores que no pueden ser fermentadas.

Aunque las fermentaciones alcohólicas son en gran medida anaerobias, las levaduras necesitan algo de oxígeno para sintetizar algunos esteroides y ácidos grasos insaturados componentes de la membrana, el mosto de cerveza contiene ya niveles sub-óptimos de estos nutrientes por lo que es necesario suplementarlo o realizarle una inyección de oxígeno al inicio de la fermentación.

El mosto se inocula con levaduras hasta un recuento de aproximadamente 10^7 células por mililitro o mayor si se necesita una velocidad de fermentación más elevada. Para las cervezas tipo lager, es decir de fermentación baja, como son la mayor parte de las producidas en México. El mosto tiene una concentración inicial después de cinco días de fermentación.

La fermentación se inicia con temperatura de entre los 8 y los 15 °C, el proceso tiende a producir un aumento de temperatura, por lo que es necesario enfriarlo, si la temperatura es mantenida alrededor de los 10 °C la fermentación durará alrededor de 10 días después de los cuales la levadura flocula y se separa de la cerveza de carbohidratos de 12 °P, que descienden hasta 2 o 2.5 °P (Ward, 1991).

3.2 Biorrefinerías

Entendemos como biorrefinería la evolución de las tecnologías basadas en biomasa como materia prima, que combina procesos biológicos, térmicos y químicos y aprovecha las sinergias existentes entre las distintas tecnologías, dando como

resultado un completo abanico de productos.

Abordan el concepto de la conversión de biomasa en biocombustibles o productos químicos a través de la fusión de biotecnologías y tecnologías físico-químicas, han surgido como alternativas sostenibles a las refinerías petroquímicas. La materia prima con más potencial para las biorrefinerías es la biomasa agroindustrial. Convertir la materia prima disponible en productos requiere del desarrollar y empleo de una variedad de tecnologías y procesos, como pre-tratamientos, fermentaciones o modificaciones fisicoquímicas.

El concepto surge principalmente en la obtención de biocombustible, primeramente a partir de material celulósico y lignocelulósico de desecho (Park, Kondo, Chang, Perry Chou, & Monsan, 2013), en años recientes otras materias primas prometedoras han sido las micro y macro algas, que crecen más rápido y fijar CO₂ con mayor eficiencia que las plantas terrestres.

En Brasil, se obtiene etanol a partir de biomasa de bagazo de caña de azúcar (Osakabe 2002); y poli-ácido-3-hidroxibutírico de forma barata y con menor producción de dióxido de carbono (Nonato et al. 2001). Sin embargo, este plástico biodegradable no ha sustituido los plásticos comerciales porque no es transparente y tiene un olor característico. Por otro lado el polilactato, plástico producido a partir de suero de leche, ya cuenta comercial aplicaciones. Las posibilidades son inmensas, considerando solamente las fermentaciones lácticas y etanólicas es posible producir,

energía, etanol, ácido láctico, polilactato, etil-lactato, proteína, materiales biológicamente activos y fertilizantes. (Ohara, 2003)

3.3 Tecnologías de secado

3.3.1 Generalidades

El agua presente en los alimentos no se encuentra en estado puro sino que puede estar en forma de solución de sólidos, de gel, en emulsión o ligada de diversos modos a los constituyentes sólidos. Además, la naturaleza celular también afecta la conducta de este tipo de muestras durante la desecación. Algunas dificultades comunes durante los procesos de secado son el movimiento de solutos, la retracción y el endurecimiento superficial (Brennan *et al.*, 1980).

3.3.2 Secador de dos plantas

El secador de dos plantas consiste básicamente en un equipo de dos plantas, la planta inferior donde se sitúa un horno o quemador y en ella el aire caliente y los productos de combustión ascienden, por convección natural o forzada, y penetran a través del piso enrejillado de la segunda planta sobre el que se esparce el producto húmedo en forma de una capa uniforme. El aire húmedo se elimina por una chimenea ubicada en la planta superior (Brennan *et al.*, 1980).

3.3.3 Secador de túnel

Consiste en un túnel que cubre la totalidad del producto, que se coloca en charolas extendido en capas uniformes, se dejan espacios entre las bandejas para dejar que el aire circule, el aire se mueve mediante un ventilador que lo hace pasar a través de

calentadores y posteriormente fluye de forma horizontal entre las bandejas (Brennan *et al.*, 1980).

3.3.4 Secador de tambor

Este tipo de secadores constan de uno o más cilindros metálicos huecos que giran sobre ejes horizontales y son intermitentemente calentados con vapor, agua u otro método de calentamiento. A la superficie del tambor se agrega una película del producto líquido de espesor uniforme. Al girar el tambor el líquido se deseca y el producto desecado se desprende de la superficie del tambor mediante una cuchilla rascadora (Brennan *et al.*, 1980).

3.3.5 Liofilización

En este método el producto se congela primero y se sublima el hielo, mediante la creación de un gradiente de presión de vapor entre el entorno inmediato al producto y el interior del producto (Brennan *et al.*, 1980).

3.4 Lípidos

3.4.1 Generalidades

Los lípidos son moléculas de almacenamiento de energía y componentes estructurales importantes en la membrana plasmática de las células. Otras funciones que poseen estas moléculas son como biocatalizadores, en donde favorecen o facilitan

las reacciones químicas que se producen en los seres vivos, estas funciones las cumplen las vitaminas lipídicas, las hormonas esteroideas y las prostaglandinas. Adicionalmente poseen actividad transportadora. El transporte de lípidos que se lleva a cabo en los organismos superiores desde el intestino hasta su lugar de destino, se realiza mediante su emulsión gracias a los ácidos biliares y a los proteolípidos (Horton, 2008). Los ácidos grasos esenciales en la dieta humana son aquellos que no pueden ser sintetizados por el ser humano. Son moléculas que pertenecen a las familias omega-3 y omega-6 que son una serie de sustancias grasas categorizadas dentro del grupo de los ácidos grasos poliinsaturados, PUFAs. Estos ácidos grasos son cadenas de 16 o más carbonos y contienen dos o más dobles enlaces. Los PUFAs son necesarios para el funcionamiento normal de las células, están directamente involucrados en la fluidez de la membrana lipídica y la señalización intercelular (Von Schacky y Dyerberg, 2001). Los PUFAs compuestos por cadenas entre 18 y 22 carbonos también son considerados de interés (Watkins *et al.*, 2001). Otras moléculas de naturaleza lipídica de importancia industrial son los fosfolípidos y los esteroides, apreciados por sus características como emulsificantes o a su potencial farmacéutico y nutracéutico (Watkins *et al.*, 2001).

3.4.2 Ácidos grasos de las series omega

Los ácidos grasos omega-3 y omega-6 son considerados esenciales debido a que los mamíferos no pueden incorporar dobles enlaces en las posiciones 3 y 6 por lo cual estos ácidos grasos, o sus precursores más importantes, el ácido linoleico en el caso

de los omega-6 y el ácido alfa-linolénico para los omega-3, deben estar presentes en nuestra dieta (Koletzko *et al.*, 2008).

La familia de los llamados omega-3 es nombrada así porque su primer doble enlace se ubica en el carbono 3, contando desde el extremo más alejado del grupo funcional ácido, es decir el grupo carboxilo. Los ácidos grasos omega-3 son derivados del ácido alfa-linolénico, que es el más simple de ellos y su precursor biosintético (Valenzuela y Nieto, 2003), la desaturasa- $\Delta 6$ actúa sobre el ácido alfa-linolénico para producir ácido estearidónico, el primer metabolito de los de la vía omega-3 (Parker-Barnes *et al.*, 2000). A este grupo pertenecen el ácido docosahexaenoico al igual que el ácido eicosapentaenoico. Los omega-3 están implicados en la maduración y el crecimiento cerebral y retiniano, además intervienen en los procesos de inflamación, coagulación, presión arterial, órganos reproductivos y metabolismo graso en el ser humano (Neuringer *et al.*, 1988).

La familia de ácidos grasos omega-6, en la cual el primer doble enlace se ubica en el carbono 6 comprende al ácido linoleico, el ácido araquidónico y el ácido docosapentaenoico (Valenzuela y Nieto, 2001). Todos estos ácidos grasos son derivados de ácido linoléico por una serie alternada de las reacciones de desaturación y elongación utilizando los mismo complejos enzimáticos para los omega- 3 y 6 (Parker-Barnes *et al.*, 2000). El primer metabolito de la ruta omega-6 en los mamíferos es gamma-linolénico producido por la enzima desaturasa- $\Delta 6$ (Ratnayake y Galli, 2009).

La familia de los omega-9, denominada así debido a la ubicación del primer doble enlace en el carbono 9, tiene como representante más importante al ácido oleico. Estos sí pueden ser sintetizados a partir de ácidos grasos de menor complejidad estructural producidos por el propio organismo, y aunque se le atribuyen muchas propiedades derivadas de su consumo habitual no son ácidos grasos esenciales (Neuringer *et al.*, 1988).

3.4.3 Ácido linoleico.

Como se mencionó con anterioridad el ácido linoleico es el más simple de los ácidos grasos pertenecientes a la serie de los denominados omega-6 y es a la vez su precursor biosintético en organismos superiores. Lo que lo convierte en un ácido graso esencial.

Algunos estudios atribuyen propiedades cardio protectoras a los ácidos grasos omega-6 (Russo, 2009) y otras relacionadas con el buen funcionamiento del músculo liso de los vasos sanguíneos (Engler, 1992) además de propiedades reductoras del colesterol (Makni *et al.*, 2008).

Dentro de esta familia, el ácido linoleico se ha asociado con reducción del proceso inflamatorio e incluso una actividad anticancerígena (Kapoor y Huang, 2006). Deficiencias en la ingesta de ácidos grasos esenciales omega-6 se correlacionan con la gravedad de la dermatitis atópica que afectan la función de barrera de la piel y

provoca inflamación (Yen *et al.*, 2008).

La inclusión de este ácido graso a la levadura de inóculo utilizada en el proceso cervecero, permite la revitalización de la cepa de proceso, mejorando las características de fluidez de la membrana. Lo que permite reducir la concentración de oxígeno adicionada al mosto, favoreciendo la calidad del producto. (Smart *et al.*, 1995)

3.4.4 Ácido docosahexaenoico

El DHA (cis-4,7,10,13,16,19 docosahexaenoico), es el ácido graso con mayor número de dobles enlaces que es posible encontrar en cantidades apreciables en los tejidos de los mamíferos (Cunnane, 1999). Posee una estructura molecular muy particular debido al alto número de dobles enlaces que presenta. Su estructura espacial semeja un helicoide, similar al de las proteínas o al de una cadena sencilla de DNA y su punto de fusión es muy bajo, inferior a -20°C , por lo cual, es un líquido bajo toda condición biológica (Crawford, 1999). No se encuentra libre en la naturaleza, ya forma parte de los triglicéridos y de los fosfolípidos, moléculas que constituyen las estructuras de depósito y las membranas de las células, respectivamente. El DHA no está presente en las fuentes nutricionales de ácidos grasos de origen terrestre, aunque sí lo está su precursor más importante, el ácido linolenico, quien se encuentra en relativa cantidad en los aceites vegetales extraídos de ciertas semillas, como es el caso

de la soja, la canola o la linaza. La fuente más importante de DHA son los organismos vegetales y animales de origen marino. Los componentes del fitoplancton, especialmente aquellos fotosintéticos, lo sintetizan con mucha eficiencia. Los peces y los animales marinos en general lo incorporan a sus estructuras celulares como parte de la cadena alimentaria, aunque no se descarta que éstos tengan la capacidad de biosintetizarlo a partir de precursores más simples. Desde el punto de vista de la alimentación humana, los peces, especialmente aquellos de constitución más grasa constituyen la principal fuente nutricional de DHA (Valenzuela *et al.*, 2000). El DHA proveniente de la dieta o de la síntesis endógena, se encuentra prácticamente en todos los tejidos, lo cual es indicativo de su importancia, es particularmente abundante en tejido cerebral, en los conos y bastoncitos de la retina y en las gónadas, especialmente en los espermatozoides, tejidos en los que puede constituir el 40%-60% de los ácidos grasos poliinsaturados (Connor *et al.*, 1993). También se le puede identificar en el plasma sanguíneo y en la membrana de los eritrocitos, que se consideran como buenos marcadores del estado nutricional general (Innis *et al.*, 1994).

3.4.5 Esteroles.

Los esteroles son componentes estructurales y reguladores esenciales en las membranas de las células eucarióticas (Volkman, 2003). Muchos intermediarios de la ruta de generación de esteroles tienen un importante valor comercial (Arnezeder y Hampel, 1990).

El primer esteroide en la ruta es el lanosterol, que es usado como un emulsificante no iónico para gelificar carbohidratos y se aplica en la industria cosmética en labiales y cremas (Veen *et al.*, 2003) Los esteroides también sirven como precursores para la síntesis química de derivados tetracíclicos de triterpenoides (Sjostrom *et al.* 1993) y de hormonas esteroideas (Stach *et al.* 1997).

Se ha demostrado *in vitro* el efecto anticancerígeno del ergosterol en las células de cáncer de mama (Subbiah y Abplanalp, 2003). Además productos metilados de intermediarios de la síntesis de esteroides, como el 4,4-dimetil-zymosterol, han demostrado tener la actividad de promover la meiosis (Xu *et al.*, 2002).

Estudios sobre el efecto fisiológico provocado por otros esteroides como el zymosterol, el 24 etil-estrol (Heiderpriem *et al.*, 1992) y el 24 etilideno-esteroide, demostraron que estas moléculas presentan una actividad hipocolesterolemizante. (Nes *et al.*, 1999).

3.4.6 Fosfolípidos.

Los fosfolípidos son componentes de naturaleza lipídica presentes en la membrana celular que tienen fósforo asociado a los glicéridos (Horton, 2008), siendo diésteres de ácidos grasos y del sn-glicerol-3-fosfato en los cuales el grupo fosfato está además

esterificado por un grupo hidrofílico como puede ser la colina, etanolamina, inositol o serina. La composición de los fosfolípidos varía dependiendo de su origen, sin embargo por lo general tienen actividad surfactante y emulsificante, lo que les da valor comercial (Badui-Sergal, 1993). Como la fosfatidilcolina, es uno de los principales fosfolípidos presentes en la membrana celular de *Saccharomyces cerevisiae*, y de manera purificada tiene un elevado valor comercial.

En la legislación mexicana y el comercio, se llama lecitina a las mezclas de diferentes lípidos polares, esencialmente fosfolípidos y glicolípidos, acompañados de cantidades variables de triglicéridos. Las lecitinas se extraen por medio de solventes a partir de aceites vegetales, principalmente de soya (NMX-F-047-SCFI-2006).

Los principales componentes activos de la lecitina son fosfolípidos entre los que se encuentran la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina y el fosfatidilinositol en proporciones casi iguales. La fosfatidilcolina tiene propiedades de estabilización de emulsiones aceite en agua, mientras que la fosfatidiletanolamina y el fosfatidilinositol tienen capacidad de emulsiona agua en aceite. Se conocen protocolos para la separación de las diferentes fracciones para incrementar su eficiencia como emulsificante, basados en la solubilidad en fase alcohólica característica de la fosfatidilcolina. Posteriormente pueden modificarse mediante acetilación o hidroxilación para aumentar su poder emulsionante. Esta característica funcional les otorga una amplia variedad de aplicaciones en la industria alimentaria, en productos tan variados como margarinas, chocolate, productos de panificación e incluso

encapsulación de grasas y texturizantes (Díaz-Casañas et al., 2012).

Desde el punto de vista nutricional en alimentación humana y animal presentan interés por el aporte de ácidos grasos esenciales y de fosfatidilcolina, compuesto que ha probado mejorar la digestibilidad, poseer efecto sobre el metabolismo del colesterol y la biosíntesis de acetilcolina, por lo que es usada en farmacia. Los fosfolípidos son utilizados en la industria farmacéutica para la producción de soluciones de perfusión y la fabricación de liposomas (Díaz-Casañas et al., 2012).

3.5 Pared Celular.

3.5.1 Generalidades.

La función de la pared celular es mantener la estructura celular, es el exoesqueleto rígido que protege a la célula, condiciona la nutrición absorptiva ya que no permite la endocitosis (Bracker, 1967).

La pared celular representa del 15-30 % del peso seco de la célula. Está compuesta primariamente por 2 capas. Una capa externa formada por un complejo de manoproteínas que representan aproximadamente 25-50 % del peso seco de la pared y corresponde a una asociación de polisacáridos de α -D-manosa con proteínas (manano-oligosacáridos). Éstas se unen a través de extremos no reductores en forma directa con los 1-3 β -glucanos o, indirectamente, con los 1-6 β -glucanos. Los

mamano-oligosacaridos contienen abundantes polipéptidos glucosados que salen como fimbrias afuera de la pared celular.

La capa interna que está constituida por un complejo de glucomananos que representan aproximadamente el 25-30 % del peso seco de la pared y que son β -glucanos asociados a una pequeña cantidad de quitina. Las cadenas de quitina se unen por los extremos no reductores a las cadenas de β -glucanos 1-3 y 1-6 formando una pared celular insoluble. (Magnelli *et al.* 2002).

En años recientes la utilización industrial de estos compuestos ha ido aumentando; sin embargo, para poder utilizarlos en la industria es necesaria su purificación previa.

3.5.2 Polisacáridos

Los polisacáridos son una clase muy importante de biopolímeros, que consisten en cadenas largas de repetición de unidades de azúcar. Estos estructuralmente se caracterizan principalmente por el tipo de unidad de monómero, la longitud de la cadena, el tipo de la enlace glicosídico y el grado de ramificación. La naturaleza sintetiza continuamente grandes cantidades de polisacáridos, que sirven sobre todo como andamios estructurales como la celulosa de las plantas y la quitina en los animales o como carbohidratos de almacenamiento como el almidón y el glucógeno (Horton, 2008).

3.5.3 Mananos.

Los manano-oligosacáridos son un tipo de carbohidratos derivados de la pared celular de levaduras. Estos oligosacáridos están compuestas por varias subunidades del azúcar manosa unidas por enlaces glucosídicos. Los glucomananos presentes en la pared celular de las levaduras son activos funcionalmente. Sus propiedades radican en la modificación de la respuesta biológica del huésped, pues la transforman mediante la estimulación de los mecanismos de defensa del sistema inmune, frenando todo cambio producido por una agresión bacteriana, viral o fúngica (Hooge D. 2004). Los Manano-oligosacáridos tienen la capacidad de aglutinar las micotoxinas presentes en el tracto intestinal animal. (Ferket *et al.*, 2002) Así pues, se las puede utilizar como sustituto de coccidiostáticos y/o antibióticos usados como promotores de crecimiento en las aves y otros animales, ya que se ha descubierto que su acción central consiste en el bloqueo competitivo de las lectinas bacterianas debido a que las fimbrias tipo 1 de la superficie de las bacterias patógenas reconocen específicamente las glucoproteínas de la pared celular y las aglutinan (Dominguez-Vergara *et al.*, 2009).

3.5.4 β -Glucanos.

El β -glucano es un polisacárido, formado por cadenas homopoliméricas de glucosa, que se encuentran en las paredes celulares de diferentes organismos, bacterias,

levaduras, algas, hongos y plantas superiores. (Naumann *et al.*, 2006) Existen diferentes tipos de β -glucanos dependiendo de la cantidad de monómeros que los conforman y el carbono en el que se encuentra el enlace.

Un grupo especial de b-1,3-poli-glucosas, usualmente llamado glucano o b- glucano, que está muy extendida en muchas bacterias, hongos, algas y plantas superiores y ha atraído la atención debido a bioactivas y medicinales propiedades, como antiinflamatorios, antimicrobianos, antivirales, antitumorales y radio protectores (Cox y Dalloula 2010)

Algunas de las características más interesantes de estos compuestos son sus propiedades como modificadores de la respuesta inmune, y que pueden reducir la concentración de LDL en el suero (Thanardkit *et al.*, 2002). Además de esto su aplicación directa en la industria es a través de su aplicación en la producción de alimentos, como sustitutos de grasa, fuente de fibra dietética, agentes espesantes, emulsificantes y formadores de películas.

3.5.5 Quitina.

La quitina es un compuesto insoluble en agua y soluble en la mayoría de solventes orgánicos (Hansen y Llanes 1994). Es el segundo polímero más abundante de la naturaleza después de la celulosa (Deshpande *et al.*, 1986). Es un homopolisacárido constituido por moléculas de N-acetil-D-glucosamina, unidas por

enlaces glucosídicos β -1,4. Esta se encuentra ampliamente distribuida, particularmente en animales como artrópodos, moluscos, anélidos, braquiópodos, así como en la pared celular de hongos y en algunas algas clorofíceas (Flach y col., 1992). Los materiales quitinosos en estos organismos se encuentran integrados a diferentes estructuras y organelos, en proporciones tan variadas que pueden representar desde trazas hasta el 80% del peso seco (Shirai, 1999)

Tiene numerosas aplicaciones en la industria de alimentos, cosmética y farmacéutica como agente espesante, estabilizante y gelificante, así como en la elaboración de pinturas y textiles. Las ventajas del uso de este polímero es su condición de aditivo natural, no tóxico y biodegradable. (Hansen y Llanes, 1994).

4. HIPÓTESIS

Es posible desarrollar un sistema de procesamiento tipo biorrefinería para el aprovechamiento de las fracciones lipídicas y glucídicas de la biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* generada como subproducto del proceso cervecero.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar diferentes procesos de obtención de fracciones lipídicas y glucídicas, para de esta forma integrarlos en una metodología que permita un mejor aprovechamiento de la pasta de levadura *Saccharomyces cerevisiae* generada como subproducto de la industria cervecera.

5.2 Objetivos Específicos

- 1) Determinar el impacto de la integridad celular sobre la extracción de lípidos totales a partir de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 2) Determinar el método óptimo de secado para la extracción de lípidos totales a partir de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 3) Seleccionar el método de extracción más apropiado para la extracción lipídica en *Saccharomyces cerevisiae*.
- 4) Separación de las familias lipídicas obtenidas a partir de los lípidos totales de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 5) Obtener y cuantificar los diferentes polisacáridos estructurales a partir de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 6) Evaluar la factibilidad económica y tecnológica de la concatenación de procesos para la obtención de metabolitos de alto valor a partir de *Saccharomyces cerevisiae*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material biológico.

La biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* fue proporcionada por la cervecería Cuauhtémoc Moctezuma. Tratándose de levadura de cosecha que ha cumplido su ciclo de utilización y ya no será reincorporada al proceso.

6.2 Tratamientos de lisis celular.

Previo al tratamiento, se ajustó la pasta de levadura a una densidad celular de 10^{30} células por mililitro.

6.2.1 Choque térmico.

Se sometió a la pasta de levadura a un calentamiento progresivo con agitación a 63°C por 30 minutos y posteriormente se enfrió en baño con hielo hasta 4°C.

6.2.2 Congelado Rápido.

Se sometió la pasta de levadura a congelación con un baño de CO₂ hasta observar cristales uniformes y corroborar que la temperatura interna era menor a -15°C.

6.2.3 Congelado Lento.

La levadura líquida se mantuvo a -18°C hasta obtener cristales uniformes y corroborar que la temperatura interna era menor a -15°C.

6.2.4 Ultrasonido

Se sometió la levadura líquida a un proceso de sonicación a 200 Hertz durante 15 minutos en un equipo Sonic Ruptor 250 de la marca Omni international.

Todos los tratamientos se evaluaron mediante una técnica de conteo directo en cámara de Neubauer al microscopio óptico en tinción de contraste con azul de metileno.

Posteriormente se secaron las muestras por liofilización y se realizaron extracciones por el método de soxhlet.

6.3 Secado

6.3.1 Secado en secador de dos plantas

Se colocó la muestra húmeda en charolas de aluminio de forma uniforme en una capa con profundidad no mayor a 0.5 cm, que se colocaron en la parte superior de un horno de convección natural a 130°C por 6 horas.

6.3.2 Secado en secador de túnel.

Se depositó la muestra húmeda en charolas de aluminio de forma uniforme en una capa con profundidad no mayor a 0.5 cm, y se colocaron las charolas en un secador de túnel Procmex modelo LQ001 con el motor al 70% de capacidad y en la temperatura 8, es decir a 130°C por 4 horas.

6.3.3 Secador de tambor.

Se realizó en colaboración con la empresa grupo Plasset en un secador de tambor en

condiciones protegidas por propiedad industrial.

6.3.4 Liofilización.

En frascos de 150 ml marca Labconco, se depositaron 50 ml de muestra, posteriormente fueron congelados con ayuda de CO₂ para proceder a realizar la liofilización en un equipo Telstar LyoQuest por 4 horas a -48°C con 0.19 mBar de vacío.

6.4 Extracción de lípidos.

Anterior a la extracción se realizaron dos lavados con agua y uno con una solución de NaHCO₃ al 0.1 % centrifugando a 3000g por 5 min entre cada lavado. Esto con el fin de eliminar los ácidos del lúpulo y los residuos de cerveza.

6.4.1 Extracción cruda método de Soxhlet

Se colocó la muestra en un dedal de celulosa, que se instaló en la corneta del equipo de extracción soxhlet, en el matraz bola se adicionó hexano como solvente así como perlas de ebullición, se mantuvo funcionando el sistema durante 4 horas, controlando la temperatura del refrigerante alrededor de 4°C, y la del solvente en 67 °C. (AOAC Am 5-04)

6.4.2 Hidrólisis ácida

Se pesaron 10 gramos de muestra seca, y se disolvieron en 50 ml de una solución de HCl 1.2M en un embudo de separación de 250ml, se dejaron en reposo durante toda la noche a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 100ml de una mezcla de éter de petróleo – éter etílico en proporción 1:1, se homogenizaron y se dejaron separar las fases, se realizaron tres lavados, y la fracción orgánica se recuperó en un matraz bola en donde se separó de la fracción lipídica mediante rotavapor a presión reducida. (AOAC 954.02)

6.4.3 Vía saponificación acidificación

Se tomaron 120g de muestra, se adicionaron 900ml de etanol y 100ml de KOH 50%, se mantuvieron en reflujo durante 2 horas a 85°C, para posteriormente evaporar el solvente hasta un volumen final de 200ml, se adicionó el HCl 0.01N necesario para alcanzar pH final de 2.1, se adicionaron 300 ml de éter de petróleo, y se dejaron reposar para permitir la separación de fases, se recuperó la fase orgánica y se hicieron 2 lavados más, finalmente la grasa se obtuvo por evaporación del solvente. (AOAC 932.06)

6.4.4 Hidrólisis alcalina

Se agregaron 10 gr de muestra, 15 ml de amoníaco y 100ml de etanol al 95%, se agitaron vigorosamente, se añadieron 250ml de éter etílico y 250ml de éter de petróleo, se dejaron separar las fases, se decantó recuperando la fracción orgánica, y se repitió el procedimiento en tres lavados más.

6.4.5 Extracción directa cloroformo metanol

Los lípidos fueron extraídos al pesar 1 gr de muestra se adicionaron 3.75 ml de una mezcla cloroformo-metanol 1:2 (v/v). Esta mezcla se homogenizó vigorosamente. Después, se agregaron 1.25 ml de cloroformo y 1.25 ml de agua y se agitó vigorosamente después de cada adición. Por último, se permitió la separación de fases y la fase orgánica se extrajo con una pipeta Pasteur. Se evaporó el solvente y se determina el contenido de lípidos gravimétricamente (*Folch et al.*, 1957).

6.5 Separación de Familias lipídicas

6.5.1 Obtención de Fosfolípidos

La muestra lipídica obtenida anteriormente se sometió a calentamiento a 90 °C se pasó a un embudo de separación, se adicionó un volumen igual a la mitad de la muestra de agua destilada, se agitó vigorosamente y se dejaron separar las fases.

La fracción acuosa obtenida se pasó a un embudo de separación, se adicionó un volumen igual de alcohol etílico absoluto, se agitó vigorosamente y se dejaron separar las fases. (Dynska-Kukulska , y Ciesielski, 2012)

6.5.2 Separación según carga eléctrica

Los lípidos neutros y polares fueron separados del extracto total por cromatografía en capa fina. (Blagovic, *et al.*, 2001) En una placa con silica gel de 20 x 10 cm, y un

grosor de 0.2 mm se usó como fase móvil una solución de éter de petróleo - éter dietílico - ácido acético (70:30:2) Se dejó correr la cromatografía hasta los 8 cm para que se separasen correctamente las fracciones. Se revelaron las bandas asperjando ácido sulfúrico al 50% y calentando 30 minutos a 120°C. Posteriormente las fracciones fueron raspadas de la placa, las diferentes bandas de lípidos neutros fueron puestas juntas. Los lípidos fueron recuperados con cloroformo-metanol (2:1) y se determinaron gravimétricamente después de remover la silica gel y los solventes.

6.6 Caracterización fisicoquímica

Estos análisis se realizaron a la muestra grasa obtenida después del desgomado del aceite obtenido de la pasta de levadura

6.6.1 Humedad

Una porción de ensayo se calentó a 105 °C hasta que la humedad y las sustancias volátiles se eliminan por completo, y se determinó la pérdida de masa (AOAC 926.12).

6.6.2 Índice de acidez

Se pesaron 5 g de aceite y se adiciona una solución alcohólica que se titula con hidróxido de sodio. Expresando los ácidos grasos libres como ácido oleico. (AOCS Ca 5a – 40., 1997).

6.6.3 Índice de peróxido

Se pesaron 5 gramos de aceite y se diluyeron en una solución de ácido acético-cloroformo 3:2; se agregaron yoduro de potasio y agua, luego se tituló con tiosulfato de sodio 0.1N, hasta que el color amarillo desaparezca (AOCS Cd 8-53., 2003).

6.6.4 Índice de yodo

Se pesaron 5 gramos de aceite y se disolvieron en tetracloruro de carbono, luego se le agregaron 25 ml del reactivo de Wijs, dejando reposar la solución en la oscuridad, se le agregó solución de yoduro de potasio y se tituló, luego se adiciona almidón y se continua titulado hasta que el color azul desaparezca (AOCS Cd 1-25., 1997).

6.6.5 Índice de saponificación

Se pesaron 5 gramos de aceite y se agrega una solución alcohólica de hidróxido de potasio, se preparó un blanco simultáneamente, se colocaron el blanco y la muestra en el condensador hasta completar la saponificación luego se titularon con solución de ácido clorhídrico (AOCS Cd 3-25., 2003).

6.6.6 Materia Insaponificable

Se cuantifican mediante la determinación gravimétrica de la materia no saponificada posterior al tratamiento con hidróxido de potasio (AOAC 933.08)

6.7 Identificación y cuantificación de compuestos lipídicos

6.7.1 Cuantificación de ácidos grasos y esteroides

Se pesó 0.1g de muestra, se agregó 1ml de una solución de estándar interno (Triundecanoín) de 5,000mg/L. Se añadieron 2ml de hexano y 2 ml de una solución de ácido sulfúrico al 5% en metanol. Se colocó en un baño maría a 85°C por una hora, se dejó enfriar, se añadieron 5ml de hexano y se agitó por 1 minuto, se dejó reposar para la separación de fases, se trasvasó la fase superior a un matraz de aforación de 10ml. Se realizó una cromatografía líquida de alta eficiencia siguiendo la metodología de la AOCS Ce 1C-89., 1997

6.7.2 Cuantificación de fosfolípidos

Una vez separadas las fracciones de fosfolípidos se realizaron cromatografías en capa fina para separarlos por su afinidad a solventes y posteriormente se cuantificó el fósforo de acuerdo a la metodología descrita por AOAC (AOAC Ja 7-86)

6.8 Obtención de polisacáridos

Todas las muestras que se trabajen para extraer polisacáridos provienen del proceso de obtención de lípidos, es decir se trata de muestras desgrasadas a las que se eliminó el solvente por evaporación en estufa de convección de aire.

Anterior a la extracción se realizarán dos lavados con agua y uno con una solución de 0.1 % NaHCO₃ centrifugando a 3000g por 5 min entre cada lavado. Esto con el fin de eliminar los ácidos del lúpulo y los residuos de cerveza.

6.8.1 Obtención de paredes celulares

Para obtener un pellet que contenga únicamente las paredes celulares, el paquete celular obtenido fue sometido a lisis a través del uso de sonicador a 200 Watts durante 2 minutos en frío a 4°C, se realizaron 3 sesiones de sonicado. La solución sonicada se centrifugó 15 minutos a 27000g y se descartó el sobrenadante, los pellets se resuspendieron en una solución al 8M de urea, y se sonicaron nuevamente durante 15 segundos. Se centrifugó otros 10 minutos a 27000g repitiendo este proceso 5 veces. Finalmente se realizaron un lavado con agua destilada. Y se liofilizaron. (Reid y Bartnicki, 1976).

6.8.2 Obtención de Mananos

6.8.2.1 Extracción hidrolítica

Se pesará muestra y se colocará en un matraz conteniendo una solución NaOH al 50% en una relación 1:4 sólido-líquido, por 2 horas a 60°C, será tratada con solución de Fehling, se dejará precipitar, será decantada y el precipitado será tratado con HCl 0.6N en una relación 1:11 sólido-líquido a una temperatura de 30°C durante 3 horas. Se precipitan los mananos adicionando un igual volumen de alcohol etílico. Se decantará, se evaporará el solvente y se determinará el contenido gravimétricamente.

6.8.2.2 Extracción conservativa

Se realizó una suspensión de la muestra en agua destilada en proporción 1.3:8.8, se ajustó a pH 7 con NaOH. La suspensión agitada se calentó a 125°C en un recipiente

apropiado. Después de 5 horas, la suspensión se enfrió a 45°C. El residuo insoluble se separó por centrifugación y se lavó dos veces con agua, reservándolo para el proceso posterior. A partir del sobrenadante se precipitaron manoproteínas mediante la adición de etanol hasta que se llegó a una concentración de 70%, se conservó en refrigeración toda la noche a 5°C permitiendo la precipitación se llevó a sequedad mediante evaporación a presión reducida a 70°C y se cuantificó gravimétricamente (Freimund *et al.*, 2003).

6.8.3 Obtención de B-Glucanos

6.8.3.1 Extracción hidrolítica

La muestra fue sometida a una solución de NaOH 1M a 90°C durante 2 horas, seguido de una centrifugación a 6000rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante. El sedimento se lavó tres veces con agua destilada bajo mismas condiciones de centrifugado, posteriormente se sometió a un tratamiento ácido con ácido fosfórico al 4% a temperatura ambiente por 2 horas. El material sedimentado se lavó nuevamente tres veces y se separara por centrifugación bajo las mismas condiciones. La muestra se secó en estufa de convección de aire a 100°C por toda la noche. (Zechner-Karpan *et al.*, 2010)

6.8.3.2 Extracción conservativa

A partir del sedimento obtenido en el protocolo descrito en el punto 6.7.1.2 este se rehidrató en agua destilada y se calentó a 45°C y se ajustó el pH a 10.5 con NaOH y

se agregó la enzima proteolítica savinasa bajo agitación, después de 5 horas se neutralizó el pH con ácido acético, el residuo insoluble fue separado por centrifugación y lavado dos veces con agua destilada, posteriormente fue tratado con un excedente de acetona y se evaporó la acetona a presión reducida. (Freimund *et al.*, 2003).

6.8.4 Obtención de Quitina

6.8.4.1 Desmineralización

La muestra fue mezclada con ácido clorhídrico 1.2 M en agitación continua a 25° C durante 1 hora, en una proporción de 1:15. Posteriormente se lavó con agua hasta neutralidad. Se filtró al vacío con papel Whatman número 1. El sólido se secó a 60°C (Zakaria, 1997).

6.8.4.2 Desproteínezación química

El sedimento obtenido después de la desmineralización fue mezclado con hidróxido de sodio 1M durante 2 horas a 25°C. Se lavó hasta neutralidad, filtrándolo al vacío en papel Whatman número 1. El sólido se secó a 60°C (Zakaria, 1997).

6.8.4.3 Blanqueado

Una vez desmineralizado y desproteínezado, se añadió al residuo una solución de hipoclorito de sodio al 5%, para ser posteriormente lavado y filtrado, para recuperar el sedimento. El sólido se secó a 60°C (Zakaria, 1997).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Impacto de la integridad celular sobre la extracción de lípidos.

7.1.1 Porcentaje de muerte

Como un pre tratamiento a las extracciones lipídicas se buscó algún mecanismo de daño celular que facilitara la extracción al comprometer la integridad de la matriz, en este apartado se trata sobre el impacto que tuvieron los diferentes tratamientos sobre la viabilidad celular medida por una técnica de microscopía directa con tinción diferencial con azul de metileno, técnica basada en la capacidad metabólica de las células vivas, ya que al tener un contenido intracelular metabólicamente funcional se caracteriza por ser reductor, por lo que es de esperar que las células viables se presenten incoloras, comparadas con aquellas cuyas membranas estén comprometidas permitiendo la secreción de los fluidos intracelulares o cuya herramienta metabólica se encuentre inactiva que se espera sean de color azul. En el presente trabajo observamos que las células de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que se obtuvo como subproducto de proceso cervecero, se trata de una levadura estresada que cuenta con un elevado porcentaje de células muertas en este caso de $17.83\% \pm 1.76$, además se pudo apreciar que las levaduras son más sensibles a los tratamientos de choque térmico que produjo una letalidad de $93.57\% \pm 0.96$ y el ultrasonido que causa una letalidad de $89.87\% \pm 2.45$, probablemente debido a que en ambos tratamientos ocurre un calentamiento, lo que podría inactivar proteínas vitales para la levadura. En

el caso de los tratamientos de congelado lento que produce una letalidad de $46.87\% \pm 1.79$ y congelado rápido de $64.13\% \pm 1.5$ la considerable menor letalidad podría deberse al tamaño de la célula que le permite esquivar los cristales de hielo, además se ha sugerido que este organismo se adapta incrementando la cantidad de residuos de ácidos grasos insaturados en la membrana lipídica para adaptarse a la baja temperatura (Hunter y Rose, 1972), este efecto es también producido por la presencia de etanol en el medio (Carman y Zeimet, 1996). La presencia de ácidos grasos insaturados podría aumentar la flexibilidad de las membranas favoreciendo la supervivencia en ambientes fríos y permitiendo una congelación progresiva sin ruptura celular.

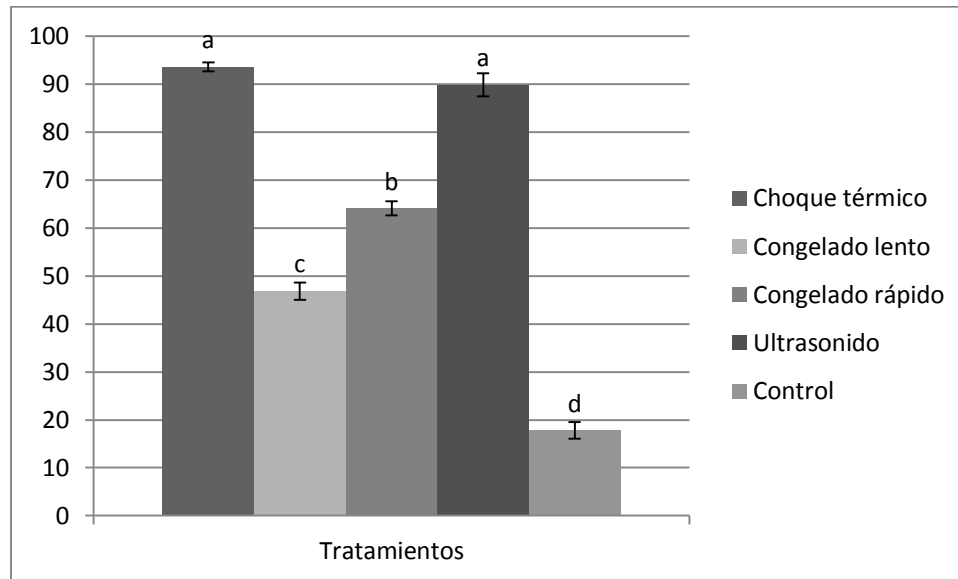


Figura 1. Porcentaje de mortalidad contra tratamientos de lisis celular.

7.1.2 Efecto del daño celular sobre extracción lipídica.

Se ha observado en matrices complejas que la alteración de su estructura puede

favorecer la remoción de compuestos de interés, es por ello que se esperaba encontrar un tendencia con correlación positiva entre la muerte celular y la extracción de lípidos sin embargo esto no fue así probablemente debido a que la muerte celular no se debía a la destrucción total del organismo, sino que se estaba favoreciendo la inactivación enzimática mediada por calor y la mayor parte de las células de levadura conservaban su estructura celular bien delimitada.

Si bien se presentaron pequeñas diferencias entre cada método de extracción estas no fueron estadísticamente significativas al estar demasiado cercanas entre sí. Siendo estas de $3.63\% \pm 0.09$ para choque térmico, $3.62\% \pm 0.08$ para congelado lento, $3.62\% \pm 0.1$ para congelado rápido, $3.66\% \pm 0.12$ para ultrasonido y $3.61\% \pm 0.08$ para el control.

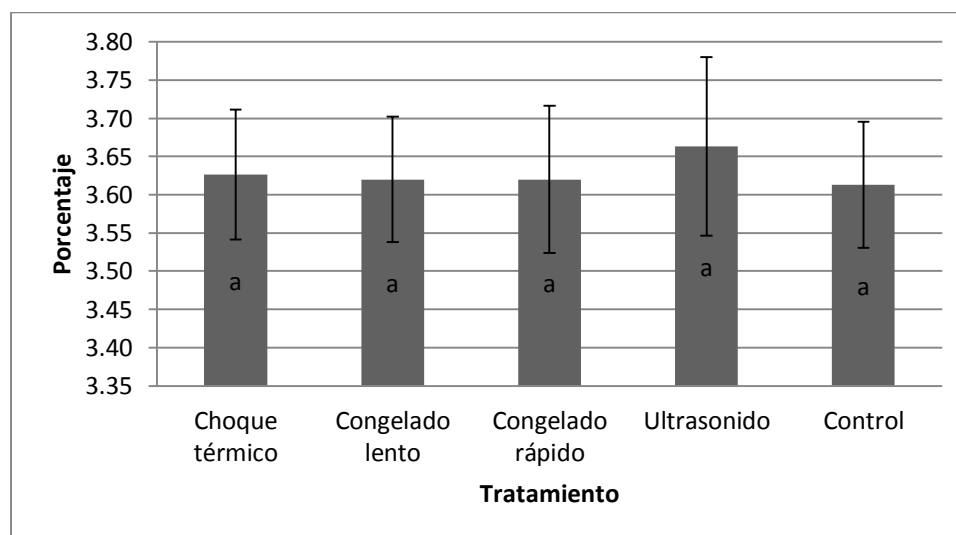


Figura 2. Porcentaje de lípidos obtenido por cada tratamiento de lisis.

7.2 Efecto del método de secado sobre la extracción de lípidos.

Los experimentos realizados hasta este punto se realizaron con muestras deshidratadas por liofilización, un proceso de lo más ventajoso para la conservación de muestras sin embargo, es un proceso costoso, lento y con bajo rendimiento, por lo que se evaluaron diferentes tecnologías para sustituirlo, y se evaluó el efecto del secado contra la recuperación de lípidos totales por el método soxhlet.

De estos experimentos podemos observar que, en efecto la liofilización es el método que permitió una mayor recuperación de lípidos con $3.66\% \pm 0.12$ probablemente esto sea debido a que al suceder la deshidratación en tres etapas, siendo la primera de ellas la congelación donde el agua se separa para formar cristales de hielo o mezclas eutécticas y que como apreciamos anteriormente no somete a un estrés muy importante a la levadura en un ambiente con elevada humedad, este estrés debe ser menor en las condiciones en las que se realizaron estas pruebas. Después, la sublimación de los cristales elimina agua del seno del producto, esto permite obtener un producto ligero, de estructura porosa que conserva el tamaño y forma del producto original, muchos de los problemas propios de otros sistemas de secado no se presentan durante la liofilización la retracción es despreciable, el movimiento de solutos es limitado y el daño por el calor es mínimo. También es alta la retención de compuestos volátiles responsables de aroma y sabor (Brennan *et al.*, 1980), moléculas generalmente con comportamiento de lípidos.

La siguiente muestra con mayor recuperación de lípidos fue la obtenida del secador de tambor que permite una recuperación de $3.52\% \pm 0.09$ de lípidos y no presenta diferencia significativa con la liofilización, esto es congruente con el comportamiento

apreciado en otras matrices y evaluaciones, generalmente este tipo de secadores son utilizados como una opción más rentable a la liofilización, debido al menor costo de los equipos y la operación y las buenas características de los productos obtenidos por este procesamiento, se emplea para desecar productos tan sensibles leche, sopa, alimento para bebe y puré de papa. Otra ventaja son las altas velocidades de desecación y la eficiencia del uso del calor, ya que el producto está expuesto solamente entre 2 y 30 segundos según el tamaño del tambor.

A partir de la levadura deshidratada en el secador de túnel se pudieron recuperar hasta $2.89\% \pm 0.11$ de lípidos Este tipo de equipo permite desecar con una gran capacidad de producción ya que se pueden utilizar temperaturas relativamente elevadas del aire sin riesgo de sobrecalentar el producto, ya que conforme el aire avanza en el túnel va ganando humedad y perdiendo temperatura, lo que evita el daño, lo que permite obtener un producto de baja densidad ya que la retracción que se produce es pequeña. Sin embargo se favorece el movimiento de solutos, y el endurecimiento superficial (Brennan *et al.*, 1980), lo que podría asociarse a la baja recuperación que presentó este procesamiento.

Finalmente la levadura deshidratada en el secador de dos plantas fue la que permitió una menor recuperación de lípidos quedando hasta un 50% por debajo de la muestra liofilizada con un rendimiento de $1.86\% \pm 0.1$ de lípidos. Los principales inconvenientes de estos secadores son los largos tiempos de desecación y la falta de control de las condiciones de desecación lo que puede producir tanto el movimiento de solutos, la retracción y el endurecimiento superficial, lo que dificulta el fraccionamiento.

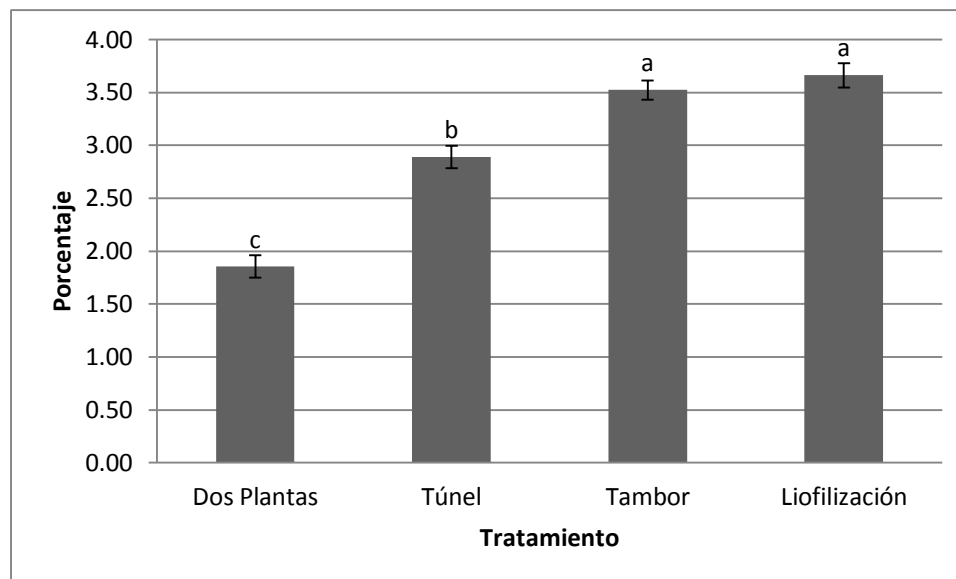


Figura 3. Recuperación de lípidos totales contra método de secado.

7.3 Efecto del método de extracción sobre la recuperación de lípidos.

Hasta este punto todos los experimentos se habían realizado usando la técnica de extracción por reflujo con solvente soxhlet utilizando hexano, se realizaron pruebas para evaluar el efecto de diferentes técnicas de extracción de lípidos totales utilizando como base levadura deshidratada por secador de tambor.

Se evaluaron cinco técnicas, dos de ellas que conservan el sustrato para posteriores análisis y tres de ellas que degradan la muestra para observar si es posible obtener un mayor contenido de lípidos de esta.

De las técnicas que degradan la muestra se tratan de hidrólisis alcalina la que consigue extraer más lípidos obteniendo un $4.2\% \pm 0.19$ de lípidos, esto probablemente es debido a que en esta metodología el efecto de la adición de alcohol etílico y la mezcla de solvente permiten que exista una mayor interacción con las grasas y sean más

fácilmente solubilizadas, a la vez que el etanol permite que las proteínas se solubilicen y sean más fácilmente degradadas por el hidróxido de amonio permitiendo que se desintegren los envoltorios celulares en los que se encuentran atrapados los lípidos. Sin embargo tanto en esta técnica como en la hidrólisis ácida el éter de petróleo reduce la solubilidad del agua en el éter etílico y previene la extracción de materiales hidrosolubles, por lo que la recuperación de moléculas anfífilas puede verse reducido. La hidrólisis ácida obtuvo $4.07\% \pm 0.18$ de lípidos este método se diferencia del anterior fundamentalmente en que la digestión se realiza con ácido clorhídrico, también en medio alcohólico, e incluye el calentamiento del material para disolver las proteínas en el medio ácido y separar la porción lipídica de igual forma que el método de hidrólisis alcalina con las mismas dificultades que presenta la mezcla de solventes. El último método destructivo evaluado fue por la vía de saponificación acidificación, este método consiste en hacer reaccionar la muestra en un medio alcohólico con hidróxido de potasio, para formar jabones, posteriormente acidificando el medio para poder recuperar la estructura y de esta forma recuperarlos en el solvente orgánico, sin embargo como se puede apreciar por el bajo rendimiento obtenido en este caso que es de $2.15\% \pm 0.09$ podemos inducir que los triglicéridos necesarios para realizar la saponificación o bien no están presentes como tal en la muestra o se encuentran atrapados en la matriz celular y no están disponibles para la reacción.

En estudios anteriores evaluaron otras técnicas analíticas de mayor complejidad sobre levaduras cerveceras y obtuvieron resultados superiores. Evaluaron el método de Bligh and Dyer (1959) es decir una digestión con HCl y extracción con metanol-cloroformo-agua (2:1:0.8) en *S. cerevisiae* cepa CCY-22-3-46 y obtuvieron un 4.37%

± 0.11 y en *S. cerevisiae* cepa E7 $5.5\% \pm 0.15$. Además de digestión ácida con HCl y reflujo con tetracloruro de carbono seguida de extracción con éter di etílico- éter de petróleo en *S. cerevisiae* cepa CCY-22-3-46 obteniendo $6.99\% \pm 0.28$ y $8.3\% \pm 0.36$ para *S. cerevisiae* cepa E7 (Lamacka, Sajbidor, & Bohov, 1998).

Los métodos que conservan la muestra se evaluó el método de Folch que es uno de los métodos más utilizados para estudiar la fracción lipídica de *Saccharomyces cerevisiae* por diversos equipos de trabajo y tiene la particularidad de utilizar una mezcla de solvente de diferente polaridad para extraer un rango amplio de compuestos, estos solventes son cloroformo metanol, sin embargo, se trata de una extracción directa sin reflujo ni acción mecánica sobre la muestra por lo que la recuperación lipídica es baja en este caso obtuvimos $1.06\% \pm 0.07$. Por este mismo método obtuvieron a partir de *S. cerevisiae* cepa CCY-22-3-46 $0.425\% \pm 0.09$ y de *S. cerevisiae* cepa E7 $0.53\% \pm 0.05$ (Lamacka et al., 1998).

El otro método utilizado fue el método de soxhlet pero con la modificación de utilizar hexano como solvente esto debido a que el hexano al no poseer grupos funcionales en su estructura química como ocurre con el éter y facilite la liberación y recuperación del aceite durante el proceso, además de ser un solvente ampliamente utilizado en la industria aceitera y que puede utilizarse de forma segura en productos alimenticios si es eliminado del producto final. Por esta técnica obtuvimos un $3.66\% \pm 0.07$ de lípidos totales.

Entre métodos no destructivos con que han trabajado incluye una modificación del método de Bligh and Dyer (1959) consistente extracción con metanol-cloroformo-agua (2:1:0.8) al vacío obteniendo $1.52\% \pm 0.1$ para *S. cerevisiae* cepa CCY-22-3-46

y $3.52\% \pm 0.13$ para *S. cerevisiae* cepa E7.(Lamacka et al., 1998)

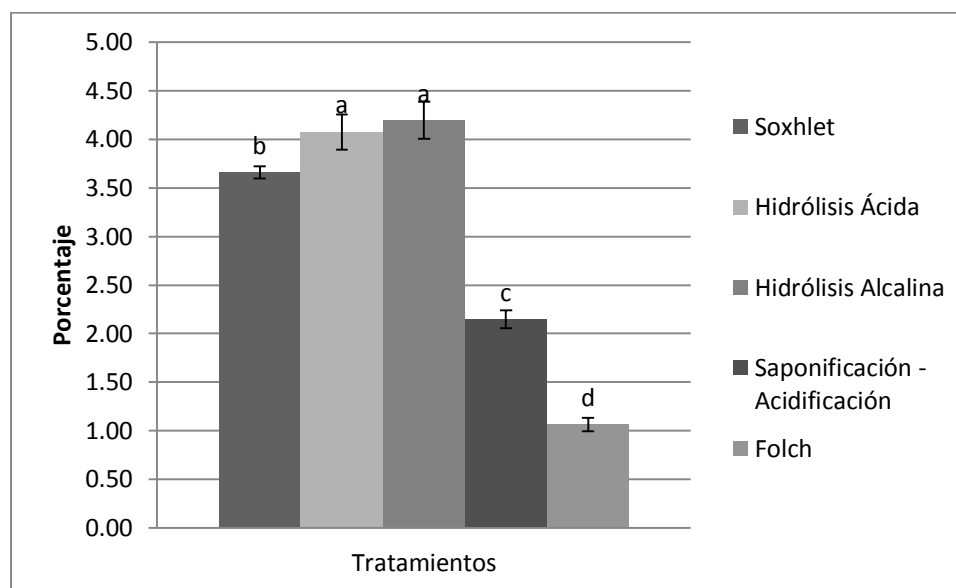


Figura 4. Obtención de lípidos totales por diferentes metodologías.

El contenido de lípidos totales en *S. cerevisiae* se fluctúa entre 3,5 y 14,7% dependiendo de la etapa de crecimiento y condiciones de cultivo (Alexandre *et al.*, 1994). Por otra parte se analizaron los lípidos de dos cepas de levadura de cerveza que pertenecen a la especie *S. cerevisiae* cultivadas en el fermentador de laboratorio en condiciones aeróbicas y descubrieron que contenían 6,6% de lípidos en la biomasa seca (Vendramin-Pintar *et al.*, 1995). El contenido de lípidos totales en el *S. uvarum* fue de 4,4% (Blagovic et al., 2001). Lo podría ser explicado por una disminución de la tasa de síntesis de lípidos debido a la bajada de ATP / ADP-relación de (16,17), ya que se obtuvo como un subproducto de la fermentación de la cerveza anaeróbica. Como también fue el caso de nuestro trabajo. En forma general se puede apreciar que en *Saccharomyces cerevisiae* el contenido de lípidos es muy bajo por lo que no es comparable con otras fuentes industriales de aceites.

7.4 Separación de las familias lipídicas.

7.4.1 Fosfolípidos

A partir de los lípidos totales se realizaron fraccionamientos basados en la solubilidad, se realizó el desgomado de la muestra, en este proceso se busca extraer los fosfolípidos de forma cruda. En la legislación y el comercio, se llama lecitina a las mezclas de diferentes lípidos polares, esencialmente fosfolípidos y glicolípidos, acompañados de cantidades variables de triglicéridos. Las lecitinas se extraen por medio de solventes a partir de aceites vegetales, principalmente de soja. Los principales componentes activos de la lecitina son fosfolípidos entre los que se encuentran la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina y el fosfatidilinositol en proporciones casi iguales. La fosfatidilcolina tiene propiedades de estabilización de emulsiones aceite en agua, mientras que la fosfatidiletanolamina y el fosfatidilinositol tienen capacidad de emulsionar agua en aceite. Posteriormente pueden modificarse mediante acetilación o hidroxilación para aumentar su poder emulsionante. Esta característica funcional les otorga una amplia variedad de aplicaciones en la industria alimentaria, en productos tan variados como margarinas, chocolate, productos de panificación e incluso encapsulación de grasas y texturizantes (Dyńska-Kukulska, y Ciesielski, 2012)

Desde el punto de vista nutricional en alimentación humana y animal presentan interés por el aporte de ácidos grasos esenciales y de fosfatidilcolina, compuesto que ha probado mejorar la digestibilidad, poseer efecto sobre el metabolismo del colesterol y la biosíntesis de acetilcolina, por lo que es usada en farmacia. Los

fosfolípidos son utilizados en la industria farmacéutica para la producción de soluciones de perfusión y la fabricación de liposomas.

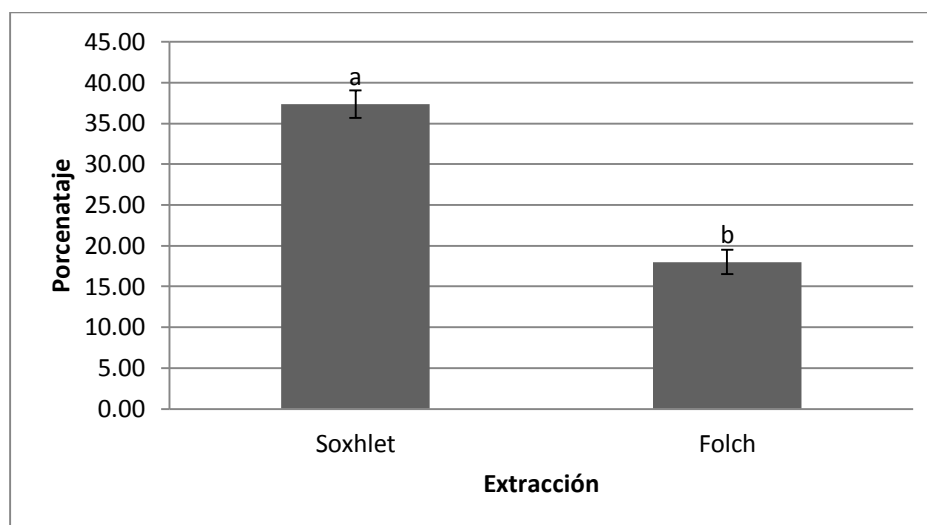


Figura 5. Porcentaje de fosfolípidos totales con respecto a los lípidos totales

Se analizaron las fracciones lipídicas obtenidas de las técnicas de soxhlet y de Folch resultando $37.36\% \pm 1.66$ de los lípidos polares del extracto hexánico de soxhlet y $18\% \pm 1.5$ del extracto crudo del método de Folch. Los resultados obtenidos por el método soxhlet concuerdan con el 31% de fosfolípidos respecto a los lípidos totales de levadura cervecera reportado anteriormente (Blagovic *et al.*, 2001). Sin embargo la recuperación de fosfolípidos presentada en el método de Folch es mucho menor, probablemente debido a la poca eficiencia de la mezcla de solventes para extraer este tipo de moléculas.

7.4.2 Caracterización y cuantificación de fosfolípidos

Se conocen protocolos para la separación de las diferentes fracciones para incrementar su eficiencia como emulsificante, basados en la solubilidad en fase alcohólica característica de la fosfatidilcolina (Dynska-Kukulska y Ciesielski, 2012).

Utilizando este principio además de la solubilidad en diferentes solventes de las fracciones fosfolípicas mediante una cromatografía de capa fina esta forma es posible hacer una aproximación de los principales fosfolípidos usando su solubilidad y su contenido de fósforo. De esta forma utilizando una técnica de cuantificación de fósforo por espectrofotometría y una separación por cromatografía de capa fina siguiendo los protocolos de la AOCS se observó que la fosfatidilcolina es el fosfolípido más abundante representando el $20.48 \% \pm 0.51$ de los fosfátidos totales, seguida de la fosfatidiletanolamina que representa el $23.07 \% \pm 1.12$, ácido fosfátídico en un $15.87 \% \pm 0.37$ y fosfatidilinositol con $6.17 \% \pm 0.25$.

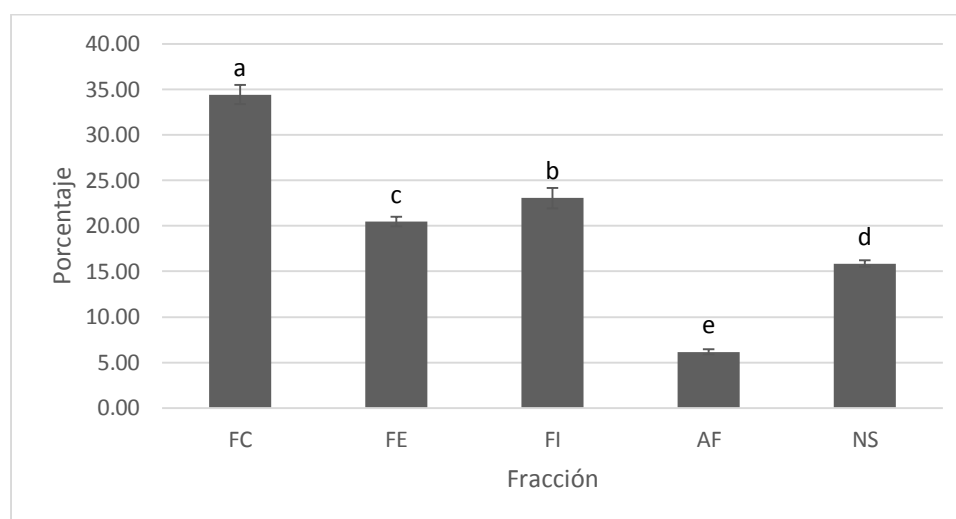


Figura 6. Porcentaje de fracciones de fosfolípidos.

Se ha observado en cepas utilizadas en proceso cervecero que existe una variación pronunciada en la relación fosfatidilcolina: fosfatidiletanolamina, conforme la levadura se ha reincorporado un mayor número de veces al proceso. Dichas variaciones fueron acompañadas por una fracción mayor de ácidos grasos

insaturados en las dos especies de fosfolípidos. Lo que sugiere que ambas especies de fosfolípidos (Jurešić *et al.*, 2009), e incluso los ácidos grasos (Beaven *et al.*, 1982), están altamente involucrados en la adaptación de la levadura de cerveza a las condiciones de estrés durante la fermentación. Estas proporciones de fosfolípidos concuerdan con los antecedentes bibliográficos al trabajar con cepas cerveceras, en las que se había observado tendencias parecidas (Blagovic *et al.*, 2001)

7.4.3 Separación según carga eléctrica.

Estas pruebas se realizaron de acuerdo a la afinidad a solventes que presentan las diferentes familias lipídicas en una cromatografía en capa fina, por lo que los lípidos polares se mantuvieron en la línea de salida, mientras que los lípidos neutros se tomaron a lo largo de la placa. Las bandas se rasparon de la placa y los lípidos neutros se agruparon. Los lípidos se recuperaron en cloroformo / metanol (2:1) y se determinaron gravimétricamente después de la eliminación de gel de sílice y disolventes. Los resultados obtenidos para el método de soxhlet son de $59.32\% \pm 2.12$ para lípidos neutros y $46.68\% \pm 2.12$ para lípidos polares lo que concuerda con los resultados reportados de 58% lípidos neutros y 42 % lípidos polares (Blagovic *et al.*, 2001), sin embargo en el método de soxhlet los valores difieren de forma significativa resultando en $45.7\% \pm 2.59$ para lípidos neutros y $54.3\% \pm 2.59$ para lípidos polares. Estas diferencias podrían deberse a las afinidades de los solventes o a cambios específicos en la levadura debido a condiciones de cultivo

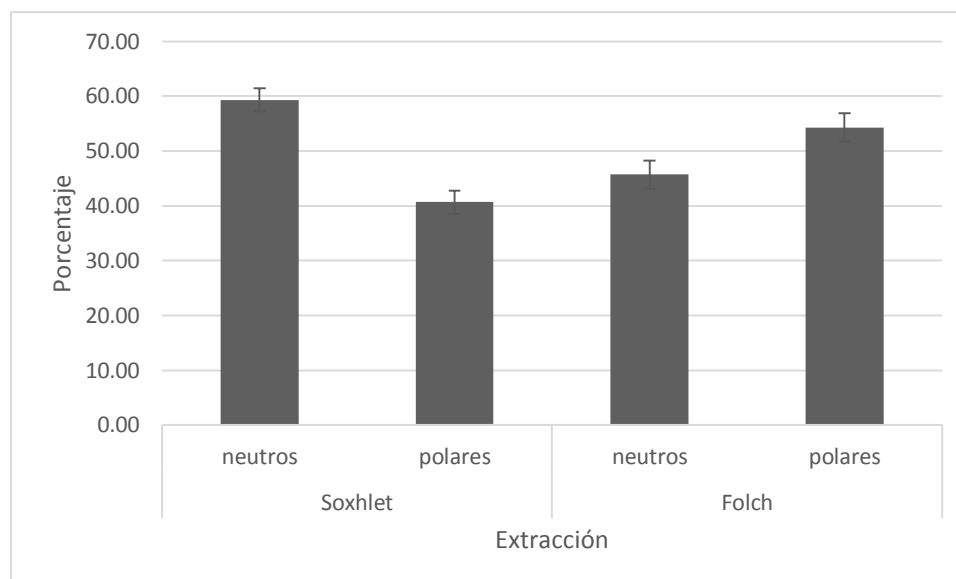


Figura 7. Relación de lípidos polares y neutros según el tipo de extracción.

7.4.4 Caracterización Físicoquímica

Se realizaron los ensayos para determinar las características físicoquímicas del aceite desgomado de *Saccharomyces cerevisiae*, los resultados se muestran en la Tabla 1.

Se puede observar que los resultados son congruentes con el tipo de aceite obtenido se trata de una grasa clara de olor característico a levadura que tiende a cristalizar a temperatura ambiente.

Tabla 1. Caracterización físicoquímica del aceite.

Parámetro	Resultado
Humedad	0.93 ± 0.03
Densidad	0.91 ± 0.05
Índice de peróxidos	4.61 ± 0.10
Índice de acidez	5.22 ± 0.09
Índice de yodo	33.27 ± 1.76
Materia Insaponificable	9.55 ± 0.37
Índice de saponificación	203 ± 1.22

Estos resultados son favorables para la mayoría de los criterios al compararlos con los parámetros de calidad de la FAO para aceites comestibles, en esta normativa se designa un valor de humedad o volátiles de 0.2%, en este caso la humedad es mayor, probablemente debido a una falta de purificación después del proceso de desgomado. El índice de acidez es superior al estipulado para aceites prensados en frío y vírgenes que es de 4.0 mg/g, sin embargo el valor obtenido experimentalmente que es de 5.22 ± 0.09 mg/g es inferior al límite de aceites de palma que es de 10.0 mg/g, por lo que aún podría considerársele un valor satisfactorio. A la vez que el índice de peróxidos 4.61 ± 0.1 es menor que el límite estipulado para aceites refinados que es de 10 meq. En cuanto al índice de saponificación $203 \text{ mg/g} \pm 1.22$, índice de yodo 33.27 ± 1.76 tiene un comportamiento parecido al del aceite de coco paraguayo para el que se reporta un índice de yodo de 26 a 32 y un índice de saponificación de 230 a 242, este aceite en específico difiere del aceite de coco estándar delimitado por la normativa de la FAO con parámetros de índice de yodo de 6.3 a 10.6 y un índice de saponificación de 248 a 265 estas diferencias podrían derivarse de diferencias adaptativas, ya que el aceite de coco se obtiene de *Acrocomia aculeata* y el de coco paraguayo de *Acrocomia totai* y se ha observado que esta última especie tiene una mayor resistencia al frío y a las heladas. En cuanto a la materia insaponificable se obtuvo un resultado de $9.55\% \pm 0.37$, es un valor muy alto, la normativa marca un promedio de 1.5% para la mayoría de los aceites, siendo la excepción el de maíz que admite hasta 2.8%, para los casos previamente mencionados del aceite de coco paraguayo se estima un valor de materia insaponificable de 0.7% y para el aceite de coco según la FAO presenta un valor de materia insaponificable de 1.5%. La materia insaponificable incluye

aquellas sustancias que se encuentran frecuentemente disueltas en grasas y aceites y las cuales no pueden ser saponificadas por el tratamiento cáustico normal, pero que son solubles en solventes de aceites y grasas. Incluidas en este grupo de compuestos están los alcoholes alifáticos de cadena larga, esteroides, pigmentos e hidrocarburos (NMX-K-306-SCFI-2006). Por lo que se asume que el contenido de estos es elevado.

7.4.5 Perfil de ácidos grasos

Se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia obteniendo los resultados mostrados en la tabla 2. Donde se puede apreciar la concentración de los diferentes ácidos grasos expresada en porcentaje con respecto a los lípidos totales. Fue posible apreciar que los lípidos encontrados en mayor concentración fueron el ácido palmítico en 32.5%, el ácido palmitoléico en 15.82%, el ácido oleico con 15.49%, el ácido esteárico con 13.61% y el ácido linoleico 7.56%.

Estos resultados concuerdan con los observado anteriormente que estos mismos lípidos estaban presentes en mayor abundancia en esta levadura obteniendo ácido palmítico en 44.2%, el ácido palmitoléico en 16.9%, el ácido oleico con 7.3%, el ácido esteárico con 13.9% y el ácido linoleico 2.9% (Blagovic *et al.*, 2001).

Aproximadamente el 70% de los ácidos grasos de la membrana lipídica de *S. cerevisiae* cultivada en condiciones normales de laboratorio consiste en ácidos monoinsaturados principalmente palmitoléico y oleico. El resto de los ácidos grasos son saturados, principalmente palmítico, y bajas cantidades de ácidos esteárico y mirístico y no se presentan ácidos poliinsaturados (Henry, 1982).

Tabla 2. Contenido de ácidos grasos en los lípidos de *Saccharomyces cerevisiae*

Nombre	Formula	%
Octanoico	C8:0	1.33
Decanoico	C10:0	3.41
Undecanoico	C11:0	0.38
Láurico	C12:0	1.66
Mirístico	C14:0	0.66
Pentadecanoico	C15:0	0.29
	C15:1 (CIS 7)	0.02
Palmítico	C16:0	32.50
Palmitoléico	C16:1 (CIS 7)	0.09
Palmitoléico	C16:1 (CIS 9)	15.82
Margárico	C17:0	0.14
Margaroleico	C17:1	0.02
Esteárico	C18:0	13.61
	C18:1 (TRANS 11)	0.01
Elaídico	C18:1 (TRANS 9)	0.02
Oleico	C18:1 (CIS 9)	15.49
Vaccénico	C18:1 (CIS 11)	0.24
	C18:1 (CIS 12)	0.07
	C18:1 (CIS 15)	0.00
	C18:2 (TRANS9, TRANS12)	0.00
	C18:2 (CIS 9, TRANS 12)	0.00
	C18:2 (TRANS 9, CIS 12)	0.00
Linoleico	C18:2 (CIS 9, CIS 12)	7.56
Linoleico Conjugado	C18:2 CONJUGADO	0.00
	C18:3 (TRANS 9, CIS 12, TRANS 15)	0.00
	C18:3 (CIS 9, TRANS 12, TRANS 15)	0.00
	C18:3 (CIS 9, TRANS 12, CIS 15)	0.00
	C18:3 (TRANS 9, CIS 12, CIS 15)	0.00
Alfa Linolénico	C18:3 (CIS 9, CIS 12, CIS 15)	0.26
Araquidónico	C20:0	2.65
Godoico	C20:1 (CIS 11)	0.00
Eicosapentaenoico	C20:5 (CIS 5, CIS 8, CIS 11, CIS 14, CIS 17)	3.03
Behénico	C22:0	0.05
Tricosénico	C23:0	0.00
Lignocérico	C24:00	0.00
Docosahexaenoico	C22:6 (CIS 4, CIS 7, CIS 10, CIS 13, CIS 16, CIS 19)	0.68

Sin embargo, el estrés provocado por la baja temperatura reduce la fluidez de la membrana (Suutari y Laakso, 1994) y se ha sugerido que este organismo se adapta incrementando la cantidad de residuos de ácidos grasos insaturados en la membrana lipídica para adaptarse a la baja temperatura (Hunter y Rose, 1972), este efecto es también producido por la presencia de etanol en el medio (Carman y Zeimetz, 1996).

A la vez cabe destacar la presencia de lípidos insaturados como son el ácido eicosapentaenoico con 3.03%, el ácido araquidónico con 2.65% el ácido docosahexaenoico con 0.68% el ácido alfa linolénico con 0.26% y el ácido palmitoléico con 0.09%. Es importante remarcar que el 43.31% de los ácidos grasos son insaturados, en estudios anteriores ya se había encontrado la presencia de ácidos grasos de cadena larga con múltiples insaturaciones como el eicosadienoico (Lamacka *et al.* 1998).

7.4.6 Esteroles

Los esteroides fueron cuantificados por cromatografía líquida de alta eficiencia resultando en un contenido de escualeno de 2.99% de los lípidos totales lo que contrasta con lo apreciable en estudios anteriores donde se puede observar que el ergosterol es el esteroide más abundante en *Saccharomyces cerevisiae* (Parks y Casey, 1995). El ergosterol es un precursor de la vitamina D, y es usado en la producción de corisona y flavona (Volkman, 2003) Es comercialmente producido por fermentación.

Sus síntesis puede ser incrementada hasta el 3% de la biomasa por modificaciones en el medio de cultivo (Parks y Casey, 1995) Se ha reportado que su síntesis no depende del crecimiento, si no de la tasa de consumo de oxígeno y el contenido de ergosterol se incrementa cuando la tasa de crecimiento disminuye y los parámetros fisiológicos como el oxígeno disuelto, la tasa de absorción de oxígeno de las células tienen influencia directa en la acumulación de ergosterol en levaduras. (Gibson et al., 2007) Esta molécula es responsable de la fluidez y permeabilidad de la membrana, de forma similar en que ocurre con el colesterol actúa en los mamíferos. Se ha apreciado que cuando el nitrógeno es limitado, las células ya no son capaces de producir biomasa, pero sigue sintetizando lípidos. Esto conduce a una acumulación de esteroides y otros lípidos en la célula. (Behalova *et al.*, 1992). Dichas condiciones se presentan durante la producción de cerveza, por lo que al tratarse de levadura obtenida como subproducto cervecero se podía esperar este comportamiento, como fue el caso de la levadura *Saccharomyces uvarum* en la que se pudo observar una concentración de 32.6% de escualeno y 9.5% de ergosterol de los lípidos totales. (Blagovic *et al.*, 2001) Las diferencias tan importantes con estos valores podría deberse a que se trata de uno de los precursores más estables durante la biosíntesis de ergosterol (Mizoguchi y Hara, 1997). O probablemente a que las técnicas de extracción empleadas no favorecen una extracción completa del ergosterol, como lo harían técnicas basadas en la saponificación con KOH 8M, y la extracción de la fracción no saponificable seguida de cuantificación por HPLC fase reversa (Lamacka y Sajbidor, 1997).

7.5 Obtención y cuantificación de polisacáridos.

Para la separación de polisacáridos se obtuvieron previamente las paredes celulares a partir de la muestra desgrasada mediante sonicación y centrifugación, obteniendo un rendimiento del 35% de la masa inicial de *S. cerevisiae*.

Entre un 80 y 90% del peso seco de la pared son carbohidratos poliméricos, estos son responsable de organizar la pared celular, ya que se interconectan simultáneamente glucanos, manoproteínas de la capa externa y quitina dando estructura a la célula (Magnelli P *et al.*, 2002). Diversos factores como la cepa con que se trabaje, las condiciones de fermentación y la edad del cultivo afectan el contenido de carbohidratos presentes en la pared (Reisinger *et al.* 1980).

La remodelación de la pared celular es importante en el contexto elaboración de la cerveza, ya que se ha demostrado que el potencial de la floculación de las cepas de levadura cervecera se altera por el crecimiento en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Lawrence y Smart, 2007). La expresión modificada de genes puede alterar la composición de la pared celular y la estructura, favoreciendo las interacciones de los receptores de lectina durante la floculación (Smart, 2003).

7.5.1 Mananos

Dentro del grupo de mananos se enlistan dos clases principales de biomoléculas los mananoligosacáridos y las mananoproteínas, moléculas de comportamiento similar en cuanto a sus procesos de extracción. No se dispone de mucha información del

contenido de mananos presente en la pared de la levadura de cerveza.

Los resultados obtenidos experimentalmente fueron de $20.42\% \pm 0.89$ para el método destructivo de extracción y de $13.49\% \pm 0.92$ para el método conservativo, si bien la diferencia entre ambos es estadísticamente significativa es relevante considerar que es factible recuperar otro tipo de biomoléculas a partir del efluente obtenido en este proceso. En estudios anteriores se pudieron encontrar contenidos de manano en una cepa de laboratorio de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* de 19 por ciento de manano (DiCarlo y Fiore , 1958).

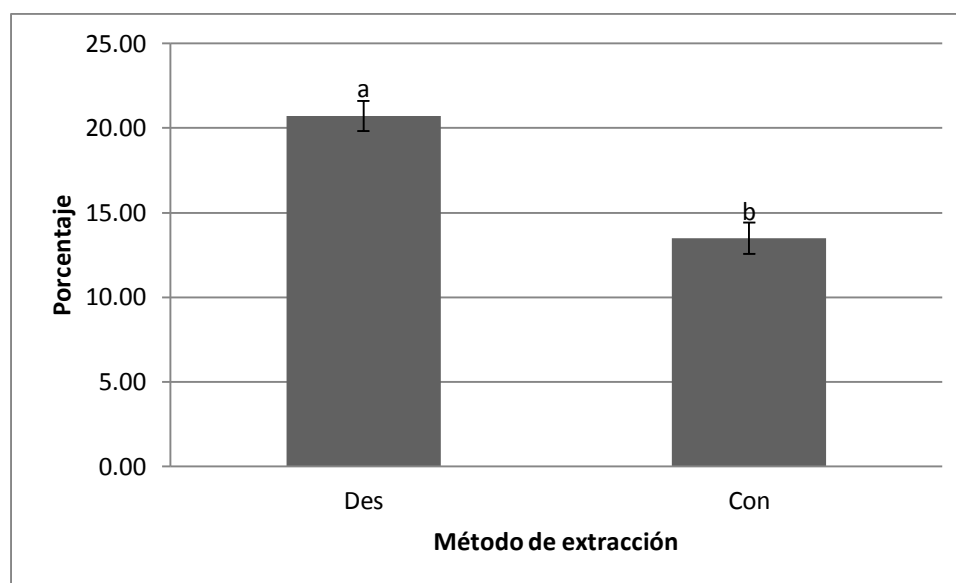


Figura 8. Relación del contenido de manano contra el peso de la pared.

La pared celular de la levadura representa un orgánulo dinámico que modifica la composición y la funcionalidad en respuesta a estímulos externos (Lesage y Bussey, 2006). Bajo condiciones de crecimiento aeróbicas, Cwp1p y Cwp2p son las mananoproteínas más abundantes de la pared celular y están implicadas en la biosíntesis de la pared celular durante la replicación celular (Van der Vaart et al.,

1995). Durante el estrés ambiental la composición de las mananoproteínas de las células cambia reduciendo los niveles de expresión de Cwp1p Cwp2p. La respuesta más común es la inducción de varias mananoproteínas homólogas como son Dan1p, Tip1p, Tir1p y Tir2p, durante el crecimiento anaeróbico (Abramova et al., 2001).

7.5.3 β -Glucano

Los resultados obtenidos experimentalmente fueron de $45.88 \% \pm 2.35$ para el método destructivo y de $25.13 \% \pm 1.47$, estos niveles concuerdan con lo encontrado por grupos de investigación anteriores en los que se concluye que las paredes celulares son, por tanto, una materia prima ideal para la fabricación de 1,3- B- glucano. Son baratos y muestran un contenido suficientemente elevado de glucano, que representa el 30 - 60 % del peso seco (Magnelli et al, 2002). En 1973, Modales et al. Encontrado la presencia de dos diferentes glucanos en la pared celular de la levadura : 1,3- B- glucano que contiene 3 % de B - 1 ,6 - glucosídicos vínculos como el componente principal representando un 85 % y 1,6 -B- glucano trivialmente llamado pustulano con b- 1 ,3- glucosídicos sucursales en pequeñas cantidades de alrededor del 15%

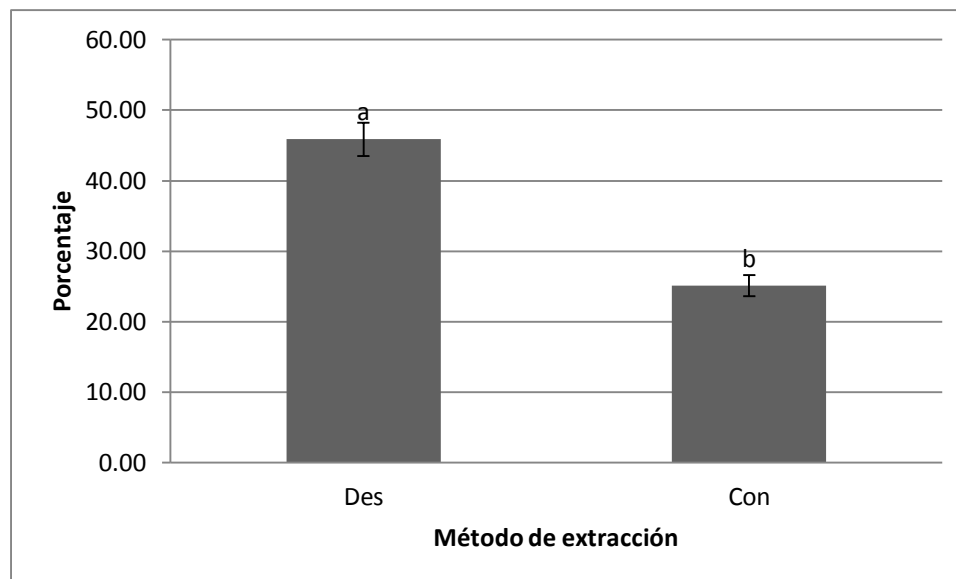


Figura 9. Relación del contenido de β -glucano contra el peso de la pared celular.

Los 1-3 β -glucanos son moléculas helicoidales de aproximadamente 1500 glucosas, que representan el 30-35 % de la masa celular. Su función es mantener la estructura mecánica de la pared celular. Mientras que los 1-6 β -glucanos son moléculas lineales de aproximadamente 150 glucosas, que representan el 10 % de la masa celular. (Magnelli *et al.*, 2002). Desde el descubrimiento de que glucano de la levadura tiene propiedades beneficiosas para el ser humano (Wasser y Weis, 1999) y animales (Dalmo, 2000) se han desarrollado muchos procesos para el aislamiento y purificación del polisacárido. La mayoría de ellos utilizan alcalino caliente, ácidos o una combinación de ambos, que solubilizan las proteínas y otros polisacáridos. El residuo insoluble restante se designa como 'glucano de levadura', pero a partir de la química de carbohidratos es bien sabido que las condiciones ácidas, así como alcalinas conducen a una degradación más o menos fuerte de las cadenas de glucosa, particularmente si el oxígeno está implicado. Por lo tanto, los rendimientos suelen ser

bajos que resultan en precios altos, o la pureza de glucano es limitada. Con el fin de mantener la estructura nativa del glucano garantizar un mínimo de degradación de la cadena, ha habido una necesidad de un proceso de fabricación suave, en el que se evitan, las condiciones de glucano-destruyendo drásticas, pero que son eficientes en términos de la producción de glucano y la eliminación de los componentes indeseables como las proteínas, lípidos y otros polisacáridos.

Las primeras preparaciones de levadura de panadería arrojaron un glucano enriquecido llamado zymosan, que mostró propiedades promotoras de la salud y los cuales se analizaron para contener aproximadamente 55 % de D - glucano , 19 % de manano , 15 % de proteína y 7 % de lípidos (DiCarlo y Fiore , 1958).

7.5.4 Quitina

La única metodología evaluada para la extracción de quitina fue una técnica degradativa de la matriz que se basa en la destrucción del resto de los componentes celulares, los resultados obtenidos fueron de $2.88 \% \pm 0.18$ del peso de la pared celular para la levadura caso de *Saccharomyces cerevisiae* se reporta un contenido del 2.9% de quitina en el peso seco de la pared celular. (Shirai, 1999), si bien no se trata de un contenido muy alto, al compararlo contra otras fuentes industriales aún al tratarse de material de subproducto, como es el caso del exoesqueleto de camarón del cual se puede obtener hasta un 48% de quitina.

7.6 Evaluación de la factibilidad

En cuanto a la factibilidad técnica, se lograron diseñar cuatro esquemas de procesamiento para la obtención de diferentes metabolitos de interés industrial.

Para todos ellos, dados los resultados observados en los experimentos realizados se pudo descartar la necesidad de técnicas de lisis celular previa a los procesos de extracción, ya que se demostró que no ejerce ningún efecto sobre la recuperación de biomoléculas de interés, a la vez que representa operaciones unitarias costosas en tiempo y energía. De igual forma se decidió trabajar por la metodología de secado por tambor, al ser una tecnología que presenta un bajo costo energético y tiempo de procesamiento, además que las características de la materia seca obtenida son idóneas para su inclusión en los diferentes procesos de extracción a los que se sometió la muestra.

Las primeras metodologías desarrolladas se centran en la recuperación de una sola fracción de polisacáridos y emplean técnicas destructivas de la muestra, por lo que la operación de recuperación y aislamiento de paredes celulares no fue necesaria, reduciendo el costo por esta operación unitaria, sin embargo, al recuperar solo un biopolímero se vuelven tecnológicamente menos deseables. A continuación se muestran los esquemas de procesamiento de las tres diferentes rutas para la obtención de polisacáridos.

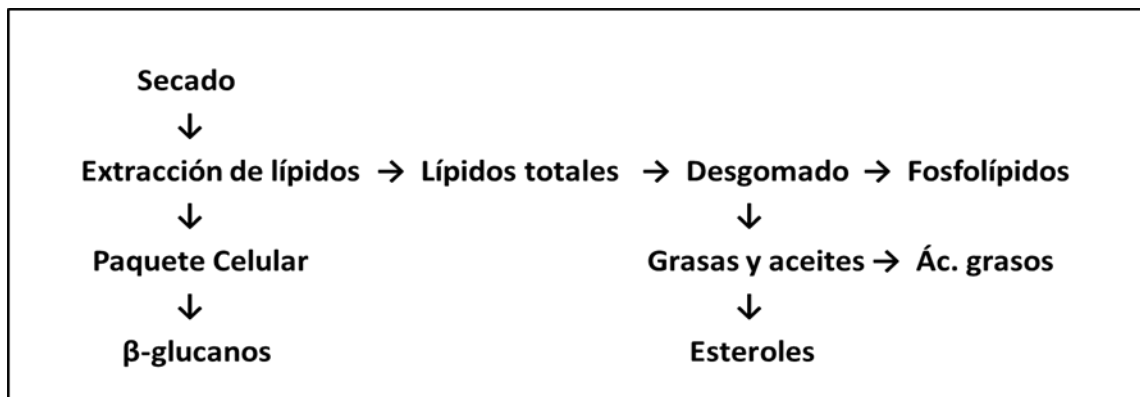


Figura 10. Esquema de procesamiento obtención de β-glucano.

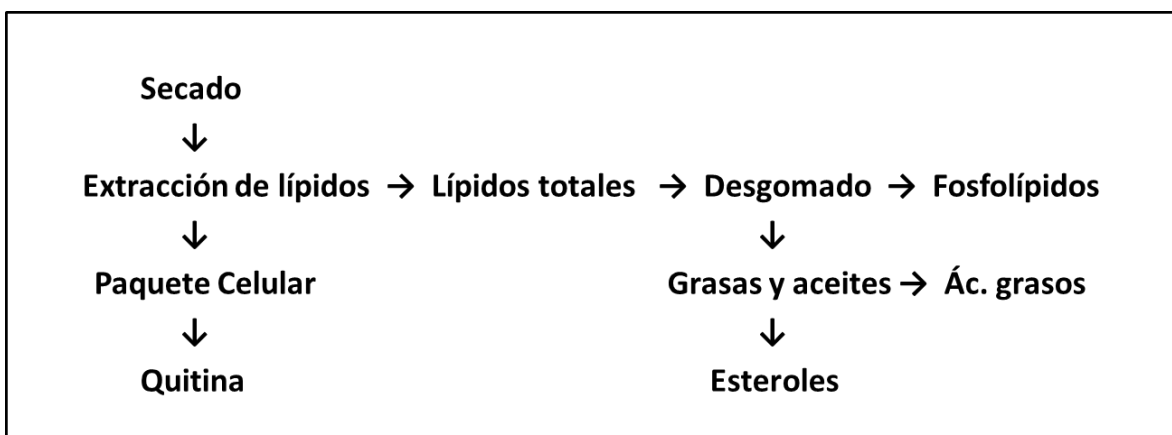


Figura 11. Esquema de procesamiento obtención de Quitina.

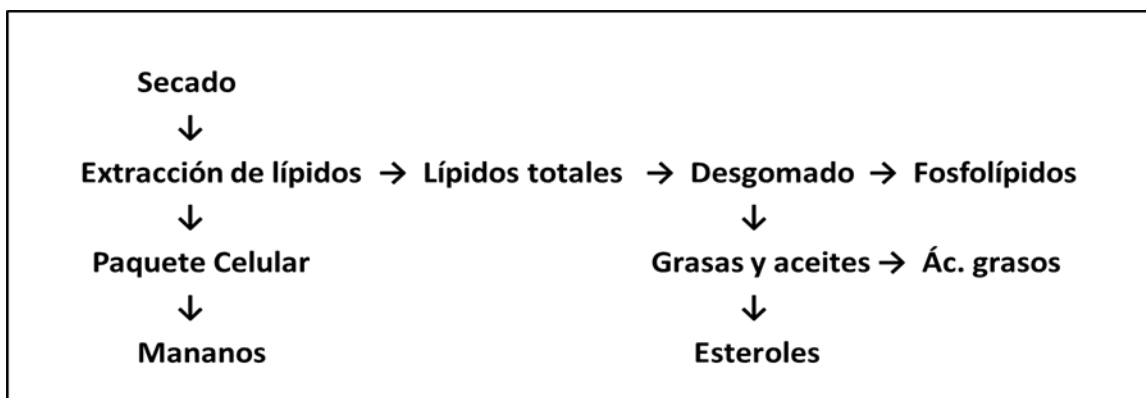


Figure 12. Esquema de procesamiento obtención de Mananos

Si se aborda desde una perspectiva holística, y se busca recuperar la mayor cantidad de biomoléculas en un proceso concatenado se obtuvo una metodología en la que se pueden obtener dos grupos de polisacáricos, y los tratamientos utilizados resultan menos agresivos, por lo que se espera que las moléculas presenten una constitución más parecida a su forma nativa, por lo que su actividad biológica o funcional sea mejor.

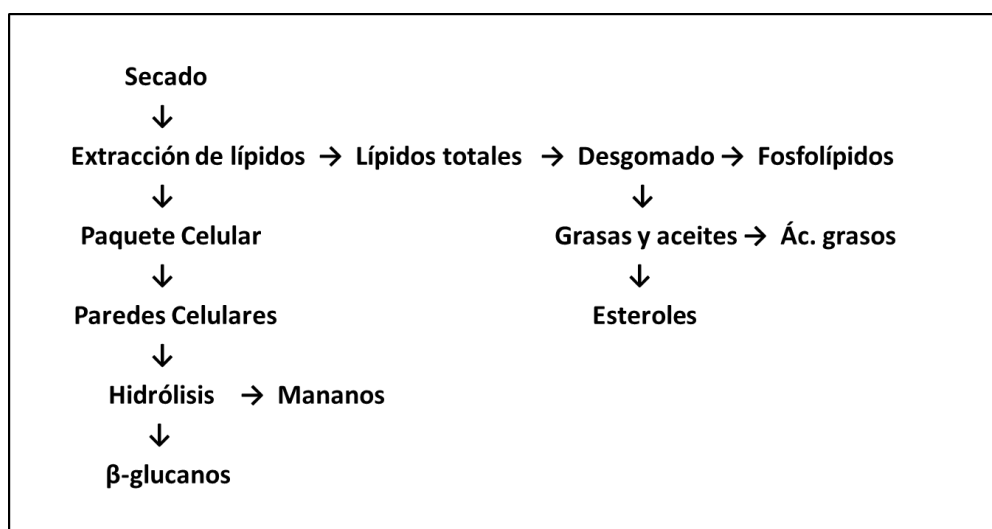


Figura. 13. Esquema integrado para obtención de metabolitos.

Una vez definidas las rutas que se pueden seguir para la obtención de cada uno de los metabolitos o de grupos de ellos según la factibilidad técnica es importante considerar la factibilidad económica, que se relaciona directamente con el rendimiento obtenido para cada biomolécula de interés, por lo que a continuación se presentan los resultados generales de las diferentes fracciones estudiadas expresadas en gramos por kilogramo de pasta seca de levadura, para contemplar de forma más clara la

factibilidad de realizar estas mismas extracciones a nivel industrial como un uso que de valor agregado a este subproducto.

Tabla 3. Rendimiento de las fracciones de *Saccharomyces cerevisiae* en base seca.

Fracción		g/Kg
Grasa		36.60
Ácidos grasos	Linoleico C18:2	2.77
	Docosaheptaenoico C22:6	0.25
Esteroles	Escualeno	1.09
Fosfolípidos	Totales	13.67
	fosfatidilcolina	4.71
	fosfatidiletanolamina	2.80
	fosfatidilinositol	3.15
	ácido fosfatídico	0.84
Pared Celular		337.19
β-Glucano	método degradativo	154.70
	método concatenado	84.72
Mananos	método degradativo	69.88
	método concatenado	45.49
Quitina	método degradativo	9.70

Considerando estos rendimientos, desde la perspectiva de los lípidos es importante considerar que las operaciones unitarias que tienen repercusiones más importantes sobre el costo de los productos extraídos, especialmente fosfolípidos y esteroles, se tratan de la extracción de grasa cruda con hexano, y la precipitación de fosfolípidos con etanol, sin embargo, es importante recalcar que estos procesos se vuelven rentables al considerar que estos solventes son recuperables a partir de los efluentes de los que se obtienen las moléculas de interés mediante un proceso de destilación, y que pueden ser reutilizados en este mismo proceso de forma cíclica sin perder volúmenes importantes en el procesamiento.

En cuanto a la fracción glicosídica obtenida por pasos secuenciales de mananos y β -glucanos, son dos las operaciones que aumentan de forma dramática el costo de obtención de estas moléculas, la primera de ellas es la obtención de paredes celulares, en este caso realizada utilizando lavados con urea, sin embargo si se desarrollan tecnologías que permitan la formación de un gradiente que favorezca recuperar paredes celulares con un compuesto que proporcione una osmolaridad similar y que no afecte la integridad de las paredes celulares, este costo podría reducirse dramáticamente. La otra operación unitaria que implica un incremento en el costo, es un proceso biotecnológico, es decir la utilización de enzimas proteolíticas para la degradación de la estructura de la pared durante la recuperación del β -glucano, en años futuros con el desarrollo de una industria biotecnológica con mayor rentabilidad se espera que el precio de las enzimas disminuya por lo que eventualmente esta operación unitaria podría disminuir su costo, pero está influenciada directamente por el desarrollo de esta industria. Superando estos dos rubros, es importante remarcar que las cantidades y concentraciones de ácidos y álcalis empleados por esta técnica son inferiores de forma muy significativa comparadas con las técnicas tradicionalmente empleadas para extraer este tipo de compuestos a partir de otras fuentes, aunado a la obtención de dos fracciones de polisacáridos lo que permitiría una mayor ganancia económica.

8 CONCLUSIONES

Dados los resultados de los experimentos podemos concluir que si bien todos los tratamientos de lisis celular provocan la muerte celular o al menos la inactivación metabólica, esto no representa una ventaja para la realización de las extracciones lipídicas por los que su implementación no resulta favorable en cuestión costo beneficio.

En cuanto a las tecnologías de secado, la integridad celular y la disminución de desviaciones indeseables del producto repercute de manera positiva en la extracción de lípidos, que se favorece por las técnicas que conservan mejor las características originales del producto, sin embargo, se prefiere la técnica de secado por tambor, ya que industrialmente es más factible y proporciona buenas características.

Los métodos de extracción que permiten una mayor recuperación de fracción lipídica implican la destrucción de la muestra, sin embargo para tratar de sacar mayor provecho de este subproducto se considera recomendable la aplicación de pasos concatenados para obtener diferentes fracciones con valor comercial. De igual forma para los polisacáridos.

Las relativas bajas tasas de rendimiento, disminuyen su impacto al tratarse de un subproducto de alta disponibilidad, a la vez que la utilización de metodologías tipo biorrefinería que permitan extraer de forma sucesiva diferentes compuestos le da valor como una fuente de metabolitos lipídicos y glicosídicos a nivel industrial.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

En esta investigación se dieron respuestas a algunas incógnitas planteadas; sin embargo, deja algunas preguntas que podrían averiguarse en el futuro. Algunos de los aspectos que se podrían dilucidar de mejor manera serían la rentabilidad económica y tecnológica de la obtención de los metabolitos tratados en esta tesis así como su implementación a escala piloto.

Por otra parte la caracterización funcional de los compuestos de interés en este proyecto, las capacidades emulsionantes de las diferentes fracciones de fosfolípidos, la actividad biológica de los esteroides aislados y las aplicaciones como espesantes, o formadores de películas de los diferentes polisacáridos con los que trabajamos.

10 LITERATURA CITADA

Abramova N.E., Cohen B.D., Sertil O., Kapoor R., Davies K.J. y Lowry C.V.. 2001. Regulatory mechanisms controlling expression of the DAN/TIR mannoprotein genes during anaerobic remodeling of the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 157:1169–1177.

Alexandre H, Rousseaux I y Charpentier C. 1994. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol Lett* 124: 17–21.

Arnezeder C y Hampel WA. 1990. Influence of growth rate on the accumulation of ergosterol in yeast-cells. *Biotechnology Letters* (12):277–282.

Badui-Sergal B. *Química de los alimentos*. 1993. Pearson Educación. México

Bairgian AJ. 2006. Asociación de Cerveceros Artesanales de la República de Argentina.[online] http://www.cervezasargentinas.com.ar/Las_levaduras_en_la_fermentacion.htm.

Beaven MJ, Charpentier C y Rose A. 1982. Production and tolerance of ethanol in

relation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *J Gen Microbiol* 128: 1447–1455.

Behalova B, Hozak P, Blahova M, Sillinger V. 1992. Effect of nitrogen limitation and sporulation on sterol and lipid formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiologica. International Journal for General, Environmental and Applied Microbiology, and Immunology.* (37):442–449.

Blagovic B, Rup J, Mesari M., Georgiú K. y Mari V. 2001. Lipid Composition of Brewer's Yeast. *Food technology. Biotechnology.* 39 (3): 175–181.

Bligh, EG y Dyer, WJ .1959. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37:911–917.

Boulton C. 2000. Trehalose, glycogen and sterol. *Brewing Yeast Fermentation Performance.* 1st edn SmartKA, ed, pp. 10–19. Blackwell Science, Oxford, UK.

Bracker, C,E. 1967. Ultrastructure of fungi. *Annual Reviews in Phytopathology* 5:343-374.

Brennan J.G., Butters J.R., Cowell N.D., Lilly A.E.V., 1980. Las operaciones de la ingeniería de los alimentos. *Acribia.* España. Pp 333-360

Burgstaller G. 1997. Levadura de cerveza, Un ingrediente proteico de alto valor para los animales domésticos. Unión de Cerveceros Bábaros. München.

Carman GM y Zeimet GM. 1996. Regulation of phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 271:13293–13296.

Connor WE, Lin DS, Neuringer M. 1993. Is the docosahexaenoic acid (DHA, 22:6, n-6) content of erythrocytes a marker for the DHA content of brain phospholipids? *FASEB Journal* (7): A152.

Cox CM, y Dalloula RA. 2010. Beta-glucans as immunomodulators in poultry: use and potential applications. *Avian biology research* 3 (4), 2010 171 – 178.

Crawford MA, Bloom M, Broadhurst CL. 1999. Evidence of the unique function of docosahexaenoic acid during the evolution of the modern hominid brain. *Lipids*; 34: 539-547.

Cunnane S. 1999. Modeling human infant requirements for long-chain polyunsaturated fatty acids. *British Journal of Nutrition*; 82: 163-164.

Dalmo R. 2000. Immunostimulatory b (1,3)-D-glucans; prophylactic drugs against threatening infectious diseases of fish. *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, 44, 95 – 106.

Deshpande MV. 1986. Enzymatic Degradation of Chitin and Its Biological Applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 45: 273-281.

Díaz-Casañas CE, Pereira-Cabral GH, Alfonso-Lorenzo W. 20012. Separación de fosfolípidos mediante la aplicación de fuerzas centrífugas. *Revista Cubana de Farmacia*. 46(1):4-10.

DiCarlo FJ, y Fiore JV. 1958. Composition of zymosan. *Science*, 127, 756 – 757.

Dominguez-Vergara AM, Vazquez-Moreno L y Ramos-Clamont-Montfort G. 2009. Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales. *Sociedad Latinoamericana de Nutrición*. 59: 358-3684.

Dynska-Kukulska K, y Ciesielski W. 2012. Methods of extraction and thin-layer chromatography determination of phospholipids in biological samples. *Rev Anal Chem* 31: 43–56.

Engler MB. 1992. Effects of omega-3, omega-6 and omega-9 fatty acids on vascular smooth muscle tone. *European Journal of Pharmacology*. (21): 325–328.

Ferket PR., Parks CW. y Grimes JL. 2002. Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. 22 pages. In: *Proc. Multi-State Poultry Feeding and Nutrition Conference*, Indianapolis, Indiana USA. May 14-16.

Flach J, Pilet PE, y Jollis P. 1992. What's new in chitinase research?, *Experientia* 48, 70 1-7.

Folch J, Lees M, y Sloane-Stanley GH. 1957. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497–509.

Folch-Mallol JL, Garay-Arroyo A, Lledías F, Covarrubias-Robles AA. 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de microbiología*. Vol. 46, 1-2. 24 – 46.

Freimund S, Sauter M, Käppeli O, y Dutler H. 2003. A new non-degrading isolation process for 1,3- β -d-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Polymers*, 54(2), 159–171.

García-Garibay M, Quintero-Ramirez R, López-Munguía. 2005. *Biotechnología Alimentaria*. LIMUSA.México.

Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JPR, Powell CD, y Smart K. 2007. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS microbiology reviews*. 31, 535–69.

Hansen ME, y Llanes A. 1994. Applications of crustacean wastes in

Biotechnology. En: Fisheries Processing: Biotechnological applications. A. M. Martin. Chapman & Hall. Londres. 174-205.

Heiderpriem RW, Livant PD, Parish EJ, Barbuch RJ, Broaddus MG, Bard M. 1992. A simple method for the isolation of zymosterol from a sterol mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. (43):741–74.

Henry SA. 1982. Membrane lipids of yeast: biochemical and genetic studies, 101-158. En Strathern JN, Jones W, y Broach JR. (ed.), *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: metabolism and gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Hooge D. 2004. Meta-analysis of broiler chicken pen trials evaluating dietary mannan oligosaccharide. *International Journal of Poultry Sciences*; 3: 179-188.

Horton H. R. 2008. *Principios de Bioquímica*. Pearson Educación. México.

Hunter K, y Rose AH. 1972. Lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* as influenced by growth temperature. *Biochimica et Biophysica Acta* 260:639–653.

Innis SM, Nelson CM, Rioux MF, King DJ. 1994. Development of visual acuity in relation to plasma and erythrocyte omega-6 and omega-3 fatty acids in healthy term

gestation infants. *American Journal of Clinical Nutrition* (60): 347-52.

Jurešić GC, Rupčić J, y Blagović B. 2009. Alterations in Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine Content During Fermentative Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* Brewer's Yeast. *Food Technology & Biotechnology*. 47; (3): 246-252.

Kapoor R y Huang YS. 2006. Gamma linolenic acid: an antiinflammatory omega-6 fatty acid. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. (7):531–534.

Koletzko B, Lien E, Agostoni C, Boehles H, Campoy C, Cetin I, Cenci T, Dudenhausen JW, Dupont C, Forsyth S, Hoesli I, Holzgreve W, Lapillonne A, Putet G, Secher JN, Symonds M, Szajewska H, Willatts P, Uauy R. 2008. The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. *Journal of perinatal medicine* 36; (1): 5-14.

Lamacka M. y Sajbidor J. 1997. Ergosterol determination in *Saccharomyces cerevisiae*. Comparison of different methods. *Biotechnology Techniques*, Vol 11, No 10, pp. 723–725.

Lamacka M., Sajbidor J., Bohovb P. 1998. Lipid isolation and fatty acid analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. Comparison of different methods. *Biotechnology*

Techniques, Vol 12, No 8, pp. 621–625.

Lawrence SJ y Smart KA. 2007. Impact of CO₂ induced anaerobiosis on the assessment of brewing yeast flocculation. *J Am Soc Brew Chem*.

Lesage G. y Bussey H. 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 317–343.

Lorenz RT y Parks LW. 1991. Involvement of heme components in sterol metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Lipids* 26:598–603.

Magnelli P, Cipollo J, Abeijon C. 2002. A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and b1-6 glucan fine structure. *Analytical Biochemistry*: 2002; 301: 136-150.

Magnelli P, Cipollo J, Abeijon C. 2002. A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and b1-6 glucan fine structure. *Analytical Biochemistry*: 2002 ; 301: 136-150

Makni M, Fetoui H , Gargouri NK, Gargouri M , Jaber H , Makni J. 2008. Hypolipidemic and hepatoprotective effects of flax and pumpkin seed mixture rich in omega-3 and omega-6 fatty acids in hypercholesterolemic rats *Food Chem Toxicol*. (46):3714–3720.

Mizoguchi H y Hara S. 1997. Ethanol-induced alterations in lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of exogenous fatty acid. *J Ferment Bioeng* 83: 12–16.

Naumann E, Van Rees AB, Onning G, Oste R, Wydra M y Mensink RP. 2006. B-Glucan incorporated into a fruit drink effectively lowers serum LDL-cholesterol concentrations. *American Journal of Clinical Nutrition* 83 (3): 601-605.

Nes WD, McCourt BS, Marshall JA, Ma J, Dennis AL, Lopez M, Li H, He L. 1999. Site-directed mutagenesis of the sterol methyl transferase active site from *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of novel 24-ethyl sterols. *Journal of Organic Chemistry*. (64):1535–1542.

Neuringer M, Anderson GJ, y Connor WE. 1988. The Essentiality of N-3 Fatty Acids for the Development and Function of the Retina and Brain *Annual Review of Nutrition* (8): 517-541.

Nonato RV, Mantelatto PE, Rossell CEV. 2001. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:1–5

Ohara, H. 2003. Biorefinery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(5-6), 474–7.

Osakabe K. 2002. The latest trend of ethanol manufacture. *Biosci Bioind* 60:118–121.

Parker-Barnes JM, Das T, Bobik E, Leonard AE, Thurmond JM, Chaung LT. 2000. Identification and characterization of an enzyme involved in the elongation of n–6 and n–3 polyunsaturated fatty acids *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (97): 8284–8289.

Parks LW y Casey WM. 1995. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annual Review of Microbiology*. (49):95–116.

Pinto M, Coelho E, Nunes A, Brandão T, y Coimbra M. 2014. Valuation of brewers spent yeast polysaccharides: A structural characterization approach. *Carbohydrate Polymers*, 1–8. doi:10.1016/ 2014.03.010.

Plato Logic Limited. 2010. *World Beer Report*. England.

Ratnayake WM y Galli C. 2009. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. *Annals of Nutrition and Metabolism* (55): 8–43.

Reid ID, y Bartnicki-Garcia S. 1976. *Cell-wall Composition and Structure of Yeast*

Cells and Conjugation Tubes of *Tremella mesenterica*. *Journal of General Microbiology* (1976), 96, 35-50

Reisinger O, Al-Bassam, R, Bizeau P, Bonaly R, y Galzy P. 1980. Ultrastructure study of a wild strain and three mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Hansen. *Cellular and Molecular Biology* 26, 227-233.

Romanin D, Diosma G, Rumbo M, Garrot EG. 2010. Estudio de la potencialidad probiótica de levaduras aisladas de kefir *Revista Argentina de Microbiología. Memorias del XII Congreso Argentino de Microbiología* 2010.32-33.

Russo GL. 2009. Dietary n - 6 and n - 3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Bioquimical pharmacology*. (77):937- 946.

Sajbidor J, Certik M, Grego J. 1994. *Chromatogr A*, 665 191–195.

Shirai K. 1999. Utilización de desperdicios de camarón para recuperación de quitina, proteína y pigmentos por vía microbiana. Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana.

Sjostrom B, Bergenstahl B, Kronberg B. 1993. A method for the preparation of submicron particles of sparingly water-soluble drugs by precipitation in oil-in-water

emulsions. II: Influence of the emulsifier, the solvent, and the drug substance. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. (82):584–589

Smart KA, Boulton CA, Hinchcliffe E y Molzahn S. 1995. Effect of physiological stress on the surface properties of brewing yeast. *J Am Soc Brew Chem* 53: 33–38.

Smart KA. 2003. Differential regulation of yeast cell wall mannoproteins in response to stress during brewing yeast fermentation. *Proc Congr Eur Brew Conv* 29: 481–489.

Stach D, Zheng YF, Perez AL, Oehlschlager AC, Abe I, Prestwich GD, Hartman PG. 1997. Synthesis and inhibition studies of sulfur-substituted squalene oxide analogues as mechanismbased inhibitors of 2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase. *Journal of Medicinal Chemistry*. (40):201–209

Subbiah MT y Abplanalp W. 2003. Ergosterol (major sterol of baker's and brewer's yeast extracts) inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and the potential role of its oxidation products. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. (73):19–23

Suutari M, y Laakso S. 1994. Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Critical Reviews in Microbiology* 20:285–328.

Thanardkit P, Khunrae P, Suphantharika M, y Verduyn C. 2002. Glucan from spent brewer's yeast: preparation, analysis and use as a potential immunostimulant in shrimp feed. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18: 527–539.

Valenzuela A, Sanhueza J, Nieto S. 2000. Ácidos grasos omega-3 de cadena larga en la salud y nutrición humana y animal: un modelo para el desarrollo de alimentos funcionales. *Aceites y Grasas*; (10): 526-33.

Valenzuela BA y Nieto KS. 2003. Ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal: su importancia en el desarrollo del sistema nervioso y visual. *Revista chilena de pediatría*. 74 (2); 149-157

Valenzuela BA, y Nieto MS. 2001. Ácido docosahexaenoico (DHA) en el desarrollo fetal y en la nutrición materno-infantil. *Revista médica de Chile*. 129(10): 1203-1211.

Van der Vaart JM, Caro LHP, Chapman JW, Klis FM y Abee T. 1995. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 177: 3104–3110.

Varnam AH y Sutherland JP. 1994. *Beverages. Technology, chemistry and microbiology. Food Products Series 2*. Champ & Hall. London UK.

Veen M, Stahl U, Lang C. 2003. Combined overexpression of genes of the ergosterol biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*.1267-1356.

Vendramin-Pintar M, Jernejc K., Cimerman A., *Food Biotechnol.* 9 (1995) 207–215.

Volkman JK. 2003. Sterols in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*.(60):495–506.

Von Schacky C y Dyerberg J. 2001. Omega 3 fatty acids. From eskimos to clinical cardiology—what took us so long? *World Rev Nutr Diet* 88:90–99.

Vrachtert H, DeMot R, editors. *Yeast biotechnology and biocatalysis*. Marcel Dekker; New York: 1990. pp. 103–146

Ward OP. 1991. *Biotecnología de la fermentación. Principios, procesos y productos*. Acibia. España.

Wasser SP, y Weis AL. 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: A modern perspective. *Critical Reviews in Immunology*, 19(1), 65 – 96.

Watkins BA, Li Y, Seifert MF. 2001. Nutraceutical fatty acids as biochemical and molecular modulators of skeletal biology. *JAm Coll Nutr* 20:417–420.

Xu R, Wilson WK, Matsuda SP. 2002. Production of meiosisactivating sterols from metabolically engineered yeast. *Journal of the American Chemical Society*. (124):918–919.

Yen CH, Dai YS, Yang YH, Wang LC, Lee JH, Chiang BL. 2008. Linoleic acid metabolite levels and transepidermal water loss in children with atopic dermatitis. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. (100):66–73.

Zakaria, Z. 1997. Lactic acid purification of chitin from prawn waste using a horizontal rotating bioreactor. Tesis de Doctorado. Universidad de Loughborough. Reino Unido.

Zechner-Karpan V, Petravi-Tominac V, Gospodari I, Sajli L, Dakovi S, y Filipovi-Grcic J. 2010. Characterization of β -Glucans Isolated from Brewer's Yeast and Dried by Different Methods. *Food Technology. Biotechnology*. 48 (2) 189–197.

Si quieres ser sabio, aprende a interrogar razonablemente, a escuchar con atención, a responder serenamente y a callar cuando no tengas nada que decir.

- Johann Kaspar Lavater