

APROVECHAMIENTO BIOTECNOLÓGICO DE PRODUCTOS AGROPECUARIOS II



*Guadalupe Bustos Vázquez, Gonzalo Velázquez de la Cruz,
Ernesto Rangel Torres, Efrén Compeán Ramírez, José Roberto Campos Leal*

Universidad Autónoma de Tamaulipas
Unidad Académica Multidisciplinaria Mante
Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán



Aprovechamiento biotecnológico de productos agropecuarios

II

Guadalupe Bustos Vázquez
Gonzalo Velázquez de la Cruz
Ernesto Rangel Torres
Efrén Compeán Ramírez
José Roberto Campos Leal

Universidad Autónoma de Tamaulipas
Unidad Académica Multidisciplinaria Mante
Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán



Primera edición: 2008

- © Guadalupe Bustos Vázquez, Gonzalo Velázquez de la Cruz,
Ernesto Rangel Torres, Efrén Compeán Ramírez y José Roberto Campos Leal
- © Universidad Autónoma de Tamaulipas
- © Consejo Tamaulipeco de Ciencia y Tecnología
- © Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica
- © Plaza y Valdés, S.A. de C.V.

Derechos exclusivos de edición reservados
para Plaza y Valdés, S.A. de C.V. Prohibida
la reproducción total o parcial por cualquier
medio sin la autorización escrita de los editores.

Plaza y Valdés, S.A. de C.V.
Manuel María Contreras 73. Colonia San Rafael
México, D.F., 06470. Teléfono: 5097 20 70
editorial@plazayvaldes.com
www.plazayvaldes.com

Calle de las Eras 30, B
28670, Villaviciosa de Odón
Madrid, España. Teléfono: 91 665 89 59
madrid@plazayvaldes.com
www.plazayvaldes.es

ISBN: 978-970-722-768-2

Impreso en México / *Printed in Mexico*

Esta obra se realizó con la colaboración de:
Dr. José Alberto Ramírez de León
Dr. Manuel Vázquez Vázquez
Dr. Simón Josías Téllez Luis

Agradecemos al Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica Conacyt-Gobierno del estado de Tamaulipas por el apoyo brindado para la coedición de este libro.

Índice

Introducción	13
Evaluación de lías de vinificación como fuente de ácido tartárico y como nutriente fermentativo económico	15
Evaluation of Vinification Lees as Source of Tartaric Acid and Low-Cost Fermentative Nutrient <i>Domínguez González, J. M.; Converti, A.; Bustos Vázquez, G.</i>	
Producción de transglutaminasa microbiana a partir de melaza de caña de azúcar	55
Production of Microbial Transglutaminase from Sugar Cane Molasses <i>Portilla Rivera, O. M.; Téllez Luis, S. J.; Velázquez de la Cruz, G.; González Cabriales, J. J.; Ramírez de León, J. A.; Vázquez, M.</i>	
Producción de ácido láctico en medios nutritivos adicionados con jarabes de fructosa a partir de la hidrólisis de la inulina del <i>Agave americana</i>	67
Production of Lactic Acid in Media Made from High-Fructose Fermentable Liquor Obtained from Hydrolysis of the Inulin of <i>Agave americana</i> <i>Gómez-Ayala, R. C.; Téllez-Luis, S. J.; Ramírez de León, J. A.; Vázquez Vázquez, M.; Jacques Hernández, C.</i>	
El mezcal de <i>Agave salmiana</i>: una bebida alcohólica étnica	77
The Mezcal from <i>Agave Salmiana</i> : an Ethnic Alcoholic Beverage <i>Barba de la Rosa, A. P.; De León-Rodríguez, A.</i>	

Biomineralización de oxalato de calcio en amaranto (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>)	91
Biomineralization of Calcium Oxalate in Amaranth (<i>Amaranthus Hypochondriacus</i>) <i>Barba de la Rosa, A. P.; Briones-Cerecero, M.;</i> <i>Ramírez-González, D.; Muñoz-Sandoval, E.; Terrones, H.; Terrones, M.</i>	
<i>Carica papaya</i>: composición química y actividad biológica de sus extractos	105
<i>Carica Papaya</i> : Chemical Composition and Biological Activity from its Extracts <i>Rodarte-Morales, A. I.; López-Cervantes, J.; Gutiérrez-Coronado, M. A.;</i> <i>Sánchez-Machado, D. I.</i>	
La introducción de transgénicos de maíz a México: ¿están completamente considerados los riesgos biológicos?	127
Introduction of Transgenic Corn to Mexico: Are the Biological Risks Considered? <i>Cervantes Martínez, J. E.; Mata Vázquez, H.; Rangel Torres, E.;</i> <i>García Delgado, M. A.; Bustos Vázquez, G.</i>	
Incidencia de hongos micotoxigénicos en maíz cultivado y almacenado en el norte de Tamaulipas, México	139
Incidence of Micotoxigenic Fungi in Cultivated and Stored Maize at Northern Tamaulipas, Mexico <i>Hernández-Delgado, S.; Reyes-Méndez, C. A.; Reyes-López, M. A.;</i> <i>García-Olivares, J. G.; Mayek-Pérez, N.</i>	
Evaluación de la neutralización de hidrolizados de paja de sorgo con carbonato de calcio e hidróxido de amonio para la producción de xilitol	155
Evaluation of the Neutralization of Hydrolysates of Sorghum Straw with Calcium Carbonate and Ammonium Hydroxide for the Xylitol Production <i>Sepúlveda-Huerta, E.; Ramírez de León, J. A.; Oliva Álvarez, M. A.;</i> <i>Herrera Guajardo, A.; González Cabriales, J. J.; Téllez Luis, S. J.;</i> <i>Vázquez Vázquez, M.</i>	

Cuantificación de glucosamina en quitina de residuos de camarón por HPLC.	165
Quantification of Glucosamine from Shrimp Waste by hplc <i>Sánchez-Machado, D. I.; López-Cervantes, J.; Gutierrez-Coronado, M. A.; Delgado-Rosas, K. E.</i>	
Conversión microbiana de ácido ferulico a vainillina	181
Microbial Conversion of Ferulic Acid to Vanillin <i>De Faveri, D.; Torre, P.; Aliakbarian, B.; Domínguez, J. M.; Perego, P.; Bustos, G.; Converti, A.</i>	
Probióticos en el comportamiento de pollos de engorda en la fase de iniciación	205
Probiotics on Performance of Broiler Chickens in the Starter Phase <i>Martínez-González, J. C.; Martínez-Herrera, F.; Soto-Castillo, J. J.; Castillo-Rodríguez, S. P.</i>	
Aplicación de la biotecnología para utilización de lignocelulosa y avances sobre bioproducción de xilitol.	217
Application of Biotechnology for Utilization of Lignocellulose and Advances on Xylitol Bioproduction <i>Silva, S. S.; Cunha, M. A. A.; Santos, J. C.; Carvalho, W.; Sarrouh, B. F.; Branco, R.; Coelho, T.C.; Santos, D. T.; Campos, J. R.</i>	
Aprovechamiento del bagazo de caña para la producción de xilitol	227
Use of the Sugar Cane Bagasse for the Production of Xylitol <i>Rodríguez Durán, N. A.; Bustos Vázquez, G.; Gámez García, S.; López González, P.; Compeán Ramírez, E.</i>	
Empleo de transglutaminasa microbiana en la industria alimentaria.	247
Use of Microbial Transglutaminasa in Food Industry <i>Del Ángel, J. A.; Rodríguez Durán, N. R.; Ramírez de León, J. A.; Bustos Vázquez, G.; Velázquez de la Cruz, G.; Rodríguez Durán, N. A.</i>	
Establecimiento de un proceso de producción de etanol a partir de caña de azúcar utilizando cepas autóctonas selectivas	255
Designing an Ethanol Production Process from Sugar Cane Using Selective Wild Strains <i>Aguilar Uscanga, M. A.; Gómez Rodríguez, J.</i>	

Procesamiento de levadura para la obtención de derivados: diferentes alternativas	271
Yeast Processing to Obtain Products: Several Alternatives <i>Otero, M. A.</i>	
Panorama general de la biotecnología aplicada al desarrollo de bioproductos para la agricultura en Cuba	289
General Overwiev of the Biotechnology Applied to Develop Bioproducts for the Agriculture in Cuba <i>Díaz de Villegas, M. E.; Altuna, B.; Villa, P.</i>	

Introducción

La biotecnología permite la bioconversión de residuos agroindustriales en productos de interés comercial mediante el uso de microorganismos. Además del interés económico que implica para la producción de productos de mayor valor agregado (enzimas, proteína unicelular, pigmentos, antibióticos, etc.), la utilización de subproductos agroindustriales tiene incidencia en la preservación del medio ambiente al considerar el desarrollo de tecnologías orientadas hacia una transformación sustentable de los recursos naturales. La búsqueda de materias primas de bajo costo y fácil adquisición para utilizarse como sustratos fermentables (fuentes de carbono o de nitrógeno) constituye uno de los retos más interesantes de la biotecnología actual. Por ello, es de especial importancia la investigación dirigida a encontrar medios de cultivo alternativos que sean económicamente competitivos. En este sentido, existen diversos subproductos de la agroindustria que podrían ser utilizados como sustratos no convencionales para la obtención de productos de interés económico como los aditivos alimentarios.

Los aditivos alimentarios son sustancias que desempeñan una función esencial en las cualidades y características de los alimentos que exigen los consumidores y cumplen una función muy importante en el complejo sistema del abastecimiento alimentario. Los aditivos se adicionan intencionalmente a los alimentos para modificar sus propiedades, facilitar su conservación, mejorar su apariencia, conferir sabor o color al alimento y en ningún caso tienen un papel enriquecedor del alimento.

El Cuerpo Académico Ciencia y Tecnología Agroalimentaria en colaboración con el Cuerpo Académico de Alimentos y Nutrición a través de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos (Somenta), lleva a cabo el Encuentro Académico: Avances en el Aprovechamiento Biotecnológico de Productos Agropecuarios. Este foro ofrece una plataforma que permite, a los grupos de investigación naciona-

les e internacionales, compartir los avances científicos en el área del aprovechamiento biotecnológico de productos agrícolas para la producción de aditivos alimentarios. Asimismo, permite establecer redes de colaboración entre los participantes en el evento.

Ma. Guadalupe Bustos Vázquez

Evaluación de lías de vinificación como fuente de ácido tartárico y como nutriente fermentativo económico

Evaluation of Vinification Lees as Source of Tartaric Acid and Low-cost Fermentative Nutrient

Domínguez González, J. M.¹; Converti, A.²; Bustos Vázquez, G.³

Resumen

Todo fenómeno que contribuye a modificar el equilibrio de un medio vivo representa una fuente de contaminación. Es el caso de los vertidos orgánicos de las actividades agroalimentarias y, por lo tanto, de los efluentes de origen vitivinícola, como las lías de vinificación. Aunque son naturales y no representan en general toxicidad, estos vertidos pueden dar lugar a la destrucción de la fauna y flora del medio cuando se vierten en gran cantidad en un río, un estanque o un lago. La actividad vitivinícola es hoy considerada como una industria susceptible de producir daños medioambientales y, por ello, deben tratarse sus residuos, particularmente si tenemos en cuenta que la producción de aguas residuales en este sector en España se sitúa en $18 \cdot 10^6$ m³/año, seis veces más que la cantidad de residuos generados en Francia o Italia.

Las lías de vinificación se producen en las bodegas, durante el proceso de elaboración del vino. En ocasiones se destilan para recuperar alcoholes y sustancias aromáticas, quedando por lo tanto unas lías empobrecidas en estos compuestos. La

¹ Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Vigo (campus Ourense), As Lagoas s/n, 32004, Ourense, España, teléfono: 34-988-387047; fax: 34-988-387001, e-mail: jmanuel@uvigo.es

² Department of Chemical and Process Engineering "G. B. Bonino", Via Opera Pia 15, I-16145 Génova, Italia.

³ Departamento de Biotecnología, Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Blvd. E. C. Glez. 1201.

composición de las lías varía en función de si se han destilado o no y del trasiego del que proceden.

Los nutrientes empleados tradicionalmente en los medios fermentativos resultan muy costosos para llevar a cabo el proceso a escala industrial, por lo que la búsqueda de nutrientes alternativos, que sean económicamente competitivos es particularmente interesante. Dado que las lías son básicamente levaduras muertas, esta fracción residual constituye una fuente potencial de nutrientes.

Las lías, además, se caracterizan por contener elevados contenidos de tartratos, subproducto de importante valor económico y aplicación como corrector de acidez en la elaboración del vino. El ácido tartárico se puede recuperar por solubilización con HCl, posterior precipitación a tartrato cálcico con CaCO_3 y CaCl_2 , redisolución con HCl y final recuperación por cristalización. Las lías así tratadas son aptas para ser utilizadas directamente en aquellos casos en los que los microorganismos posean capacidad para romper las células no autolisadas e hidrolizar las proteínas y péptidos procedentes de las levaduras presentes en las lías. Para el resto de los microorganismos será necesaria una segunda etapa de pretratamiento de las lías encaminada a la liberación de los componentes intracelulares y la hidrólisis de las macromoléculas, empleando distintos métodos de rotura celular:

- a) Procedimientos mecánicos como rotura mecánica.
- b) Procedimientos químicos como permeabilización.
- c) Procedimientos enzimáticos como rotura o lisis.
- d) Otros métodos como termólisis o permeabilización.

De este modo se pretende desarrollar una tecnología rentable para el aprovechamiento de lías como nutrientes económicos y como fuente de ácido tartárico.

Abstract

Every phenomenon that changes the balance of an ecosystem represents a pollutant system. This is the case of the organic wastes from the agro-alimentary activities, and thus the effluents of the viticulture, as the vinification lees. **Although, they are natural** and do not show a big toxicity, these effluents can give place to the destruction of the fauna and flora when they are spilt in great quantity in a river, a reservoir or a lake. The wine activity is considered to be today an industry capable of producing environmental damages, and consequently these residues must be treated, particularly if we take into account that the production of waste water in this sector in Spain is $18 \cdot 10^6$ $\text{m}^3/\text{año}$, six folds the amount generated in France or Italy.

Vinification lees are produced in wineries, during wine elaboration. In occasions they are distilled to recover alcohols and aromatic substances, staying therefore some impoverished lees in these compounds. The composition changes depending on if they have been distilled or not and of the decanting from which they come.

Nutrients traditionally employed in fermentative media turn out to be very expensive to carry out the process in an industrial scale, thus searching for alternative nutrients, more economic, is very interesting. Because of lees are basically death yeasts, this fraction is a potential source of nutrients.

Lees, besides, are characterized by having high tartrate contents, which is a sub-product with important economic value and application to correct acidity in the elaboration of wine. Tartaric acid can be recovered by solubilization with HCl, further precipitation to calcium tartrate with CaCO_3 y CaCl_2 , solution with HCl and final recovery by crystallization. These lees are also suitable to be used directly in those cases in which the microorganisms possess aptitude to break the no autolized cells and hydrolyzed proteins and peptides coming from yeasts present in lees. Other microorganisms must be necessary a second stage to release the intracellular compound by using different methods, such as:

- a) Mechanic procedures such as mechanic breakdown.
- b) Chemical procedures such as permeabilization.
- c) Enzymatic procedures such as breakdown or lysis.
- d) Other methods such as thermolysis or permeabilization.

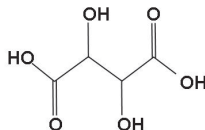
In this way, we tray to develop a suitable technology to use lees as an economic nutrient and source of tartaric acid.

Introducción

El ácido tartárico ya era conocido por los griegos y los romanos, y se encuentra en la naturaleza en forma de tartrato de hidrógeno y potasio en el zumo de la uva. Fue aislado por primera vez el año 1769 por el químico sueco Carl Wilhelm Scheele.

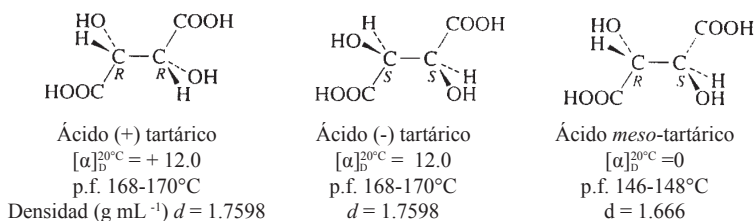
Estructura química

El ácido tartárico es un ácido dicarboxílico natural. Su fórmula es: $\text{HOOC-CHOH-CHOH-COOH}$. Contiene, por tanto, dos grupos carboxílicos y dos grupos alcohol en una cadena de hidrocarburo lineal de longitud cuatro. La figura 1.1 muestra su estructura. El nombre sistemático del ácido tartárico es ácido 2,3,-dihidroxibutano-dioico. Este ácido contiene dos centros quirales con idéntica sustitución. Por tanto, existe como un par de enantiómeros y una forma meso aquiral.

Figura 1.1. Estructura del ácido tartárico


En la figura 1.2 se muestran los distintos estereoisómeros del ácido tartárico. El enantiomero destrógiro del ácido tartárico está ampliamente extendido en la naturaleza y se encuentra en muchos frutos. El ácido tartárico levógiro puro, así como el isómero meso, no son tan habituales.

El ácido tartárico tiene una importancia histórica, ya que fue la primera molécula quiral cuyo racemato se separó en los dos enantiómeros correspondientes. Ello tuvo lugar en 1848, mucho antes de que se planteara la estructura tetraédrica del carbono. Lo único que se sabía era que el ácido tartárico de la fruta era dextrógiro, y que de la uva podía aislarse otra forma del ácido tartárico, ópticamente inactiva. Esta última se denominaba corrientemente ácido racémico (*racemus*, latín, racimo de uva).

Figura 1.2. Estereoisómeros del ácido tartárico


El químico francés Louis Pasteur obtuvo una muestra de sal sódico-amónica de este ácido y observó que estaba formado por dos tipos de cristales, unos imagen especular de los otros. Separando manualmente ambos tipos de cristales, disolviéndolos en agua y midiendo su rotación óptica, Pasteur comprobó que una de las formas cristalinas era idéntica a la forma natural del ácido (+) tartárico y que la otra era la forma levógira. La quiralidad de las moléculas se traducían en quiralidad macroscópica del cristal, algo relativamente infrecuente. Pasteur concluyó que las propias moléculas debían ser quirales.

A partir del ácido tartárico se puede obtener otro ácido empleado en enología el ácido metatartárico. Se obtiene por el calentamiento a 170°C del ácido tartárico a la presión atmosférica, o de 150°C cuando la presión es reducida, produciéndose entre las moléculas del ácido tartárico una esterificación parcial entre sus funciones ácidas y alcohólicas. Se obtiene un producto polimerizado, que presenta la propiedad de impedir la formación de cristales de tartratos en el vino.

Propiedades físicas y químicas del ácido tartárico

Las principales características físicas y químicas del ácido tartárico son:

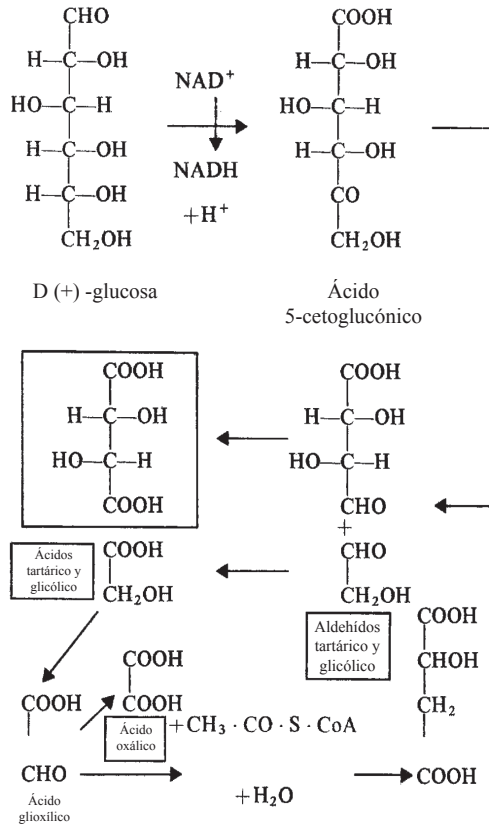
- Denominación: L - (+) - Ácido Tartárico
- Fórmula específica: $C_4H_6O_6$
- Peso molecular: 150.09 g/mol
- Punto de fusión: 168 °C - 170 °C
- Temperatura de descomposición: > 220 °C
- Estado físico (Condiciones estándar): sólido
- Apariencia: blanca
- Olor: inodoro
- pH en solución al 1%: 2.1
- Rotación específica (solución al 20%): +11,90 : +12,80
- Solubilidad en agua a 22 °C: 1 390 gr/l
- Constantes de disociación: $K_1 = 1,04 \times 10^{-3}$; $K_2 = 4,05 \times 10^{-5}$
- Presentación comercial: Cristales monoclinicos translucidos, o en forma de polvo blanco inodoro y agradable sabor ácido. Estable al aire y nada higroscópico.

Síntesis del ácido tartárico

El ácido tartárico es un producto secundario del metabolismo de los azúcares, con una síntesis muy lenta. En la figura 1.3 se muestra un esquema de la síntesis. Una primera posible explicación es la transformación de la glucosa en ácido-5-cetogluconico, el cual pasa a los aldehídos tartárico y glicólico, el primero por oxidación se transforma en ácido tartárico y el segundo en los ácidos glicólico, oxálico y glioxílico. Otra posible hipótesis se encuentra en la transformación del ácido ascórbico

en ácido tartárico, no conociéndose exactamente cómo llega a formarse el primer compuesto a partir de los azúcares.

Figura 1.3. Síntesis del ácido tartárico



Formación del ácido tartárico en la vid

En las vides se puede distinguir una parte enterrada, formada por las raíces de mayor o menor grosor y más o menos viejas, cuyas extremidades, más finas y jóvenes,

constituyen la cabellera. Y otra parte aérea o vuelo en la que hay que distinguir: el tronco, brazos y sarmientos que duran varios años, y las hojas, frutos y zarcillos, cuya duración no pasa corrientemente de un año. La zona que une estas dos partes, la subterránea y la aérea, se llama cuello. Las partes de la vid donde se sintetiza el ácido tartárico son las hojas jóvenes y las bayas verdes.

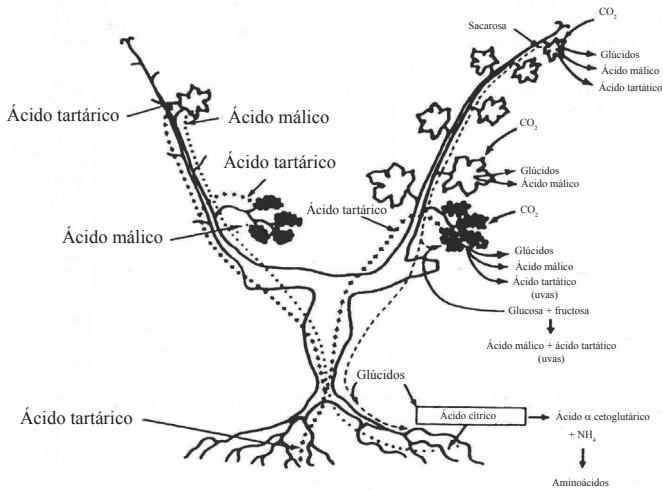
La vid es una de las pocas plantas en que el ácido tartárico es sintetizado en las hojas, lo cual también acontece con el ácido málico, teniendo como precursor a la glucosa. Las hojas adultas no conducen a la formación de ácido tartárico. El inicio de la formación del ácido tartárico tiene lugar en las hojas de la vid. En esta parte de la planta es donde tiene lugar la fotosíntesis, la respiración y la transpiración. Mediante la fotosíntesis se elaboran nutrientes a partir de elementos inorgánicos simples utilizando la energía proveniente de la luz. La energía es captada por los cloroplastos, los cuales contienen clorofila, que es la encargada de combinar el anhídrido carbónico extraído del aire y el agua proveniente del suelo, desprendiendo oxígeno. Como consecuencia de este proceso surgen los hidratos de carbono (azúcares, almidón, etc). El nutriente básico es la glucosa a partir de la cual son sintetizados todos los demás elementos.

La respiración, al igual que en el resto de las plantas, se realiza absorbiendo el oxígeno presente en el aire y expulsando el gas carbónico. Esta función vital para la cepa, se realiza en los estomas. Los estomas se encuentran en las hojas, favorecen la transpiración o evitan la desecación en función de la cantidad de agua que se encuentre en la hoja. Durante la respiración se libera energía que es utilizada por la cepa para el crecimiento, la reproducción, la formación de frutos, la absorción de nutrientes, la constitución de diversas sustancias químicas, tales como los ácidos tartárico, málico, taninos, etc.

El ácido tartárico se forma por un corte de la molécula de glucosa entre los átomos de carbono 4 y 5. Una vez formado se transporta hacia las raíces, donde se acumula sin transformación, para ser transportado a los órganos verdes. Durante la migración a los órganos verdes parte del ácido tartárico puede oxidarse a ácido málico. En la figura 1.4 se muestra la formación del ácido tartárico en las diferentes partes de la vid, además de otras sustancias orgánicas.

La uva es de los pocos frutos de origen europeo que acumula ácido tartárico, encontrándose el isómero L(+), con concentraciones en el momento del envero del orden de 20 a 25 g/L y de 3.5 a 11.5 g/L en la maduración. El desarrollo de las bayas empieza con la polinización y continúa hasta el estado de madurez o, eventualmente, de sobremadurez si la recolección se retrasa. Se produce un crecimiento en volumen de las bayas acompañado de una evolución de las características físicas (color,

Figura 1.4. Formación de sustancias orgánicas y su transporte



Fuente: Ribéreau-Gayon, 1975.

firmeza) y de la composición química de las uvas (azúcares, ácidos, compuestos fenólicos). Se distinguen dos periodos a lo largo del desarrollo del fruto: un periodo herbáceo y un periodo de maduración.

Periodo herbáceo. Durante el crecimiento herbáceo de la baya, ésta se comporta como un órgano clorofiliano en crecimiento. Su respiración es activa con un máximo al cabo de cuatro semanas. Su fotosíntesis es intensa al principio pero disminuye progresivamente hasta el final del periodo. Las bayas verdes pueden sintetizar ácidos orgánicos, principalmente ácido málico y ácido tartárico. La síntesis de ácido tartárico se realiza simultáneamente y del mismo modo que en las hojas jóvenes, a partir de la glucosa. Al final de la etapa herbácea, el contenido en azúcar de las bayas es pequeño; por el contrario, los contenidos de ácido málico y de ácido tartárico son elevados.

Periodo de maduración. Comienza con el envero, un periodo de evolución rápida de las características físicas y bioquímicas de la uva y termina con el estado de madurez. En esta etapa la baya cambia de color, engrosa y se comporta como un órgano de transformación y, sobre todo, de almacenamiento. La composición de la uva cam-

bia, en principio, bruscamente al comienzo del periodo y después progresivamente. La acidez disminuye, mientras que aumenta el contenido en azúcares, compuestos fenólicos y compuestos aromáticos. El crecimiento del contenido en azúcares se debe esencialmente a la migración de azúcares producidos por fotosíntesis, por movilización eventual de reservas y por transformación del ácido málico en azúcares; siendo ésta última causa de menor importancia.

La disminución de la acidez tiene diversas causas:

- *Degradación respiratoria:* Los ácidos orgánicos sirven de sustrato a la respiración. La degradación aumenta con la temperatura, por lo que la acidez es más reducida los años de verano cálido. Esta degradación afecta al ácido tartárico por encima de 30° C.
- *Transformación del ácido málico en azúcares:* La síntesis de azúcar a partir de ácido málico, llamada gluconeogénesis, participa en la disminución de la acidez.
- *Fenómenos de dilución:* Durante la maduración, la uva engorda por aporte de agua a través de la raíces, lo que contribuye a disminuir la concentración en ácidos.
- Migración de las bases procedentes de las raíces.

A pesar de la disminución de la acidez, el contenido en ácido tartárico permanece sensiblemente constante, ya que la síntesis y las migraciones equilibran las pérdidas por respiración. En periodo seco este contenido disminuye y, por el contrario, aumenta después de la lluvia.

Situación del ácido tartárico en el grano de uva

Las bayas o granos de uva presentan en todos los casos una estructura formada por una película exterior llamada *hollejo*, una masa que rellena interiormente la baya conocida como pulpa y en el centro un número variable de semillas o pepitas.

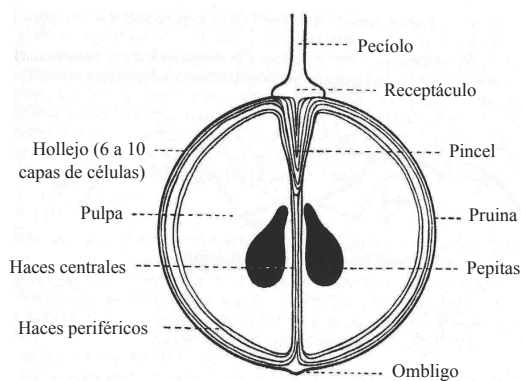
El *hollejo* tiene por misión encerrar los tejidos vegetales que contienen las sustancias de reserva que acumula el fruto, proteger las semillas como elementos perpetuadores de la especie hasta llegar a su maduración y defender estas estructuras de las agresiones externas. Representa una fracción variable desde el 8 al 20 por 100. El contenido en ácidos orgánicos de esta parte de la uva es muy reducido, alrededor del 1 por 100.

Las pepitas constituyen los elementos de la vid encargados de perpetuar la especie por vía sexual. El número de pepitas es variable, puede existir desde ninguna pepita, hasta una, dos, tres o cuatro como máximo. En esta zona de la uva no hay ácidos orgánicos.

La pulpa es la zona más voluminosa del grano de uva, representando un 75 a 85 por 100 del peso de éste. La parte exterior de la pulpa se conoce con el nombre de *mesocarpio*, sus células se confunden en la periferia con las del hollejo, presentan una forma poligonal y sus paredes son más delgadas que las de la piel. El interior de la pulpa se denomina *endocarpio*, que se compone a su vez de dos capas, la más externa de células alargadas situadas en posición radial y de paredes más gruesas, y las que rodean las pepitas, también de forma alargada, situándose en este caso de manera tangencial respecto del centro del grano de uva y pepitas.

La pulpa es un tejido de acumulación de las sustancias sintetizadas por la vid. Todas estas sustancias están contenidas en las vacuolas de las células de la pulpa y proceden en su mayoría de otros lugares de la planta o en menor cuantía de la síntesis del propio racimo.

Figura 1.5. Corte esquemático de un grano de uva



Fuente: Peynaud, 1989.

El agua es el compuesto mayoritario que contiene la pulpa, pero los compuestos más importantes son los azúcares y los ácidos orgánicos, entre ellos el ácido tartárico. La zona más rica en ácido tartárico es la zona central de la pulpa, luego le sigue la intermedia y la exterior. En la figura 1.5 se observan las diferentes partes del grano de uva.

Formación de sales tartáricas en el procesado del vino

El ácido tartárico puede formar sales por la presencia de calcio y potasio. Las diferentes sales que puede formar son: bitartrato potásico (THK), tartrato neutro de potasio (TK_2), tartrato neutro de calcio (TCa), tartrato doble de potasio y calcio (T_2K_2Ca) y sal mixta de malotartrato de calcio ($MTCa_2$).

En el vino, debido a los valores de pH que tiene, solamente se encuentran el bitartrato potásico y el tartrato cálcico. Las demás sales sólo se forman cuando el pH es superior al valor de 4,5. La solubilidad de estas sales disminuye por la formación de alcohol durante la fermentación alcohólica, así como también por el enfriamiento del vino.

El bitartrato potásico. Su fórmula es $COOH-CHOH-CHOH-COOK$. También se llama tartrato ácido de potasio. La solubilidad de esta sal en el vino depende de la concentración de alcohol y, sobre todo, de la temperatura del vino. La solubilidad del bitartrato potásico en el vino a $20^\circ C$ es de 5.7 g/L mientras que la del ácido tartárico es de 4,9 g/L. La solubilidad disminuye cuando se añade ácido tartárico, y aumenta cuando se añade cualquier ácido, ya que se produce una modificación del equilibrio iónico, formando estos ácidos sales solubles con el potasio, mientras la concentración de bitartrato potásico se reduce. Durante la fermentación maloláctica sucede el fenómeno contrario, pues al desaparecer el ácido málico, el equilibrio entre este ácido y sus malatos se desplaza hacia la descombinación de éstos últimos, cediendo potasio al medio, que aumenta la concentración de bitartrato potásico y además el pH se eleva disminuyendo la solubilidad de esta sal. La cantidad de esta sal en los vinos tintos es del orden de un 40 por 100 más que en los blancos, debido a su mayor riqueza en potasio.

El tartrato neutro de calcio. Su fórmula es $COOCa-CHOH-CHOH-COOCa \cdot 4H_2O$. Es una sal que presenta una solubilidad bastante inferior a la del bitartrato potásico, del orden de 0.53 g/L en vino a $20^\circ C$. La solubilidad de esta sal depende fundamentalmente del contenido en alcohol, pasando a un segundo plano el efecto de la temperatura. Por esta razón las precipitaciones de tartrato de calcio en los vinos pueden ser incompletas por los tratamientos realizados por frío y aparecen más tarde sin razón alguna aparente. El contenido de esta sal es inferior en los vinos tintos de un 30 a 50 por 100, más pobres que los vinos blancos.

La insolubilización de estas sales en el vino provoca la presencia de un sedimento de tartratos que no es admitido por los consumidores, pero en la actualidad existe una tendencia cada vez mayor a ser tolerados por los aficionados al vino, entendiendo que su presencia es natural, junto a los sedimentos de materia colorante de los vinos

tintos, disponiendo entonces de un vino más rico e íntegro, que les permite disfrutar mejor de sus cualidades. Por ejemplo, en Alemania, a los sedimentos que quedan en sus vinos blancos les denominan “diamantes de vino”.

Cristalización de las sales tartáricas. La cristalización exige la presencia en el vino de gérmenes o núcleos de cristalización, estando formados por cristales sub-microscópicos, o por cristales de mayor tamaño, e incluso también sobre sólidos de distinta naturaleza pero también de estructura cristalina.

Tratamientos para las precipitaciones tartáricas. Hay diferentes tratamientos para estabilizar los vinos e impedir las precipitaciones tartáricas. Unos son más eficaces que otros, ya que en los mecanismos de insolubilización de estas sales inciden una gran cantidad de factores, que pueden acelerar o retardar la precipitación de las mismas.

Antes de la aplicación de uno u otro sistema de estabilización, es conveniente analizar el vino frente a los elementos o sustancias que intervienen en estas precipitaciones: pH, calcio, potasio, ácido tartárico, etcétera.

Los métodos de estabilización utilizados en la actualidad pueden clasificarse en:

I. Sistemas que insolubilizan y eliminan los tartratos del vino.

- *Tratamiento por frío:* se basa en la insolubilización de los tartratos por el frío. Puede realizarse espontáneamente por el frío del invierno o aplicándoles frío artificialmente, estos tratamientos son de más corta duración.
- *Ósmosis inversa:* la estabilización tartárica se realiza haciendo pasar el vino por un aparato de ósmosis inversa, donde temporalmente se elimina parte del agua que contienen, resultando así los vinos concentrados y produciéndose una importante insolubilización de los tartratos, la cual puede ser activada por un tratamiento complementario por frío. Una vez separados los tartratos precipitados, se restituye el agua separada en un principio, resultando de este modo estabilizados.

II. Sistemas que impiden las precipitaciones tartáricas.

- *Ácido metatartárico:* el mecanismo de inhibición sobre los tartratos del vino, se explica por formar alrededor de los núcleos de cristalización una barrera, que impide la aproximación de las moléculas de tartratos insolubilizadas y, por lo tanto, el crecimiento de los cristales.
- *Carboximetilcelulosa:* es una celulosa esterificada por grupos carboximetilos sobre los carbonos 6 y 2. Presenta en el vino a pH de 3 a 4 cargas negativas sobre los grupos carboxílicos, lo que permite adsorber los núcleos de los tartra-

tos e inhibir su crecimiento, pudiendo además acomplejar los cationes calcio y potasio, provocando la disminución de estos cationes en estado libre.

- Manoproteínas: son unas sustancias obtenidas de las paredes de las levaduras en autólisis; existen en el vino de manera natural cuando se aplican determinadas técnicas de extracción, o bien mediante adición de preparados comerciales. Frenan las precipitaciones tartáricas por un mecanismo de inhibición de la cristalización muy similar al de la carboximetilcelulosa, pero de efecto de adsorción mucho más reducido, por lo que es menos eficaz.

III. Sistemas que eliminan los cationes responsables de las precipitaciones tartáricas.

- Ácido tartárico racémico: es el ácido DL-tartárico ópticamente inactivo, que combinándose con el calcio, forma una sal de racemato cálcico muy poco soluble. Por este motivo reduce la cantidad de calcio en el vino.
- Electrodiálisis: es una técnica que permite la separación de determinados aniones o cationes de los mostos o vinos, haciendo pasar éstos por un aparato dializador, donde una corriente continua aplicada entre dos electrodos y unas membranas semipermeables, logran la eliminación o reducción de los niveles de calcio o de potasio.
- Intercambio iónico: un intercambiador iónico es una sustancia mineral u orgánica insoluble, que presenta la propiedad de ionizarse en presencia de una fase acuosa y de intercambiar estos iones con los de la solución acuosa (J. Ribéreau-Gayon y cols., 1998). Este sistema permite la eliminación uno o varios iones causantes de precipitaciones tartáricas, así como de quiebras férricas o cúpricas.

Aplicaciones del ácido tartárico

El uso del ácido tartárico está extendido en diferentes campos. Los sectores que lo utilizan son la industria alimentaria, la farmacéutica, la química y la construcción, pero el más importante es el sector enológico.

- Industria alimentaria: el ácido tartárico es un acidificante y conservante natural. Se emplea como emulsionante en panadería, como ingrediente para la levadura, en la fabricación de caramelos y golosinas como acidificante, en la elaboración de mermeladas y gelatinas; también es acidificante de bebidas gaseosas como la Coca Cola.

- Industria farmacéutica: se utiliza para la preparación de antibióticos, píldoras y pastillas efervescentes, medicina para las cardiopatías y en compuestos terapéuticos que combaten el sida.
- Industria construcción: en este sector industrial se utiliza como retardante del fraguado del yeso y el cemento.
- Industria química: se emplea en fotografía, galvanotécnica, para preparación de tartratos y como secuestrante de iones metálicos.

Empleo del ácido tartárico en la industria enológica. El ácido tartárico es un elemento muy importante en la industria enológica. Al ser uno de los ácidos orgánicos que están presentes en las uvas, influye en la acidez del fruto. Es el compuesto mayoritario de la acidez de los vinos.

El nivel de acidez de las uvas se mide por la acidez total, que es la suma de las acideces valorables de la uva y clásicamente se dividen en acidez fija y acidez volátil. La acidez volátil está constituida por el ácido acético. La acidez fija se debe al ácido tartárico y al ácido málico. Los ácidos combinados en forma de sales no intervienen en el valor de la acidez total.

En la mayoría de los países, la acidez fija se expresa en g/L de tartárico, en algunos países como en Francia se expresa en g/L sulfúrico. Para determinar la acidez total se realiza por titulación del mosto con una solución de hidróxido sódico N/10, con azul de bromotimol como indicador. El resultado se puede expresar directamente en ácido sulfúrico o por una fácil conversión referirlo a ácido tartárico:

- Acidez sulfúrica · 1.530 = Acidez tartárica
- Acidez tartárica · 0.653 = Acidez sulfúrica

En algunas ocasiones la acidez puede también expresarse en miliequivalentes, es decir, los mililitros de una solución normal de sosa, necesarios para neutralizar las funciones ácidas de un litro de mosto.

$$\text{Acidez sulfúrica (g/L)/0.049} = \text{Acidez tartárica (g/L)/0.075} = \text{miliequivalentes/L}$$

La acidez desempeña un papel importante a la hora de definir el estado óptimo de maduración industrial de la vendimia. Forma parte de los índices de maduración químicos.

Otro uso del ácido tartárico es en las correcciones de la acidez en las vendimias, mostos o vinos. Las correcciones de acidez, por exceso o por defecto, tienen a nivel popular una consideración de menor nivel que la de los azúcares, aunque desde

el punto de vista técnico son de gran interés para lograr en los vinos un equilibrio adecuado, así como también algunas importantes prestaciones, donde destaca el papel que la acidez desempeña en la conservación de los vinos.

Las correcciones de la acidez se pueden hacer con prácticas vitícolas, modificando los niveles de acidez de las vendimias, o con prácticas de acidificación directa.

La acidificación directa se realiza con la adición de ácidos orgánicos autorizados, estando expresamente prohibidos el uso de ácidos minerales, tales como los ácidos sulfúrico, clorhídrico o fosfórico, que fraudulentamente se utilizan en ocasiones, buscando más bien una corrección del pH a la baja, siendo éste un valor difícil de modificar con los ácidos orgánicos autorizados.

El ácido tartárico es el principal acidificante autorizado. La Unión Europea establece unas limitaciones legales. En los productos mostos y vendimias, la acidificación solamente podrá realizarse hasta el límite máximo de 1.5 g/L, expresado en tartárico. Mientras que en vinos la acidificación máxima será de 2.5 g/L expresado en ácido tartárico. Teóricamente 1 g/L de ácido tartárico es capaz de elevar la acidez total en 0.65 g/L, expresada en ácido sulfúrico o 1 g/L en ácido tartárico.

La acidificación precoz sobre la vendimia o el mosto debe ser restringida a lo necesario por las importantes pérdidas o insolubilizaciones que se producen a lo largo de la fermentación y fases posteriores del vino. Se recomienda no obstante, corregir la acidez cuando la vendimia presenta valores inferiores a 4.5 g/L en tartárico, añadiendo 1 g/L de tartárico, y con valores entre 4.5 y 5.5 g/L en tartárico, agregando 0.5 g/L de tartárico.

Una acidificación tardía, antes del embotellado del vino, conduce a crear un desequilibrio del mismo, pudiendo ocasionar precipitaciones posteriores en botella, a la vez que produce una sensación de dureza en la boca. El momento más adecuado de acidificar con ácido tartárico es hacerlo en una primera adición al finalizar la fermentación alcohólica con la cantidad indispensable, y luego corregir definitivamente el vino antes de su estabilización tartárica por frío, donde se deben realizar los ensayos pertinentes para calcular la cantidad a añadir, teniendo en cuenta que parte se solubilizará en forma de tartratos.

Objetivos y plan de trabajo

Las lías de vinificación constituyen uno de los principales residuos de las industrias vitivinícolas y representan una fuente de contaminación importante. Su eliminación supone un gasto económico para las empresas productoras. En los últimos años, en el

Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias de Ourense, se han estado desarrollando una serie de trabajos encaminados al aprovechamiento de estos residuos agroindustriales para su conversión en aditivos alimentarios.

El objetivo planteado para este estudio es la recuperación del ácido tartárico presente en las lías de vinificación (blancas y tintas) y optimización del proceso. Para cumplir con este objetivo se elaboró el siguiente plan de trabajo:

- Solubilización del ácido tartárico empleando HCl.
- Purificación del ácido tartárico mediante la precipitación con Ca_2CO_3 y CaCl_2 .
- Optimización de los procesos realizados.

Materiales y métodos

Lías de vinificación

Las lías procedentes de la campaña de 2002 fueron cedidas amablemente por la “Cooperativa Vitivinícola del Ribeiro” (Ribadavia, Orense, España) y almacenadas a 4 °C.

En el vino blanco, el proceso de fermentación se lleva a cabo sin maceración, por lo que primero se prensa la vendimia y se obtienen dos fracciones, una constituida por el mosto y otra por el bagazo (hollejo, pepitas, etc). Esta última fracción se utiliza para producir vino de peor calidad obtenido a partir del bagazo de prensa. Durante el proceso fermentativo, las partículas en suspensión decantan al fondo del barril y se separan del vino mediante la operación de trasiego. El número de trasiegos dependen del tipo de vino.

En el proceso de elaboración de vino tinto, la fermentación se realiza simultáneamente con la maceración, por lo que la separación del bagazo será posterior a la fermentación. Durante la fermentación, al igual que en el vino blanco, se producen lías.

Las lías procedentes del vino blanco y del vino tinto, tanto del primer trasiego como del segundo, se mezclan con su bagazo respectivo (para aportarle aromas) y se destilan conjuntamente, obteniéndose así *lías de vino blanco destiladas* y *lías de vino tinto destiladas*, constituyendo las fracciones de lías ensayadas en este trabajo.

Caracterización de las lías de vinificación

Sólidos

Para la determinación de los sólidos se tomó, para cada tipo de lía, un crisol de vidrio, secado en estufa durante 12 horas, de peso conocido. En cada crisol se pesó aproximadamente 1 g de lía y se metieron en estufa a 102 °C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se metieron los crisoles en un desecador hasta que alcanzaron la temperatura ambiente, momento en el cual se determinó su peso.

Carbono y nitrógeno

Para la determinación del porcentaje en carbono y nitrógeno de las lías se analizó la fracción sólida utilizando un analizador elemental “Thermo Finningan Flash Elemental Analyser 1 112 series” (San José, California, Estados Unidos).

Compuestos orgánicos

Los componentes orgánicos de las lías: glucosa, ácido láctico y ácido acético se determinaron por “Cromatografía Líquida de Alta Eficacia” (CLAE) (Agilent, modelo 1 100, Palo Alto, California, Estados Unidos), con un detector de índice de refracción y utilizando una “Columna Transgenómica ION-300” (Transgenomic Inc., San José, California, Estados Unidos). La fase móvil consistió en H₂SO₄ 0.01 N con un caudal de 0.4 mL/min.

Cenizas

Las cenizas se determinaron a 550 °C en una mufla hasta peso constante. Los recipientes utilizados fueron crisoles de porcelana secos (se secaron en estufa a 102 °C durante 12 horas) y la cantidad de muestra utilizada fue de 0.5 g.

Elementos minerales

Los elementos minerales Cu, Mg, Fe, Mn, Ca, Al y Zn, se determinaron a partir de las cenizas por absorción atómica empleando un “Espectrofotómetro 220 Fast

Sequential” (Varian, Palo Alto, California, Estados Unidos). Para ello, se sometieron 0.15 g de cenizas a un proceso de digestión con 5 mL de HNO₃ al 65%, 1 mL de H₂O₂ al 30% y 0.5 mL de HF al 40% en un horno microondas “Labstation mls 1200 mega” (Milestone, Bérghamo, Italia).

Recuperación del ácido tartárico

Desarrollo del proceso

En la figura 3.1 se muestra un esquema del proceso llevado a cabo para la recuperación del ácido tartárico de las lías de vinificación. El proceso se dividió en dos fases, en cada fase se realizó un diseño experimental para la optimización del proceso.

I. Solubilización del ácido tartárico. Para solubilizar el ácido tartárico presente en las lías se empleó HCl al 37 por ciento. La mezcla de las lías con el HCl se realizó en un vaso de precipitados. La mezcla se centrifugó a 3600 rpm y 15 min. La parte sólida se liofilizó para emplearla como nutriente en fermentaciones lácticas y la parte líquida, donde se encuentra el ácido tartárico, se guardó en frío a 4 °C para realizar el segundo diseño experimental.

II. Precipitación y recuperación del ácido tartárico. Para retirar selectivamente el ácido tartárico de las demás sustancias presentes en el líquido, se hizo precipitar el ácido tartárico en forma de tartrato cálcico empleando CaCO₃ y CaCl₂; se emplearon diferentes valores de pH y tiempos de reacción.

Después de la precipitación se realizó una filtración con un embudo Büchner, obteniendo una parte sólida que es el tartrato cálcico y una parte líquida donde se encuentran los demás componentes. El tartrato cálcico se redisolvió en una solución de 95 mL de agua caliente y 5 mL de HCl al 37 por ciento.

Diseño experimental y análisis estadístico

Para la recuperación del ácido tartárico de las lías de vinificación se realizaron dos diseños experimentales. Se empleó un diseño factorial incompleto 3³ (Box y cols., 1978). Los datos experimentales se analizaron por la metodología de la Superficie de Respuesta, usando el paquete estadístico: Statistica 5.0. La relación entre las varia-

bles dependientes y de operación se estableció por un modelo que incluye términos lineales, de interacción y cuadráticos:

$$y = b_0 + b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 + b_3 \cdot x_3 + b_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 + b_{13} \cdot x_1 \cdot x_3 + b_{23} \cdot x_2 \cdot x_3 + b_{11} \cdot x_1^2 + b_{22} \cdot x_2^2 + b_{33} \cdot x_3^2$$

Donde “y” es la variable dependiente, “b” denota los coeficientes de regresión (calculados a partir de los datos experimentales por regresión múltiple, usando el método de los mínimos cuadrados), y “x” denota las variables independientes.

a) Diseño 1: Solubilización del ácido tartárico

Las tres variables independientes fueron la concentración de HCl (37%), la temperatura y el tiempo. La variable dependiente fue la concentración de ácido tartárico.

b) Diseño 2: Precipitación y recuperación del ácido tartárico

Las tres variables independientes fueron la concentración de CaCl₂, el pH y el tiempo. La concentración de CaCO₃ se fijó en función de la estequiometría de la reacción. La variable dependiente fue el % de ácido tartárico recuperado.

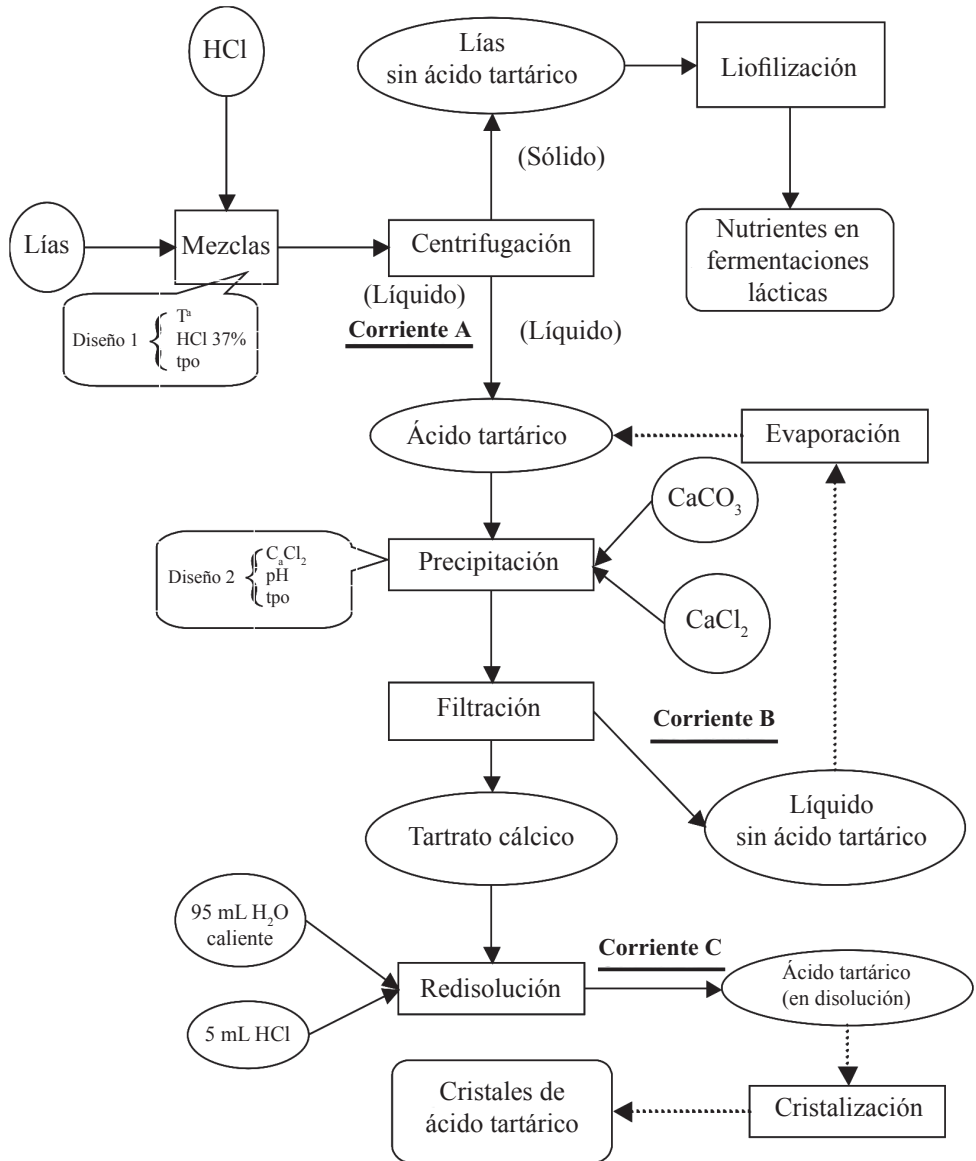
Análisis

La concentración de ácido tartárico, así como de otras sustancias presentes en menor medida (ácido málico, glicerina, azúcares...) se determinó por HPLc. Para calcular los valores óptimos de las variables dependientes se empleó la herramienta “Solver” de Excel.

Los subproductos y efluentes líquidos de las bodegas (lías, vinazas, aguas de la limpieza de tartratos de los depósitos...) están formados por diversas sustancias que se encuentran presentes en los mostos o los vinos, donde en unos casos proceden de la vendimia como materia prima, o bien se generan durante los procesos microbianos o fisicoquímicos de la elaboración de los vinos. Por lo general, estos subproductos se presentan en fase líquida acompañados de una no despreciable cantidad de mosto o de vino, y también en algunos casos de agua procedente de las operaciones de limpieza.

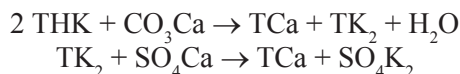
La mayor parte de estos subproductos son susceptibles de valorización, es decir, de un aprovechamiento económico añadido al de la actividad vitivinícola; aunque generalmente son vertidos directamente al medio ambiente, convirtiéndose entonces en un problema medioambiental a resolver.

Figura 3.1. Esquema propuesto para la recuperación de ácido tartárico



Entre los subproductos o efluentes enológicos más frecuentes cabe destacar las *heces o lías*, que son el conjunto de materias orgánicas y sales, que se depositan de forma natural en el fondo de los envases después de la fermentación o durante la conservación de los vinos. Del mismo modo que en el tratamiento de otros subproductos, el principal aprovechamiento de las lías estriba en la obtención de alcohol etílico mediante su destilación, resultando entonces como materia residual las *lías destiladas*.

Independientemente del valor nutritivo de las lías destiladas para cepas de *Lactobacillus* (Bustos y cols., 2004) uno de los componentes más interesantes de las lías es el tartrato de calcio. Este compuesto es muy poco soluble (0.53 g/L a 20°C y 1.16 g/L a 60°C) si se compara con el hidrogenotartrato de potasio (5.7 g/L a 20°C y 24 g/L a 60°C) (Flancy, 2003). Industrialmente, la extracción de tartratos de los subproductos y efluentes líquidos de las bodegas puede hacerse siguiendo el siguiente procedimiento: las vinazas y lías destiladas se reciben en una primera pila decantadora de poca altura y elevada superficie, pasando por desbordamiento sucesivamente de una pila a otra, de tal forma que en la primera, con ayuda de un codo decantador giratorio, la vinaza clara se descarga en la pila de decantación provista de agitador y el residuo sólido se elimina de la instalación. A continuación se añade una lechada de cal: $\text{Ca}(\text{OH})_2$ o de carbonato cálcico: CO_3Ca hasta alcanzar un pH de 4.5 a 5.0 seguida de una cantidad de yeso: SO_4Ca , para tener una precipitación completa y evitar que el tartrato de potasio, formado en el transcurso de la neutralización, no se quede en solución. A continuación se especifican las reacciones que tienen lugar durante el proceso.



En donde:

HK: bitartrato potásico.

TK_2 : tartrato neutro de potasio.

Ca: tartrato neutro de calcio.

El proceso de agitación transcurre durante 30 minutos, seguido de una decantación de otros 20 minutos más, eliminando el líquido con un codo decantador, y el precipitado se lava varias veces con agua limpia, dejándolo escurrir y por fin desecar para su conservación con un contenido de humedad inferior al 5 por ciento.

En todos estos subproductos o efluentes líquidos se puede aprovechar una cantidad importante de sales de ácido tartárico. Sin embargo, es necesario desarrollar nuevas tecnologías, ya que las soluciones de eliminación de tartratos son muy con-

taminantes, con valores de DQO de 50 mil a 200 mil mg de oxígeno/L, con un contenido en tartratos equivalente de ácido tartárico de 100 a 400 g/L. Este proyecto propone una metodología alternativa en la que se aprovechan todas las corrientes generadas. A continuación se detallan los pasos y resultados obtenidos hasta lograr completar este proceso.

Caracterización de las lías

Contenido en sólidos, cenizas, nitrógeno y carbono

El contenido en sólidos, cenizas, nitrógeno y carbono están recogidos en la tabla 4.1. El nitrógeno y carbono fueron analizados a partir de la fracción sólida de las lías, y las cenizas se determinaron por incineración de ésta. Tal como se observa, tanto el contenido en sólidos como el porcentaje en cenizas es muy superior en las lías procedentes de la vinificación en blanco, ya que las lías procedentes de la vinificación en tinto, estudiadas en este trabajo, estaban muy diluidas.

Tabla 4.1. Porcentaje de sólidos de las lías y porcentaje en la fracción sólida de cenizas, carbono y nitrógeno

	% Sólidos	% Ceniza	%N	%C
<i>Lías vino blanco destiladas</i>	17.200	23.426	1.97	31.06
<i>Lías vino tinto destiladas</i>	3.324	16.925	2.06	37.36

Fuente: Rivas y cols., 2006.

El contenido en carbono y nitrógeno es significativamente más bajo que el recogido por Rivas y cols. (2004) para la levadura *Debaryomyces hansenii* procedente de la producción de xilitol (42.2-46.2 y 5.7-6.3 % respectivamente), la cual también ha sido utilizada como fuente nutritiva de bajo coste para la producción de ácido láctico.

Contenido en compuestos orgánicos

La fracción líquida de las lías se analizó por “Cromatografía Líquida de Alta Eficacia” para determinar compuestos orgánicos: glucosa, etanol, glicerina y los ácidos málico, láctico, acético y tartárico. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.2.

Tabla 4.2. Concentración de compuestos orgánicos (en g/L) en lías destiladas

	<i>Glucosa</i>	<i>Etanol</i>	<i>Ác. Málico</i>	<i>Ác. Láctico</i>	<i>Ác. Acético</i>	<i>Ác. Tartárico</i>	<i>Glicerina</i>
<i>Lías blancas</i>	0.0	8.6	0.0	5.9	2.3	0.0	0.0
<i>Lías tintas</i>	0.0	2.3	0.0	2.4	11.4	0.0	0.0

Fuente: Rivas y cols., 2006.

No se detectó glucosa en ambos casos, lo que indica que los azúcares fueron consumidos durante la fermentación y transformados a etanol, si bien la concentración en este alcohol es inferior a 9 g/L, ya que durante la destilación se retira el etanol para la obtención de alcohol vínico.

Tampoco se detectó ácido málico, mientras que las concentraciones de ácido láctico oscilaron entre los 2.4 g/L en las lías procedentes del vino tinto y los 5.9 g/L en las lías procedentes del vino blanco. Una concentración menor de ácido láctico se relaciona con la fermentación maloláctica, durante la cual el ácido málico es descarboxilado a ácido láctico principalmente por *Oenococcus oeni*, lo que provoca una disminución de la acidez del vino confiriendo características organolépticas apropiadas y una mayor estabilidad.

Para el ácido acético los valores fueron muy superiores en el caso de las lías procedentes del vino tinto. Las bacterias productoras de ácido acético (*Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter pasteurianus* y *Acetobacter aceti*) están presentes durante el proceso fermentativo procedentes de la propia uva. Los niveles de ácido acético en el vino se pueden ver incrementados por la exposición del vino al aire, incluso en periodos cortos, o por altas temperaturas o pH. Debido a que en el vino tinto el mosto y la uva están en contacto, la posibilidad de encontrar estas bacterias en el vino tinto es mayor que en el vino blanco.

En cuanto al ácido tartárico, no se encontró en la fase líquida de las lías, ya que este ácido se encuentra precipitado en forma de sus sales correspondientes: bitartrato potásico y tartrato cálcico, debido en gran parte al tiempo transcurrido entre la producción de las lías y su tratamiento industrial, y al hecho de que las lías se conservan en cámaras refrigeradas, lo que estimula esta precipitación. Tampoco se detectó glicerina.

Contenido en minerales

La tabla 4.3 muestra las concentraciones de minerales expresadas en mg de Cu, Mg, Fe, Mn, Ca, Al y Zn por kg de fracción sólida de lía.

Tabla 4.3. Contenido en minerales (en mg/kg) de la fracción sólida de las lías destiladas

	<i>Cu</i>	<i>Mg</i>	<i>Fe</i>	<i>Mn</i>	<i>Ca</i>	<i>Al</i>	<i>Zn</i>
<i>Lías blancas</i>	347.9	126.0	289.8	24.1	684.0	N.D	18.6
<i>Lías tintas</i>	39.3	N.D	366.7	51.0	971.3	N.D	19.5

Fuente: Rivas y cols., 2006.

Los valores encontrados entre ambas lías no difieren significativamente. El proceso de vinificación de ambos tipos de vino cambia en que la fermentación alcohólica del mosto tinto es simultánea a la maceración con el bagazo, que puede contener restos de fitosanitarios que contengan metales en su formulación. Sin embargo, al ponerse las lías en contacto con el bagazo para llevar a cabo la destilación, las diferencias en composición se reducen drásticamente.

Obtención de ácido tartárico a partir de las lías de vinificación

Solubilización del ácido tartárico con HCl

La recuperación del ácido tartárico, que en las lías se encuentra precipitado en forma de bitartrato potásico y tartrato cálcico, requiere dos etapas principales, tal y como se describe en la figura 3.1. En la primera etapa, las sales de tartrato se solubilizan con HCl para obtener una disolución de ácido tartárico, mientras que en una segunda etapa, el ácido tartárico se precipita selectivamente en forma de tartrato cálcico. A fin de optimizar este proceso, ambas etapas se optimizaron a través de diseños factoriales incompletos.

Las variables independientes usadas en el primer diseño, para lías destiladas tanto procedentes de la vinificación en blanco como de la vinificación en tinto, así como sus rangos de variación fueron las siguientes, temperatura: (T), 20–80 °C; volumen de HCl: al 37 % (vol. HCl), 1–10 mL, y tiempo de reacción: (t), 5–30 min. Las variables adimensionales codificadas empleadas, con límites de variación (-1,1), fueron definidas como x_1 (temperatura codificada), x_2 (volumen de HCl codificado) y x_3 (tiempo de reacción codificado). La correspondencia entre variables codificadas y

no codificadas se estableció por ecuaciones lineales deducidas a partir de sus límites respectivos de variación (ver tabla 4.4).

Esta tabla también muestra las variables dependientes consideradas: y_1 (concentración de ácido tartárico solubilizado en lías blancas destiladas) e y_2 (concentración de ácido tartárico solubilizado en lías tintas destiladas). Las muestras procesadas también contenían pequeñas cantidades de ácido málico, glicerina y compuestos fenólicos, que son de menor importancia para este estudio por lo que no se consideraron.

Tabla 4.4. Variables usadas el estudio de la solubilización del ácido tartárico

a) Variables independientes			
<i>Variable</i>	<i>Nomenclatura</i>	<i>Unidades</i>	<i>Rango de variación</i>
Temperatura	T.	°C	20-80
Volumen de HCl al 37%	Vol. HCl	mL	1-10
Tiempo de reacción	t.	minutos	5-30
b) Variables independientes adimensionales y codificadas			
<i>Variable</i>	<i>Nomenclatura</i>	<i>Unidades</i>	<i>Rango de variación</i>
Temperatura adimensional	x_1	(T-50)/30	(-1.1)
Volumen de HCl al 37% adimensional	x_2	(Vol. de HCl-5.5)/4.5	(-1.1)
Tiempo de reacción adimensional	x_3	(t-17.5)/12.5	(-1.1)
c) Variables dependientes			
<i>Variable</i>	<i>Nomenclatura</i>		
Concentración de ácido tartárico solubilizado en lías blancas destiladas, g/L	y_1		
Concentración de ácido tartárico solubilizado en lías tintas destiladas, g/L	y_2		

Fuente: Rivas y cols., 2006.

Dado que un estudio sistemático de los efectos causados por las variables de operación en la composición y susceptibilidad de la hidrólisis requeriría una gran cantidad de trabajo experimental, se llevó a cabo un diseño factorial, centrado e incompleto de experimentos. Varios grupos de investigación han usados modelos fenomenológicos basados en diseños experimentales para estudiar el procesamiento químico y/o bioconversión de materiales lignocelulósicos (Moldes y cols., 2002). En este estudio, hemos

utilizado un diseño factorial incompleto, en el cual se analizan tres variables independientes a tres niveles. Basándose en datos experimentales, se emplearon ecuaciones que incluyen los términos lineales, de interacción y cuadráticos a fin de describir la relación entre las variables de operación independientes y las variables dependientes.

La tabla 4.5 muestra el conjunto de condiciones experimentales ensayadas (expresadas en términos de variables codificadas). La secuencia para el trabajo experimental se estableció de forma aleatoria para limitar la influencia de errores sistemáticos en la interpretación de los resultados. Se puede observar que los experimentos 13-15 son réplicas en el punto central del diseño para medir el error experimental.

Tabla 4.5. Condiciones de operación consideradas en este estudio (expresadas en términos de variables independientes codificadas: temperatura adimensional, x_1 ; volumen de HCl al 37% adimensional, x_2 ; y tiempo adimensional, x_3)

<i>Condiciones de operación</i>			
<i>Experim.</i>	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Fuente: Rivas y cols., 2006.

La tabla 4.6 lista los coeficientes de regresión y su importancia estadística. La misma tabla incluye parámetros estadísticos (R^2 y F), midiendo la correlación y

la importancia estadística de los modelos, respectivamente. Se puede observar que ambos modelos muestran buenos parámetros estadísticos para la correlación e importancia y permiten una buena reproducción de los datos experimentales.

Ácido tartárico a partir de las lías procedentes de vino blanco

La figura 4.1 muestra la correlación entre los valores experimentales y los valores calculados durante la extracción del ácido tartárico de las lías procedentes de vino blanco. Ningún punto se aleja significativamente de la línea central, lo que da idea de la concordancia entre los valores experimentales y los calculados.

Tabla 4.6. Coeficientes de regresión, niveles significativos y parámetros estadísticos (R^2 , R^2 corregido, F y P), midiendo la correlación y relevancia de los modelos

<i>a) Coeficientes de regresión y relevancia</i>				
<i>Coeficientes</i>	y_1	$(1-p)*100$	y_2	$(1-p)*100$
b_0	-20.815497***	92.37	3.61239542**	98.06
b_1	0.17958965	62.04	0.03643601	88.68
b_{11}	-0.0011265	49.64	-0.00033304	89.63
b_2	19.51961*	99.78	10.6284417*	99.99
b_{22}	-0.9230913*	99.55	-0.64517987*	99.99
b_3	0.82641584	85.73	-0.29885175*	99.05
b_{33}	-0.0317378***	94.16	-0.00331627**	96.14
b_{12}	-0.05090678**	97.07	-0.01244687*	99.64
b_{13}	0.01229196***	93.80	0.00943422*	99.92
b_{23}	-0.0512845	86.11	0.00774804**	95.05

* Coeficientes relevantes al 99% del nivel de confianza.

** Coeficientes relevantes al 95% del nivel de confianza.

*** Coeficientes relevantes al 90% del nivel de confianza.

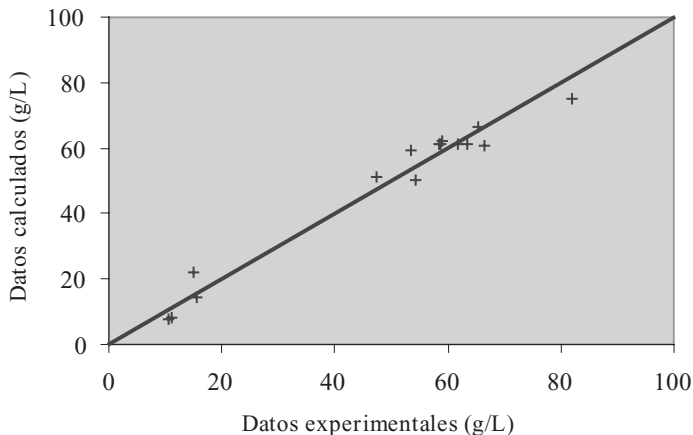
$(1-p)*100$: % de probabilidad de que se cumpla.

<i>b) Parámetros estadísticos midiendo la correlación e importancia de los modelos</i>				
<i>Variable</i>	R^2	R^2 corregido	$F_{exp.}$	P
y_1	0.96712	0.90795	13.6376	0.930912
y_2	0.98371	0.95438	309.59	0.996779

Fuente: Rivas y cols., 2006.

La tabla 4.6 muestra información sobre la relevancia de los coeficientes de regresión. En el intervalo considerado, la variable más significativa fue el volumen de HCl (variable x_2 del diseño), con un nivel de confianza del 99%, tanto para el término lineal como para el término cuadrático. En segundo lugar, cabe destacar la influencia del tiempo de reacción (variable x_3 del diseño), mientras que la temperatura a la que se lleva a cabo la solubilización (variable x_1), apenas tuvo influencia, tal y como se puede observar en el valor absoluto de los coeficientes correspondientes.

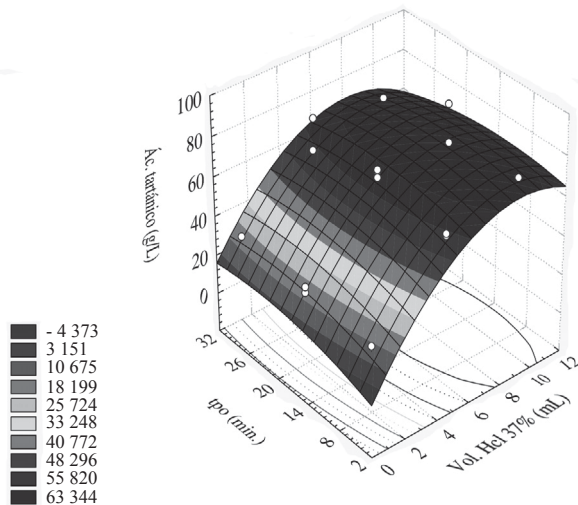
Figura 4.1. Comparación entre valores experimentales y calculados para la variable y_1



Fuente: Rivas y cols., 2006.

Por esta razón, la figura 4.2 muestra la concentración de ácido tartárico solubilizado en las lias procedentes de la vinificación en blanco (variable y_1) en función de las dos variables de operación más influyentes (volumen de HCl al 37% y tiempo de reacción) en experimentos realizados a una temperatura intermedia ($T = 50\text{ }^\circ\text{C}$). Tal y como se puede observar, la cantidad de ácido tartárico solubilizado aumenta significativamente con el volumen de HCl empleado. Por el contrario, como ya se ha mencionado, se observa que el tiempo de reacción apenas influyó en el tratamiento, encontrando valores ligeramente más altos a los tiempos más bajos considerados.

Figura 4.2. Dependencia de la concentración de ácido tartárico solubilizado (variable y_1) frente a las variables “Vol. HCl” y “t” para los experimentos realizados a temperatura ambiente ($x_1 = 0$)



Fuente: Rivas y cols., 2006.

A partir de los coeficientes de la tabla 4.6 y empleando la aplicación Solver de Microsoft Excel se dedujo un óptimo para $x_1 = 20$ °C, $x_2 = 9.77$ mL y $x_3 = 9.0$ min. Bajo estas condiciones, el modelo predijo un valor máximo de ácido tartárico solubilizado de 77.5 g/L.

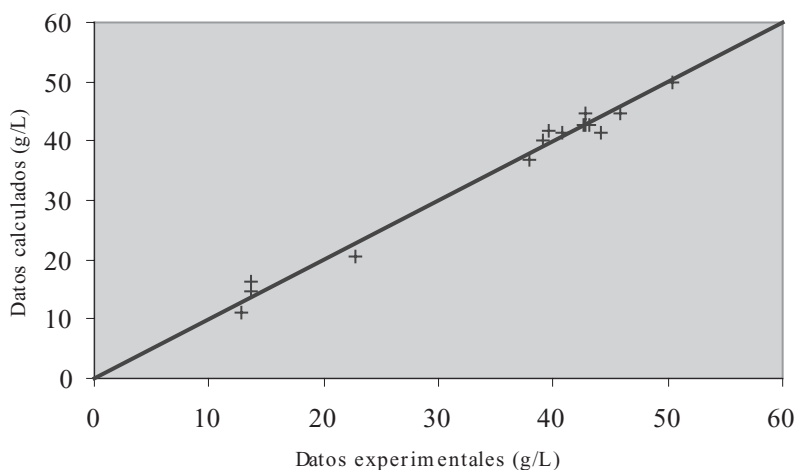
Ácido tartárico a partir de las lías procedentes de vino tinto

La figura 4.3 muestra la correlación entre los valores experimentales y los valores calculados durante la extracción del ácido tartárico de las lías procedentes de vino tinto. De nuevo se observa una gran concordancia entre los valores experimentales y los calculados.

En la tabla 4.6 se recoge la información relativa a los coeficientes de regresión. Al igual que ocurría con las lías procedentes de vino blanco, en el intervalo consi-

derado, la variable más significativa fue el volumen de HCl (variable x_2 del diseño), con un nivel de confianza del 99%, tanto para el término lineal como para el término cuadrático. En este caso, el término lineal del tiempo de reacción (variable x_3 del diseño), también resultó significativa al 99% y el término cuadrático al 95%, siendo por lo tanto la segunda variable más significativa. Por el contrario, la temperatura a la que se lleva la solubilización (variable x_1), mostró la menor influencia en el tratamiento, salvo al interactuar con las otras variables.

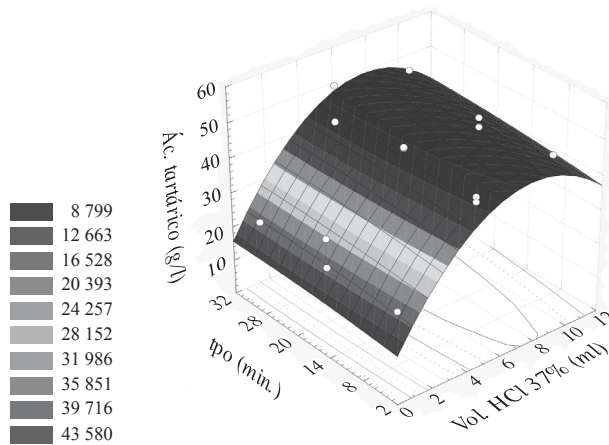
Figura 4.3. Comparación entre valores experimentales y calculados para la variable y_2



Fuente: Rivas y cols., 2006.

En consecuencia, la concentración de ácido tartárico solubilizado en las lías procedentes de vino tinto (variable y_2) se expresó en la figura 4.4, en función del volumen de HCl al 37 % y el tiempo de reacción, por ser las dos variables de operación más influyentes. Por comodidad de operación y economía del proceso, se muestran los experimentos realizados a 50 °C. De nuevo se observa un incremento significativo en la cantidad de ácido tartárico solubilizado al aumentar la cantidad de HCl adicionado hasta valores en torno a 8 mL y un incremento moderado al disminuir el tiempo de reacción.

Figura 4.4. Dependencia de la concentración de ácido tartárico solubilizado (variable y_1) frente a las variables “vol. HCl” y “t” para los experimentos realizados a temperatura ambiente ($x_1 = 0$)



Fuente: Rivas y cols., 2006.

A partir de los coeficientes recogidos en la tabla 4.6 y de nuevo, al emplear la aplicación Solver de Microsoft Excel se dedujo un óptimo para: $x_1 = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ $x_2 = 8.07 \text{ mL}$ $x_3 = 5.0 \text{ min}$. Estas condiciones son similares a las obtenidas al emplear las lías destiladas procedentes de vino blanco. Bajo estas condiciones, el modelo predijo un valor máximo de ácido tartárico solubilizado de únicamente 45.6 g/L, que es sensiblemente inferior a los 77.5 g/L obtenidos con las lías procedentes de vino blanco, en parte debido a que éstas últimas presentaban un mayor contenido en sólidos.

Precipitación del ácido tartárico como tartrato cálcico

La solubilización del ácido tartárico conlleva la disolución de pequeñas cantidades de otras sustancias, tales como ácido láctico, ácido acético, etanol, glicerina o compuestos fenólicos, que dificultarían una posterior etapa de cristalización, al tiempo que se requerirían costosas etapas de purificación para obtener un producto con

elevada pureza. Para evitar estos problemas resulta conveniente llevar a cabo una precipitación selectiva del ácido tartárico a tartrato cálcico. La adición de sales cálcicas para recuperar el ácido tartárico, presente en residuos vitivinícolas, es bastante habitual (Versari y cols., 2001). El proceso se estudió empleando las lías procedentes de la vinificación en blanco, debido a su mayor contenido en ácido tartárico y a que representan la fracción más importante en la empresa que nos suministra las lías (*Cooperativa Vitivinícola del Ribeiro*).

La cantidad de carbonato cálcico se fijó de acuerdo a la estequiometría de la reacción:



Versari y cols. (2001) sugieren la hipótesis de que la adición de un exceso de CaCl_2 mejora la recuperación de ácido tartárico. Así, al añadir 7.6 g/cm^3 de CaCl_2 a unas corrientes de eluyentes se simulan las condiciones de precipitación industrial y se recupera a nivel de laboratorio un 62.4% del ácido tartárico inicial, comparable al 58.3% que se obtiene a nivel industrial. El pH es otra de las variables más influyentes. Sin embargo, hay que considerar que un exceso de CaCl_2 , así como un valor de pH demasiado alto o demasiado bajo, puede disminuir el rendimiento de la precipitación dado que los residuos enológicos pueden tener coloides que floculan a valores altos de pH que se corresponden a su punto isoelectrónico.

Para tener en cuenta todas estas variables se realizó un diseño experimental a partir del valor óptimo seleccionado en el primero. De nuevo se utilizó un diseño factorial incompleto con tres variables independientes a tres niveles. Las variables independientes seleccionadas así como sus rangos de variación fueron los siguientes, concentración de CaCl_2 : (Conc. CaCl_2), 0-100 g/L; pH: (pH), 0.5-9.5 y tiempo de reacción: (t), 10-240 min. Las variables adimensionales codificadas empleadas, con límites de variación (-1, 1), fueron definidas como x_4 (concentración de CaCl_2 codificada), x_5 (pH codificado) y x_6 (tiempo de reacción codificado). La correspondencia entre variables codificadas “y” no se estableció por ecuaciones lineales deducidas a partir de sus límites respectivos de variación (ver tabla 4.7). Asimismo, se indica la variable dependiente considerada: y_3 (porcentaje de ácido tartárico recuperado en lías destiladas procedentes de vino blanco). Para poder realizar estos cálculos el tartrato cálcico se resuspendió en 100 mL de una disolución caliente formada por 95 mL de H_2O caliente y 5 mL de HCl y se analizó por CLAE.

Tabla 4.7. Variables usadas en el estudio de la precipitación del ácido tartárico a tartrato cálcico

a) Variables independientes			
<i>Variable</i>	<i>Nomenclatura</i>	<i>Unidades</i>	<i>Rango de variación</i>
Concentración de CaCl ₂	Conc. CaCl ₂	g/L	0-100
pH	pH	-	0.5-9.5
Tiempo de reacción	t.	minutos	10-240
b) Variables independientes adimensionales y codificadas			
<i>Variable</i>	<i>Nomenclatura</i>	<i>Unidades</i>	<i>Rango de variación</i>
Concentración de CaCl ₂ adimensional	x ₄	(Conc. CaCl ₂ -50)/50	(-1.1)
pH adimensional	x ₅	(pH-5)/4.5	(-1.1)
Tiempo de reacción adimensional	x ₆	(t-125)/115	(-1.1)
c) Variables dependientes			
<i>Variable</i>	<i>Nomenclatura</i>		
Porcentaje de recuperación de ácido tartárico %	y ₃		

Fuente: Rivas y cols., 2006.

La tabla 4.8 muestra el conjunto de condiciones experimentales ensayadas (expresadas en términos de variables codificadas). También se recogen los gramos de ácido tartárico en las condiciones óptimas de partida, que se corresponden a las alcanzadas en el primer diseño experimental y referidas a un volumen de 1L (corriente A de la figura 3.1), los gramos de ácido tartárico residuales tras la etapa de filtración (corriente B) y los gramos de ácido tartárico recuperados al final del proceso, tras redisolución del tartrato cálcico precipitado (corriente C). Con esta información se calculó el rendimiento de cada experimento (variable y₃).

La tabla 4.9 muestra los coeficientes de regresión y su importancia estadística. También se incluyen los parámetros estadísticos (R² y F) que miden la correlación y la importancia estadística del modelo. Se puede observar que ambos modelos muestran aceptables parámetros estadísticos permitiendo una buena reproducción de los datos experimentales.

Tabla 4.8. Condiciones de operación consideradas en este estudio (expresadas en términos de variables independientes codificadas: concentración de CaCl_2 adimensional, x_1 ; pH adimensional, x_2 y tiempo de reacción adimensional, x_3); y resultados experimentales alcanzados para las corrientes A, B y C (porcentaje de recuperación de ácido tartárico %)

<i>Condiciones de operación</i>				<i>Gramos de ácido tartárico iniciales (corriente A)</i>	<i>Gramos de ác. tartárico tras filtración (corriente B)</i>	<i>Gramos de ác. tartárico tras redisolución (corriente C)</i>
<i>Exp.</i>	x_4	x_5	x_6			
1	-1	-1	0	72.8	27.9	45.9
2	1	-1	0	72.8	28.5	49.8
3	-1	1	0	72.6	5.7	49.3
4	1	1	0	72.6	0.8	58.9
5	-1	0	-1	72.8	3.0	44.3
6	1	0	-1	72.9	1.0	63.7
7	-1	0	1	72.8	1.0	62.9
8	1	0	1	78.5	5.2	64.5
9	0	-1	-1	72.8	25.2	51.4
10	0	1	-1	72.6	0.6	52.4
11	0	-1	1	72.8	28.4	53.2
12	0	1	1	72.6	0.6	62.5
13	0	0	0	72.8	1.4	67.6
14	0	0	0	72.8	0.6	64.5
15	0	0	0	72.8	0.7	65.2

Fuente: Rivas y cols., 2006.

La figura 4.5 muestra la relación entre los valores experimentales y los valores calculados. Ningún punto se aleja significativamente de la línea central, lo que da idea de la concordancia entre los valores experimentales y los calculados.

Por su parte, tanto la figura 4.6 como la tabla 4.9 nos dan información sobre la relevancia de los coeficientes de regresión. En el intervalo considerado, la variable

más significativa fue el pH (variable x_5 del diseño), con un nivel de confianza del 99%, tanto para el término lineal como para el término cuadrático. En segundo lugar, cabe destacar la concentración de CaCl_2 (variable x_4 del diseño), mientras que el tiempo de reacción (variable x_6), a penas tuvo influencia en el tratamiento de precipitación, tal y como se puede observar en el valor absoluto de los coeficientes correspondientes.

Tabla 4.9. Coeficientes de regresión, niveles significativos y parámetros estadísticos (R^2 , R^2 corregido, F y P), midiendo la correlación y relevancia de los modelos

a) Coeficientes de regresión y relevancia		
<i>Coefficientes</i>	y_3	$(1-p)*100$
b_0	46.77776226*	99.54
b_4	0.54045679**	96.17
b_{44}	- 0.00373225***	93.72
b_5	7.14035862*	99.23
b_{55}	- 0.82786687*	99.78
b_6	0.0906207	53.93
b_{66}	- 0.00037453	76.11
b_{45}	0.02199898	74.68
b_{46}	- 0.00189477**	96.48
b_{56}	0.01876920**	96.26

* Coeficientes relevantes al 99 % del nivel de confianza.

** Coeficientes relevantes al 95 % del nivel de confianza.

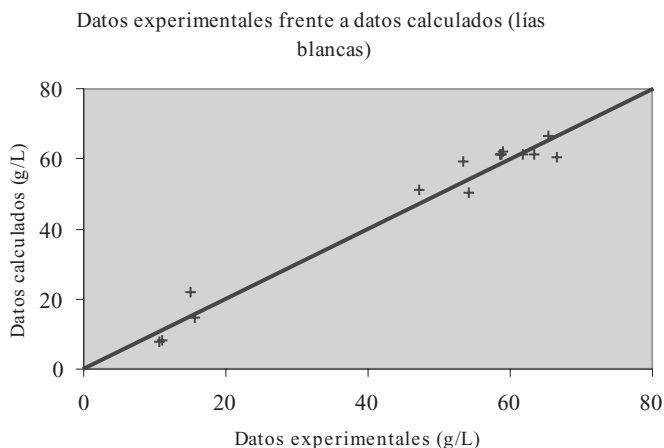
*** Coeficientes relevantes al 90 % del nivel de confianza.

$(1-p)*100$: % de probabilidad de que se cumpla.

b) Parámetros estadísticos midiendo la correlación e importancia de los modelos				
<i>Variable</i>	R^2	R^2 corregido	F_{exp}	P
y_3	0.94026	0.83272	2.9997	0.259945

Fuente: Rivas y cols., 2006.

Figura 4.5. Comparación entre valores experimentales y calculados para la variable y_3

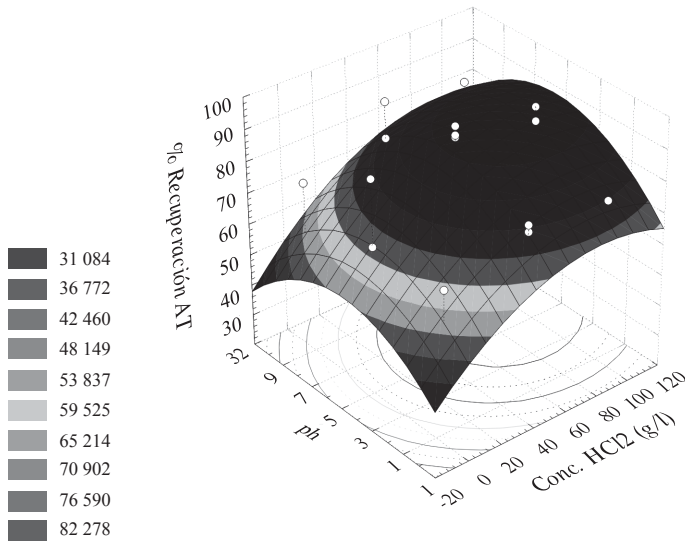


Fuente: Rivas y cols., 2006.

Por esta razón, la figura 4.6 muestra el porcentaje de ácido tartárico solubilizado en las lías procedentes de vino blanco (variable y_2) en función de las dos variables de operación más influyentes (concentración de CaCl_2 y pH) en experimentos realizados al menor tiempo ($t = 10$ min.); para ambas variables más significativas se observa un máximo a valores intermedios, lo que está en consonancia con los datos de Versari y cols. (2001) que observaron que un exceso de CaCl_2 , así como un valor demasiado alto o bajo de pH, puede disminuir el rendimiento de la precipitación.

A partir de los coeficientes recogidos en la Tabla 4.9 y empleando la aplicación “Solver” de Microsoft Excel, se calculó un óptimo para $x_4 = 51.3$ g/L, $x_5 = 6.84$ y $x_6 = 162.5$ min. Bajo estas condiciones, el modelo predijo un valor máximo de ácido tartárico precipitado del 92.41%. Comparando las disoluciones de ácido tartárico de las corrientes A y C (tabla 4.10), se observa que tras la precipitación selectiva de ácido tartárico, la segunda disolución presenta una disminución significativa de compuestos secundarios, principalmente de compuestos fenólicos, lo que da idea de la importancia de llevar a cabo este proceso para obtener una disolución más purificada.

Figura 4.6. Dependencia del porcentaje de ácido tartárico recuperado (variable y_2) frente a las variables “Conc. CaCl_2 ” y “pH” para los experimentos realizados a tiempo intermedio ($x_6 = 0$)



Fuente: Rivas y cols., 2006.

Tabla 4.10. Compuestos presentes en las corrientes A y C para los puntos óptimos, así como porcentaje de reducción de esos compuestos

Compuesto	Corriente A	Corriente C	Reducción (%)
Ácido tartárico	77.50 g/L	71.62 g/L	7.59
Ácido láctico	2.84 g/L	1.24 g/L	56.34
Ácido acético	1.24 g/L	0.50 g/L	59.68
Etanol	2.86 g/L	0.33 g/L	88.46
Glicerol	0.25 g/L	0.00 g/L	100
Compuestos fenólicos	58 abs.	1.93 abs.	96.67

Fuente: Rivas y cols., 2006.

Conclusiones

Después de los diferentes experimentos realizados en este trabajo para evaluar la recuperación del ácido tartárico de las lías de vinificación, se llegaron a las siguientes conclusiones:

1. El valor máximo de ácido tartárico solubilizado ha sido más alto en las lías blancas. Esto es debido a que las lías blancas presentan un mayor contenido en sólidos, siendo ahí donde se encuentra el ácido tartárico precipitado.
2. La precipitación selectiva del ácido tartárico como tartrato cálcico ha permitido eliminar pequeñas cantidades de otras sustancias presentes en las lías como glicerina, ácido málico o compuestos fenólicos que dificultarían una posterior cristalización, ayudando a la purificación del ácido tartárico.

En definitiva, el tratamiento secuencial de solubilización de ácido tartárico y precipitación selectiva a tartrato cálcico permite revalorizar un residuo contaminante con la obtención de dos subproductos de gran valor económico: ácido tartárico y nutrientes económicos en procesos biotecnológicos.

Bibliografía

- Box, G. E. P.; W. G. Hunter; J. S. Hunter (1978), *Statistic for Experimenters: an Introduction to Design, Data Analysis and Model Building*, Nueva York, John Wiley, pp. 125-175.
- Bustos, G.; J. M. Cruz; A. B. Moldes; J. M. Domínguez (2004), "Production of Fermentable Media From Vine-Trimming Wastes And Bioconversion Into Lactic Acid by *Lactobacillus pentosus*", *J. Sci. Food Agric.* 84 (15): 2105-2112.
- Flancy, C. (2003). *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*, Madrid, **Mundi-Prensa**.
- Moldes, A. B.; J. M. Cruz; J. M. Domínguez; J. C. Parajó (2002), "Production of a Cellulosic Substrate Susceptible to Enzymatic Hydrolysis From Prehidrolized Barley Husks", *Finlandia, Agr. Food Sci.* 11 (1): 51-58.
- Peynaud, E. (1989), *Enología práctica. Conocimiento y elaboración del vino*, **Mundi-Prensa**, 163-238.
- Ribéreau-Gayon, J.; E. Peynaud; P. Ribéreau-Gayom (1975), *Traité d'Oeologie. Sciences et Techniques du Vin*, tomo II, Francia, Dunod.

- Rivas, B.; A. B. Moldes; J. M. Domínguez; J. C. Parajó (2004), “Development of Culture Media Containing Spent Yeast Cells of *Debaryomyces hansenii* and Corn Steep Liquor for Lactic Acid Production with *Lactobacillus rhamnosus*”, *International Journal of Food Microbiology* 97 (1): 93-98.
- ; A. Torrado; A. B. Moldes; J. M. Domínguez (2006), “Tartaric Acid Recovery From Distilled Lees and Use of the Residual Solid as Economic Nutrient for *Lactobacillus*”, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, en prensa.
- Versari, A.; M. Castellari; U. Spinabelli; S. Galassi (2001), “Recovery of Tartaric Acid From Industrial Enological Wastes”, *Chem. Technol. Biotechnol.* 76: 485-488.

Producción de transglutaminasa microbiana a partir de melaza de caña de azúcar

Production of Microbial Transglutaminase from Sugar Cane Molasses

Portilla Rivera, O. M.^{1}; Téllez Luis, S. J.¹; Velázquez de la Cruz,
G.¹; González Cabriales, J. J.¹; Ramírez de León, J.A.¹; Vázquez, M.^{1,2}*

Resumen

La transglutaminasa es una enzima que cataliza la reacción de transferencia entre los residuos glutamina que actúan como donadores de grupos γ -carboxiamida y el grupo amino de los residuos lisina. Cuando los residuos de lisina actúan como aceptores, se forman enlaces ϵ -(γ -glutamil) lisina, resultando el entrecruzamiento de proteínas. Debido a esta propiedad de ligado, la enzima transglutaminasa se utiliza para mejorar algunas propiedades texturales de alimentos ricos en proteínas, tales como embutidos, reestructurados de pescado, tofu, yogures, etc. La transglutaminasa se encuentra en todos los seres vivos. La transglutaminasa proveniente de microorganismos, especialmente del *Streptovercillium ladakanum*, es la más utilizada como aditivo alimentario.

Por su parte, la caña de azúcar es uno de los principales productos agrícolas de México. Tamaulipas es uno de los estados productores de este cultivo, ubicándose en el quinto lugar de producción a nivel nacional. El principal producto comercial obtenido de la caña de azúcar es la sacarosa o azúcar de mesa. Los principales subproduc-

¹ Departamento de Ciencia y Tecnología, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa Aztlán, Universidad Autónoma de Tamaulipas. Calle 16 y Lago de Chapala, s/n., col. Aztlán, Reynosa, Tam., México, 88740.

*e-mail: manuelportillarivera@hotmail.com

² Departamento de Química Analítica, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Santiago de Compostela-Campus de Lugo, 27002, Lugo, España.

tos son el bagazo y la melaza. La melaza es un líquido viscoso muy rico en azúcares residuales no cristalizados (sacarosa, glucosa y fructosa) durante la producción de sacarosa.

En el presente trabajo, se estudió la factibilidad de utilizar la melaza de caña de azúcar como fuente de carbono para la producción de transglutaminasa microbiana en medios fermentativos con *Streptoverticillium ladakanum*, NRRL-3191. Se estudiaron tres medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono (melaza, mezcla melaza-glicerol y glicerol), y tres velocidades de agitación (200, 300 y 400 rpm). Se determinó el crecimiento en biomasa, la producción de enzimas y el consumo de las fuentes de carbono cada 24 horas durante 120 horas. Los resultados mostraron que con los tres medios de cultivo al incrementar la velocidad de agitación, se favorece la generación de biomasa, obteniéndose a 400 rpm la máxima concentración de biomasa en los medios que contenían sólo melaza y mezcla de melaza-glicerol (aprox. 8 g/L). En cuanto a la generación de enzimas, se obtuvo la máxima producción a 400 rpm en las mezclas de melaza-glicerol alcanzándose una producción de hasta 0.38 U/mL, mientras que en los medios que contenían melaza se alcanzó una producción de aprox. 0.2 U/mL y en lo que contenían glicerol se alcanzó una producción de aprox. 0.1 U/mL.

Abstract

Transglutaminase is an enzyme that catalyses an acyl transfer reaction between γ -carboxamide groups of glutamyl residues and lysine residues in proteins. When lysine residues are the acceptors, it is formed an ϵ -(γ -glutamyl)lisin bound, resulting in protein crosslinking. Due to this property, this enzyme is used for enhancing some textural properties of protein foods like sausages, restructured fish food, tofu, yogurt, etc. Transglutaminase occurs in all life. Transglutaminase obtained by microorganisms, mainly *Streptoverticillium ladakanum*, is the most used as food additive.

Sugar cane is one of the major agricultural products in Mexico. Tamaulipas is one of the states that produces sugar cane in Mexico, reaching the fifth place in production national. The main commercial product obtained from sugar cane is sucrose. Bagasse and sugar cane molasses are the main by-products of the process. Sugar cane molasses is a viscous liquid rich in no-crystallized sugars (sucrose, glucose and fructose) during the production of sucrose.

In this work, we have studied the feasibility of using sugar cane molasses as carbon source for the production of microbial transglutaminase on fermentative media with *Streptoverticillium ladakanum*, NRRL-3191. Three culture media with different carbon source including sugar cane molasses, glycerol and their mixture 1:1 at three agitation speed (200, 300 or 400 rpm) were studied. Time courses of microbial growth, enzyme production and carbon sources consumption were determined each 24 h during 120 h. The results showed that an increase in agitation speed increased the biomass concentration at the three agitation speed, obtaining the highest concentration at 400 rpm in the medium containing only sugar cane molasses and the mixture

of molasses-glycerol (approx. 8 g/L). For the enzyme production, it was obtained the highest production at 400 rpm on media containing mix molasses-glycerol, reaching 0.38 U/mL. While in media containing sugar cane molasses it was obtained approx. 0.2 U/mL and using glycerol alone were obtained approx. 0.1 U/mL.

Introducción

La enzima transglutaminasa microbiana (EC 2.3.2.13) es un aditivo alimentario que cataliza la formación de enlaces isopeptídicos, mediante una reacción de transferencia de grupos acilo entre glutamina (donador) y lisina (aceptor) de las proteínas, generando enlaces covalentes entre proteínas adyacentes (De Jongand y Koppelman, 2002). Esta propiedad se aprovecha en tecnología de elaboración de alimentos protéicos, tales como productos cárnicos, derivados de productos marinos, productos derivados de la soja, en los cuales mejora algunas propiedades de textura (Zhu *et al.*, 1995; Ramírez de León *et al.*, 2004).

El microorganismo *Streptovorticillium ladakanum*, NRRL-3191, es la principal fuente comercial de esta enzima, debido a que es extracelular e independiente de iones calcio (Nonaka *et al.*, 1989).

La melaza de caña de azúcar es un subproducto de la industria azucarera que contiene gran cantidad de azúcares que bajo el proceso convencional de obtención del azúcar es difícilmente recuperable. Actualmente este subproducto de la agroindustria se utiliza principalmente para la alimentación del ganado bovino, obtención de etanol y obtención de levadura prensada (Chen y Chou, 1993). Además, se ha estudiado la aplicación de la melaza como fuente de carbono para la producción de ácido láctico (Wee *et al.*, 2004), ácido cítrico (Parvez *et al.*, 1998) y sorbitol (Caseta *et al.*, 2005). Sin embargo, no se han encontrado antecedentes acerca de la utilización de esta fuente de carbono para la producción de transglutaminasa microbiana.

Otros estudios han mostrado que el glicerol y la caseína tienen un efecto significativo sobre el incremento de biomasa y la actividad de la enzima transglutaminasa microbiana por *Streptovorticillium ladakanum* (Junqua *et al.*, 1997). Se ha encontrado que un medio con 50.5 g glicerol/L y 20 g caseína/L producen 0.725 U de enzima/mL (Téllez-Luis *et al.*, 2004a). El glicerol es una fuente de carbono de elevado costo comercial, por lo que sería favorable encontrar materias primas de bajo costo, como en el caso de la melaza de caña de azúcar.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la viabilidad de la utilización de la melaza de caña de azúcar como fuente de carbono para la producción de transglutaminasa microbiana, observando el efecto de la velocidad de agitación durante la

fermentación sobre la producción de transglutaminasa microbiana en medios conteniendo como sustrato melaza de caña de azúcar.

Materiales y métodos

La melaza de caña de azúcar se obtuvo de una fábrica local de azúcar de mesa (ciudad Mante, Tamaulipas).

La cepa *Streptoverticillium ladakanum*, NRRL-3191, se obtuvo del *Agricultural Research Service Culture Collection* (Peoria, Illinois, Estados Unidos). El liofilizado se inoculó en 100 mL de un medio de reactivación, cuya composición fue glucosa, 5 g/L; extracto de levadura, 4 g/L; extracto de malta, 10 g/L.

Después de 96 horas de cultivo, se tomó una muestra que se utilizó como inóculo de un medio de cultivo estándar (100 mL), cuya composición se menciona en la tabla 1.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo inicial

<i>Nutriente</i>	<i>Concentración</i>
Fosfato de sodio dibásico	5 g/L
Fosfato de potasio monobásico	2 g/L
Sulfato de Magnesio heptahidratado	0.5 g/L
Peptona	10.5 g/L
Extracto de levadura	2.5 g/L
Caseinato de sodio	38.4 g/L
Glicerol	30 g/L

El resultado de la fermentación en este medio se guardó a las 96 horas en congelación con glicerol 50% a -20 °C en tubos Eppendorf. Este nuevo medio de cultivo sirvió para hacer el inóculo utilizado en las fermentaciones de este estudio.

La reactivación del microorganismo congelado se llevó a cabo en 100 mL de medio de reactivación en un agitador orbital a 250 rpm durante 24 horas a 26 °C. Se tomaron 5 mL de inóculo para hacer las fermentaciones experimentales. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado a 200, 300 y 400 rpm, durante 120 horas en un agitador orbital a 26 °C en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo. Los medios de cultivo contenían como fuente de carbono melaza de caña de azúcar 60 g/L; mezcla de melaza de caña de azúcar 30 g/L; con glicerol

30 g/L y glicerol 60 g/L. La melaza de caña de azúcar fue esterilizada por filtración en membranas de 0.2 μm e incorporada a los nutrientes esterilizados en autoclave.

Métodos analíticos

Se tomaron muestras cada 24 horas durante 120 horas de fermentación. Las muestras se centrifugaron a seis mil rpm durante 10 min. El sobrenadante se guardó para determinar las cinéticas de consumo de azúcares residuales y la producción de enzimas. El precipitado se lavó tres veces con agua destilada y se secó a 110 °C durante 24 horas para determinar el incremento de biomasa con base en su peso seco. Los azúcares de la melaza y de los medios fermentativos se analizaron por HPLC con una columna Transgenomic ICSEpICE-ION-300, temperatura de 20 °C, velocidad de flujo de 0.4mL/min y fase móvil de 0.005 M H_2SO_4 .

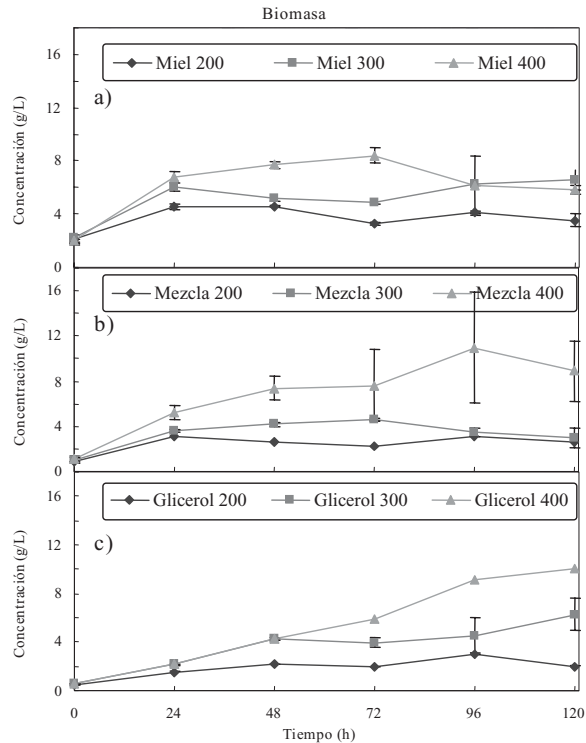
La actividad enzimática de transglutaminasa se determinó por un método colorimétrico basado en la formación de monohidroxamato a partir de N- α -CBZ-GLN-GLY. Una unidad de transglutaminasa es definida como la formación de 1 μMol de monohidroxamato en 1 min a 37 °C (Grossowicz *et al.*, 1950).

Resultados y discusión

Se analizó el contenido de azúcares residuales por HPLC, encontrándose las siguientes concentraciones: Sacarosa, 609.82 g/L; glucosa, 116.53 g/L; fructosa, 158.33 g/L. El total de azúcares fue de 884.68 g/L, por lo que se tuvo que realizar las diluciones correspondientes para obtener los medios de cultivo con las concentraciones previstas.

Los resultados de la figura 1 muestran que al incrementar la velocidad de agitación, se favorece la generación de biomasa para los medios de cultivo que contienen tanto melaza o miel, como mezcla miel-glicerol y glicerol, obteniéndose la máxima concentración de biomasa (~8 g/L) en los medios agitados a 400 rpm, independientemente de la composición de fuente de carbono, lo cual indica que la composición de la fuente de carbono no afecta a la producción de biomasa. Esto es debido a que al aumentar la agitación, se incrementa la oxigenación en los medios de cultivo, lo cual favorece la duplicación celular y la formación de producto. El oxígeno disuelto en el medio de cultivo es uno de los factores ambientales más importantes que afectan el crecimiento de microorganismos y la formación de transglutaminasa (Yan *et al.*, 2005).

Figura 1



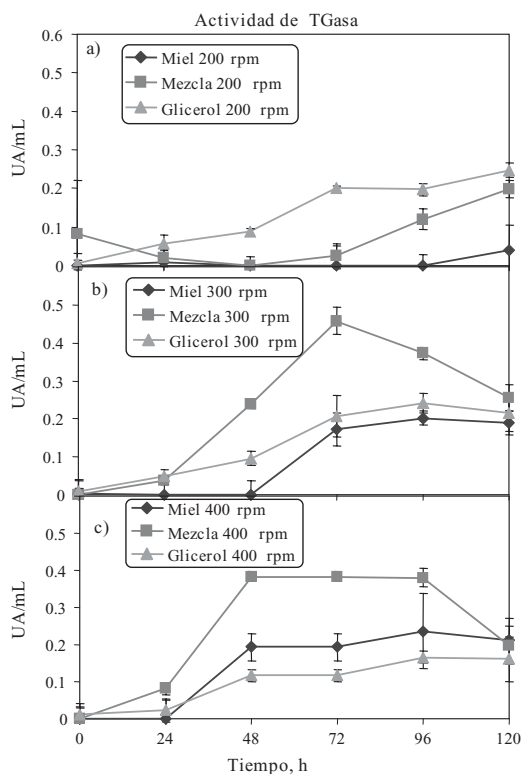
Cinéticas de producción de biomasa en los medios de cultivo que contienen: a) miel o melaza de caña de azúcar a 200, 300 y 400 rpm; b) medios que contienen mezcla de melaza con glicerol a 200, 300 y 400 rpm; y c) medios que contienen únicamente glicerol como fuente de carbono a 200, 300 y 400 rpm.

En la figura 2 se aprecian las cinéticas de producción de la enzima transglutaminasa. Se observa que en los medios que contienen únicamente glicerol como fuente de carbono, la máxima producción de enzima se obtiene a 200 y 300 rpm (~ 0.2 U/mL), observándose una ligera disminución a 400 rpm (~ 0.15 U/mL), tal vez debido al aumento de la viscosidad del medio de cultivo por efecto de la enzima generada sobre el caseinato de sodio, lo cual es probable que haya dificultado la disponibilidad de fuente de nitrógeno necesaria para la producción de enzima (Zhu *et al.*, 1998).

En los medios que contienen únicamente melaza se observó que el incremento de la velocidad de agitación tiene un efecto favorable para la generación de la enzima.

A 200 rpm se observó sólo actividad enzimática a partir de las 96 horas. El tiempo de inicio en la generación de la enzima disminuye a 48 horas a 300 rpm y a 24 horas a 400 rpm, obteniéndose en ambos casos un máximo de ~ 0.2 U/mL, semejante a la producción de enzimas con glicerol a 200 y 300 rpm.

Figura 2



Cinéticas de producción de transglutaminasa microbiana:
 a) Melaza, mezcla melaza-glicerol y glicerol a 200 rpm;
 b) Melaza, mezcla melaza-glicerol y glicerol a 300 rpm;
 c) Melaza, mezcla melaza-glicerol y glicerol a 400 rpm.

El medio más favorable para la producción de enzima transglutaminasa microbiana es el que contiene la mezcla melaza-glicerol, ya que a 300 y 400 rpm se observó la producción de enzima mayor que en los demás medios de cultivo evaluados, obte-

niéndose alrededor de 0.38 U/mL de actividad de enzima. En estos casos se observó una disminución de la actividad enzimática a las 120 horas, lo cual sugiere la actividad de proteasas generadas en el medio.

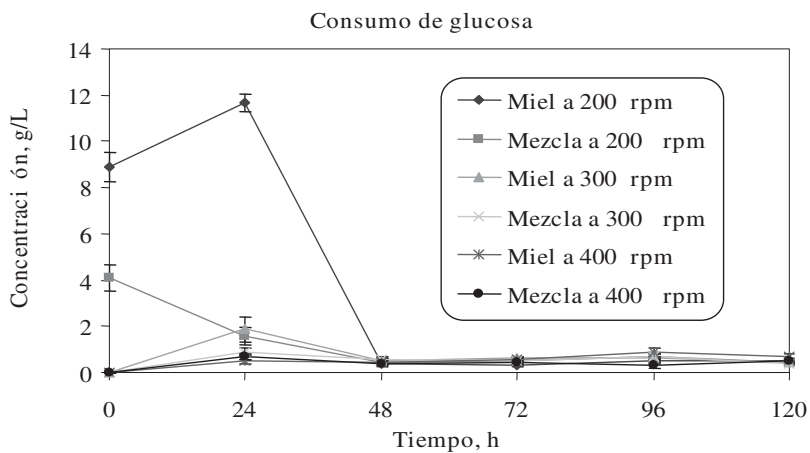
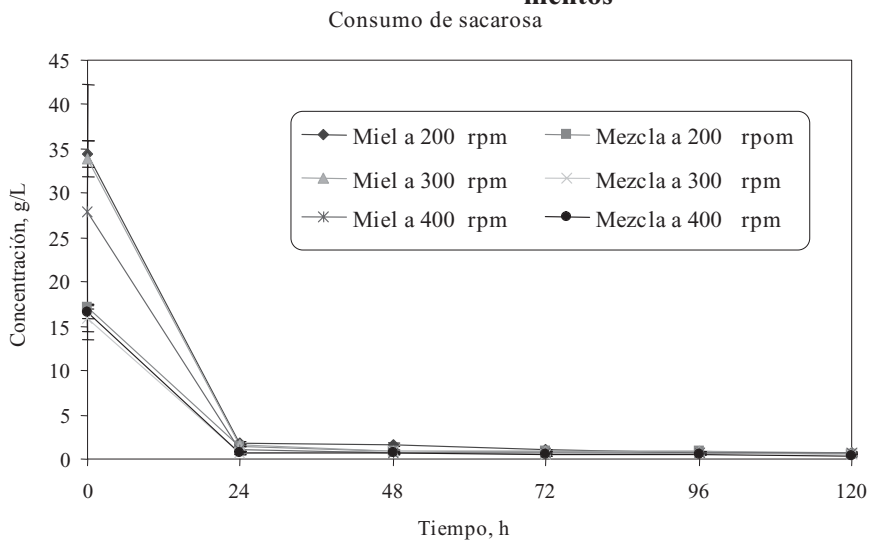
La figura 3 muestra el consumo de las fuentes de carbono en todos los experimentos. No se observó un efecto de la velocidad de la agitación sobre el consumo de las fuentes de carbono provenientes de la melaza de caña de azúcar. Se observa para todos los casos que el tiempo de consumo total de estas fuentes es de 48 horas. Sin embargo, la producción de enzimas se observa aún cuando estas fuentes han sido agotadas por completo (Junqua *et al.*, 1997). Tal vez debido a que la transglutaminasa se libera como zimógeno al medio de cultivo, el cual posteriormente por acción de proteasas es hidrolizado para dar lugar a la transglutaminasa (Zotzel *et al.*, 2003; Pasternack *et al.*, 1998). Sin embargo, para el consumo del glicerol se observó un efecto directo de la velocidad de agitación.

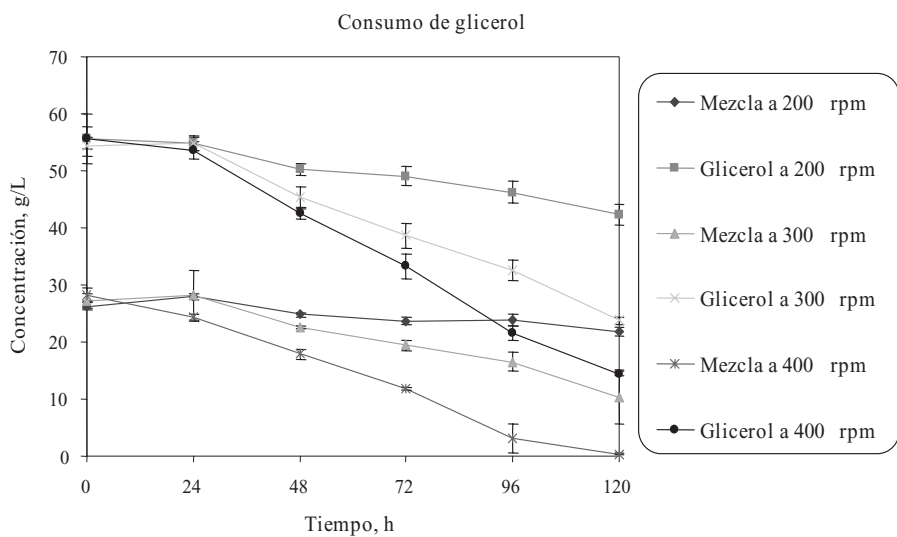
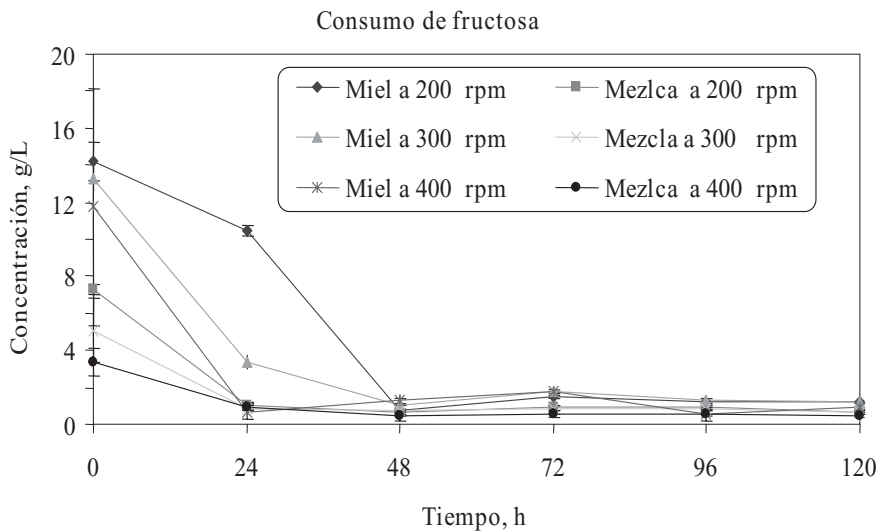
Con el fin de proponer alternativas para la producción de la transglutaminasa microbiana a partir de materias primas de bajo costo, se ha investigado la posibilidad de variar las fuentes de carbono de los medios de cultivo y usar residuos agroindustriales por su alto contenido en azúcares fermentables. Recientemente, se ha comprobado la viabilidad de la producción de transglutaminasa microbiana mediante el uso de hidrolizados de paja de sorgo como sustrato (Téllez-Luis *et al.* 2004b), obteniéndose 0.348 U/mL de actividad en 72 horas a partir de soluciones de 20 g xilosa /L obtenidas de los hidrolizados de paja de sorgo. Las unidades de actividad obtenidas con este sustrato están ligeramente por debajo de las obtenidas utilizando melaza de caña de azúcar como sustrato. Además de que al utilizar la melaza de caña de azúcar no se requiere un tratamiento adicional que implique un costo al momento de usarla como sustrato, en cambio a la paja de sorgo se debe aplicar un tratamiento de hidrólisis.

Conclusiones

Se demostró que la mezcla de melaza de caña de azúcar con el glicerol es un medio de cultivo adecuado para la producción de la enzima transglutaminasa por *Streptovorticillium ladakanum*. Los resultados obtenidos sugieren que el microorganismo requiere el glicerol para elevar la producción de la enzima, ya que cuando éste es eliminado de los medios de cultivo la producción de la enzima transglutaminasa disminuye. Se ha observado en todos los experimentos que la producción máxima de la enzimas se lleva a cabo entre las 48 y 96 horas, por lo que se consideran suficientes 96 horas como tiempo de fermentación. Los azúcares de la melaza son generalmente

Figura 3. Consumo de fuentes de carbono en los experimentos





consumidos en un tiempo máximo de 48 horas, lo cual no afecta a la producción de la enzima transglutaminasa, tal vez debido a que la enzima se genera como zimógeno y no como enzima activa. La activación del precursor es realizada en el medio de cultivo, lo cual significa que ya no es necesario el uso de la fuente energética, tal vez actuando como inductor el caseinato de sodio.

Bibliografía

- Cazetta, M. L.; M. A. P. C. Celligoi; J. B. Buzatob; I. S. Scarminoc; R. S. F. da Silva (2005), “Optimization Study for Sorbitol Production by *Zymomonas mobilis* in Sugar Cane Molasses”, *Process Biochemistry*, 40 (2): 747-751.
- Chen, J. C. P.; C. C. Chou (1993), *Cane Sugar Handbook: A Manual for Cane Sugar Manufacturers and Their Chemists*, doceava edición 12ava. edición, Hoboken, Nueva Jersey, John Wiley and Sons, ISBN 0-471-53037-9.
- De Jongand, G. A. H.; S. J. Koppelman (2002), “Transglutaminase Catalyzed Reactions: Impact in Food Applications”, *Journal of Food Science* 67 (8), 2798-2806.
- Grossowicz, N., E. Wainfan; E. Borek y H. Waelsoh (1950), “The Enzymatic Formation of Hydroxamic Acid from Glutamine”, *J. Biol. Chem.* 187: 111-125.
- Junqua, M.; Durán, R.; C. Gancet; P. Goulas (1997), “Optimization of Microbial Transglutaminase Production Using Experimental Designs”, *Appl. Microbiol.* 48: 730-734.
- Nonaka, M.; H. Tanaka; A. Okiyama; M. Motoki; H. Ando; K. Umeda; A. Matsuura (1989), “Polymerization of Several Proteins by Ca²⁺- Independent Transglutaminase Derived from Microorganisms”, *Agric. Biol. Chem.* 53:2619-2623.
- Parvez, S.; M. I. Rajoka; M. N. Ahmed; F. Latif; R. Shahid, K. A. Malik (1998), “Citric Acid Production from Sugar Cane Molasses by 2-deoxyglucose-resistant Mutant Strain of *Aspergillus niger*”, *Folia Microbiologica* 43 (1): 59-62.
- Pasternack, Ralf; Simone Dorsch; Jens T. Otterbach; Isabella R. Robenek; Sabine Wolf y Hans-Lothar Fuchsbauer (1998), “Bacterial Pro-Transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense* Purification, Characterisation and Sequence of the Zymogen”, *Eur. J. Biochem.* 257, 570-576.
- Ramírez de León, J. A.; S. Josías Luis Téllez; R. Uresti Marín; M. Vázquez (2004), *Aplicaciones de la enzima transglutaminasa en alimentos. Alimentación, equipos y tecnología.* 189:69-73.

- Téllez-Luis, S. J.; J. J. González-Cabriales; J. A. Ramírez; M. Vázquez (2004b), “Production of Transglutaminase by *Streptovorticillium ladakanum* NRRL-3191 Grown on Media Made from Hydrolysates of Sorghum Straw”, *Food Technology and Biotechnology* 42 (1), 1-4.
- ; Ramírez, J. A.; M. Vázquez (2004a), “Production of Transglutaminase by *Streptovorticillium ladakanum* NRRL-3191 Using Glycerol as Carbon Source”. *Food Technology and Biotechnology*, 42 (2), 75-81.
- Wee, Y. J.; J. N. Kim; J. S. Yun; H. W. Ryu (2004), “Utilization of Sugar Cane Molasses for Economical L(+)-Lactic Acid Production by Fermentation of *Enterococcus Faecalis*”, *Enzyme and Microbial Technology* 35 (6-7): 568-573.
- Yan, G. L.; G. C. Du; Y. Li; J. Chen; J. J. Zhong (2005), “Enhancement of Microbial Transglutaminase Production by *Streptovorticillium mobaraense*: Application of a Two-Stage Agitation Speed Control Strategy”, *Process Biochemistry* 40 (2): 963-968.
- Zhu, Y.; A. Rinzem; J. Tramper; E. De Bruin; J. Bol (1998), “Fed-Bach Fermentation Dealing with Nitrogen Limitation in Microbial Transglutaminasa Production by *Streptovorticillium mobareense*”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49 : 251-257.
- ; A. Rinzema; J. Tramper; J. Bol (1995), “Microbial Transglutaminase- A Review of its Production and Application in Food Proccesing”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 277- 282.
- Zotzel, J.; P. Keller; H. L. Fuchsbauer (2003), “Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* Activated by an Endogenous Metalloprotease”, *Eur. J. Biochem.* 270, 3214–3222.

**Producción de ácido láctico en medios nutritivos
adicionados con jarabes de fructosa a partir
de la hidrólisis de la inulina *del Agave americana***
Production of Lactic Acid in Media Made from
High-fructose Fermentable Liquor Obtained from
Hydrolysis of the Inulin of *Agave Americana*

Gómez-Ayala, R. C.¹; Téllez-Luis, S. J.¹; Ramírez de León, J. A.^{1*};
Vázquez Vázquez, M.¹; Jacques Hernández, C.²

Resumen

El *Agave americana* es un recurso agrícola abundante en Tamaulipas, se utiliza para la obtención de mostos ricos en fructosa que mediante fermentaciones naturales o inducidas con levaduras del género *Saccharomyces* permiten la obtención de alcohol. El principal azúcar que se encuentra en el agave es la inulina, la cual se puede hidrolizar para obtener una mezcla de fructosa (principalmente) y glucosa. El proceso de obtención de azúcares fermentables se realiza en forma tradicional e involucra cocciones a fuego lento de hasta 72-96 horas, donde la inulina se hidroliza para así obtener los jarabes fermentables. Para mejorar el proceso de obtención de azúcares fermentables, el agave se sometió a una hidrólisis ácida débil utilizando ácido fosfórico al 1% en un tiempo de 120 minutos a una temperatura de 80°C; actualmente se estudia la posi-

¹ Departamento de Ciencia y Tecnología, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa Aztlán, Universidad Autónoma de Tamaulipas. Calle 16 y Lago de Chapala, s/n., col. Aztlán, Reynosa, Tam., México, 88740.

*e-mail: ramirez@uat.edu.mx

² Centro de Biotecnología Genómica-IPN. Blvd. del Maestro esq. Elías Piña, col. Narciso Mendoza, Reynosa, Tam., México, 88710.

bilidad de usar este mosto fermentable para la producción biotecnológica de aditivos alimentarios con mayor valor comercial (enzima transglutaminasa o ácido láctico). El objetivo de este trabajo fue estudiar la producción de ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* en medios adicionados con jarabes de fructosa obtenido de la hidrólisis de la inulina del *Agave americana*, con una composición de 21.99 ± 0.65 g/L de fructosa y 9.77 ± 0.77 g/L de glucosa. La concentración de fructosa, glucosa y ácido láctico se determinó por HPLC usando un detector de índice de refracción. Los resultados obtenidos muestran que es posible obtener ácido láctico a partir de jarabes de fructosa obtenidos del *Agave americana*, obteniéndose una máxima concentración de ácido láctico de 9.19 ± 1.12 g/L en un tiempo de 96 horas, con una concentración de fructosa de 11.10 ± 0.99 g/L y una concentración de glucosa de 5.79 ± 0.51 g/L. Se requieren estudios adicionales para poder optimizar la producción de ácido láctico a partir de jarabes de fructosa.

Abstract

Agave americana is an abundant agricultural resource in Tamaulipas (Mexico), used to obtain of high-fructose fermentable liquor from natural or induced fermentations with yeast of genus *Saccharomyces* that obtaining the production of alcohol. The inulin is the main sugar from the agave, which can be hydrolyzate to a mixture of fructose (mainly) and glucose. The process to obtain fermentable sugars carry out traditionally involves low heat up to 72-96 h, where the inulin is hydrolysis to high-fructose fermentable liquors. The aim of this work was study the production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in media made from high-fructose fermentable liquors obtained from the hydrolysis of inulin from *Agave americana*. The hydrolysates had a composition of 21.99 ± 0.65 g/L of fructose and 9.77 ± 0.77 g/L of glucose. The concentration of fructose, glucose and lactic acid was determinate for HPLC using a refraction index detector. The results showed that it is possible to obtain lactic acid using high-fructose fermentable liquors from *Agave americana*, obtaining a maximum concentration of 9.19 ± 1.12 g/L of lactic acid and a residual concentration of fructose and glucose of 11.10 ± 0.99 g/L and 5.79 ± 0.51 g/L, respectively. Additional studies are required to optimize the production of lactic acid from high-fructose fermentable liquors.

Introducción

El agave o maguey es de suma importancia en México, ya que ha estado ligado al desarrollo de culturas antiguas. En el estado de Tamaulipas se han identificado de 20 a 26 especies, donde la mayor superficie cosechada pertenece al

grupo *Americanae*. En este estado, la explotación comercial se lleva a cabo con base en la producción de fibra donde se utiliza *Agave lechuguilla* y *Agave fourcroydes*, la producción de tequila donde se utiliza *Agave tequilana* y la producción de mezcal donde se usa *Agave americana* (Jacques-Hernández, 2003).

El agave actualmente es utilizado para la elaboración de bebidas alcohólicas (pulque, aguamiel), bebidas alcohólicas destiladas (mezcal y tequila), así como para la obtención de fibras, alimento, ganadería, artesanías, ornamento y construcción, entre otros (García-Mendoza, 1998; Morales-Carrillo y Esparza, 2001).

El principal carbohidrato del agave o maguey es la inulina, la cual sirve de almacén de energía, el cual es un polisacárido que se encuentra presente en tubérculos, raíces de dalias, alcachofas y dientes de león, además del agave. La inulina es la fructosana más difundida; su hidrólisis total produce, además de fructosa, de 5 a 6 % de moléculas de glucosa que se considera se encuentran en los extremos de las cadenas (Gómez-Ayala, 2003; Badui, 1997).

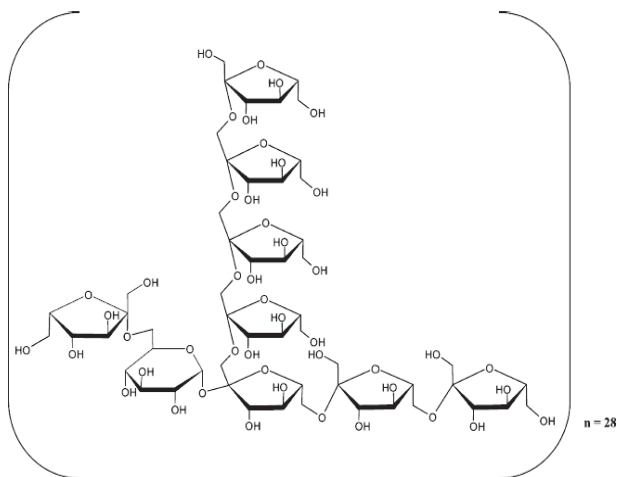
La inulina es un carbohidrato no digerible que está presente en muchos vegetales que consumimos regularmente, frutas y cereales, incluyendo el puerro, cebolla, ajo, trigo, chicoria, alcachofa y plátanos. Industrialmente es obtenida de la raíz de la chicoria y es usada como ingrediente funcional, ya que ofrece una única combinación de interesantes propiedades nutricionales e importantes beneficios tecnológicos.

La inulina ha sido definida como un carbohidrato poli-disperso que contiene principalmente, pero no exclusivamente, enlaces $\beta(2\rightarrow1)$ fructosil-fructosa. Se encuentra una molécula de glucosa inicial, pero no es necesaria. Fructosano es el nombre más generalmente usado para cualquier compuesto que esté constituido mayormente por uno o más enlaces fructosil-fructosa. (Franck y De Leenheer, 2000).

Cuando nos referimos a la definición de inulina, los compuestos GF_n y F_m son considerados dentro de la misma nomenclatura. En la inulina de la chicoria, n (el número de unidades de fructosa unidas a una glucosa terminal) puede variar de 2 a 70. Esto también significa que la inulina es una mezcla de oligómeros y polímeros.

La principal diferencia entre la inulina de la raíz de la chicoria con la inulina del agave es que la primera es una molécula lineal y la segunda una molécula ramificada (con distintos grados de ramificación). El agave presenta una mezcla compleja y sumamente ramificada con una glucosa interna y conteniendo ambos enlaces $\beta(2\rightarrow1)$ y $\beta(2\rightarrow6)$, la estructura se muestra en la figura 1 (López *et al.*, 2003).

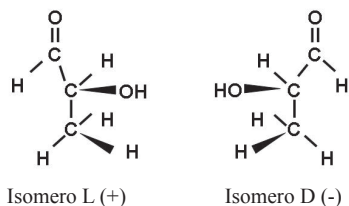
Figura 1. Estructura química de la inulina del Agave



El ácido láctico (o ácido 2-hidroxi-propanoico) (figura 2) es un compuesto importante en la industria alimentaria, debido a sus propiedades como acidulante y conservante; o a la intervención de la fermentación láctica en determinados procesos (por ejemplo, en la fabricación de yogur) (Parajó *et al.*, 1995).

En el mundo, más del 50% del ácido láctico producido se utiliza en la industria alimentaria, ya sea como conservante o como acidulante; el interés por el ácido láctico reside en que posee un elevado valor añadido, en la diversidad de materias primas de las que se puede partir para su producción industrial; y que su producción puede ser por vía química o por vía fermentativa (Bustos-Vázquez, 2005).

Figura 2. Estructura espacial de los dos isómeros del ácido láctico



El ácido láctico y sus derivados tienen muchas aplicaciones en la industria alimentaria y no alimentaria. En el área no alimentaria, poliésteres de ácido láctico pueden ser usados como plásticos degradables con una buena resistencia a la tensión, termoplaticidad, fabricabilidad y degradabilidad (Demirci *et al.*, 1993).

El ácido láctico es un producto químico versátil, usado como: 1) acidulante, saborizante y preservante en la industria alimentaria, farmacéutica, textil y de cuero; 2) en la producción de bases químicas; 3) base para la polimerización formando polylactato biodegradable (PLA) (Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000; Luis Téllez *et al.*, 2003).

El ácido láctico puede producirse industrialmente por vía química o por vía fermentativa; en los últimos años se ha producido un aumento de la proporción de ácido láctico producido por métodos biotecnológicos. Aunque la producción biotecnológica puede basarse en la utilización de hongos y bacterias, la gran mayoría de la bibliografía se refiere a la utilización para este fin de las bacterias lácticas, particularmente *Lactobacillus* (bacterias ácido tolerantes) (Luis Téllez *et al.*, 2003; Moldes *et al.*, 1998).

Casi todos los microorganismos producen una cierta cantidad de ácido láctico de la escisión de los hidratos de carbono y también es uno de los productos de la fermentación alcohólica, aunque en pequeña cantidad. El ácido láctico es, por lo tanto, el producto final de la fermentación láctica; en algunos casos es el único producto final (homofermentación) y en otras ocasiones (heterofermentación) además de lactato se produce etanol y acetato (Casp y Abril, 2003).

Las bacterias ácido lácticas (LAB) son Gram-positivas, no esporuladas, que producen ácido láctico como su mejor producto final durante la fermentación de carbohidratos (Axelsson, 2004). Son usadas en la fermentación de la leche y el principal producto de este proceso es el lactato. Para algunos productos lácteos, como mantequilla, el diacetilo producido por *Lactobacillus lactis* es el componente que más aporta al sabor (Hoefnagel *et al.*, 2002).

En la actualidad la elaboración de mezcal resulta atractiva, debido a las altas cotizaciones y gran demanda que este producto ha alcanzado en los mercados nacionales e internacionales. Sin embargo, hay factores que limitan su elaboración, tales como materia prima, elevados costos de producción, falta de tecnología apropiada, carencia de asesoría técnica y comercialización deficiente (Hidalgo-Reyes *et al.*, 2003) por lo que la búsqueda de nuevas alternativas para procesar el agave son necesarias.

Objetivos

Estudiar la viabilidad de la producción de ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus*, NRRL-B445, en medios hechos con jarabes de fructosa obtenido de la hidrólisis de la inulina del *Agave americana* y valorar el mejor método de esterilización del medio, esterilización por calor o por filtración.

Materiales y métodos

La cepa utilizada fue *Lactobacillus rhamnosus*, NRRL-B445, proporcionada por *National Center for Agricultural Research Service Culture Collection* (Peoria, Illinois, Estados Unidos). Esta cepa se encontraba en estado puro y liofilizada. Fue transferida en condiciones asépticas a matraces con medio líquido que contenía una composición de 20 g/L de glucosa, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de peptona, 2.27 g/L de citrato de sodio dihidratado, 2 g/L de K_2HPO_4 dibásico, 1 mL/L de Tween 80, 0.580 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.120 g/L de $MnSO_4$ monobásica, 0.05 g/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 8.2 g/L de acetato de sodio. El pH del medio se ajustó a 5.85 con HCl. Se incubó a 45 °C por 96 horas con agitación de 200 rpm. De ahí fue transferida a placas petri que contenían las mismas proporciones del medio líquido además de 20 g/L de agar. Semanalmente fueron transferidas a placas petri con medio nuevo para su mantenimiento.

Para los estudios de fermentación se preparó un inóculo con azúcares comerciales en un medio líquido que contenía una composición de 20 g/L de glucosa y los demás nutrientes antes mencionados. El pH del medio se ajustó a 5.85. Se incubó a 45 °C por 48 horas en un fermentador Innova 4900 New Brunswick Scientific (Edison, New Jersey, Estados Unidos) con control de temperatura y agitación a 200 rpm.

Los hidrolizados de agave fueron obtenidos a partir de la hidrólisis de la inulina del agave con ácido fosfórico al 1 % a 80 °C por 2 horas, donde se obtuvieron jarabes de fructosa con una concentración de 11.26 g/L de fructosa y 6.04 g/L de glucosa, los cuales fueron concentrados en un rotavapor. Se prepararon los medios de cultivo con los jarabes de fructosa, obteniéndose una concentración de fructosa de 22 g/L y una concentración de glucosa de 10 g/L, y los nutrientes fueron adicionados en las mismas condiciones que los medios sintéticos.

Se determinó la biomasa por peso seco cada 24 horas. Esto se realizó pesando una muestra de 2 mL de cada matraz de estudio y colocándolo en un tubo de ensayo previamente pesado. Se centrifugó a 3 000 rpm por 10 minutos a 21 °C en una centrífuga refrigerada Hermle Labnet Z 323 K (Alemania).

Se analizó una alícuota en un cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard serie 1 100, con una columna de intercambio iónico para separación de polisacáridos y ácidos orgánicos Transgenomic ICSePICE-ION-300 y detector de índice de refracción.

Resultados

Los resultados para la producción de ácido láctico y consumo de azúcares se muestran en la tabla 1, éstos revelan que se puede obtener hasta 6.89 g/L de ácido láctico a partir de jarabes de fructosa obtenidos de la hidrólisis de la inulina del *Agave americana* con ácido fosfórico al 1% en medios esterilizados por autoclave con una concentración de fructosa de 20.14 g/L; también se obtuvo una concentración de fructosa residual de 14.99 g/L a las 96 horas de fermentación, lo cual indica que puede haber inhibición por el descenso del pH.

Tabla 1. Resultados de la producción de ácido láctico y consumo de azúcares en medios esterilizados por autoclave por *Lactobacillus rhamnosus*

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	Fructosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Ácido láctico (g/L)
0	3.87±1.09	20.14±0.79	8.09±1.54	0.00±0.00
24	4.43±1.98	20.88±0.76	8.45±0.38	2.99±1.99
48	6.32±0.42	18.88±0.77	7.39±0.32	3.90±0.90
72	8.88±0.98	15.43±0.43	6.78±0.29	5.99±0.78
96	9.09±0.76	14.99±0.92	5.13±0.21	6.89±0.31
120	8.12±0.14	13.92±0.73	4.11±0.87	5.68±1.08

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos de la producción de ácido láctico y consumo de azúcares en medios esterilizados por filtración. Estos resultados indican que se puede obtener hasta 9.19 g/L de ácido láctico a partir de jarabes de fructosa obtenidos de la hidrólisis de la inulina del *Agave americana* con ácido fosfórico al 1% en medios esterilizados por filtración con una concentración de fructosa de 21.99 g/L, alcanzando una concentración residual de fructosa de 11.10 g/L a las 96 horas.

Tabla 2. Resultados de la producción de ácido láctico y consumo de azúcares en medios esterilizados por filtración por *Lactobacillus rhamnosus*

<i>Tiempo (h)</i>	<i>Biomasa (g/L)</i>	<i>Fructosa (g/L)</i>	<i>Glucosa (g/L)</i>	<i>Ácido láctico (g/L)</i>
0	2.98±1.65	21.99±0.65	9.77±0.77	0.00±0.00
24	5.04±0.73	18.90±1.90	8.90±0.90	3.90±0.76
48	6.87±0.76	17.87±0.38	7.79±0.54	4.99±0.68
72	9.76±0.37	14.00±0.54	5.77±1.08	8.88±1.10
96	9.10±1.08	11.10±0.99	5.79±0.51	9.19±1.22
120	8.56±1.87	10.90±0.76	5.90±0.76	6.90±0.68

Conclusiones

Los jarabes ricos en fructosa obtenidos a partir de la hidrólisis de la inulina del *Agave americana* por medio de hidrólisis con ácido fosfórico al 1 % pueden ser utilizados para la producción de ácido láctico. El método de esterilización por filtración generó más ácido láctico que la esterilización por calor.

Se sugieren estudios adicionales para optimizar la producción de ácido láctico a partir de jarabes ricos en fructosa a partir de la hidrólisis de la inulina del *Agave americana*.

Bibliografía

- Axelsson L. (2004), "Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology" [capítulo 1]; editado por S. Salminen; A. V. Wright; A. Ouwehand; *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspect*, 3a. ed.
- Badui, S. (1993), *Química de los Alimentos*, Editorial Alambre Mexicana, capítulos 2 y 11, pp. 116-117, 538.
- Bustos Vázquez, M. G. (2005), *Aprovechamiento de residuos agroindustriales para la obtención de medios nutritivos económicos y de ácido láctico*, tesis de doctorado.
- Casp, A.; J. Abril (2003), *Procesos de conservación de alimentos* [capítulo 3: "Conservación por fermentación"], 2a. ed., Madrid, Mundi-Prensa, pp. 93-123.

- Demirci, A.; A. L. Pometto III; K. E. Johnson (1993), "Lactic Acid Production in a Mixed-Culture Biofilm Reactor", *Applied and Environmental Microbiology*, (59), 1: 203-207.
- Franck, A. Ir. De Leenheer (2000), *Inulin*, Bélgica, Tienen (Orafti), Wiley Publishing.
- Galicia García, D.; G. Villa y Rabasa; L. H. Hernández Gómez; F. Diego Nava; L. Silva Santos; M. Hidalgo Reyes; J. Pozos Osorio (2003), *Diseño de una picadora de gajos de Agave angustifolia Haw*, México, Reporte de programa de estudio apoyado por la coordinación General de Posgrado e Investigación del Instituto Politécnico Nacional.
- García Mendoza, A. (1998), *Con sabor a maguey: Guía de la colección nacional de agaváceas y nolináceas del jardín botánico*, México, Instituto de Biología-UNAM, México.
- Gómez Ayala, R. C.; J. A. Ramírez de León; C. Jacques Hernández; M. Vázquez Vázquez (2003), "El Agave americana como nueva fuente de inulina y oligo-fructosa", *Alimentación Equipos y Tecnología*, año XXIV, núm. 201, mayo, pp. 63-67.
- Hidalgo Reyes, M.; G. Villa y Rabasa; L. H. Hernández Gómez; G. Urriolagoitia Calderón; F. Diego Nava; D. Galicia García; J. Pozos Osorio (2003), *Diseño de una maquina partidora de piña de agave (Agave angustifolia haw) para la producción de mezcal en el estado de Oaxaca*, México, Reporte de programa de estudio apoyado por la coordinación General de Posgrado e Investigación del Instituto Politécnico Nacional.
- Hoefnagel, M. H. N.; M. J. C. Starrenburg; D. E. Martens; J. Hugenholtz; M. Klee-rebezem; I. I. Van Swan; R. Bongers; H. V. Westerhoff; J. L. Snoep (2002), "Metabolism Engineering of Lactic Acid Bateria, the Combined Approach: Kinetic Modeling, Metabolic Control and Experimental Analysis", *Microbiology* 148, 1003-1013.
- Hofvendahl, K.; B. Hahn-Hägerdal (2000), "Factors Affecting the Fermentative Lactic Acid Production from Renewable Resources", *Enzyme and Microbial Technology* 26, 87-107.
- Jacques Hernández, C. (2003), *Estudio de factibilidad ecosistémica y justificación socioeconómica para el cultivo de agave mezcalero en el Estado de Tamaulipas*, México, Reporte de programa de estudio apoyado por la coordinación General de Posgrado e Investigación del Instituto Politécnico Nacional.
- Moldes, A. B.; J. L. Alonso; J. C. Parajó (1998), "Bioconversión de madera pretratada por hidrólisis y fermentación simultáneas: obtención de ácido láctico en sistemas con alimentación de sustrato en varias etapas", *Revista de Química Teórica y Aplicada*, Afinidad LV, 478, noviembre-diciembre: 407-412.

- Morales Carrillo, Nicolás; Gastón Esparza Frausto (2001), *Guía para el manejo de plantaciones de maguey mezcalero*.
- Parajó, J. C.; J. L. Alonso; V. Santos; A. B. Moldes (1995), “Producción biotecnológica de ácido láctico: cinética y tecnologías de fermentación”, *Revista Internacional de Derecho Alimentario*, núm. 13.
- Téllez Luis, S. J.; A. B. Moldes; M. Vázquez; J. L. Alonso (2003), *Alternative Media for Lactic Acid Production by Lactobacillus delbrueckii NRRL B-445*, Instituto de Ingeniería Mecánica, Trans IchemE, vol. 8, parte C.

**El mezcal de *Agave salmiana*:
una bebida alcohólica étnica**
*The Mezcal from Agave Salmiana:
an Ethnic Alcoholic Beverage*

Barba de la Rosa, A. P.; De León-Rodríguez, A.¹

Resumen

Mezcal es una palabra derivada del náhuatl *mexcalli*, donde *metl* significa maguey e *ixcalli* significada cocinado o hervido. En la actualidad, *mezcal* se refiere a la bebida alcohólica obtenida por la fermentación y destilación artesanal del jarabe de *Agave*. Existen varias especies de plantas del género *agaves*, tales como *A. salmiana*, *A. angustifolia*, *A. durangensis*, *A. potatorum* y otras que se usan como materia prima. Sin embargo, sólo la especie silvestre de *A. salmiana* se usa para la producción del mezcal en el altiplano mexicano, mientras que *A. angustifolia* y *A. potatorum* se usan en el sur de México. La clasificación de mezcales, estudios de la cinética del proceso fermentativo y el análisis químico por cromatografía de gases y espectrometría de masas, son descritas a lo largo de este capítulo.

Abstract

Mezcal is a word derived from Nahuatl *mexcalli* where *metl* means maguey and *ixcalli* means cocked or boiled. Nowadays, *mezcal* refers to the alcoholic beverage obtained by artisan fermentation and distilling from *Agave* syrup. Various species of agave plants such as *A. salmiana*, *A. angustifolia*, *A. durangensis*, *A. potatorum* and others are used as raw-material. However, only the wild-type *A. salmiana* is used for production of mezcal in the Mexican Altiplano, whereas *A. angustifolia* and *A. potatorum* are

¹ División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Camino a la Presa San José 2055, Lomas 4^a, sección 78216, San Luis Potosí, SLP, México, e-mail: aleonr@ipicyt.edu.mx

used in south of Mexico. Classification of mezcals, kinetics studies on fermentative process and chemical analysis by gas chromatography and mass spectrometry are described through in this chapter.

Antecedentes

El pulque era la única bebida alcohólica conocida por los nativos mexicanos, pero con la llegada de los españoles a México en 1519 y la introducción del proceso de fermentación, nuevas bebidas con mayor grado de alcohol surgieron y fueron nombradas genéricamente como “vino de agave”. Los pocos reportes existentes, refieren que la primera gran empresa productora de vino de agave se encontraba en el pueblo de Tequila (Jalisco, México) por el Sr. Pedro de Tagle en el siglo XVI (Muria, 1994). El mezcal es entonces la bebida alcohólica predecedora del tequila, por lo que puede decirse que el tequila es una especie de mezcal, pero el mezcal no es una especie de tequila. Las diferencias principales entre el mezcal y el tequila son la materia prima: el tequila es elaborado por *A. tequilana*, mientras que mezcal es elaborado con *A. salmiana*, *A. angustifolia* y *A. potatorum*; y el proceso de fermentación está totalmente controlado para la producción de tequila (Cedeño 1995, Arrizon y Gschaedler 2002). Debido a la popularidad del vino de mezcal, varias empresas se establecieron en diversas regiones de México. Actualmente la Norma Oficial establece que los estados de Oaxaca, Guerrero, San Luis Potosí, Zacatecas y Durango constituyen la región del mezcal (MMCI, 1994).

Otras bebidas provenientes de plantas del género *Agave* son denominadas por nombres específicos tales como Bacanora (producida en el estado de Sonora a partir de *Agave angustifolia* Haw) y recientemente el *Henequila* o *Sisal*, elaborada a partir de *Agave fourcroydes* en la península de Yucatán; la Raicilla, en Jalisco y el Sotol, elaborado a partir de *Dasilyrium* spp.

Clasificación de mezcales

Los mezcales se clasifican como Mezcal tipo I o 100% *agave*, cuando los azúcares provienen exclusivamente de las mieles de *agave*. Los mezcales tipo II se conocen cuando el medio de cultivo es formulado con 80% de miel de *agave* y 20% de

azúcares obtenidos de otras fuentes como caña de azúcar, jarabe de maíz, entre otros.

Los mezcales también se clasifican en tres tipos generales basados en el proceso que sigue después de la destilación, y éstos se conocen como: Mezcal blanco, embotellado justo después de la destilación; Mezcal reposado, mantenido de 2 a 6 meses en barricas de encino blanco; y el Mezcal añejado, que deberá mantenerse al menos 12 meses en las barricas de encino blanco. De éstos, sólo a los mezcales blanco y reposado se les agrega de una a cuatro larvas de gusano; por esto, al mezcal se le conoce como “la bebida del gusano”.

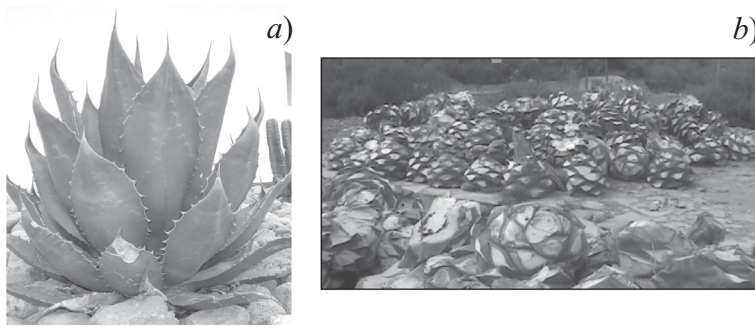
Materia prima

La Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994, publicada el 12 de junio de 1997, establece que las plantas autorizadas para la producción de mezcal son: *Agave angustifolia haw*; *Agave esperima Jacobi* (conocida como *Agave scabra*); *Agave weberi cela*; *Agave potatorum zucc*; *Agave salmiana Otto Ex Salm SSP Crassispina (Trel) Gentry*. Las plantas que se usan para la producción de mezcal deberán crecerse en las regiones marcadas en la Declaración General para la Protección del Mezcal, publicada el 28 de noviembre en el *Diario Oficial de la Federación* (MMCI 1994). Sólo el tipo silvestre de *A. salmiana* se usa para la producción de mezcal en la región del altiplano mexicano (San Luis Potosí y Zacatecas), mientras que *A. Angustifolia* y *A. Potatorum* son las especies usadas en el sur de México (Oaxaca y Guerrero) y *A. durangensis* en el estado de Durango.

Proceso de producción

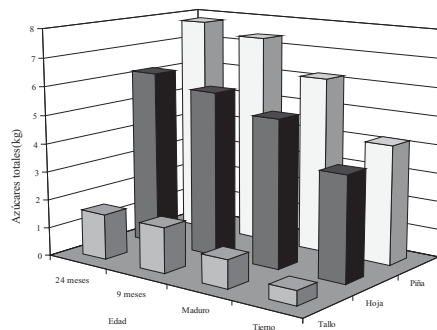
Las plantas de *agave* deben tener el mismo estado de maduración y tamaño, usualmente entre ocho y diez años (figura 1a). El primer paso es la castración de la planta; ésta es una actividad básica para obtener el material crudo de alta calidad que consiste en la eliminación de inflorescencia. Las plantas se cosechan después de 12 a 24 meses de post-castración, luego de lo cual se eliminan las hojas hasta obtener las cabezas (también llamadas piñas) (figura 1b).

Figura 1. Planta de *Agave salmiana* cultivada en San Luis Potosí, México



La cantidad de azúcares en las cabezas se ve afectada por el tiempo de cosecha después de que las plantas fueron castradas. La figura 2 muestra la relación entre la madurez y la cantidad de azúcares totales en los componentes morfológicos de *Agave salmiana*. Las cabezas alcanzan las más altas concentraciones de azúcar después de 24 meses post-castración. Por otro lado, la cantidad de carbohidratos en las plantas se modifica durante año-estación como resultado de la adaptación al clima (Aguirre-Rivera *et al.*, 2001). Se ha estimado que se necesitarán 33 kg de material cosechado durante la primavera para la producción de 1 litro de mezcal y sólo 22-24 kg son necesarios cuando la cosecha es en invierno.

Figura 2. Contenido de azúcares en cabezas, hojas y *blade* analizadas después de la castración



Fuente: Aguirre-Rivera *et al.*, 2001.

Proceso de cocción

El proceso de cocción tiene tres objetivos principales: *a)* hidrolizar la inulina y otros fructo-oligosacáridos hasta obtener fructosa; *b)* suavizar el material para hacer más fácil el proceso de molienda; *c)* Producir compuestos orgánicos característicos del aroma del mezcal.

El proceso de cocción se lleva a cabo en hornos de piedra usando calor húmedo o calor seco con rocas precalentadas. Recientemente los productores de mezcal han aceptado muy satisfactoriamente la sustitución de los hornos de piedra por autoclaves para la cocción o a gran escala de las piñas de mezcal.

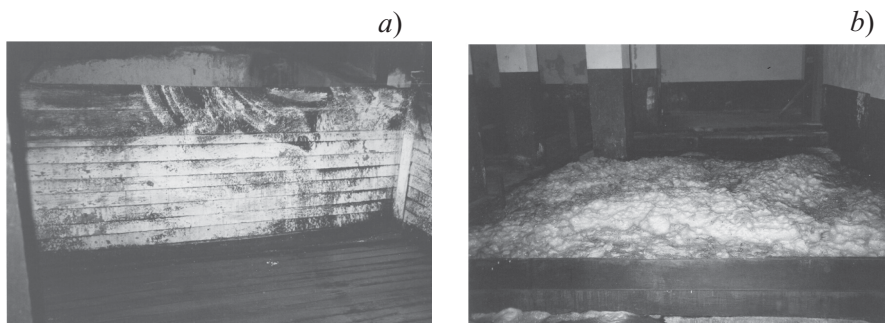
Proceso de molienda

Las cabezas cocinadas se rompen en piezas para facilitar el proceso de molienda. Los pedazos de plantas se muelen en molinos de piedra para extraer la miel de *agave*. Una alta cantidad de material ligno-celulósico se obtiene y representa alrededor del 40% del total del material crudo; este sub-producto se usa como combustible por algunas empresas. El jarabe es conducido por canales subterráneos a los fermentadores. Regularmente este jarabe de *agave* se diluye con agua a 10-11°Bx antes del proceso de fermentación.

Proceso de fermentación

La etapa fermentativa se lleva a cabo en fermentadores abiertos formados por pilas de piedras cubiertas con madera (figura 4a). Los fermentadores se llenan con el jarabe de *agave* a 10°Bx, se adiciona sulfato de amonio como fuente de nitrógeno a una concentración final de aproximadamente 2 g/L y se inocula un caldo con los microorganismos seleccionados naturalmente de fermentaciones previas (figura 4b). Dentro de los varios microorganismos que llevan a cabo la fermentación alcohólica, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia sp* y *Zymomonas mobilis* son los más abundantes.

Figura 4. Fermentador industrial usado en la Empresa Saldaña (Zacatecas, México)



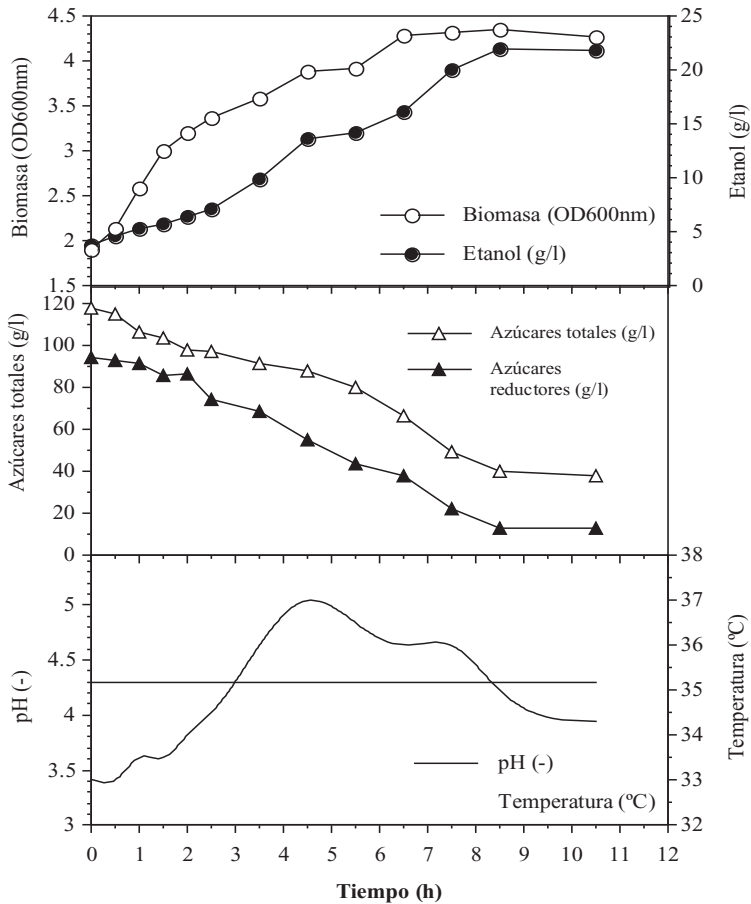
a) Fermentador vacío; b) Fermentador operando

El etanol es el principal producto de la fermentación alcohólica y alcanza concentraciones de 3 a 4 por ciento. La producción de metanol es inherente a la fermentación alcohólica producida a partir de la pectina, lignina y paredes celulares (Cedeño, 1995). Sin embargo, ya que el metanol tiene un efecto neurotóxico, la máxima concentración permitida es de 300 mg/100 mL de alcohol etílico anhidro (aproximadamente 1200 ppm) (MMCI, 1994; Cedeño, 1995). La producción de alcoholes superiores tales como 2-butanol, 2-metil propanol y 2/3 metil-1-butanol ocurre por el catabolismo de aminoácidos, aldehídos que son reducidos por las alcohol deshidrogenasas a sus respectivos alcoholes, sin embargo, su razón de producción específica es más bajo que los esperados para etanol (Pronk *et al.*, 1996).

La figura 5 muestra una cinética típica de la fermentación en biorreactor en gran escala. La fermentación es inoculada con 5-8% del caldo prefermentativo y opera a un volumen de cinco mil L. La concentración de biomasa formada por una mezcla de bacterias y levaduras llega a una concentración final de 4 g/L, mientras que la producción de etanol sigue un comportamiento de producción asociada, obteniéndose una concentración final de 22g/L.

Los azúcares se consumen durante la fase exponencial y paran alrededor de las ocho o nueve horas. En todo caso, los azúcares reductores y azúcares totales no se consumen completamente, alrededor de 13 g/L y 40g/L, respectivamente, permanecen en el residuo no fermentable. El pH del medio permanece constante a 4.32 durante todo el proceso, mientras que la temperatura se incrementa durante la fase exponencial de 33 a 37°C y decae cuando se detiene el crecimiento celular.

Figura 5. Cinética típica durante la producción de mezcal en un fermentador a gran escala



Destilación

El jarabe fermentado se conduce por gravedad al compartimiento de destilación. La destilación es la operación unitaria en la que se concentran el etanol y otros compuestos orgánicos. Los alambiques es la configuración más popular usada para la destilación del mezcal, sin embargo, el uso de otras configuraciones con las colum-

nas de destilación de operación continua actualmente se usan para mejorar el proceso de recuperación.

El alambique se construye con cobre, metal maleable, buen conductor del calor, resistente a la corrosión y cataliza la oxidación de tioles y mercaptanos que pueden conferir mal olor a la bebida.

Almacenamiento y añejamiento

El almacenamiento del mezcal se lleva a cabo en grandes tanques de plástico o acero, antes que el producto sea embotellado. El mezcal destinado a añejamiento se prepara para este proceso. El proceso de añejamiento es una transformación lenta del mezcal como resultado de reacciones intermoleculares durante el almacenamiento. La Norma Oficial Mexicana establecida para el añejamiento establece que se debe llevar en barricas de 200L construidas con roble blanco. Los mezcales reposados se conservan de dos a seis meses, mientras que los mezcales añejados deberán almacenarse por arriba de 12 meses.

Análisis y composición

El mezcal consiste de una armónica mezcla de compuestos que se producen durante la fermentación y otros provenientes de la materia prima, tales como terpenos y ácidos grasos de cadena larga. Los compuestos principales del mezcal (CPM) se definen como sustancias con concentraciones mayores de 10 mg/mL y normalmente son detectados y cuantificados por cromatografía de gases (CM) usando la inyección directa de las muestras. Los compuestos minoritarios del mezcal son sustancias detectadas sólo hasta después de que la muestra ha sido concentrada por extracción líquido-líquido o líquido-sólido (SPME), seguida por el análisis de cromatografía de gases y después por espectrometría de masas (GC-MS) (De León-Rodríguez *et al.*, 2006). La tabla 1 enlista los compuestos detectados en los diferentes tipos de mezcal. Seis alcoholes, dos ésteres de etilo y ácido acético se clasifican dentro de los CPM (De León-Rodríguez *et al.*, 2006). Para el tequila, estos compuestos son: etanol, 2/3 metil-butanol, alcohol fenil-etilo, ácido acético, ácidos decanoico y dodecanoico (López, 1999). Los alcoholes fenil-etilos son ácidos grasos de cadena larga, etil ésteres que están presentes en mezcales, pero en pequeñas cantidades.

Tabla 1. Concentraciones de los principales compuestos encontrados en los diferentes tipos de mezcales en mg/L

<i>R</i> _t ^a (min)	Compuesto	Blanco (n=4)	Blanco con gusano (n=3)	Reposado (n=3)	Reposado con gusano (n=3)	Añejado (n=3)
4.46	Acetato de etilo	182±11	103±6	150±12	113±5	107±10
4.63	Metanol	816±72	703±89	891±46	881±38	834±76
5.30	Etanol ^b	42±1	39±2	39±2	42±0	42±5
6.66	2-Butanol	61±17	54±19	66±20	56±6	ND
6.91	n-Propanol	700±108	728±18	738±87	615±62	388±26
7.87	2 Metil-propanol	17±4	ND	ND	37±4	48±7
9.62	2/3-Metil-1-Bu- tanol	30±7	26±10	ND	17±4	98±19
11.72	Etil 2-hidroxi- propanoato	105±13	101±4	117±15	109±17	192±32
13.26	Ácido acético	169±51	224±48	207±27	133±5	219±9
-	High Alcohols ^c	809±122	808±32	843±64	876±52	533±51

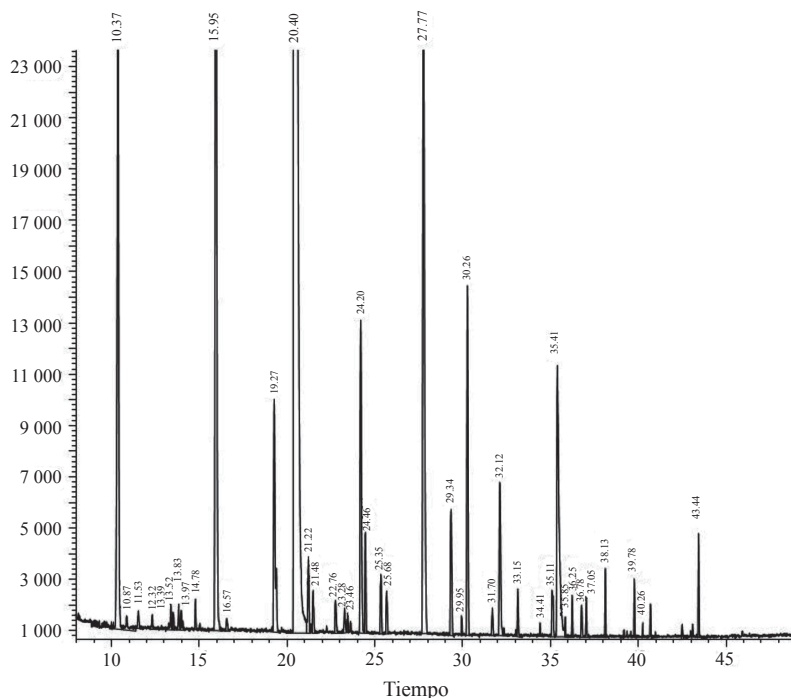
^a *R*_t= Tiempo de retención en columnas HP-Innowax, ^b Unidad para la concentración de etanol es % v/v,

^c Suma de alcoholes con tres o más carbonos. ND= no detectable, n= número de marcas. Los datos representan el promedio ± desviación estándar de cada tipo de mezcal. Adaptado de De León *et al.*, 2006.

La figura 6 muestra un cromatograma de un mezcal reposado por (SPME-GC-MS) y la tabla 2 presenta una lista de los 37 compuestos identificados en los diferentes tipos de mezcal. Además de los seis alcoholes CMM, el butanol y el alcohol fenil-etilo fueron detectados también en mezcales reposados y añejados, mientras que los alcoholes no saturados como 3-hexeno-1-ol y 6.9-pentadecadien-1-ol fueron detectados sólo en mezcales con gusanos (De León-Rodríguez *et al.*, 2006).

Un grupo abundante de ésteres de acetato de etilo a octadecanoato de etilo y fenil-butanoato fueron detectados en el mezcal (De León-Rodríguez *et al.*, 2006). El grupo químico está bien caracterizado por su aroma a frutas que contribuye en el bouquet de las bebidas alcohólicas (López, 1999; TerSchure *et al.*, 1998). El ácido acético, el propiónico y el hexanoico fueron encontrados en todos los mezcales, mientras que el ácido pentanoico se encontró solamente en mezcales blancos con gusano y mezcales añejados.

Figura 6. Cromatograma de un mezcal resposado analizado por SPME-GC-MS



Otros grupos químicos tales como aldehídos, cetonas, furanos, terpenos, naftalenos, alquenos y alquinos fueron también detectados. Para tequilas, los compuestos minoritarios son ésteres ácidos, furanos, cetonas terpenos y otros (López, 1998).

Pocos terpenos han sido reportados en tequila tales como derivados de linalil, nerolidol, timol y terpineol (López, 1998, 2001). Mientras que los terpenos encontrados en mezcales son limoneno, terpineol y terpineneo (De León-Rodríguez *et al.*, 2006). Peña-Álvarez y otros autores (2004) caracterizaron los terpenos provenientes de tres especies de *agave* y demostraron la presencia de limoneno, terpineneo y terpineol en *Agave salmiana*, la materia prima usada para la producción de mezcal. Se ha reportado que los terpenos son liberados por las glicosidasas de levaduras durante el proceso de fermentación (King y Dickinson, 2000, 2003). La presencia de limoneno en mezcal de *A. salmiana* es interesante, ya que ha sido reportado que bajas cantidades de limoneno induce la regresión de carcinomas mamarios y es clasificado como agente quemopreventivo y quemoterapéutico (Crowe *et al.*, 1991; Hagg, 1992).

Tabla 2. Compuestos detectados en mezcales por SPME-GC-MS

<i>Rt</i> [#]	<i>Compuesto</i>	<i>Mezcal</i>
<i>Alcoholes</i>		
1.51	Metanol	1,2,3,4,5
3.66	2-Butanol	1,2,3,4,5
4.06	Propanol	1,2,3,4,5
5.88	2-Metil-propanol	1,2,3,4,5
8.72	Butanol	3,4,5
10.26	2/3-Metil-1-butanol	1,2,3,4,5
37.04	Alcohol feniletilo	3,4,5
42.11	6,9-Pentadecadien-1-ol	2,4
42.75	3-Hexen-1-ol	2,4
<i>Aldehídos y cetonas</i>		
1.22	Acetaldehído	1,2,3,4
13.07	3-hidroxi-2-butanona	1,2,3,4,5
<i>Ésteres</i>		
1.19	Acetato de etilo	1,2,3,4,
3.88	Butanoato de etilo	1,2,3,4,5
6.66	Pentanoato de etilo	1,2,3,4,5
10.4	Hexanoato de etilo	1,2,3,4,5
13.9	Butanoato de pentilo	1,2,3,4,5
15.9	Etil 2-hidroxiopropanoato	1,2,3,4,5
19.28	Etil octanoato	1,2,3,4,5
27.81	Etil decanoato	1,2,3,4,5
35.1	Etil dodecanoato	1,2,3,4,5
39.77	Etil hexadecanoato	1,2,3,4,5
43.43	Etil octadecanoato	1,2,3,4,5

Continúa...

- 1) Blanco
- 2) Blanco con gusano
- 3) Reposado
- 4) Reposado con gusano
- 5) Añejado

**Tabla 2. Compuestos detectados en mezcales por SPME-GC-MS.
(continuación)**

<i>Rt^a</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Mezcal</i>
<i>Ácidos</i>		
20.4	Acético	1,2,3,4,5
24.2	Propionico	1,2,3,4,5
32.12	Pentanoico	2,5
35.44	Hexanoico	1,2,3,4,5
<i>Furanos</i>		
10.02	2-Pentilfuran	1,4
21.20	Furfural	1,2,4,5
25.66	5-Metil-2-furancarboxialdehído	1,2,4
<i>Terpenos</i>		
8.15	Limoneno	1,2,3,4,5
29.96	3-Metil-6-(1-metil-etilideno) ciclohexeno	1,3,4,5
30.2	Terpineol	1,2,3,4,5
<i>Otros</i>		
11.5	4-Etil-1,2-dimetil benzene	1,2,3,4,5
22.79	Metil-2-penteno	1,2,3,5
31.73	Naftaleno	1,3,5
43.1	1,8-Nonadienp	2,4
43.7	1-Dodecino	2,4

- 1) Blanco
- 2) Blanco con gusano
- 3) Reposado
- 4) Reposado con gusano
- 5) Añejado

^a Tiempo de retención en la columna HP-FFAP. Adaptado de León-Rodríguez *et al.*, 2006.

Sólo los mezcales con gusanos mostraron la presencia de 6.9-pentadecadien-1-ol, 3-hexen-1-ol, 1.8-nonadiene, y 1-dodecine (tabla 3). El 3-hexen-1-ol se encuentra presente en alcohol de hoja verde y también en insectos. Interesantemente, se ha re-

portado que el 3-hexen-1-ol presenta una actividad feromonal en elefantes e insectos (Rassmusen, 2002; Reinecke, 2002).

Bibliografía

- Aguirre-Rivera, J. R.; H. Charcas-Salazar; J. L. Flores-Flores (2001), “El maguey como material prima para el mezcal potosino”, en *El maguey mezcalero potosino*, San Luis Potosí, México, Copocyt (eds.), pp. 57-63.
- Arrizon, J.; A. Gschaedler (2002), “Increasing Fermentation Efficiency at High Sugar Concentrations by Supplementing an Additional Source of Nitrogen During the Exponential Phase of the Tequila Fermentation Process”, *Can. J. Microbiol.* 48: 965-970.
- Cedeño, M. (1995), “Tequila Production”, *Crit. Rev. Biotechnol.* 15:1-11.
- Crowell, P. L.; R. R. Chan; Z. Ren; Ch. E. Elson; M. N. Gould (1991), “Selective Inhibition of Isoprenylation of 21-26 kDa Proteins by the Anticarcinogen d-Limonene and Its Metabolites”, *J. Biol. Chem.* 266:17679-17685.
- De León-Rodríguez, A.; L. González-Hernández; A. P. Barba de la Rosa; M. P. Escalante-Minakata; M. G. López (2006), “Characterization of Volatile Compounds of Mezcal, an Ethnic Alcoholic Beverage Obtained from *Agave Salmiana* J. Agric”, *Food Chem.* 54:1337-1341.
- Hagg, J. D.; M. J. Lindstrom; M. N. Gould (1992), “Limonene-Induced Regression of Mammary Carcinomas”, *Cancer Res.* 52:4021-4026.
- King, A. J.; J. R. Dickinson (2000), “Biotransformation of Monoterpene Alcohols by *Saccharomyces Cerevisiae*, *Torulaspora Delbrueckii* and *Kluyveromyces Lactis*”, *Yeast.*, 16:499-506.
- ; J. R. Dickinson (2003), “Biotransformation of Hop Aroma Terpenoids by Ale and Lager Yeasts”, *FEMS Yeast Res.* 3:53-62.
- López, M. G. (1999), “Tequila aroma”, en Shahidi y Ho (eds.), *Flavor Chemistry of Ethnic Foods*, Nueva York, Kluwer Academic-Plenum Publishers, pp. 211-217.
- ; J. P. Dufour (2001), “Charm Analysis of Blanco, Reposado and Añejo Tequilas”, en J. V. Leland; P. Schieberle; A. Buettner; T. E. Acree (eds.), *Chromatography-Olfactometry. The state of the art*, ACS Symposium Series 782; Washington D. C., American Chemical Society: 60-72.
- MMCI (Mexican Ministry of Commerce and Industry) (1994), “Regulations: NOM-070-SCFI-1994. Alcoholic Drinks-Mezcal Specifications”, México, *Diario Oficial de la Federación*, 28 de noviembre.

- Muria, M. J. (1994), “El tequila. Boceto histórico de una industria”, *Cuadernos de Difusión Científica*, 18:28-30.
- Peña-Álvarez, A.; L. Díaz; A. Medina; C. Labastida; S. Capella; L. E. Vera (2004), “Characterization of Three *Agave* Species by Gas Chromatography and Solid-Phase-Gas Chromatography-Mass Spectrometry”, *J. Chromatogr. A.*, 1027:131-136.
- Pronk, J. T.; H. Y. Steensma; J. P. Van Dijken (1996), “Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces Cerevisiae*”, *Yeast*. 12:1607-1633.
- Rasmussen, L. E. L.; H. S. Riddle; V. Krishnamurthy (2002), “Mellifluous Matures to Malodorous in Musth”, *Nature*, 415:975-976.
- Reinecke, A.; J. Ruther; T. Tolasch; W. Francke; M. Hilker (2002), “Alcoholism in Cockchafers: Orientation of Male *Melolontha Melolontha* Towards Green Leaf Alcohols”, *Naturwissenschaften*, 89:265-269.
- Ter Schure, E.; M. Flikweert; J. Van Dijken; J. Pronk; T. Verrips (1998), “Pyruvate Decarboxylase Catalyzes Decarboxilation of Branched-Chain 2-Oxoacids But is not Essential for Fusel Alcohol Production by *Saccharomyces Cerevisiae*”, *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1303-1307.

Biomineralización de oxalato de calcio en amaranto
(*Amaranthus hypochondriacus*)
Biomineralization of Calcium Oxalate in Amaranth
(*Amaranthus Hypochondriacus*)

Barba de la Rosa, A. P.^{1}; Briones-Cerecero, E. P.¹;
Ramírez-González, D.²; Muñoz-Sandoval, E.²; Terrones, H.²; Terrones, M.²*

Resumen

La formación mineral de micro y nano-cristales en sistemas vivos se conoce como biomineralización. Los cristales de oxalato de calcio monohidrato (COM) están ampliamente distribuidos en plantas, incluyendo a dicotiledóneas y monocotiledóneas. La función biológica de cristales de COM en plantas no se encuentra bien caracterizada ni es totalmente entendida; aparecen en una gran variedad de morfologías que son conservadas de una generación a la siguiente. El control de la morfología de un micro y nano-cristales incluye una serie de procesos genéticos altamente regulados, y una simple mutación puntual puede alterar drásticamente el tamaño y la forma del cristal.

Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) es un pseudo-cereal de semillas dicotiledóneas que crece como un cereal. La calidad nutricional de las hojas de amaranto es comparable a las espinacas y es por lo tanto, una buena fuente para la nutrición humana. Sin embargo, las hojas de amaranto también contienen grandes cantidades de oxalatos. En este estudio, examinamos los micro y nano-cristales de COM extraídos de hojas y raíces de amaranto. Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y

¹ División de Biología Molecular.

*e-mail: apbarba@ipicyt.edu.mx

² División de Materiales Avanzados. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Camino a la Presa San José 2055, Lomas 4ª sección, 78216, San Luis Potosí, SLP, México.

técnicas analíticas, se caracterizaron dos diferentes tipos de cristales: uno exhibe la morfología pseudo-tetraédrica similar a las encontradas en plantas de tabaco y tomate, y la otra consiste de drusas. Observamos residuos de diferentes materiales como compartimentos membranales. El entendimiento de los mecanismos biológicos moleculares de control sobre la cristalización de COM es vital para controlar el crecimiento de diferentes tipos de cristales usando plantas como micro y nano-fábricas capaces de operar a temperatura ambiente. Estas técnicas podrían utilizarse en un futuro para la síntesis de novedosos nanomateriales inspirados biológicamente.

Abstract

The formation of mineral micro and nano-crystals in living systems is called biomineralization. Calcium oxalate monohydrate (COM) crystals are contained in plants, including both dicotyledons and monocotyledons. The biological function of COM crystals in plants has neither been well characterized nor fully understood; they appear in a variety of morphologies that are preserved from one generation to the next. The morphology control of a micro and nano-crystal consists of tightly regulated genetic processes, and a simple point mutation could drastically alter the size and shape of the produced crystal.

Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) is a pseudo-cereal that has dicotyledon seeds but grows as a cereal plant. The nutritional quality of amaranth leaves is comparable to spinach, and it is therefore a good source for human nutrition. However amaranth leaves also contain large amounts of oxalates. In this study, we examine the COM micro and nano-crystals extracted from amaranth leaves and roots. Using scanning electron microscopy (SEM) and allied analytical techniques, two different crystals were carefully characterized: one exhibiting the pseudotetrahedral morphology similar to those found in tobacco and tomato plants, and the other consisting of druses. We also observed residues of different materials as membrane chambers. The understanding of molecular mechanisms that control the COM crystallization is vital for achieving the growth of desired crystal morphologies, using plants as micro and nano-factories that are able to operate at room temperature. We envisage that these techniques could be used in the future for synthesizing novel biologically inspired nanomaterials.

Introducción

La Biomineralización es el proceso de mineralización dentro de sistemas vivos y es importante para la formación de partes duras, tales como huesos, dientes, caparzones, etcétera. Este proceso es regulado por biomoléculas, típicamente proteínas. Las proteínas, y quizá polisacáridos, regulan el balance entre

la saturación del cristal y la precipitación en solución, nucleación de los cristales, cese del crecimiento de cristal, y en general, la estructura del cristal (Haugo, 2002). Las proteínas, a través de sus interacciones únicas y específicas con otras macromoléculas, controlan la estructura y función de todos los tejidos duros y suaves en los organismos vivos. La biomimética es un campo emergente en el cual se usan las herramientas de biología molecular y nanotecnología para desarrollar tecnologías híbridas con mayor potencial. Tomando lecciones de la biología, ahora pueden manipularse genéticamente los polipéptidos para enlazar específicamente compuestos inorgánicos seleccionados para la aplicación en nano y biotecnología (Sarikaya *et al.*, 2003).

Dentro de los minerales encontrados en organismos vivos, el calcio es el mineral más abundante, se encuentra involucrado en cerca de la mitad de los sistemas biomineralizados conocidos en la actualidad. En plantas, los niveles citosólicos de calcio se mantienen constantes a través de la precipitación en forma de cristales de oxalato.

Cristales de oxalato de calcio

La formación mineral es un fenómeno que se da en muchos géneros de plantas, siendo las formaciones de amorfas de sílice (fitolitos), los carbonatos de calcio amorfo (citolitos) y los oxalato de calcio, los más abundantes. En plantas superiores el oxalato de calcio es probablemente el mineral más comúnmente formado y típicamente se desarrolla dentro de cámaras intravacuolares membranosas de células especializadas llamadas idioblastos (Webb 1999, Bouropoulos *et al.*, 2001).

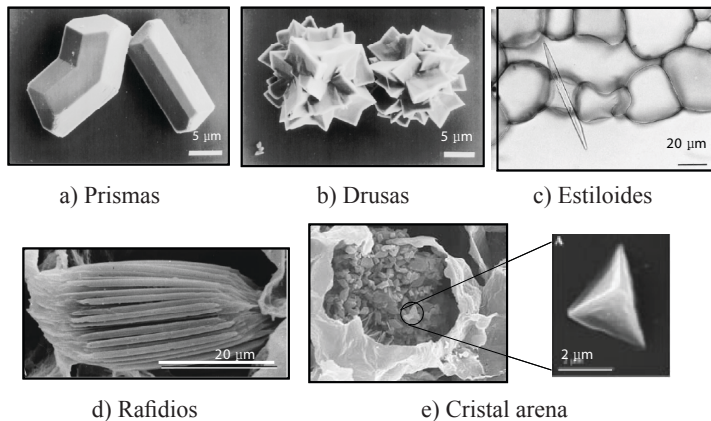
La fórmula química del oxalato de calcio es CaC_2O_4 y presenta una estructura cristalina monoclinica. En plantas el oxalato de calcio existe en dos formas: oxalato monohidrato (COM) y menos común en su forma dihidratada (COD); pudiéndose formar en cualquier órgano o tejido dentro de las plantas. Por ejemplo, se pueden encontrar cristales en raíces, tallos, hojas, flores, frutos y semillas y dentro de la epidermis y tejido vascular. Además, cada especie de planta siempre forma cristales con la misma morfología en el mismo sitio de tejido, implicando que la morfología está bajo control genético. La cantidad de cristales formados varía y se ve influenciada por condiciones ambientales, tales como intensidad de luz, temperatura y/o nutrientes de suelo.

Las plantas forman micro y nano cristales con una gran variedad de morfologías (figura 1), que se pueden dividir en las siguientes categorías: *a)* Prismas: consisten de formas regulares prismáticas simples. *b)* Drusas: son conglomerados de cristales formados alrededor de un sitio de nucleación. *c)* Estiloides: son agujas de cristales y

normalmente se forman uno en cada célula. *d*) rafidios: cristales en forma de aguja que se forman en manojos. *e*) cristal arena: son pequeños cristales tetraédricos que se forman en grupos o aglomerados (Prychid y Rudall, 1999; Webb, 1999; Bouropoulos *et al.*, 2001; Meric y Dane, 2004; Franceschi y Nakata, 2005).

Los cristales de oxalato de calcio están ampliamente distribuidos dentro de las plantas, incluyendo a los grupos monocotiledóneas y dicotiledóneas. En monocotiledóneas existen tres tipos principales de cristales de oxalato de calcio: rafidios, estiloides y drusas. Actualmente la caracterización de los cristales en plantas se ha descrito como una característica para la clasificación taxonómica.

Figura 1. Imágenes de microscopía de barrido de microcristales de oxalato de calcio con diferentes morfología de cristales de oxalato de calcio encontrados en plantas



Fuente: Webb, 1999; Prychid y Rudall, 1999; Bouropoulos *et al.*, 2001; Franceschi y Nakata, 2005.

Funciones de cristales de oxalato de calcio

Las funciones propuestas para los cristales de oxalato de calcio son el almacenamiento de calcio en una forma insoluble, lo que ayuda a mantener los niveles de calcio requeridos dentro del citosol. También se les atribuye mecanismos de protección contra herbívoros y mejoran las propiedades mecánicas de los tejidos (Franceschi y Nakata, 2005).

Se ha descrito un posible papel de los cristales de oxalato de calcio como mecanismos importantes para la detoxificación de metales pesados; sin embargo, en estudios

recientes, los cristales en hojas de *Phaseolus vulgaris* fueron investigados a diferentes concentraciones de zinc, reportando que los metales pesados tienen una correlación negativa con el crecimiento de cristales de oxalato, sugiriendo que estos cristales no desempeñan un papel importante en la detoxificación de metales pesados en *P. vulgaris*, pero sí lo tienen en la regulación de calcio (Jáuregui-Zúñiga y cols., 2005).

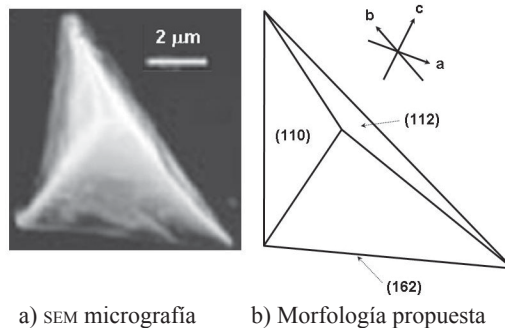
Nucleación en el proceso de biomineralización

En biomineralización, el micro-medioambiente ejerce control sobre la nucleación y el crecimiento del cristal en tejidos mineralizados. Esto es, el cristal formado es un diseño exacto de tamaño y forma.

A la fecha no se sabe con certeza cómo operan estos mecanismos, pero se ha descrito que *in vitro* algunas macromoléculas extraídas del tejido mineralizado son capaces de controlar la nucleación específica, por lo que existe mucho interés en estudiar estos mecanismos empleando plantas modelo. Recientemente, se han utilizado plantas como tabaco (*Nicotiana tabacum*) y jitomate (*Lycopersicon esculentum*); ambos miembros de la familia *Solanaceae*, y se reportó que los cristales se forman dentro de las vacuolas como la acumulación de numerosos cristales individuales (tipo arena) y adoptan morfología pseudotetraédrica o morfología con forma de corazón (figura 2).

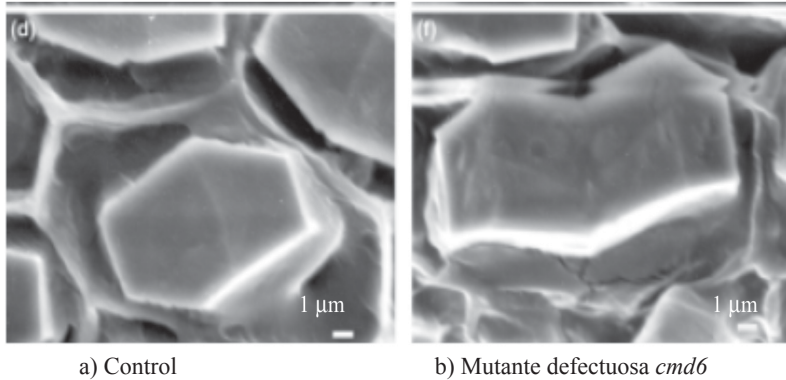
Un paso hacia la elucidación de los mecanismos que regulan la morfología del cristal, recientemente usando el modelo de *Medicago truncatula* y empleando mutantes *cmd4* y *cmd6* de morfología de cristal defectuosa (figura 3), enfatiza que existe un control de la morfología ligado fuertemente a procesos genéticos (Nakata, 2002).

Figura 2. Análisis morfológico de cristal representativos de com en hojas de tabaco



Fuente: Bouropoulos *et al.*, 2002.

Figura 3. Cristales de *Medicago truncatula*



a) Control

b) Mutante defectuosa *cmd6*

Fuente: Nakata, 2002.

Matriz de la cristalización

Se ha determinado que existen macromoléculas (proteínas), quizá carbohidratos, que regulan el balance entre la saturación del cristal, la precipitación en solución, nucleación y cese del crecimiento de cristales y morfología general del cristal. Dentro de ellas dos tipos de proteínas son las que más han llamado la atención: proteínas ácidas y proteínas de marco. Las proteínas ácidas son denominadas debido a su función íntimamente conectada con la naturaleza ácida y la abundancia de cadenas polares que están cargadas negativamente a un pH neutro. Típicamente, son ricas en aspartato, glutamato, serinas fosforiladas, tirosina y treonina. Estas proteínas están íntimamente asociadas con el mineral y la formación del cristal. La función de las proteínas de marco es precisamente como su nombre indica. Son altamente insolubles, relativamente hidrofóbicas y típicamente entrecruzadas. Por ejemplo, el colágeno encontrado en tejido óseo es una proteína típica de este tipo (Haugo, 2005).

Aunque las proteínas específicas de la matriz no han sido bien caracterizadas dentro de la biomineralización de plantas, se ha demostrado que hay un complejo de polipéptidos de 55, 60 y 73 kDa que están relacionados con la formación del cristal de orgánico asociado con los cristales rafidios en uva (*Vitis vinifera*). En tomate y tabaco se ha demostrado que los polipéptidos promueven la nucleación de oxalato de calcio, mientras que en *Pistia stratoites*, estos polipéptidos tienen influencia sobre la morfología (Li y cols., 2003; Jáuregui-Zúñiga *et al.*, 2005).

Planta modelo

Una planta modelo para los estudios genéticos puede ser una herramienta extremadamente importante en este campo. *Arabidopsis*, la planta modelo por tradición, no produce cristales normalmente, por lo que otras plantas como el tabaco, el jitomate, la lechuga y más recientemente, *Medicago truncatula*, se han utilizado para el estudio de la biomineralización. El amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) es un pseudo-cereal que proporciona granos y hojas de alto valor nutricional. Las semillas tienen un alto contenido de proteínas y su composición de aminoácidos está cercana al óptimo balance requerido en la dieta humana. Debido a sus propiedades alimenticias, el amaranto puede considerarse como un alimento funcional.

El amaranto puede crecer en suelos donde granos convencionales (maíz, frijol) no pueden ser cultivados (Paredes-López *et al.*, 1991). Se ha descrito que la planta ayuda a la remediación de suelos, especialmente *Amaranthus tricolor*, y mejora la disipación de hidrocarburos aromáticos policíclicos, por lo que se ha usado en fito-remediación de suelos contaminados con metales pesados (Ling y Gao, 2004). La planta de amaranto tiene altos contenidos de ácido oxálico (arriba del 10%) y 2-3% de glucósidos, por lo que se ha utilizado como preservativo biológico en silos; esto da como resultado que no existen señales de crecimiento de hongos (Allaberdin, 2004).

Por lo tanto, nosotros proponemos al amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) como una planta modelo para el estudio de morfologías y distribución de cristales de oxalato de calcio, con el fin de establecer las bases para el estudio de los mecanismos de crecimiento de cristales en plantas.

Aislamiento de cristales de oxalato de calcio

Tejidos frescos (aproximadamente 200-300 g) se lavaron perfectamente con agua destilada y desionizada, y se colocaron por dos horas en agua desionizada conteniendo 1 mM de azida de sodio; se lavaron y se secaron al aire. Las hojas secas se molieron por dos minutos en licuadora de laboratorio (Waring) con 200 mL de etanol absoluto (esto ayuda a minimizar la disolución de los cristales), y la mezcla resultante se filtró a través de cuatro capas de gasa. El filtrado se transfirió a tubos de centrifuga de polipropileno de 50 mL y fue centrifugado con etanol a cuatro mil rpm (5 min). El sobrenadante se eliminó y el precipitado se resuspendió en etanol. Este proceso se repitió dos veces, seguido por tres lavados más con agua desionizada centrifugando

a cuatro mil rpm (5 min). El precipitado se mezcló con politungstato de sodio ($3\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 9\text{WO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 20 mL) de 1.7 g/mL densidad y centrifugados tres veces a cuatro mil rpm (10 min). El sobrenadante, junto con material orgánico, no precipita bajo estas condiciones. Éste fue eliminado y el precipitado resuspendido, agitado y centrifugado tres veces más, lavando con agua desionizada a tres mil rpm (5 min), luego con etanol absoluto bajo las mismas condiciones, y finalmente las muestras se secaron al aire. Si la pureza de los cristales no fuera la apropiada, la centrifugación con el líquido pesado se repite usando una densidad de 1.9 g/mL (Bouropoulos *et al.*, 2001).

Análisis morfológico de los cristales

Las muestras fueron recubiertas por una pequeña película de oro en una evaporadora Cressington Sputter Coater durante 20 segundos, con una corriente de 20 mA; se montaron en un soporte de aluminio con una cinta doble cara de carbono y fueron caracterizadas por microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) y por microscopía de transmisión de barrido electrónico de barrido (STEM, por sus siglas en inglés), usando un microscopio XL30 SFEG de emisión de campo marca FEI, que operaba a 5-10 keV.

La corroboración de la morfología de los cristales se realizó por microscopía de barrido por transmisión (STEM) en un TECNAI XL30 SFEG.

Estudio EDX (Energy Dispersive X Ray) y mapeo elemental

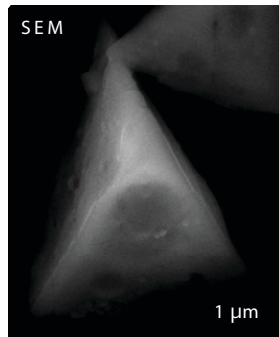
Los estudios de EDX y mapeo elemental se llevaron a cabo en un microscopio electrónico de barrido TECNAI XL30 SFEG, equipado con un espectrómetro EDX. El estudio EDX permite determinar la composición química de las muestras, mientras que el mapeo elemental ofrece una vista de la distribución química de los elementos en las muestras.

Cristales de oxalato de calcio en amaranto

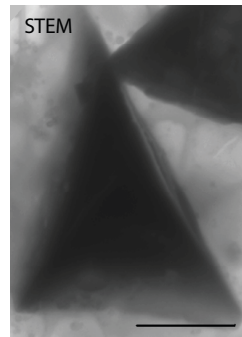
Se encontraron dos tipos de cristales en las hojas de amaranto: arena de cristal con una morfología pseudo tetrahédrica y un tamaño entre 1-3 μm (figura 1), y cristales

en formas de drusas con una tamaño entre 30 y 40 μm (figura 2). Se observó una mayor concentración de cristales en forma de arena de cristal que las drusas. Los cristales encontrados en raíz y tallo del amaranto fue arena de cristal con una morfología pseudo tetrahédrica con un tamaño entre 1-3 μm (figura 3).

Figura 1. Análisis morfológico de los cristales de oxalato de calcio en hoja de amaranto

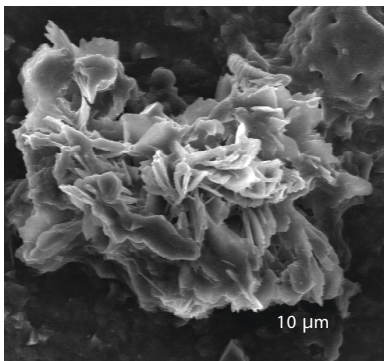


a) Micrografía SEM: se observa una morfología pseudo tetrahédrica

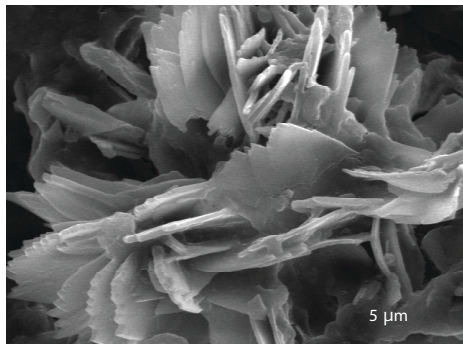


b) Micrografía STEM: se corrobora la misma morfología.

Figura 2. Micrografía SEM de cristales en forma de drusas encontrado en hojas de amaranto observada a dos diferentes aumentos

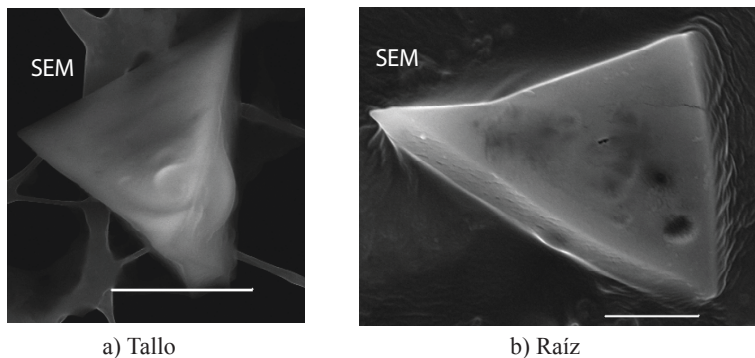


a) Barra 10 μm



b) Barra 5 μm

Figura 3. Micrografía SEM de cristales de oxalato de calcio con morfología pseudo tetrahédrica



En el espectro de EDX se determina la composición química de la muestra y los resultados obtenidos se presentan en la tabla 1. Con estos datos se observa que el cristal está compuesto por aproximadamente 2% de calcio.

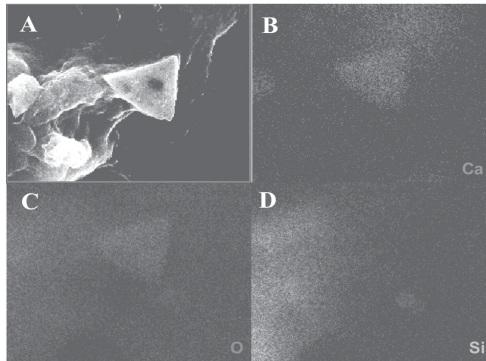
Tabla 1. Cuantificación química obtenida por espectroscopía de EDX de cristales de oxalato de calcio en amaranto

<i>Elemento</i>	<i>Wt%</i>	<i>At%</i>
C	67.74	75.32
N	8.46	8.07
O	15.41	12.86
Al	0.58	0.29
Si	6.04	2.87
Ca	1.77	0.59

Wt(%)=por ciento en peso
At%=por ciento área

En el mapeo elemental de la muestra se observa la distribución química del Ca, Si, y O; con esto es posible corroborar que los cristales son de oxalato de calcio (figura 4).

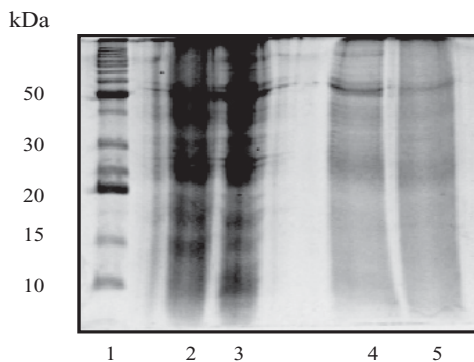
Figura 4. Mapeo elemental utilizando EDX de un cristal de oxalato de calcio extraído del tallo de amaranto



A) imagen analizada, B) distribución de calcio, C) distribución de oxígeno, D) distribución de sílice

En muchos tejidos mineralizados, las proteínas de matriz sólo pueden extraerse si el material está disuelto, lo mismo sucede en plantas (Li *et al.*, 2003). En algunos casos se ha observado que un subgrupo de proteínas de matriz están ocluidas dentro de la fase mineral, estas proteínas influyen la forma, crecimiento y propiedades mecánicas del mineral (Weiner y Addadi, 1991). El material asociado al cristal, fue extraído y caracterizado por electroforesis en geles de poliacrilamida (figura 7).

Figura 6. Gel de poliacrilamida al 15% teñido con *sypro ruby*



Carril 1, marcador de peso molecular. Carriles 2 y 3, proteína soluble de hoja y tallo. Carriles 4 y 5, proteínas insoluble de tallo y hoja.

Al igual que trabajos previos, se observa que las proteínas de matriz asociada a los cristales está compuesta por varios polipéptidos. Se ha reportado que los polipéptidos de alto peso molecular son los que muestran la más alta afinidad por los cristales de calcio a pH 5.6, y que estos polipéptidos inhiben la nucleación de cristales de oxalato de calcio en solución (Jáuregui-Zúñiga *et al.*, 2005). El papel de las proteínas en la nucleación del oxalato de calcio es variable; se ha descrito una función dual: como inhibidor cuando están presentes en solución o como promotores cuando estas proteínas son adsorbidas en las superficies (Campbell *et al.*, 1989).

Retos para la investigación futura

Numerosas preguntas acerca de la cristalización mediada por las células aún no han sido respondidas, por lo que existe una necesidad crítica para correlacionar las características bioquímicas y biofísicas; esto puede conllevar a las aproximaciones tradicionales tales como aislamiento y caracterización de organelos y membranas. Aproximaciones contemporáneas, utilizando sondas inmunológicas y moleculares, pueden proporcionar nueva información acerca de la expresión y localización específica de las proteínas dentro de las células que forman cristales y, adicionalmente, sondas fluorescentes pueden permitir la medición de factores físicos como pH y gradientes de calcio dentro y alrededor de las células. Los estudios de genética molecular proporcionan oportunidades adicionales para identificar factores celulares que afectan la cristalización de oxalato de calcio, incluyendo genes expresados específicamente en las células formadoras del cristal.

El estudio de los mecanismos de nucleación y crecimiento de cristales podrá contribuir al entendimiento de una variedad importante de procesos de la biología celular de plantas y desarrollo, incluyendo la especialización de membrana, transporte y secuestro de calcio, biosíntesis de oxalato y función vacuolar (Webb, 1999). Además podrá extrapolarse a enfermedades en humanos como las piedras en el hígado y riñón.

Bibliografía

- Allaberdin, I. L. (2004), "A Plant Derivade Preservative", *Kormoproizvodstvo*, 9:31-32.
- Antonkiewicz, J.; C. Jasiewicz (2002), *Acta Sci Pol Form Circum*, 1:119-130.

- Campbell, A. A.; A. Ebrahimpour; L. Pérez; S. A. Smesko; G. H. Nacollas (1989), “The Dual Role of Polyelectrolytes and Proteins as Mineralization Promoters and Inhibitors of Calcium Oxalate Monohydrate”, *Calcif Tissue Int.* 45:122-128.
- Bouropoulos, N.; S. Weiner; L. Addadi (2001), “Calcium Oxalate Crystals in Tomato and Tobacco Plants: Morphology and In Vitro Interactions of Crystal-Associated Macromolecules”, *Chem Eur J.*:1881-1888.
- Franceschi, V. R.; P. A. Nakata (2005). “Calcium Oxalate in Plants: Formation and Function”, *Annu Rev Plant Biol.* 56:41-71.
- Haugo, A. (s/f). *Biom mineralization: Can the Mechanisms of Acidic Proteins in Vertebrates be Used as a Model for Higher Plants?* en <http://www.chem.plu.edu/cotten/andrea.pdf>.
- Kamchan, A.; P. Puwastien; P. P. Srichakwal; R. Kongkachuichai (2004), “In Vitro Calcium Bioavailability of Vegetables, Legumes and Seeds”, *J. Food Comp Anal.* 17:311-320.
- Li, W.; Y. Gao (2004), “Promoted Dissipation of Phenanthrene and Pyrene in Soils by Amaranth (*Amranthus Tricolor L.*)”, *Environ Geol.* 46:553-560.
- ; D. Zhang; V. J. Lynch-Holm; T. W. Okita; V. R. Franceschi (2003), “Isolation of a Crystal Matrix Protein Associated with Calcium Oxalate Precipitation in Vacuoles of Specialized Cells”, *Plant Physiol.* 133:549-559.
- Jáuregui-Zúñiga, D.; M. Ángeles-Ferrer; A. A. Calderón; R. Muñoz; A. Moreno (2005), “Heavy Metal Stress Reduces the Deposition of Calcium Oxalate Crystals in Leaves of *Phaseolus vulgaris*”, *J. Plant Physiol.* 162:1183-1187.
- ; J. P. Reyes-Grajeda; A. Moreno (2005), “Modifications on the Morphology of Synthetically-Grown Calcium Oxalate Crystals by Crystal-Associated Proteins Isolated from Bean Seed Coats (*Phaseolus Vulgaris*)”, *Plant Sci.* 168:1163-1169.
- Meric, C.; F. Dane (2004), “Calcium Oxalate Crystals in Floral Organs of *Helianthus Annuus L.* and *H. tuberosus L.* (Asteraceae)”, *Acta Biol. Szegediensis* 48:19-23.
- Nakata, P. A. (2002). “Calcium Oxalate Crystal Morphology”, *Trends in Plant Sci.* 7:324.
- ; M. M. McConn (2000), “Isolation of *Medicago Truncatula* Mutants Defective in Calcium Oxalate Crystal Formation”, *Plant Physiol.* 124:1097-1104.
- Paredes-López, O.; A. P. Barba de la Rosa; D. Hernández; A. Carabez (1991), *Amaranto: Características alimentarias y aprovechamiento agroindustrial*, Washington, D. C. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico.
- Prychid, C. J.; P. J. Rudall (1999), “Calcium Oxalate Crystals in Monocotyledons: A Review of Their Structure and Systematics”, *Ann. Bot.* 84:725-739.

- Sarikaya, M.; C. Temerler; A. K. Y. Jen; K. Schulten; F. Baneyx (2003), “Molecular Biomimetics: Nanotechnology Through Biology”, *Nature* 2:577-585.
- Touryan, L. A.; R. H. Clark; R. W. Gurney; P. S. Stayton; B. Kahr; V. Vogel (2001), “Incorporation of Fluorescent Molecules and Proteins into Calcium Oxalate Monohydrate Single Crystals”, *J. Cryst. Growth* 233:380-388.
- Webb, M. A. (1999), “Cell-Mediated Crystallization of Calcium Oxalate in Plants”, *The Plant Cell* 11:751-761.
- Weiner, S.; L. Addadi (1999), “Acidic Macromolecules of Mineralized Tissues: The Controllers of Crystal Formation”, *Trends Biol. Sci.* 16:252-256.

***Carica papaya: composición química
y actividad biológica de sus extractos***
*Carica papaya: Chemical Composition
and Biological Activity from its Extracts*

Rodarte-Morales, A. I.; López-Cervantes, J.;
Gutiérrez-Coronado, M. A.; Sánchez-Machado, D. I.¹

Resumen

La planta *C. papaya* se encuentra presente en todos los países tropicales y subtropicales. En algunas culturas es considerada como una planta medicinal, debido a que sus semillas y hojas han sido utilizadas con fines curativos. Por ello, *C. papaya* posee un gran potencial, ya que se puede aprovechar para consumo fresco o incorporándole valor mediante un proceso industrial para obtener un metabolito que pueda servir de materia prima en otros procesos, principalmente en la industria alimenticia y farmacéutica. En esta revisión se investigaron los métodos de extracción utilizados para la recuperación de los componentes activos de las semillas, hojas, látex y pulpa de *C. papaya*, así como los posibles usos de los extractos obtenidos.

Abstract

C. papaya is found in all subtropical and tropical countries. In some cultures it is considered to be a medicinal plant, due to the fact that seeds and leaves have been used for curative purposes. Because of this, *C. papaya* has great potential since it can be used for fresh consumption, or through an industrial process, a compound can be obtained that is able to be used as food and pharmaceutical product. In this revision the extraction methods utilized for recovery of the active compounds of the seeds, leaves, latex and pulp of *C. papaya* were investigated, as well as the possible uses for the extracts obtained.

¹ Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias. Instituto Tecnológico de Sonora, apartado postal 541, Cd. Obregón, Sonora, México, e-mail: dsanchez@itson.mx

Introducción

El árbol de *C. papaya* se encuentra presente en todos los países tropicales y subtropicales; el fruto es muy conocido por su gran valor nutritivo así como valor económico, ya que durante el año 2002 la producción mundial fue de 5 591 692 toneladas (Freire *et al.*, 2003; López *et al.*, 2004; Monti *et al.*, 2004). Pertenece a la Familia *Caricaceae*, que agrupa cuatro géneros, de los cuales el más importante es *Carica* y las especies son diversas; sobresaliendo en México *C. papaya* L., la cual es una planta herbácea gigante, dicotiledónea que puede producir fruto por más de 20 años. El fruto de la papaya es una baya, con semillas comestibles que tienen sabor parecido a la pimienta. Cada fruta contiene alrededor de 1 500 semillas negras con una membrana gelatinosa (Von Loesecke y Nolte, 1937). La papaya es una especie polígama y se clasifica en tres clases sexuales: masculina estaminada, hermafrodita bisexual, y femenina pistilada. Estas tendencias al cambio de expresiones sexuales parecen deberse a las condiciones climáticas como la sequía y las variaciones de temperatura (Revista Claridades Agropecuarias, 1999).

Composición química de *C. papaya*

La fruta inmadura contiene papaína, la cual es considerada como el principal componente activo de *C. papaya* y es una enzima de uso industrial, principalmente para alimentos, clarificación de cervezas, ablandamiento de carne, preparación de proteínas hidrolizadas, entre otros (Monti *et al.*, 2000, 2004). La papaína es una proteína que contiene 212 aminoácidos y posee una masa molecular aproximada a 23 000 daltones (Bruneton, 2001). Se ha reportado que el látex de *C. papaya* contiene algunas *cistein* proteinasas, como la quimopapaína, caricaína y glicil endopeptidasa (O'Hara *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 1997; Monti *et al.*, 2000, 2004); además de una mezcla de terpenoides, ácidos orgánicos y alcaloides (Murphy, 1999). La composición de glicéridos en semillas de *C. papaya* fue realizada por Von Loesecke y Nolte (1937), obteniendo un 11.94% de ácido palmítico, 5.49% de ácido esteárico, 0.32% de ácido araquídico, 79.94% de ácido oleico y 2.22% de ácido linoléico. Asimismo, en las semillas se ha encontrado cloroformo (Lohiya *et al.*, 2002). La pulpa de la fruta fresca contiene resina, grasa y pectina. Por otro lado, las hojas del árbol de papaya, contienen un alcaloide llamado carpaína y un glucósido conocido como carposido (Raj Kapoor *et al.*, 2002). También, en los brotes de hojas de *C. papaya*, se ha encontrado alfa-tocoferol (Ching y Mohamed, 2001) y flavonoides como quercetol y kaempferol (Miean y Mohamed, 2001).

Usos de los extractos de *C. papaya*

En México se contemplan diversos usos de los extractos de *C. papaya*; de acuerdo con Vázquez (1999), los más importantes son: comestible (tallo, hoja y fruto), fabricación de chicle (látex), cosmético (aceite de la semilla), forrajero (hoja y fruto), obtención de enzimas proteolíticas (fruto), insecticida (látex), uso medicinal (fruto, látex, semilla y raíz), apicultura (flores) y saponífera (hojas). Además, se ha reportado que algunos extractos de *C. papaya* presentan las siguientes propiedades: antibacteriana (Emeruwa, 1982; Vieira *et al.*, 2001; Rhoades y Roller, 1999), anticonceptivas (Lohiya *et al.*, 2000, 2002; Verma y Chinoy, 2001, 2002), actividad hepatoprotectiva (Rajkapoor *et al.*, 2002), de control de algunos parásitos (Idowu y Sonde, 2003; Ekanem *et al.*, 2004), antimalaria (Bhat y Surolia, 2001) y antifúngica (Nwachukwu y Umechuruba, 2001).

Métodos de extracción de compuestos activos de *C. papaya*

La eficacia de los tratamientos con extractos de *C. papaya* depende de la concentración de los diferentes compuestos presentes. Dicha cantidad difiere si proviene del fruto, látex, hojas o raíces; y el método de extracción varía con la edad de la planta, la parte de la planta que se va a extraer, el cultivo, así como el sexo del árbol. De acuerdo con Murphy (1999), los análisis científicos de los componentes de las plantas siguen un patrón lógico. Primero, se realizan investigaciones para una posible actividad antibacterial utilizando el extracto acuoso o extracción de alcohol, y puede ser seguido por varios métodos orgánicos de extracción. Debido a que casi todos los compuestos activos contra microorganismos (que han sido identificados en las plantas), son compuestos aromáticos u orgánicos saturados, son obtenidos más a menudo por la extracción con etanol o metanol. De hecho, muchas investigaciones han evitado el uso de la fracción acuosa. Por otro lado, los taninos y terpenoides que se han encontrado en la fase acuosa son obtenidos por extracción con solventes menos polares.

Para extracciones alcohólicas, las partes de las plantas son secadas, molidas y entonces son remojadas en etanol o metanol por periodos prolongados. Después la mezcla es filtrada y lavada, para ser secada bajo condiciones de presión reducida. Por otro lado, cuando se utiliza agua para las extracciones, las partes de las plantas son remojadas en agua destilada, secadas y filtradas. El filtrado puede ser centrifugado (aproximadamente a 20 000 g por 30 minutos) varias veces para lograr la clarificación. En la tabla 1 se muestran los principales solventes para la extracción

de los diversos componentes activos de las plantas, entre ellos algunos compuestos presentes en *C. papaya* (Murphy, 1999).

Principales componentes activos de *C. papaya*

Carotenoides

Se ha demostrado que el consumo de carotenoides está ligado a la disminución de la incidencia de cáncer. Además, representan una fuente de provitamina A, no son tóxicos, presentan actividad antioxidante y participan en la desactivación de radicales libres producidos en el metabolismo celular (Breithaupt *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2003). Algunas de las propiedades físicas y químicas más importantes de los carotenoides son las siguientes: solubles en lípidos y solventes no polares, se extraen fácilmente con solventes no polares, son sensibles a la luz y oxígeno, además su degradación se acelera por los radicales libres que se forman en la oxidación lipídica (Moreno *et al.*, 2003).

Tabla 1. Solventes utilizados para la extracción de diversos componentes activos en plantas

<i>Agua</i>	<i>Etanol</i>	<i>Metanol</i>	<i>Cloroformo</i>	<i>Diclorometanol</i>	<i>Eter</i>	<i>Acetona</i>
Antocianinas	Taninos	Antocianinas	Terpenoides	Terpenoides	Alcaloides	Flavonoles
Almidones	Polifenoles	Terpenoides	Flavonoides		Terpenoides	
Taninos	Poliacetileno	Saponinas			Coumarinas	
Saponinas	Flavonoles	Taninos			Ácidos grasos	
Terpenoides	Terpenoides	Xantoxilenas				
Polipéptidos	Esteroles	Totarol				
Lectinas	Alcaloides	Quasinoides				
	Propoles	Lactonas				

Con base en la investigación de Breithaupt y otros autores (2001), en los extractos no saponificados de 62 frutas y verduras (entre ellas *C. papaya*), se ha determina-

do la cantidad de ésteres de carotenoides en plantas. Muestras de 20-200 g de pulpa de *C. papaya* fueron trituradas por 1 minuto y los carotenoides fueron extraídos agitando las muestras con metanol/etilacetato/éter de petróleo (1:1:1 v/v/v; 25ml). Los extractos combinados se secaron con 10g de sulfato anhidro de sodio. El residuo se disolvió en metanol/éter/BHT (1:1:0.01 V/V/V; 2 ml). Después se filtraron y la solución fue analizada por HPLC. La saponificación de los extractos se realizó según el método de Breithaupt. La mayor parte de las frutas y verduras investigadas mostraron concentraciones de carotenoides de hasta 1.5 mg/100g de la planta. La atención especial fue dedicada al éster criptoxantina, para lo cual se purificó a partir de la papaya y se utilizó para la síntesis de criptoxantina de laurato, de miristato y de palmitato, representando a los ésteres criptoxantinos, que se encuentran en mayor proporción en las plantas. De los análisis realizados se obtuvieron 2436 µg de ésteres de carotenoides por cada 100g de *C. papaya*. La concentración de β-criptoxantina libre y ésteres de β-criptoxantina estaba compuesta de la siguiente manera: β-criptoxantina de laurato (892 ± 26 µg/100g), β-criptoxantina libre (143 ± 2 µg/100g), β-criptoxantina de miristato (103 ± 2 µg/100g) y β-criptoxantina de palmitato (86 ± 2 µg/100g) (Breithaupt *et al.*, 2001).

Por otro lado, Moreno y otros autores (2003) llevaron a cabo una investigación para evaluar mediante un estudio cinético la pérdida de carotenoides totales liofilizados, obtenidos mediante remoción con solventes orgánicos del pericarpio de *C. papaya*. Se removieron los pericarpios manualmente de frutos maduros, y se sometieron a un proceso de extracción de carotenoides con solventes orgánicos, según procedimiento establecido por Moreno-Álvarez y otros autores en 1999. La fase no polar, previa decantación, se liofilizó y las muestras se almacenaron a 25°C y pH 6.0 en completa oscuridad. Los extractos concentrados se resuspendieron en 10ml de n-hexano y diluidos en el mismo solvente a una relación 1/10ml; la cuantificación del contenido de carotenoides totales se efectuó mediante estándar de betacaroteno. Con base en los resultados obtenidos por Moreno y otros autores (2003), la concentración de carotenoides en el pericarpio de *C. papaya* fue de 2.29 mg/kg.

En otra investigación, Netto y otros autores (2002), proponen una cuantificación no destructiva de la concentración de clorofila y nitrógeno utilizando un medidor portátil de clorofila (SPAD-502). Hojas de papaya de diferentes edades fueron colectadas y se estableció una relación entre el contenido de clorofila y de extractos de carotenoides, así como del contenido de nitrógeno. Los resultados muestran que este método es seguro para la determinación no destructiva de pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenoides), ya que las técnicas basadas en el uso de solventes orgánicos son destructivas. Este método puede ser usado indirectamente para la interpretación del proceso fotoquímico de *C. papaya*.

Papaína

La papaína se purifica generalmente por técnicas de separación de proteínas (alternando precipitaciones y solubilizaciones) y por técnicas clásicas de cromatografía de afinidad (Bruneton, 2001). El látex fresco se puede obtener a partir de las hojas o frutos de *C. papaya*, por medio de un corte por donde se segregan las enzimas proteolíticas. En diversas investigaciones (O'Hara *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 1997; Monti *et al.*, 2000, 2004), se ha reportado que el látex de *C. papaya* contiene una mezcla de cistein endopeptidasas, como la papaína, quimiopapaínas A y B, endopeptidasa de papaya III, endopeptidasa de papaya IV y la endopeptidasa Ω . De acuerdo con Bruneton (2001), la quimiopapaína puede constituir un método terapéutico de las hernias discales, mientras que la papaína se propone en terapéutica digestiva y dietética como una enzima de sustitución en casos de insuficiencia gástrica o duodenal.

O'Hara y otros autores (1995) analizaron la estructura cristalizada de la cistein endopeptidasa obtenida a partir del látex de *C. papaya*, el cual fue purificado por cromatografía seguido de una inactivación selectiva de otra cistein proteinasa con yodo-acetato. El látex es rico en enzimas degradativas, incluyendo las quitinasas, las cuales pueden digerir esqueletos de insectos y artrópodos.

Mukherjee y Kiewitt (1996) han evaluado el látex como un biocatalizador en la esterificación de varios ácidos grasos con 1-butanol en la presencia de ácido mirístico como referencia estándar. El látex fue molido en un mortero hasta obtener un polvo fino. Se llevó a cabo una esterificación seguida de una extracción de lípidos, para finalizar con un análisis cinético. La papaína obtenida a partir de *C. papaya* ha demostrado tener actividad lipolítica. Esto concuerda con lo encontrado por Gandhi y Mukherjee (2000), quienes investigaron la actividad de la lipasa de *C. papaya* (CPL) con respecto a diversos sustratos o sus derivados, enfocándose a la aplicación de la CPL como biocatalizador de la transesterificación en la síntesis de triacilgliceroles.

Por otro lado, Monti y otros autores (2000) reportan un método para la cristalización de papaína a partir de látex de frutos verdes de *C. papaya*, sin involucrar el uso de agentes sulfhídricos.

Polifenol oxidasa (PPO)

Algunas enzimas detectadas en frutos de *C. papaya* han sido parcialmente caracterizadas como peróxidasas, invertasas y catalasas. Pero, la polifenol oxidasa de papaya

(PPO) no ha sido muy estudiada. Cano y otros autores (1996) caracterizaron la PPO de frutos de *C. papaya* y establecieron las posibles diferencias entre los frutos hermafroditas y femeninos. Frutos de papaya hermafrodita y femenina fueron almacenados a 14°C con una humedad relativa de 90-95% y se eligieron 10 frutos en diversos intervalos de almacenamiento: un día (fruto verde), cinco días (verde maduro), 10 días (maduro) y 15 días (muy maduro). Los frutos fueron pelados y cortados en rebanadas. Se congelaron con nitrógeno líquido y luego fueron liofilizados por 48 horas, después fueron almacenados a -24°C hasta su análisis. Para la determinación del total de sustancias pécticas, se utilizó el método de colorimetría del ácido galactúrico producido por la hidrólisis alcalina de compuestos pécticos. La extracción de la enzima fue a partir de 0.5 g del liofilizado, el cual fue homogenizado por 1 minuto con 20 ml de solución buffer. Después fue centrifugado por 30 minutos a 18 mil g a 4°C. La concentración de carotenoides y pectinas encontradas por Cano (1996) se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Concentración de carotenoides y pectinas en *C. papaya*

Componente	Fruto inmaduro		Fruto maduro	
	Hermafrodita	Femenino	Hermafrodita	Femenino
Carotenoides totales (g/100g fruto)	8.76 ± 1.02	8.25 ± 0.98	8.84 ± 0.87	10.26 ± 0.76
Pectinas totales (g/100g fruto)	0.35 ± 0.07	0.34 ± 0.05	0.42 ± 0.04	0.45 ± 0.06

Tocoferoles

La vitamina E es protectora contra aproximadamente 80 enfermedades, como el cáncer, cardiovasculares, daño por radicales libres en la membrana celular y DNA, oxidación de lipoproteína de baja densidad, desórdenes en la piel, ojos y otros constituyentes del cuerpo rico en lípidos. El tocoferol, la forma más común de encontrar a la vitamina E en la naturaleza, es biológicamente activo, y se puede transportar y mantener en grandes cantidades por los componentes del cuerpo. Soon y Mohamed (2001), determinaron por HPLC la concentración de vitamina E presente en 62 plantas tropicales comestibles, entre ellas, los brotes de hojas de *C. papaya*. Los brotes de hojas de *C. papaya* fueron lavados, cortados y secados a 40°C y a continuación molidos y suspendidos en 30 ml de agua; se añadieron 21 g de KOH disuelto en 100 ml de

etanol, así como 0.25 g de ácido ascórbico por cada gramo de la muestra para evitar la oxidación. Se llevó a cabo la saponificación a 80°C durante 40 minutos, se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 300 ml de etanol/agua. Se añadió n-hexano/etil acetato (9:1), se mezcló y se extrajo tres veces en un embudo de separación. Las fases orgánicas fueron combinadas y lavadas con 100 ml de agua hasta la liberación del álcali. Se filtraron y evaporaron a sequedad. El residuo fue disuelto en 20 ml de n-hexano, secado en atmósfera de nitrógeno y congelado a -20°C. Por HPLC se determinó el contenido de α -tocoferol en los brotes de hojas de *C. papaya*, encontrándose 20.78 ± 0.54 mg/100 mg en peso seco.

Flavonoides

Los flavonoides tienen un gran efecto bioquímico y farmacológico, incluyendo antioxidante, antiinflamatorio, antiplaquetas, antitrombóticos y antialérgicos. Pueden inhibir enzimas como la prostaglandina, lipoxigenasa y cicloxigenasa, que están muy relacionadas con la generación de tumores. Míean y Mohamed (2001) realizaron un estudio para determinar el contenido de flavonoides (quercetol, kaempferol y apigenina) en 62 plantas tropicales comestibles, dentro de las cuales se encontraban los brotes de hojas de *C. papaya*. Para ello, éstos se lavaron y secaron en un horno a 40°C; las muestras fueron molidas y se añadieron 62.5 % de metanol que contenía TBHQ. Por cada 20 ml de metanol se añadieron 6 ml de HCl. La solución de extracción consistió en HCl 1.2 M en 50 % de metanol. Esto fue mezclado y refluado por dos horas a 90°C. Se analizó el extracto crudo por medio de HPLC utilizando metanol/agua (50:50, v/v) en la fase móvil. La concentración total de flavonoides en los brotes de hojas de *C. papaya* fue de 1 264 mg/kg de peso seco, de los cuales 811 ± 0.06 mg/kg peso seco, corresponden a quercetol y el resto es de kaempferol.

Carpaína

Coke y Rice (1965) investigaron la configuración de la carpaína. Para ello llevaron a cabo el aislamiento de este compuesto a partir de las hojas de *C. papaya*. Las hojas fueron extraídas continuamente durante cuatro días con una solución de 89 % etanol, 10 agua y 1% ácido acético. La mezcla fue extraída continuamente con éter para remover todo el material ácido insoluble. La solución acuosa fue entonces preparada con 160 g de carbonato de potasio y extraída con éter. El extracto fue lavado varias

veces con agua y extraído con ácido clorhídrico al 5 por ciento. Los extractos ácidos acuosos fueron combinados y extraídos con éter. La solución de éter fue combinada, secada y concentrada. Los sólidos que se cristalizaron y fueron separados por filtración, arrojando de 4 a 5 g de carpaína por cada 7 kg de hojas secas.

Componentes volátiles

En la tabla 3 se presentan algunos de los principales compuestos volátiles encontrados en *C. papaya* en diversas investigaciones. Por ejemplo, Flath y Forrey (1977) desarrollaron un experimento para la obtención de los componentes volátiles en fruto de *C. papaya*, la cual fue cortada en rebanadas delgadas y colocadas en una olla apropiada para su concentración, donde fue hervida al vacío y los compuestos volátiles fueron retenidos en las trampas, para ser extraídos dos horas después con éter. La concentración de ácidos libres en la pulpa de la papaya fue determinada de la siguiente manera: pulpa de papaya (2.91 kg) fue picada y colocada en un frasco, después de 18 horas a temperatura ambiente, el material fue prensado para extraer el látex, el cual fue combinado con éter. Esta solución fue lavada con NaOH 2N. El material básico acuoso fue extraído nuevamente con éter y acidificado con 35 ml de HCl 6N. Después de la purificación los concentrados fueron analizados por cromatografía de gases con espectrofotometría de masas (GC-MS), y 106 compuestos fueron identificados siendo el linalol el componente de mayor concentración seguido de dos óxidos de tetrahidrofuranol de linalol. También se incluyen 30 alcoholes, un pequeño número de componentes carbonilos, 32 ésteres, pequeñas concentraciones de tres acetatos, halogenados de bajo peso molecular (metileno, cloroformo y 1,2-dibromoetano), entre otros. Sólo cuatro componentes tienen las concentraciones mayores al 0.5 % en la mezcla de la muestra.

Después, MacLeod y Pieris (1983) identificaron los compuestos volátiles presentes en *C. papaya*, con referencia a los productos de glucosinolato. Las papayas fueron peladas, se removieron las semillas, y la pulpa fue mezclada con agua y extraída con pentano por tres horas en el aparato de Likens y Nickerson, y las muestras se examinaron por cromatografía de gases-espectrofotometría de masas. También se analizaron las semillas de papaya en busca de productos de glucosinolato. El componente más abundante en la papaya fue el metil butanoato (46.7 µg/kg), en contraste con el 68 % de linalol obtenido de papaya hawaiana por Flath y Forrey (1977). El segundo compuesto más abundante fue el fenilacetónitrilo (17.1 µg/kg), producto de

la degradación del benzilglucosinolato. Además, Macleod y Pieris (1983) identificaron 18 compuestos nuevos.

Tabla 3. Compuestos volátiles presentes en *C. papaya*

<i>Compuestos volátiles de C. papaya</i>			
Óxido de linanol A	Ácido octanoico	Pentano-2,4-diona	Metil octanoato
Óxido de linanol B	2-Propanol	Metilciclohexano	Etil benzoato
Linalol	2-Metil-1-propanol	2-Metilbutanol	Metil salicilato
4-Terpineol	1-Butanol	Butanodiona	Butil hexanoato
Hexanol	1-Pentanol	Metil butanoato	Etil octanoato
Heptanol	3-Hexanol	Tolueno	γ -Octanoato
Benzaldehído	α -Terpineno	Piridina	Metil geranato
Octanol	β -Felandreno	o-Xileno	Triacetin
Nonanol	Limoneno	Estireno	Butil benzoato
Decanol	(Z)- β -Ocimeno	Metil nicotinato	3-Metilbutil benzoato
Etil acetato	(E)- β -Ocimeno	Metil dodecanoato	Metil tiocianato
Etil butirato	γ -Terpineno	Ácido hexanoico	Fenilacetnitrilo
2-Propil-butilato	Terpinoleno	Alcohol benzil	Benzil isotiocianato
Metil hexanoato	Cariofileno	Benzil butanoato	α -Felandreno
γ -Hexalactona	Pentadecano	2-Feniletanol	Terpeno

Fuente: Flath y Forrey, 1977; MacLeod y Pieris, 1983; Heidlas *et al.*, 1984; Schwab *et al.*, 1989; Flath *et al.*, 1990.

Por otro lado, Heidlas y otros autores (1984) determinaron por cromatografía de gases-espectrofotometría de masas los terpenos presentes en la pulpa de *C. papaya*, encontrando que el componente de mayor concentración fue el linalol, coincidiendo con lo reportado por Flath y Forrey (1977). Schwab y otros (1989) estudiaron los componentes aromáticos del fruto de *C. papaya* por medio de hidrólisis enzimática, identificaron 47 compuestos aromáticos en *C. papaya*.

Flath y otros investigadores (1990) examinaron las emisiones volátiles de *C. papaya*. Se utilizó una cámara consistente en un frasco de 12 litros con un cuello alargado, y fue sellado con dos anillos. Asimismo, se inyectó aire hacia el frasco pasando a través de una columna de carbón activado. Se colocó un tubo con una trampa hasta el fondo del frasco que estaba conectado a uno de los anillos que lo sellaban. Se

introdujeron seis papayas, se estableció un flujo de aire de un litro por minutos. Después de dos horas la trampa fue removida. Se añadió cicloheptanona y ciclodecanona en las trampas para provocar la desorción de los compuestos volátiles. La separación de los compuestos se llevó a cabo en columnas cromatográficas, para su identificación y cuantificación. Los compuestos con mayor concentración encontrados fueron el linalol, bencil isotiocianato y fenilacetoniitrilo.

Muchos de los ésteres en frutas tropicales son fuertes contribuidores de los aromas de las mismas. Metil y etil ésteres, similares a los encontrados por Pino y otros (2002) en su investigación sobre la caracterización de compuestos volátiles en guayaba (*Psidium friedrichsthalianum*) de Costa Rica, fueron encontrados también en *C. papaya*.

Obtención de ácidos no volátiles

Chan y otros autores (1971) identificaron los ácidos no volátiles presentes en los extractos de *C. papaya*. Se preparó un puré de papaya, separando las cáscaras y semillas e inactivando las enzimas por calor. Para la extracción de ácidos orgánicos, un kg de puré fue mezclado con 2 l de metanol, se filtró y se colocó el concentrado en un evaporador para remover el metanol. Este concentrado entonces fue percolado a través de una columna de resina catiónica Dowex 50W X4, y después por una columna de resina aniónica Amberlite IRA 400. La columna fue lavada con 1500 ml de agua, para remover los azúcares, y luego con 20 ml de metanol, seguidos de 200 ml de agua. Los ácidos fueron eluidos con 100 ml de ácido fórmico 6N, seguido de agua, hasta obtener alrededor de 250 ml. Después se evaporó por 16 horas para remover el ácido fórmico. El extracto fue analizado por cromatografía de capa fina con etanol y por cromatografía de gas-líquido con metanol. Los ácidos fueron esterificados, se añadieron 5 ml de BF₃-metanol 14% (v/v) a 2 ml del extracto de papaya en metanol y se dejaron reaccionar 16 horas. Entre los ácidos obtenidos de *C. papaya*, a partir de tres mezclas de solventes diferentes están el ácido α -ketoglutarico, málico, cítrico, ascórbico, tartárico, oxálico, glucónico y galacturónico.

Actividad biológica de los extractos

De acuerdo con Murphy (1999), existen dos razones para estar interesado en los extractos antimicrobianos de las plantas: primero, es muy probable que estos fotoquímicos encuentren su objetivo en el arsenal de drogas ya prescritas por los médicos; y segundo, el público se ha interesado cada vez más en su uso, ya que una planta y sus compuestos están disponibles sin receta médica en tiendas de hierbas medicina-

les. El uso de extractos de planta, así como otras formas alternativas de tratamientos médicos, gozan de gran popularidad en Estados Unidos, donde se informó que en 1996 las ventas de medicinas botánicas aumentaron 37% sobre 1995. Además, se ha reportado que las hojas, semillas, raíz y extractos de la fruta de *C. papaya*, poseen actividad antibacteriana, antiviral y fungicida (Lohiya *et al.*, 2000).

Actividad antihepatóxica

Los extractos de etanol de *C. papaya* han sido evaluados por su actividad antihepatóxica, contra el CCl_4 , que induce la hepatotoxicidad. Raj Kapoor y otros (2002) evaluaron el uso de dichos extractos al medir parámetros bioquímicos, así como cambios hispatológicos en el hígado. Las frutas fueron cortadas en pedazos pequeños, secadas y molidas. El polvo fue sometido a una extracción con etanol (95 % v/v). El etanol fue removido por destilación y el extracto fue suspendido en goma de acacia al 5% y utilizado para esta investigación. Se utilizaron cuatro grupos de ratas, los grupos I y II, fueron tratados con goma de acacia, mientras que el III y IV, con etanol y extractos acuosos de *C. papaya* en dosis de 250 mg/kg durante 7 días. Al séptimo día se suministró CCl_4 , 30 minutos después de la última dosis de todas las ratas, excepto para el grupo I. Después de 36 horas, todas las ratas fueron sacrificadas, y la sangre fue recolectada, centrifugada y el suero fue separado. Se removió el hígado de las ratas sacrificadas y se llevaron a cabo estudios hispatológicos. Los resultados de esta investigación muestran que el etanol y los extractos acuosos de *C. papaya* poseen una buena actividad hepatoprotectora, aunque los mecanismos por los cuales esta actividad se lleva a cabo no son totalmente conocidos.

Actividad antimalaria

Praveen y Surolia (2001) desarrollaron una investigación en la búsqueda de nuevas drogas contra la malaria, utilizando plantas tradicionales curativas de la India. Los extractos acuosos y orgánicos obtenidos a partir de partes específicas de las plantas *Swertia chirata*, *C. papaya* y *Citrus sinensis* fueron probados contra el organismo causante de la malaria, *Plasmodium falciparum* FCK 2 *in vitro*. Se utilizaron corteza y pulpa de fruta inmadura de *C. papaya*, las cuales fueron secadas al sol y pulverizadas. El polvo fue mezclado en éter de petróleo, metanol y agua. Los solventes fueron evaporados hasta la sequedad, y el residuo fue almacenado en frascos a 25-

30°C hasta su análisis. La corteza cruda de *C. papaya* mostró la actividad antimalaria más alta de todos los extractos utilizados. La extracción del elemento activo de esta planta es de gran potencial, ya que crece abundantemente en las zonas tropicales, y por lo general la corteza es desechada.

Protección contra enfermedades crónicas

Los beneficios específicos que se pueden obtener a partir de frutas y vegetales han sido conocidos por siglos y, más recientemente, estudios epidemiológicos han demostrado claramente que los alimentos basados en plantas pueden brindar protección contra enfermedades crónicas. Por ejemplo, la elevación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en la sangre, como el colesterol, es un factor de riesgo para la aterosclerosis. Es por ello que Nizar y otros investigadores (2002) llevaron a cabo un experimento utilizando extractos de 12 plantas tropicales comestibles, entre ellos, los brotes de hojas de *C. papaya*, para medir su actividad antioxidante, así como la modulación del receptor de LDL en células HepG2. Los brotes de hojas fueron lavados, secados, cortados en pedazos pequeños y liofilizados. El material seco fue entonces molido y se llevó a cabo una extracción con metanol (10% w/v). La fase orgánica fue filtrada, secada al vacío a 40°C y almacenada a -8°C en oscuridad. En general, el uso de los extractos de *C. papaya* y otras plantas tienen un gran potencial como nutracéuticos para la prevención de enfermedades cardiovasculares.

Propiedades anticonceptivas

Lohiya y otros autores (2000) reportan que los extractos de *C. papaya* han mostrado una eficiencia anticonceptiva en animales, por ello, los efectos sobre la inmovilización de espermatozoides humanos fueron analizados *in vitro*. Las semillas de *C. papaya* fueron pulverizadas y sometidas a una extracción por el método Soxhlet con cloroformo a 58°C durante 12x3 horas. Después se llevó a cabo una purificación por cromatografía utilizando benceno, cloroformo y etilacetato como eluentes. A continuación, la fracción cromatográfica del benceno fue subfraccionada con metanol y etilacetato, y los residuos fueron utilizados para una purificación por cromatografía de capa fina (TLC). El extracto, las fracciones y componentes obtenidos por la TLC, fueron disueltos en medio Biggers Whitten y Whittingham (BWW), suplementado

como señala Lohiya y otros (2000). Muestras de semen de 250 μL fueron añadidas a 250 μL de extracto de semilla de *C. papaya*, y fueron precalentados a 37°C. Se tomaron como aptas para la evaluación *in vitro*, las muestras de semen con cuentas mayores a 50 millones de esperma por mililitro, con morfología normal, motilidad rápida, lineal y progresiva, y con viabilidad mayor a 50 por ciento. Con base en los resultados, la fracción del cloroformo obtenido por cromatografía con benceno y sus subfracciones de metanol y etilacetato, así como los componentes aislados por TLC, mostraron un efecto de inmovilización *in vitro* de espermatozoides humanos. Un posible enfoque útil puede ser la combinación de extractos de *C. papaya* con otros espermicidas, ya que además de la inmovilización instantánea del esperma, contiene acción antimicrobial.

Además, Lohiya y otros autores (2002) probaron la eficacia anticonceptiva del extracto de cloroformo de las semillas de *C. papaya* utilizado en monos *Presbytis entellus entellus* Dufresne.

Por otro lado, Verma y Chinoy (2001) analizaron el efecto del extracto de semilla de *C. papaya* sobre la cauda del epidídimo en el microambiente de las ratas. El extracto acuoso crudo de semilla de papaya, administrado oral o intramuscularmente, causa una reducción significativa en la cuenta de espermatozoides, en la motilidad y fertilidad en ratas. Las semillas de *C. papaya* madura fueron pulverizadas. Una suspensión acuosa de 5 mg de polvo en 100 ml de agua destilada fue preparada y sometida al método Soxhlet por una hora, repitiendo esto de tres a cuatro veces más para la extracción completa del agua. Los filtrados fueron colectados y evaporados en baño maría hasta la sequedad. Verma y Chinoy (2001) concluyeron que el extracto de la semilla de papaya causa un decremento significativo en el contenido total de proteínas y ácido sialico del fluido del cauda epidídimo luminal, así como en la formación de pellet de espermas. La disminución del contenido total de proteínas ocasiona un efecto anticonceptivo debido a que las proteínas contribuyen a la maduración de los espermas.

En otro experimento de Verma y Chinoy (2003), se evaluó el efecto del extracto acuoso de la semilla de papaya sobre la respuesta contráctil del epidídimo. La extracción de las semillas siguió el mismo procedimiento que se menciona en la investigación de Verma y Chinoy (2001). En este estudio se concluyó que el tratamiento con extracto acuoso de las semillas de *C. papaya* causa una reducción significativa de la respuesta contráctil.

Propiedades antibacterianas

Se ha reportado que las hojas, semillas, raíz y extractos de la fruta de *C. papaya*, poseen actividad antibacteriana, antiviral y fungicida (Emeruwa, 1982; Rhoades y Roller, 1999; Nwachukwu y Umechuruba, 2001; Vieira *et al.*, 2001; Idowu y Sonde, 2003; Ekanem *et al.*, 2004). Estos extractos son particularmente sensibles con *Candida albicans*, virus del mosaico del tabaco y un gran número de bacterias incluyendo *Salmonella*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas* (Lohiya *et al.*, 2000).

Emeruwa (1982) realizó una investigación acerca de una sustancia presente en extractos de *C. papaya*, que tiene una actividad antibacterial contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Shigella flexneri*. Frutos maduros e inmaduros de *C. papaya* fueron separados en epicarpio, endocarpio y semillas. Después cada parte, incluyendo las hojas, fueron sometidas a una extracción con etanol por 24 horas. Los extractos se recuperaron por filtración y centrifugación. El extracto crudo de cada parte fue sometido a una salazón con sulfato de amonio y suavemente ajustado al 30% con acetona, se mantuvo en reposo por 30 minutos, y después fue filtrado. Se analizó la sensibilidad de las especies bacterianas a los extractos de *C. papaya*, la determinación de la concentración mínima de inhibición del extracto, el efecto de la temperatura y pH en la actividad antibacteriana del extracto y otras pruebas. Los extractos del epicarpio, endocarpio y semillas, tanto del fruto maduro como del inmaduro, generan altos grados de actividad antibacteriana en contra de *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa* y *S. flexneri*. También se comparó la concentración mínima de inhibición de los extractos de *C. papaya*, con penicilina G y tetraciclina, siendo significativos para la papaya como se muestra en la tabla 4.

Por otro lado, Rhoades y Roller (2000) realizaron una investigación para determinar si el quitosán (poli- β -1,4-glucosamina), así como los hidrolizados del quitosán, pueden ser utilizados como conservadores en la industria alimenticia. Se llevó a cabo la degradación del quitosán, siguiendo tres métodos diferentes. Uno de ellos fue el tratamiento con látex crudo de papaya, el cual fue disuelto en agua destilada en concentraciones de 2.0 g/l, y filtrado. Cinco gramos por litro de la solución de quitosán fueron preparados en 10 mM de solución buffer de ácido acético-acetato de sodio. Se mezclaron las soluciones de látex de papaya y quitosán (1:4) y se mantuvo a temperatura ambiente por 20 horas. El quitosán degradado fue esterilizado y almacenado a 4°C por no más de 24 horas, antes de analizar la actividad antimicrobiana. El quitosán nativo y el degradado por el látex de papaya inactivaron la población natural de levaduras presentes en jugo de manzana pas-

teurizado, hasta el punto de que los microorganismos no se podrían detectar hasta dos semanas después.

Tabla 4. Concentración mínima de inhibición del extracto de *C. papaya* comparado con Penicilina G y Tetraciclina

<i>Bacterias</i>	<i>Concentración mínima de inhibición</i>		
	<i>Penicilina</i> (<i>mg x 10⁻¹/ml</i>)	<i>Tetraciclina</i> (<i>mg x 10⁻¹/ml</i>)	<i>Extracto de papaya</i> (<i>mg/ml</i>)
<i>S. aureus</i>	0.12 – 0.24	0.2	0.2
<i>B. cereus</i>	0.12 – 0.24	0.2	0.3
<i>E. coli</i>	0.12 – 0.24	0.2	1.5
<i>Ps. aeruginose</i>	0	0	2.5
<i>S. flaxneri</i>	0	0	4.0

En otro trabajo, Vieira y otros autores (2001) realizaron un experimento para comprobar el efecto antimicrobial de extractos de hojas de *Psidium guajava* y *C. papaya*, y fueron estudiados utilizando *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, aislados de camarones frescos. Los extractos de *Psidium guajava* y *C. papaya* fueron preparados de la siguiente manera: muestras de 30 g de cada hoja joven se secaron por una hora en un horno a 120°C, y luego molidas. Se utilizaron tres solventes para la preparación de los extractos: agua destilada, acetona y etanol en cuatro concentraciones diferentes (20%, 50%, 60% y 80%). Cada extracto fue hervido por 15 minutos, filtrado, y hervido de nuevo por otros 15 minutos para una mayor uniformidad. La actividad antimicrobiana de los extractos de guayaba y papaya en agua, acetona y etanol, fue evaluada por dos métodos: difusión radial en agar de dos capas perforadas (RDAP) y difusión por disco (DD). En conclusión, en el tratamiento de diarrea causada por *E. coli* o *Staphylococcus aureus*, los brotes de hojas de guayaba y papaya constituyen una opción factible, debido a su acción curativa y la gran facilidad de obtenerlos así como su bajo costo.

Ekanem y otros autores (2004) analizaron los efectos del extracto metanólico crudo de hojas de *Mucuna pruriens* y semillas de *C. papaya* contra el parásito *Ichthyophthirius multifiliis* en condiciones *in vivo* e *in vitro*. El ciliado *I. multifiliis* es el parásito más patógeno de los pescados mantenidos en cautiverio, por lo que constituye un problema sanitario en la acuicultura.

El efecto de los extractos de las plantas fue analizado a 600, 800 y 1 000 mg/lit utilizando 10 peces dorados en cada tanque, que contenía 3 lit. de las soluciones. Los

peces fueron analizados cuidadosamente para observar cualquier signo de aumento de la frecuencia de respiración o si presentaban un comportamiento errático. Los resultados de esta investigación han demostrado que las preparaciones de plantas tradicionales medicinales tienen un potencial para el control del *I. multifillis* durante el cultivo de peces.

Propiedades fungicidas

Nwachukwu y Umechuruba (2001) analizaron la eficiencia de extractos de hojas de *Ocimum basilicum*, *Vernonia amygdalina*, *Cymbopogon citrates*, *Azadirachta indica* y *C. papaya* sobre los principales hongos (*Aspergillus Niger*, *Aspergillus flavus*, *Botryodiplodia theobromae* y *Fusarium moniliforme*) que crecen en las semillas del frijol africano (*Sphenostylis stenocarpa*). Las pruebas *in vitro* fueron llevadas a cabo para determinar los efectos de los extractos de hojas en el crecimiento radial de hongos en las semillas del frijol africano. Por cada 15 ml de agar dextrosa de papa, 5ml de cada extracto acuoso de las plantas fue añadido. El medio con el extracto fue inoculado en el centro con 5 mm de disco de inóculo de cada hongo e incubado a 25 ± 2 °C por 14 días, y después de este periodo, se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio. Para las pruebas *in vivo*, las semillas fueron remojadas por separado en el extracto crudo de cada planta durante una hora, mientras que las semillas sin tratamiento fueron remojadas en agua destilada. Las semillas tratadas y no tratadas fueron incubadas a 20 ± 2 °C por una semana, y se determinó el crecimiento fúngico y el porcentaje de germinación. Todos los extractos de hojas fueron efectivos en la reducción de la incidencia de hongos en semillas. Este resultado indica que los extractos de hojas de *C. papaya*, así como de las otras plantas, probablemente tienen algunas propiedades fungicidas que inhiben el crecimiento de los hongos en las semillas. Esto coincide con lo indicado por Lohiya y otros autores (2000), quienes dicen que puede ser debido a que el látex de *C. papaya* cuenta con una mezcla de terpenoides, alcaloides como la carpaína y ácidos orgánicos que son de actividad general, es decir, actúan contra varios tipos de microorganismos como bacterias, hongos y protozoarios.

Conclusión

Una de las ventajas principales que posee la *C. papaya* es que es un árbol que se encuentra disponible en muchos países. Se han demostrado en diversos estudios las

propiedades medicinales que poseen los extractos de *C. papaya* como antibacterianas, anticonceptivas, actividad hepatoprotectiva, antimalaria y antifúngica. Dichas propiedades son gracias a la gran cantidad de compuestos químicos que se encuentran en las semillas, hojas, látex y pulpa de *C. papaya*, por lo que actualmente se considera como una fuente de metabolitos de interés para la industria de alimentos y farmacéutica.

Bibliografía

- Breithaupt, D. E. y A. Bamedi (2001), “Carotenoid Esters in Vegetables and Fruits: A Screening with Emphasis on Cryptoxanthin Esters”, *J. Agric. Food Chem.* 49: 2064-2070.
- Bruneton, J. (2001), *Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales*, España, Acribia, 2ª edición, pp. 221-223.
- Cano, M. P.; G. Lobo; B. Ancos y M. A. Galeazzi (1996), “Polyphenol Oxidase from Spanish Hermaphrodite and Female Papaya Fruits (*C. Papaya* Cv. Sunrise, Solo Group)”, *J. Agric. Food Chem.* 44: 3075-3079.
- Chan, H. T.; T. S. K. Chang; A. E. Stafford y J. E. Brekke (1971), “Nonvolatile Acids of Papaya”, *J. Agric. Food Chem.* 19(2): 263-265.
- Ching, L. S. y S. Mohamed (2001), “Alpha-Tocopherol Content in 62 Edible Tropical Plants”, *J. Agric. Food Chem.* 49: 3101-3105.
- Coke, J. L., y W. Y. Rice Jr. (1965), *The Absolute Configuration of Carpaine*. Venable Chemical Laboratory, University of North Carolina, vol. 30, pp. 3420-3422.
- Ekenem, A. P.; A. Obiekezie; W. Kloas y K. Knopf (2004), “Effects of Crude Extracts of *Mucura Pruriens* (Fabaceae) and *Carica Papaya* (Caricaceae) Against the Protozoan fish Parasite *Ichthyophthirius Multifiliis*”, *Parasitol Res.* 92: 361-366.
- Emeruwa, A. C. (1982), “Antibacterial Substance from *Carica Papaya* Fruit Extract”, *Journal of Natural Products* 45(2): 123-127.
- Flath, Robert A. y R. R. Forrey (1977), “Volatile Components of Papaya (*Carica Papaya* L., Solo Variety)”, *J. Agric. Food Chem.* 25(1).
- Flath, R. A.; D. M. Light; E. B. Jang; R. Mont y J. Johnt (1990), “Headspace Examination of Volatile Emissions from Ripening Papaya (*Carica Papaya* L., Solo Variety)”, *American Chemical Society*: 1060-1063.
- Freire, A. Takaaki, I.; Isao, M. y Kazuomi, K. (2003), “Evaluation of the Micelial Network Formed by Arbuscular Mycorrhizal Hyphae in the Rhizosphere of Pa-

- paya and Other Plants Under Intercropping System”, *Brazilian Journal of Microbiology* 34: 72-76.
- Gandhi, N. N.; K. D. Mukherjeel (2000), “Papaya (*Carica Papaya*) Lipase with some Distinct Acyl and Alkyl Specificities as Compared with Microbial Lipases”, *Biochem. Soc. Trans.* 28: 977-978.
- (2000), “Specificity of Papaya Lipase in Esterification with Respect to the Chemical Structure of Substrates”, *J. Agric. Food Chem.* 48: 566-570.
- Heidlas, J.; M. Lehr; H. Idstein P. Schreier (s/f), “Free and Bound Terpene Compounds in Papaya (*Carica Papaya*, L.) Fruit Pulp”, *J. Agric. Food Chem.* 32: 1020-1021.
- Lohiya, N. K.; L. K Kothari; B. Manivannan; P. K. Mishra; N. Pathak (2000), “Human Sperm Immobilization Effect of *Carica Papaya* Seed Extracts: An In Vitro Study”, *Asian J. Androl.*, 2: 103-109.
- ; B. Manivannan; P. K. Mishra; N. Pathak; S. Sriram; S. S. Bhande; S. Panneerdoss (2002), “Chloroform Extract of *Carica Papaya* Seeds Induces Long-term Reversible Azoospermia in Langur Monkey”, *Asian J. Androl.* 4: 17-26.
- López, R.; F. Morales; O. Mendoza; M. A. Gómez (2004), “Identification of a Genomic Clone to ACC Oxidase from Papaya (*Carica Papaya*) and Expression Studies”, *J. Agric. Food Chem.* 52, 794-800.
- MacLeod, A. J.; N. M. Pieris (1983), “Volatile Components of Papaya (*Carica Papaya* L.) with Particular Reference to Glucosinolate Products”, *J. Agric. Food Chem.* 31:1005-1008.
- Miean, K. H.; S. Mohamed (2001), “Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants”, *J. Agric. Food Chem.* 49: 3106-3112.
- Monti, R.; C. A. Basilio; H. C. Trevisan; J. Contiero (2000), “Purification of Papain from Fresh Latex of *Carica Papaya*”, *Brazilian Archives of Biology and Technology* 43(5):501- 507.
- ; C. Jonas y J. G. Antonio (2004), “Isolation of Natural Inhibitors of Papain Obtained from *Carica Papaya* Latex”, *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47(5): 747-754.
- Moreno, M. J.; B. Camacho; V. Torrez (2003), “Degradación cinética de carotenoides obtenidos de frutos de *Carica papaya* L”, *Rev. Fac. Agron.* 20: 232-237.
- Mukherjee, K. D.; I. Kiewitt (1996), “Specificity of *Carica Papaya* Latex as Biocatalyst in the Esterification of Fatty Acids with 1-butanol”, *J. Agric. Food Chem.* 44: 1948-1952.
- Murphy C. M. (1999), “Plant Products as Antimicrobial Agents”, *Clinical Microbiology reviews* 12(4): 564-582.

- Nizar, M.; I. Runnie; P. D. Roach; S. Mohamed; M. Y. Abeywardena (2002), "Inhibition of Low-Density Lipoprotein Oxidation and Up-Regulation of Low-Density Lipoprotein Receptor in HepG2 Cells by Tropical Plant Extracts", *J. Agric. Food Chem.* 50:3693-3697.
- Nwachukwu, E. O.; C. I. Umechuruba (2001), "Antifungal Activities of Some Leaf Extracts on Seed-Borne Fungi of African Yam Bean, Seed Germination and Seedling Emergence", *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* 5(1): 29-32.
- O'Hara, B. P.; A. M. Hemmings; D. J. Buttle; L. H Pearl (1995), "Crystal Structure of Glycyl Endopeptidase from *Carica Papaya*: A Cysteine Endopeptidase of Unusual Substrate Specificity", *Biochemistry* 34: 13190-13195.
- "Papaya y Maíz", (1999), *Claridades Agropecuarias*, núm. 67, México, producida y editada por Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA) y la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (Sagarpa).
- Pino, J. A.; R. Marbo y C. Vázquez (2002), "Characterization of Volatiles in Costa Rican Guava [*Psidium friedrichsthalianum* (Berg.) Niedenzu] Fruit", *J. Agric. Food Chem.* 50: 6023-6026.
- Praveen, G; N. Surolia (2001), "In Vitro Antimalarial Activity of Extracts of Three Plants Used in the Traditional Medicine of India", *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65(4): 304-308.
- Raj Kapoor, B.; B. Jayakar; S. Kavimani; N. Muruges (2002), "Effect of Dried Fruits of *Carica Papaya* LINN on Hepatotoxicity", *Notes Biol. Pharm. Bull.* 25(12): 1645-1646.
- Rhoades J. y S. Roller (2000), "Antimicrobial Actions of Degraded and Native Chitosan Against Spoilage Organisms in Laboratory Media and Foods", *Appl Env. Microb.* 66(1): 80-86.
- Savickiene, N.; A. Dagilyte; A. Lukosius; V. Zitkevicius (2002), "Importance of Biologically Active Components and Plants for the Prevention of Diabetes Mellitus", *Medicina* 38(10): 970-975.
- Schawb, W.; C. Mahr y P. Schreier (1989), "Studies on the Enzymic Hydrolysis of Bound Aroma Components from *Carica Papaya* Fruit", *J. Agric. Food Chem.* 37: 1009-1012.
- Silval, L. G.; O. García; M. T. P. Lopes; C. E. Salas (1997), "Changes in Protein Profile During Coagulation of Latex from *Carica papaya*", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30: 615-619.
- Solís, M. V. "Bandeo de cromosomas humanos con extracto crudo de frutas u hojas de papaya", *Journal of Tropical Biology* 49(3).

- Torres, N. A.; E. Campostrini; J. G. de Oliveira; O. K. Yamanishi (2002), "Portable Chlorophyll Meter for the Quantification of Photosynthetic Pigments, Nitrogen and the Possible use for Assessment of the Photochemical Process in *Carica papaya L.*", *Braz J. Plant Physiol.* 14(3): 203-210.
- Vázquez, C.; A. I. Batis; M. I. Alcocer; M. Gual; C. Sánchez (1999), "Árboles y arbustos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación", *Reporte técnico del proyecto J084*, México, Conabio-Instituto de Ecología, UNAM, pp. 96-99.
- Verma, R. J.; N. J. Chinoy (2001), "Effect of Papaya Seed Extract on Microenvironment of Cauda Epididymis", *Asian J. Androl.* 3: 143-146.
- ; N. J. Chinoy (2002), "Effect of Papaya Seed Extract on Contractile Response of Cauda Epididymal Tubules", *Asian J. Androl.* 4(1): 77-78.
- Vieira, R. H. S. F.; D. P. Rodrigues; F. A. Gonçalves; F. G. R. Menezes; J. S. Aragão; O. V. Sousa (2001), "Microbicidal Effect of Medicinal Plant Extracts (*Psidium guajava* LINN and *Carica papaya* LINN) Upon Bacteria Isolated from Fish Muscle and Known to Induce Diarrhea in Children", S. Paulo, *Rev. Inst. Med. Trop.* 43(3): 145-148.
- Von Loesecke, H.; A. J. Nolte (1937), *Characteristics and Composition of Papaya Seed Oil*, contribución núm. 342 de la División de Investigación en Alimentos de Estados Unidos from the Food Research Division-Citrus Products Station, E.U.-Department of Agriculture-Bureau of Chemistry and Soils: 2565-2567.
- Weber, N.; P. Weitkamp; K. D. Mukherjee (2001), "Steryl and Stanyl Esters of Fatty Acids by Solvent-Free Esterification and Transesterification in Vacuo Using Lipases from *Rhizomucor Miehei*, *Candida Antarctica*, and *Carica Papaya*", *J. Agric. Food Chem.* 49: 5210-5216.

La introducción de transgénicos de maíz a México: ¿están completamente considerados los riesgos biológicos?

Introduction of Transgenic Corn to Mexico: Are the Biological Risks Considered?

Cervantes Martínez, J. E.^{1}, Mata Vázquez, H.¹; Rangel Torres, E.¹;
García Delgado, M. A.¹; Bustos Vázquez, G.¹*

Resumen

La biotecnología y los productos transgénicos recientemente han revolucionado la agricultura en los países desarrollados; sin embargo, el éxito de ello en algunos países como México no está asegurado, ya que representan riesgos biológicos importantes en las zonas de diversidad genética de especies vegetales debido a que pueden provocar efectos desconocidos, principalmente en lo que se refiere al maíz, considerado como un cultivo básico y tradicional de los mexicanos. Las empresas transnacionales están tratando de introducir maíz a México y argumentan que no existe riesgo biológico para los maíces criollos. El presente trabajo tiene como fundamento explicar algunos factores importantes que influyen en el flujo genético entre maíces criollos en sistemas tradicionales y analizar los riesgos que implican la introducción y uso de los maíces transgénicos. Se estudia cómo ocurre el flujo genético entre parcelas vecinas de maíz en sistemas tradicionales de acuerdo a resultados de investigaciones, así como la acumulación de efectos genéticos en las poblaciones a través del tiempo y el cambio que ocurre en su estructura genética. La selección por el agricultor y mecanismos en las estructuras reproductivas también definen el grado en que ocurre dicho flujo. En análisis conjunto, indica que el flujo genético del maíz está presente a gran distancia y a través del tiempo en proporciones considerables, y no

¹ UAM-Mante, Universidad Autónoma de Tamaulipas. *E-mail: jecervan@uat.edu.mx

es posible por ahora determinar con exactitud los límites para evitarla. Por tanto, la intención de introducir los maíces transgénicos a México para producción comercial debe posponerse hasta no disponer de información suficiente acerca de cómo evitar el flujo genético y determinar los efectos en los maíces criollos. Sin embargo, grandes intereses económicos en juego pueden influir fuertemente para que sugerencias como las aquí presentes no sean tomadas en cuenta, y la semilla transgénica sea sembrada en un corto plazo.

Abstract

Biotechnology and transgenic products have been played an important role of agriculture successful in developed countries; however, its successful in some developing countries as Mexico is a concern nowadays, because such as products are representing biological risks in regions where genetic diversity is important. By transgenic, Unknown genetic effects could be introduced to crop species, mainly in maize because is a basic crop and traditional food for Mexican people. International companies want introduce transgenic corn into Mexico, and they do not take importance about risk of gene flow toward landraces. The present has as object to explain some important factors of gene flow among landraces in traditional systems and to analyze risks involved in introduction and use of transgenic maize. In this study is analyzed how gene flow occurs among neighbouring corn fields in traditional systems according research results, and accumulated effects in populations across time and their genetic changes. Selection by farmers of landraces and mechanisms involved in corn reproductive structures also are responsible of gene flow occurrence. Global analysis is interpreted as gene flow in corn occurs at long distance at higher level, and it is not possible by now determinate factors to avoid it. That is why, suggests given by companies to use transgenic corn are not appropriate to do it. So, is suggested that introduction of transgenic corn to Mexico must be postponed until enough information is available about gene flow and their risks toward land races; however, economic interest playing a important role, can be too important to avoid suggests here presented, and maybe transgenic corn seed will be planted in a short term.

Importancia y productividad del maíz

El maíz es un cultivo importante en México tanto por el área de siembra cultivada, como por el alto consumo *per cápita* y de sus valores tradicionales. Se cultivan más de ocho millones de hectáreas con aproximadamente 20 millones de toneladas de grano. El consumo por persona promedio es de 120 kg/ha. Para este consumo no es suficiente la producción nacional obtenida, ya que se importan

5.5 millones de toneladas anuales para cubrirlo. Dicha importación es en su mayor parte de Estados Unidos.

A pesar del alto volumen producido a nivel nacional, éste no es provocado por alto rendimiento unitario, pues apenas llega a las 2.5 t/ha. Este rendimiento es bajo considerando que hay regiones en el país donde se obtienen más de 10 t/ha. El uso de variedades improductivas, así como problemas de plagas, enfermedades y malezas son, además del poco uso de fertilizantes y en general baja utilización de insumos y tecnología de producción, los principales factores que influyen en esos resultados.

Una solución parcial, pero muy efectiva, lo constituye usar variedades e híbridos altamente productivos. Para ejemplificar el potencial de lo anterior, se ha comprobado que el maíz puede rendir hasta 27 t/ha. Esto ocurrió durante 2002 cuando el agricultor Francis Childs de Manchester, Iowa, lo obtuvo en 20 acres usando un híbrido transgénico, alta fertilización al suelo y foliar, además de alta población de plantas (70 mil/ha), sembrando en surcos a 20 pulgadas de amplitud (50.9 cm).

Cultivo y beneficio de los transgénicos

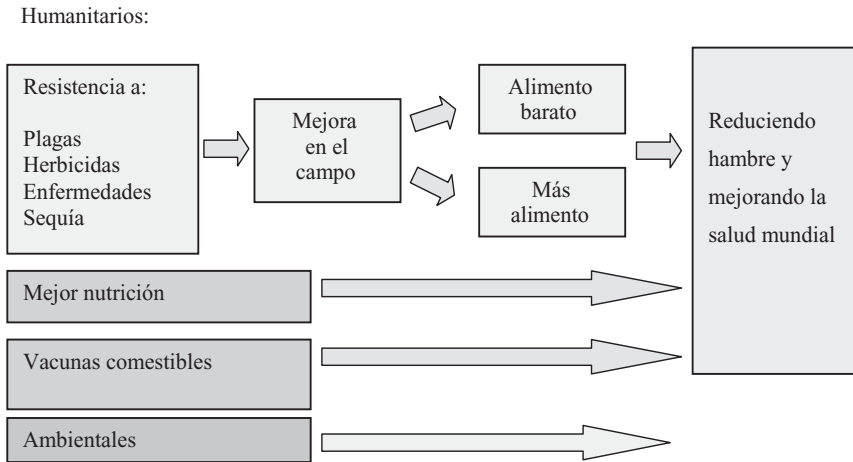
El área cultivada con el total de transgénicos, considerando todas las especies, es de 52 millones de hectáreas en el mundo, de las cuales, de maíz son el 23% (12 millones de hectáreas). La mayor parte del área sembrada con maíz transgénico corresponde a resistencia a insectos, principalmente en lo que se refiere a gusanos de la raíz y del tallo. Estados Unidos es el país que más usa transgénicos de maíz, siguiéndole Argentina, Canadá y China. Con relación a la venta de semilla de maíz transgénico, la Compañía Monsanto es quien más la distribuye (90%), seguida de Syngenta, Dupont (Pioneer), Bayer Crop Science y Dow.

Se ha generado el maíz Bt (Bt Corn), maíz que contiene un químico encontrado en una bacteria (*B. turingiensis*) que es tóxico a insectos, pero no a humanos. También hay transgénicos resistentes a herbicidas, los cuales soportan la aplicación de dichos químicos, que matan hierbas pero no al maíz con el transgene insertado que da la resistencia.

En general los beneficios potenciales humanitarios pueden definirse en la figura 1. Esto es, los transgénicos que proporcionan resistencia a plagas, herbicidas, enfermedades y sequía, mejoran las condiciones del campo proporcionando alimento barato y en mayor volumen, teniendo como consecuencia la reducción del hambre y mejorando la salud. Proporcionan además en otras especies de cultivo, mejor nutrición

y vacunas comestibles. El uso reducido de pesticidas en granjas son los efectos ambientales positivos esperados.

Figura 1. Beneficios potenciales del uso de transgénicos



Riesgos ambientales y económicos

Éstos se pueden dar por la transferencia de genes a criollos de maíz o variedades tradicionales. Por ejemplo, las plantas resistentes a herbicidas podrían cruzarse y crear super-malezas. Para evitar lo anterior se podrían crear plantas andro-estériles que producen polen, y producir transgénicos cuyo polen no contenga genes extraños o bien crear zonas o franjas de cultivos de maíz no-transgénicos alrededor de cultivos transgénicos, entonces dichas franjas no cosecharlas.

En este tópico hay una competencia desigual, al eliminarse la competencia libre en el mercado de la semilla, ya que los transgénicos están patentados y no pueden usarse libremente. Con esta tecnología patentada, los productores de maíz están forzados a comprar la semilla cada año; sin embargo, algunas compañías han reducido su costo o donado semillas de maíz transgénico a naciones pobres en desarrollo.

Riesgos a la salud

Las reacciones alérgicas que mucha gente tiene a algunos alimentos es otro aspecto importante en las propiedades de los transgénicos, y constituye un factor de riesgo. Por ejemplo, en el caso de la nuez brasileña, se creó una transgénica de soya con un gen insertado de dicha nuez; más tarde se encontró que tal gen codifica para un alérgico mayor. Como consecuencia de este problema, se abandonó el interés comercial en la variedad de soya. Esta misma situación puede ocurrir en el maíz que en México es de consumo directo. Por tanto, a los maíces transgénicos (también a los no-transgénicos) se les debe practicar pruebas estrictas. Las pruebas deben incluir, entre otras cosas, respuesta alérgica potencial y comparación de los alimentos *versus* todos los agentes alérgicos conocidos.

Aceptación pública y problemas sociopolíticos

Las preguntas más comunes que se hace el público cuando escucha algo de transgénicos son las siguientes: ¿Qué es eso?, ¿qué beneficio obtengo de él?, ¿es seguro?, ¿tengo la oportunidad de escoger?, ¿es natural?

Las respuestas no son muy sencillas de encontrar ni de explicar, pero a grandes rasgos se puede sugerir que: “productos y consumidores deben ponerse de acuerdo y educarse sobre la tecnología de que se trata y también sobre la que desea el consumidor”; sin embargo, es el consumidor quien debe decidir. La mayoría de los transgénicos de maíz benefician directamente a los productores; pero es de esperarse que si se genera un producto no alérgico o vacuna ingerida la reacción del público será muy positiva. Quizá entonces, los recursos se deberán utilizar hacia productos útiles a los consumidores.

Por otro lado, las pruebas de bioseguridad son ahora estimadas a corto plazo. Esto significa que no hay información para largo plazo, o bien no se han publicado los resultados. Asimismo, el etiquetado de productos no se da en la mayoría de los casos, sólo en algunos países europeos, y este aspecto (el etiquetado) podría dar a los consumidores la oportunidad de decidir si usarlo o no.

La organización *Greenpeace* ha mencionado aspectos negativos de los transgénicos argumentando que sirven a unos cuantos agroindustriales que cultivan grandes superficies con riego y agroquímicos, y que los transgénicos no pueden usarse exitosamente en milpas. Afirman que con ellos se refuerza el control de la alimentación mundial por parte de unas pocas transnacionales. Quienes los siembran

tienen que pagar el costo de las semillas, más las regalías por usar esa tecnología. Contaminan la agricultura orgánica y generan dependencia de los agricultores hacia unos pocos transnacionales. Además, fomentan las patentes de semillas y seres vivos.

Contaminación

Desde 1996 a 2005, la contaminación ha ocurrido principalmente en maíz, y también en forma de liberaciones ilegales y por efectos adversos a la agricultura. La contaminación en maíz ha ocurrido por ejemplo en Europa (principalmente en España), donde se ha verificado la siembra de maíz transgénico junto al maíz normal, ello facilita la contaminación debido a la condición alógama de la especie. Además, se ha observado cerca de predios recién sembrados, sacos de semillas abandonados, o en el borde de canales y acequias de riego, con algunas semillas dentro. Por tanto, éste también puede ser un factor de descontrol de los transgénicos.

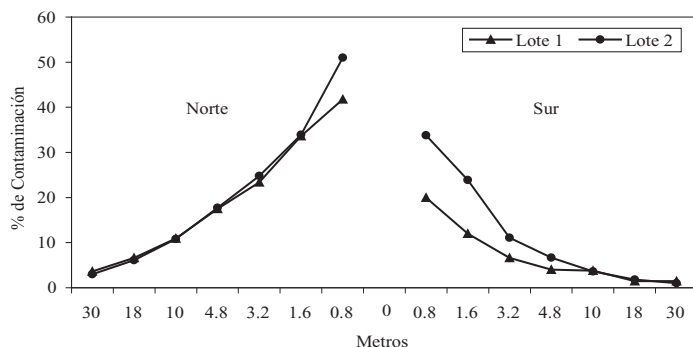
Por otra parte y en el caso de la contaminación de maíz criollo en México, se ha reportado que ésta ya se dio en Oaxaca; sin embargo, hay controversia en los resultados obtenidos en el análisis genómico de maíces criollos presumiblemente contaminados por transgénicos.

Diversidad del maíz

México posee una gran diversidad genética en maíz, la cual está representada por más de 35 razas diferentes. Además, el teosinte, un pariente cercano del maíz, aún está presente en muchas regiones productoras. El riesgo es que se pierda esta diversidad con el paso del tiempo al influir fuertemente en el valor selectivo por los genes transgénicos. Hasta ahora el mantenimiento de la diversidad genética del maíz se debe a selección local y al intercambio de semilla.

Se han hecho estudios para conocer el grado de flujo genético entre parcelas adyacentes de maíz criollo y mejorado, tratando de simular la contaminación que podría resultar de los transgénicos hacia los criollos. Según la mayoría de los resultados, la contaminación ocurre fuertemente los primeros dos metros (60%), disminuyendo en forma exponencial hasta llegar a cerca del 1% a los 30 m. Este resultado se presenta con el viento a favor, ya que en sentido inverso también ocurre pero en menor proporción (figura 2).

Figura 2. Contaminación de parcelas de maíz adyacentes



Otro aspecto considerado en la contaminación o flujo genético ha sido la preferencia del polen en las variedades criollas y mejoradas. Al realizar polinizaciones con mezcla de polen de ambos tipos de maíces y polinizando jilotes de ambos, se ha encontrado que las variedades criollas prefieren a su propio polen. Ésta podría ser una barrera reproductiva; sin embargo, la polinización por polen extraño de cualquier forma ocurre, y es de esperarse que fecunde (cuadro 1).

La acumulación de flujo genético a través del tiempo se ha detectado al analizar genéticamente las variedades criollas antiguas y las recientes, donde el análisis de conglomerados muestra como las variedades de maíz criollas antiguas van tomando similitud con las recientes, debido al flujo genético entre ellas a través del tiempo (figura 3).

La introducción de maíz transgénico a México

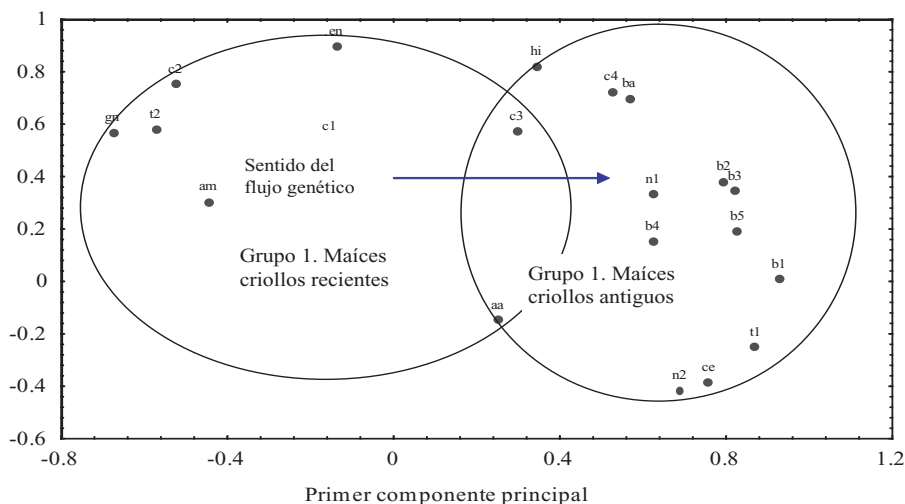
Hay fuertes presiones económicas que están influyendo para que el maíz transgénico sea introducido y comercializado en México. Los trasnacionales argumentan que contribuirían a solucionar problemas de producción; sin embargo, ello sólo beneficiaría a parte del 31% del área de maíz que es empresarial. Hasta ahora existe moratoria en el uso de transgénicos para uso comercial, pero actualmente se está analizando un proyecto maestro para evaluar transgénicos a ciclo abierto. Por tanto, el ensayo como su producción comercial no se permite por ahora, debido a que no se han cuantificado los riesgos que representan.

Cuadro 1. Preferencia de variedades para fecundarse con el polen propio en la mezcla de polen propio y extraño. Iguala, Guerrero, PV-1996

Variedad x	Cruzamiento		Grano de color		Proporción		valor de χ^2
	Mezcla de polen (Hembra + Macho)		materno	no materno	observada	esperada	
Ceroso x	(Ceroso + Blanco)	682	532	56:44	50:50	9.2**	
Ceroso x	(Ceroso + Amarillo A.)	702	508	58:42	50:50	15.5**	
Ceroso x	(Ceroso + Negro)	452	728	38:62	50:50	32.2**	
Ceroso x	(Ceroso + Chiang)	705	486	59:41	50:50	20.3**	
Ceroso x	(Ceroso + Híbrido)	382	504	43:57	50:50	8.3*	
Blanco x	(Blanco + Amarillo A.)	711	491	59:41	51:49	14.6**	
Negro x	(Negro + Amarillo A.)	953	254	79:21	55:45	127.9**	
Chiang x	(Chiang + Amarillo A.)	809	378	68:32	51:49	64.1**	
Híbrido x	(Híbrido + Amarillo A.)	815	381	68:32	57:43	26.8**	
Blanco x	(Blanco + Negro)	858	208	80:20	56:44	106.8**	
Amarillo x	(Amarillo A. + Negro)	756	461	62:38	48:52	52.7**	
Chiang x	(Chiang + Negro)	472	417	54:46	43:57	18.6**	
Híbrido x	(Híbrido + Negro)	815	381	68:32	48:52	64.7**	

*Chiang = Chianquihuitl; Amarillo A. = Amarillo Ancho; ** = proporción diferente de la esperada $\alpha=0.01$ y 0.001 ; valor crítico de χ^2 al 0.99 y 0.999= 6.63 y 10.84, respectivamente.

Figura 3. Acumulación de flujo genético a través del tiempo, según análisis de conglomerados de sistemas isoenzimáticos



Bibliografía

- Ayala, F. J.; J. A. Kiger Jr. (1984), *Genética Moderna*, España, Fondo educativo interamericano, pp. 611-763.
- Benz, B. (1986), *Taxonomy and Evolution of Mexican maize*, Tesis doctoral no publicada, Madison, University of Wisconsin, 433 pp.
- Caballero H. F.; S. T. Cervantes (1990), "Estudio genético y taxonómico de poblaciones de maíz de la raza Tuxpeño", *Agrociencia*, serie Fitociencia, 1 (2): 43-64.
- Castillo G. F.; M. M. Goodman (1996), "Investigaciones acerca del flujo genético entre maíz mejorado y maíz criollo", en J. A. Serratos, M. C. Willcox y F. Castillo (eds.) (1996), *Flujo genético entre maíz criollo, maíz mejorado y teocintle: implicaciones para el maíz transgénico*, México, CIMMYT: 72-77.
- Cervantes S. T.; M. M. Goodman y E. Casas D. (1978), "Efectos genéticos y de interacción genotipo-ambiente en la clasificación de razas mexicanas de maíz", *Agrociencia* 31:25-43.
- Doebly F. J., C. W. Stuber; M. M. Goodman (1985), "Isozyme Variation in the Races of Maize from Mexico", *Amer. J. Bot.* 72(5): 629-639.

- “GM Corn Poses Little Threat to Monarch”, *Nature Biotechnology*, 17:1154, diciembre de 1999.
- Goodman M. M. y C. W. Stuber (1983a), “Maize”, en S. D. Tanksley y T. J. Orton (eds.), *Isozymes in plant genetics and breeding, part B*, Amsterdam, Elsevier.
- Hamilton M. B. (1994), “*Ex situ* conservation of wild plant species: time to reassess the genetic assumptions and implications of seed bank”, *Conservation Biology* 8: 39-49.
- Haskell G. y Dow P. (1951), “Studies with Sweet Corn. V. Seed-setting with distances from the pollen source”, *Empire Journal of Experimental Agriculture* 19 (73): 45-50.
- Louette D. (1994), *Gestion Traditionnelle des variétés de maïs dans la Réserve de la Biosphere Sierra de Manantlán (RBSM), (états de Jalisco et Colima, Mexique) et conservation des ressources génétiques de plantes cultivées*, Tesis doctoral de l’Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, Francia, 245 pp.
- _____ (1996), “Intercambio de semillas entre agricultores y flujo genético entre variedades de maíz en sistemas agrícolas tradicionales”, en J. A. Serratos, M. C. Willcox y F. Castillo (eds.), *Flujo genético entre maíz criollo, maíz mejorado y teocinte: implicaciones para el maíz transgénico*, México, CIMMYT: pp. 60-71.
- Murillo N. P. (1978), *Estimación del grado de cruzamiento en un lote de selección masal sin aislamiento*, Tesis Profesional, México, Universidad de Guadalajara.
- Oldfield M. y J. Alcorn (1987), “Conservation of Traditional Agroecosystems”, *Bio-Science* 37: 199-208.
- Ortiz T. E. (1993), *Aislamiento y dispersión de polen en la producción de Semilla de Maíz*, Tesis de Maestría en Ciencias, Montecillo, México, Colegio de Postgraduados, 81 pp.
- Paterniani E.; A. C. Stort (1974), “Effective Maize Pollen Dispersal in the Field”, *Euphytica* 23: 129-134.
- Raynor G. S.; E. C. Ogden; J. V. Hayes (1972), “Dispersion and Deposition of Corn Pollen from Experimental Sources”, *Agron. J.* 64: 420-427.
- Russell W. A.; A. R. Hallauer (1980), “Corn”, en W. R. Fehr y H. Hadley (eds.), *Hybridization of Crop plants American Soc. of Agron. and Crop Sci*, Wisconsin, Estados Unidos, Soc. of América, Publisher.
- Sánchez G. J. J.; M. M. Goodman (1992), “Relationship Among the Mexican Races of Maize”, *Econ. Bot.* 46: 72-85.
- SAS Institute Inc. (1985), *SAS User’s guide: Statistics*, Estados Unidos, Cary, N. C., [version 5 edition].
- Snaeth P. H. A.; R. Sokal (1973), *Numerical Taxonomy*, San Francisco, Estados Unidos, W. H. Freeman and Co.

- Stuber C. W.; M. M. Goodman (1983), "Allozyme Genotypes for Popular and Historically Important Inbred Lines of Corn, *Zea Mays* L.", *USDA Agric Res. Results, Southern Ser.* 16.
- "Transgenic Pollen Harms Monarch Larvae", *Nature*, vol. 399, núm. 6733: 214, mayo de 1999.
- Wellhausen E. J.; L. M. Roberts; E. Hernández X.; en colaboración con P. C. Mangelsdorf (1951), *Razas de maíz en México. Su origen, características y distribución*, Folleto técnico, Oficina de estudios especiales, México, Secretaría de Agricultura y Ganadería núm. 5.
- Wilkes, H. G. (1967), *Tosinte. The close relative of maize*, The Bussey Inst., Harvard University.
- Wright, S. (1978), *Evolution and the genetics of populations, vol. 4: Variability within and among natural populations*, University of Chicago Press.

Referencias electrónicas

- www.enn.com
[www.propanefl.com/ images/corn.jpg](http://www.propanefl.com/images/corn.jpg)
[www.columbia.edu/cu/ opg/images/dna.jpg](http://www.columbia.edu/cu/opg/images/dna.jpg)
[www.arctictravel.com/ GJOA/haven.html](http://www.arctictravel.com/GJOA/haven.html)
[www.foodsubs.com/ Fruitber.html](http://www.foodsubs.com/Fruitber.html)
[www2.utmb.edu/scccb/mouse/ images/microinjection.jpg](http://www2.utmb.edu/scccb/mouse/images/microinjection.jpg)
[ss.jircas.affrc.go.jp/engpage/ jarq/32-4/hagio/fig4.htm](http://ss.jircas.affrc.go.jp/engpage/jarq/32-4/hagio/fig4.htm)
www.enn.com
[www.vme.net/dvm/ARNHA/ monarch.html](http://www.vme.net/dvm/ARNHA/monarch.html)
<http://www.csa.com/hottopics/gmfood/overview.html>
www.greenpeace.org
www.biotechknowledge.monsanto.com
<http://www.inspection.gc.ca/english/ppc/biotech/labeti/response.shtml>

Incidencia de hongos micotoxigénicos en maíz cultivado y almacenado en el norte de Tamaulipas, México

Incidence of Micotoxigenic Fungi in Cultivated and Stored Maize at Northern Tamaulipas, Mexico

*Hernández-Delgado, S.¹; Reyes-Méndez, C. A.²;
Reyes-López, M. A.^{1*}; García-Olivares, J. G.¹; Mayek-Pérez, N.¹*

Resumen

El presente trabajo consistió en dos fases. En la primera se efectuaron colectas de grano de maíz de junio a septiembre de 2005 (500 a 1 500 g) en bodegas ubicadas en Díaz Ordaz (cuatro), Reynosa (tres) y Río Bravo (tres), Tamaulipas. En total, se tomaron 97 muestras de maíz (54 de maíz amarillo y 43 con grano blanco). Diez granos de cada una de ellas se desinfectaron y cultivaron en medio papa-dextrosa-agar a 30 °C por tres días en oscuridad. El experimento se repitió dos veces. Se registró el número de colonias o semillas infectadas con hongos de los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*. La identidad de cada género se confirmó mediante la observación de la morfología de conidias y de micelio, y la ayuda de literatura especializada. La segunda fase se realizó en campo y laboratorio. Se cultivaron 25 híbridos (14 con grano amarillo y 11 con grano blanco) de maíz de diferentes casas comerciales de México y Estados Unidos en un diseño experimental de bloques completos al azar con cuatro repeticiones en Río Bravo, Tamaulipas, el 30 de agosto de 2005. La cosecha se realizó el 23 de enero de 2006 formando un compuesto de 200 g del grano de cada unidad experimental. La semilla se procesó en laboratorio de modo similar a lo indicado en la primera fase

¹ Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional. Blvd. del Maestro s/n esq. Elías Piña, col. Narciso Mendoza, 88710, Reynosa, Tam., México.

² Campo Experimental Río Bravo-Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, km 61 carretera Matamoros-Reynosa, Río Bravo, Tamps., México.

*e-mail: mreyesl@ipn.mx

del trabajo. En el grano de almacén se observó que el maíz amarillo exhibió 50.3% de incidencia de *Aspergillus*, 5.5% de *Fusarium* y 15.9% de *Penicillium* (71.7% en total). En maíz blanco, la incidencia de *Aspergillus* fue de 44.6%, 6% de *Fusarium* y 10.4% de *Penicillium* (61% en total). En campo, los maíces amarillos mostraron mayores incidencias de *Aspergillus* (3.1%), *Fusarium* (76.9%) y *Penicillium* (11.6%) que los maíces blancos (2.4, 63.6 y 7.9%, respectivamente). Los maíces amarillos DK-697 y DK-1060; Garst 8222, 8285 y 8288; y Golden Acres 8112, 8311 y 8460 mostraron mayores incidencias combinadas de hongos micotoxigénicos; mientras que los maíces blancos Tigre, H-437, H-436 y Asgrow 7573 presentaron las menores incidencias. Los híbridos de grano blanco UAP-1851, DK-2010 y Asgrow 7573 no presentaron incidencia de *Aspergilli*. Los resultados indican que entre los hongos potencialmente micotoxigénicos detectados en maíz blanco o amarillo almacenado en el norte de Tamaulipas, *Aspergillus* (*A. flavus* y *A. niger*) muestra las mayores incidencias (mayores al 40%), mientras que en campo, las mayores incidencias las muestra *Fusarium* (mayores a 60%).

Abstract

This research work consisted on two phases: in the first maize grain was collected from June to September 2005 ((500 to 1500 g) in silos located in Díaz Ordaz (four), Reynosa (three) and Río Bravo (three) counties in Tamaulipas. In total, 97 maize grain samples were collected (54 of yellow grain and 43 with white grain). Ten grains per sample were disinfested and cultivated in potato-dextrose-agar medium to 30 °C during three days at darkness. The experiment was repeated twice. The number of colonies or seeds infected by fungi from the genera *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium* was registered. The identity of each genus was confirmed by the conidia and mycelium morphology characterizations and the use of specialized literature. The second phase was conducted under field conditions and laboratory. Twenty-five maize hybrids (14 with yellow grain and 11 with white grain) from different companies of México and USA were sown (august 30, 2005) in a randomized complete block design with four replications in Río Bravo, Tamaulipas. Harvest was conducted at January 23, 2006 and a composite of 200 g from each experimental unit was performed. Seeds were analyzed in laboratory as been described in the first phase. In samples from silos, yellow maize showed 50.3% of *Aspergillus* incidence, 5.5% of *Fusarium* and 15.9% of *Penicillium* (71.7%). In white maize, the incidence of *Aspergillus* was 44.6%, 6% of *Fusarium* and 10.4% of *Penicillium* (61%). Under field conditions, yellow maize showed higher incidences of *Aspergillus* (3.1%), *Fusarium* (76.9%) and *Penicillium* (11.6%) than white maize (2.4, 63.6 and 7.9%, respectively). Yellow maize hybrids DK-697 and DK-1060; Garst 8222, 8285 and 8288 and Golden Acres 8112, 8311 and 8460 showed the highest micotoxigenic fungi incidences, while white maize hybrids Tigre, H-437, H-436 and Asgrow 7573 exhibited the lowest incidences. White grain hybrids UAP-1851, DK-2010 and Asgrow 7573 did not show incidence of *Aspergilli*. Results indicate that among the potentially micotoxigenic fungi detected in white or yellow maize stored at northern Tamaulipas, *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger* and *A.*

parasiticus) show the highest incidences (higher than 40%), while under field conditions the highest incidences were showed by *Fusarium* (up 60%).

Introducción

El cultivo del maíz es de importancia capital para México, debido a que constituye, junto con el frijol, la base de la alimentación de millones de mexicanos. Para el 2004, en el país se sembraron aproximadamente 8.4 millones de hectáreas con maíz, con una producción de grano de alrededor de 21.7 millones de toneladas y un rendimiento unitario promedio de 2.6 ton ha⁻¹. En el caso del estado de Tamaulipas, el maíz se cultivó en poco más de 220 mil hectáreas con una producción de alrededor de 710 mil toneladas y rendimientos unitarios promedio de 3.2 ton ha⁻¹ (SIAP, 2006). De acuerdo con el INEGI (2005), se consumen anualmente poco más de 20 millones de toneladas de maíz y, dadas las variaciones en los volúmenes de producción del grano en el país, en ocasiones existe la necesidad de importar el grano de otros países, principalmente Estados Unidos. Para ello e independientemente del origen del grano, nacional o importado, en México sólo se cuenta con la norma NOM-188-SSA1-2002 (Diario Oficial de la Federación, 2002) que regula el contenido de aflatoxinas en cereales para el consumo humano y animal. Dicha norma cubre arroz, cebada, avena, centeno, maíz, sorgo y trigo. Sin embargo, dicha norma se refiere al contenido de aflatoxinas totales, aunque se sabe que no todas las aflatoxinas tienen la misma toxicidad y, además, los cereales incluidos en la norma pueden estar contaminados por otras micotoxinas igualmente peligrosas como las aflatoxinas. De lo anterior se infiere que los cereales están sujetos en México a un control parcial en cuanto a micotoxinas se refiere y, finalmente, no se conocen los grados de exposición de la población humana que consume maíz en su dieta (Martínez-Flores y García-Aguirre, 2003).

A pesar de que el potencial productivo del maíz es mayor al consignado en las estadísticas de producción de México, una serie de factores adversos de naturaleza biótica (enfermedades, plagas, malezas) y abiótica (sequía, salinidad, altas temperaturas) afectan constantemente dicha producción. En el caso del estado de Tamaulipas, la mayor proporción de la superficie cultivada con maíz bajo condiciones de riego se concentra en la región norte, mientras que el resto de la superficie se cultiva en condiciones de temporal con sorgo. Dicha región se caracteriza por ser de temporal y por la incidencia de periodos de sequía y altas temperaturas intermitentes. Aunado a lo anterior, se registra constantemente la incidencia de plagas insectiles y de hongos fitopatógenos que principalmente infectan al grano. Entre los géneros fúngicos que destacan en maíz se encuentran *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, mismos que aparte

de los efectos nocivos que pudieran ocasionar en el cultivo, tienen efectos nocivos en los consumidores del grano. Las plagas de la mazorca tales como el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) y el gusano elotero (*Heliothis zea*) incrementan la infestación por hongos al funcionar como vectores, debido a que causan heridas en las espigas y granos del maíz por donde ingresan dichos hongos (Rodríguez del Bosque *et al.*, 1995; Rodríguez-Del Bosque, 1996). Los tres géneros sobresalen por la producción de micotoxinas: en *Aspergillus* son comunes las aflatoxinas, destacando en el caso de *A. flavus* las aflatoxinas B1, M1, y G1; en *Fusarium* son importantes la fumonisina, zearalenonas y los tricotecenos, entre otras; mientras que en *Penicillium* destacan patulina, citrina y ocratoxina A. Los efectos en el corto y largo plazo después del consumo de micotoxinas se traducen en desórdenes fisiológicos, citotóxicos e inmunosupresivos; así como en teratogénesis, mutagénesis y carcinogénesis (Albright, 2001; Peraica y Dominan, 2001; Fundohan *et al.*, 2003; Munkvold, 2003).

Este trabajo surge con la necesidad de mejorar el conocimiento sobre la biología de los hongos micotoxigénicos en el maíz en Tamaulipas, México; apoyar en el diseño de estrategias de manejo integrado que tiendan a minimizar sus daños directos al cultivo y a los consumidores, entre las que destaca la identificación y aprovechamiento de nuevas fuentes de resistencia a la infección por hongos toxigénicos. Por ello, los objetivos del presente trabajo fueron: 1) Determinar la incidencia de hongos potencialmente micotoxigénicos en grano de maíz cosechado directamente en campo y almacenado en diferentes lugares del norte de Tamaulipas, México; 2) Identificar asociaciones entre la incidencia de los hongos micotoxigénicos y las condiciones de cultivo (ambiente, germoplasma de maíz) o de almacenamiento (ambiente, tipo de grano).

Materiales y métodos

Incidencia de hongos micotoxigénicos en grano de maíz almacenado

Se realizaron colectas de grano de maíz de junio a septiembre de 2005, en bodegas ubicadas en Díaz Ordaz (cuatro), Reynosa (tres) y Río Bravo (tres), Tamaulipas. En total, se tomaron 97 muestras de maíz (54 de maíz amarillo y 43 con grano blanco), mismas que consistieron en 500 a 1 500 g cada una. Diez granos de cada muestra se desinfectaron y posteriormente se cultivaron en medio de cultivo papa-dextrosa-agar a 30 °C durante tres días en oscuridad. El experimento se repitió dos veces. Se registró el número de colonias o semillas infectadas con hongos de los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*. La identidad de cada género se confirmó mediante la observación de la

morfología de conidias y de micelio, y la ayuda de literatura especializada: *Fusarium* (Booth, 1971; Nelson *et al.*, 1983 y 1994; Chelkowski, 1989); *Aspergillus* (Raper y Fennell, 1965; Kilch y Pitt, 1988); *Penicillium* (Piff, 1979). La relación de bodegas muestreadas y el número de muestras obtenidas se consigna en el cuadro 1.

Incidencia de hongos micotoxigénicos en maíz cultivado en campo

Se cultivaron 25 híbridos (14 con grano amarillo y 11 con grano blanco) de maíz de diferentes casas comerciales de México y Estados Unidos (cuadro 2) en un diseño experimental de bloques completos al azar con cuatro repeticiones en Río Bravo, Tamaulipas, a partir del 30 de agosto de 2005. La cosecha se realizó el 23 de enero de 2006. formando un compuesto de 200 g del grano de cada unidad experimental. La semilla se procesó en laboratorio de modo similar a lo indicado en la primera fase del trabajo. Adicionalmente, se registraron algunas variables del crecimiento (altura de planta y de mazorca, aspecto de planta) y fenológicas (días para floración femenina y masculina) (cuadro 2), así como las condiciones climáticas durante el desarrollo del experimento (temperaturas máximas y mínimas, precipitación pluvial y humedad relativa) (figura 1).

Cuadro 1. Almacenes de maíz muestreados por municipio y porcentajes de infección por hongos toxigénicos en el norte de Tamaulipas, 2005

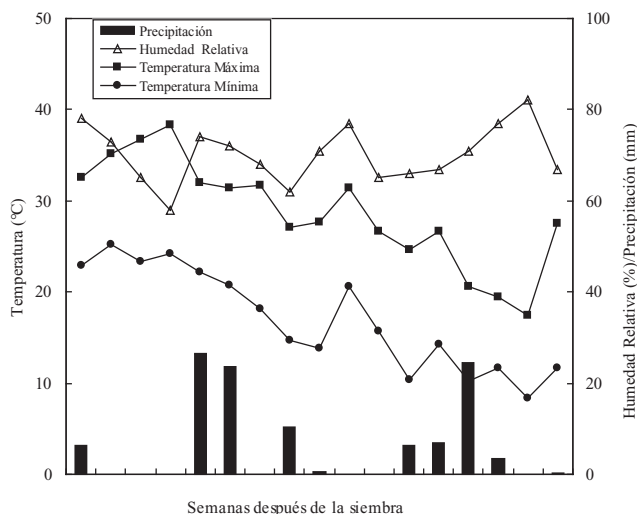
<i>Reynosa</i>			<i>Río Bravo</i>						<i>Díaz Ordaz</i>								
<i>Cantú-Noyola</i>			<i>Conagry</i>			<i>Guadalupe-Benavides</i>			<i>Río Bravo</i>			<i>Palomera</i>			<i>Merco Grain</i>		
<i>A*</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>Maíz amarillo</i>																	
<i>n=16</i>			<i>n=16</i>			<i>n=0</i>			<i>n=0</i>			<i>n=18</i>			<i>n=4</i>		
65	6	14	41	4	11	-	-	-	70	4	14	37	7	24	70	4	14
<i>Maíz blanco</i>																	
<i>n=6</i>			<i>n=0</i>			<i>n=9</i>			<i>n=7</i>			<i>n=4</i>			<i>n=17</i>		
43	6	13	-	-	-	51	8	4	50	2	11	33	5	6.2	43	6	17

* A = *Aspergillus* sp., F = *Fusarium* sp., P = *Penicillium* sp.
n = Tamaño de muestra por almacén.

Cuadro 2. Híbridos de maíz cultivados en Río Bravo durante 2005

<i>Híbrido</i>	<i>Color de grano</i>	<i>Tipo de grano</i>	<i>Días para floración</i>	
			<i>Masculina</i>	<i>Femenina</i>
DK-697	Amarillo	Dentado	54	56
DK-1060	“	Semi-cristalino	56	57
Garst 8222 1T	“	Dentado	57	58
Garst 8285	“	Dentado-harinoso	59	60
Garst 8288	“	“	54	54
Asgrow 7573Y	“	Semi-dentado	57	58
N 83-N5	“	“	59	60
Golden Acres 8112	“	Dentado-harinoso	59	61
Golden Acres 8311	“	“	58	58
Golden Acres 8460	“	“	59	63
P-31R88	“	Semi-dentado	55	57
P-31G98	“	Dentado	58	60
E-179	“	-	59	61
E-182	“	-	53	54
DJ 2060	Blanco	-	57	58
Tigre	“	Dentado	54	55
Puma	“	“	55	57
H-439	“	Semi-cristalino	58	59
H-437	“	Semi-dentado	56	58
Asgrow 7573W	“	Dentado	58	59
DK 2010	“	“	57	59
H-436	“	Semi-cristalino	65	67
Pioneer 3025	“	Dentado	55	56
UAP-1790	“	“	55	56
UAP-1851	“	“	59	62

Figura 1. Condiciones climáticas de campo durante el desarrollo de 25 híbridos de maíz en Río Bravo, Tamaulipas en 2005



Fenología: F = Floración, LLG = Llenado de grano, MF = Madurez fisiológica
 Meses del año: S = septiembre, O = octubre, N = noviembre, D = diciembre

Análisis estadístico

A partir de los datos de incidencia de hongos micotoxigénicos en grano almacenado se calcularon los porcentajes de infección, de acuerdo con el origen del material (bodega) y el tipo de grano (blanco o amarillo). En el caso de los datos de campo, los porcentajes de infección por cada género se normalizaron con la transformación arcoseno raíz del porcentaje y, posteriormente, se sometieron al análisis de varianza donde la fuente de variación fue el híbrido de maíz y las repeticiones. En los casos en que dicho análisis detectó diferencias significativas, las medias se separaron con el valor de Tukey ($P=0.05$). Finalmente, se realizó un análisis de correlación simple de Pearson entre los porcentajes de infección por hongos en la semilla en el germoplasma sembrado en campo y algunas características fenológicas y del crecimiento (Martínez-Garza, 1988). El análisis estadístico se realizó en el programa SAS versión 6.12 para Windows (SAS Institute, Cary, Carolina del Norte, Estados Unidos).

Resultados

En el grano de almacén se observó que el maíz amarillo exhibió 50.3 % de incidencia de *Aspergillus*, 5.5 % de *Fusarium* y 15.9 % de *Penicillium* (71.7 % en total). En maíz blanco, la incidencia de *Aspergillus* fue de 44.6 %, 6 % de *Fusarium* y 10.4 % de *Penicillium* (61 % en total) (cuadro 1). El análisis de varianza de los porcentajes de infección por cada género de hongos y porcentaje total de infección detectó diferencias significativas entre híbridos para los casos de infección por *Fusarium*, por *Penicillium* y total (cuadro 3). En campo, los maíces amarillos mostraron mayores incidencias de *Aspergillus* (3.1 %), *Fusarium* (76.9 %) y *Penicillium* (11.6 %) que los maíces blancos (2.4, 63.6 y 7.9 %, respectivamente). Los maíces amarillos DK-697 y DK-1060; Garst 8 222, 8 285 y 8 288; y Golden Acres 8 112, 8 311 y 8 460 mostraron mayores incidencias combinadas de hongos micotoxigénicos; mientras que los maíces blancos Tigre, H-437, H-436 y Asgrow 7 573 presentaron las menores incidencias. Los híbridos de grano blanco UAP-1851, DK-2010 y Asgrow 7573 no presentaron incidencia de *Aspergilli*. Los resultados indican que entre los hongos potencialmente micotoxigénicos detectados en maíz blanco o amarillo, almacenado en el norte de Tamaulipas, *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger* y *A. parasiticus*) muestra las mayores incidencias (mayores al 40%), mientras que en campo, las mayores incidencias las muestra *Fusarium* (mayores a 60%) (cuadro 4). El análisis de correlación no encontró asociación positiva significativa entre los valores de incidencia de hongos y las características del crecimiento y/o fenológicas registradas en campo, aunque se observó una relación negativa no significativa ($P=0.05$) entre ciclo biológico (días a floración masculina y femenina) con la incidencia de hongos potencialmente toxigénicos de los tres géneros (datos no incluidos).

Cuadro 3. Cuadrados medios del análisis de variación de los porcentajes de infección por hongos toxigénicos en semillas de 25 híbridos de maíz cultivados en Río Bravo, Tamaulipas, durante 2005

Género	Híbridos (24 g.l.)	Error (72 g.l.)	Coefficiente de variación (%)
<i>Aspergillus</i>	42.4 NS	47.9	102.7
<i>Fusarium</i>	350.4 **	124.9	18.7
<i>Penicillium</i>	307.1 **	80.8	58.7
Total	59.7 **	16.9	15.1

Cuadro 4. Porcentajes de infección por hongos toxigénicos en grano de 25 híbridos de maíz cultivados en Río Bravo durante 2005

<i>Híbrido</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Total</i>
DK-697	2.5	86.2	1.2	89.9
DK-1060	5.0	53.7	27.5	86.2
Garst 8222 1T	1.2	80.0	28.7	100
Garst 8285	1.2	83.7	22.5	100
Garst 8288	7.5	81.2	5.0	93.7
Asgrow 7573Y	2.5	52.5	8.7	63.7
N 83-N5	2.5	85.0	0	85.0
Golden Acres 8112	2.5	73.7	2.5	78.7
Golden Acres 8311	5.0	80.0	10.0	95.0
Golden Acres 8460	3.7	86.2	2.5	92.4
P-31R88	1.2	80.0	21.2	100
P-31G98	2.5	80.0	2.5	85.0
E-179	3.7	76.2	7.5	87.4
E-182	2.5	78.7	22.5	100
DJ 2060	7.5	46.2	12.5	66.2
Tigre	1.2	50.0	2.5	53.7
Puma	2.5	56.2	5.0	63.7
H-439	3.7	62.5	3.7	69.9
H-437	3.7	48.7	16.2	68.6
Asgrow 7573W	0	58.7	6.2	64.9
DK 2010	0	78.7	7.5	86.2
H-436	2.5	50.0	12.5	65.0
Pioneer 3025	1.2	71.2	15.0	87.4
UAP-1790	3.7	87.5	1.2	92.4
UAP-1851	0	90.0	5.0	95.0
DMSH (P = 0.05)	2.9	7.4	4.8	2.2

Discusión

En este trabajo se observó mayor incidencia de hongos toxigénicos en maíz blanco almacenado, mientras que en campo se observó un comportamiento inverso. En almacén, la incidencia de *Aspergilli* fue mayor, mientras que en el campo la misma fue significativamente baja. A pesar de esto, el manejo durante la cosecha, transporte y almacenaje generalmente redundan en el incremento de las infecciones en el grano. Una cosecha inoportuna y utilizando cosechadoras mal calibradas que generan daño mecánico al grano, así como una deficiente desecación del mismo antes del almacenamiento, promueven el incremento de *Aspergilli* y de *Penicillium* en el grano de maíz (Munkvold, 2003). Posterior a lo antes expuesto, el manejo inadecuado de las temperaturas en el almacén también es un factor promotor de infecciones por hongos micotoxigénicos. Munkvold (2003) indicó que las temperaturas óptimas para almacenar granos no deben exceder preferentemente los 20 °C. En los almacenes donde se tomaron muestras de grano de maíz para este trabajo y de acuerdo con lo reportado por los encargados de los mismos, las temperaturas medias oscilan entre los 24 y los 28 °C diariamente, de modo que son más calientes y favorables para el desarrollo de hongos potencialmente micotoxigénicos. A pesar de que las altas incidencias de hongos micotoxigénicos no necesariamente indican de manera directa una alta producción de micotoxinas, es notable el hecho de que el efecto potencial de estas últimas es acumulativo en los sistemas biológicos expuestos o consumidores del grano contaminado. Por ello, las instituciones involucradas en la sanidad de los alimentos deben implementar y/o mantener las medidas necesarias para promover y mantener la inocuidad del grano de maíz producido en el norte de Tamaulipas. Tal como Martínez-Flores y García-Aguirre (2003), Robinson-Fuentes y otros autores (2005) lo indicaron, y nuestros resultados lo confirman, es importante mantener el muestreo constante para la cuantificación de la incidencia de hongos micotoxigénicos y sus micotoxinas en los almacenes e inclusive en el mismo campo de cultivo y en el grano recién cosechado, de modo que paulatinamente se reduzca el riesgo sanitario que representa el consumo de maíz contaminado, principalmente en el caso de estratos poblacionales económicamente menos favorecidos donde el consumo de maíz es de importancia básica.

Mientras que en grano almacenado el género predominante fue *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger* y *A. parasiticus*), en maíz cultivado en campo en Río Bravo, Tamaulipas, la incidencia de *Fusarium* fue significativamente mayor. La incidencia de *Fusarium* observada en campo en este trabajo (76%) fue mayor al reportado por Kedera y otros

(1999) en maíz cultivado en Kenia (47%); Bucio-Villalobos y otros (2001) en Guanajuato, México (35%) y Bucio-Villalobos y otros (2005) (31%) también en diversas localidades de Guanajuato, México, aunque menores a las incidencias reportadas en maíz cultivado en Nepal (Desjardins *et al.*, 2000), donde se reportaron incidencias mayores a 95 por ciento. De manera similar, los porcentajes de infección por *Aspergilli* potencialmente toxigénicos en grano almacenado son similares a los reportados por Martínez-Flores y García-Aguirre (2003) en un estudio realizado también en el norte de Tamaulipas, donde particularmente destacó dicho género por sus altas incidencias de hongos toxigénicos y la presencia de aflatoxinas en el maíz amarillo importado principalmente de Estados Unidos. En tres localidades de Brasil se observaron incidencias parecidas a las aquí consignadas en cuanto a hongos micotoxigénicos en tres híbridos de maíz: 77% de *Fusarium*; 15% de *Aspergillus* y 47% de *Penicillium* (Almeida *et al.*, 2000). La relación inversa encontrada entre las incidencias de *Aspergilli* y *Fusarium* en grano de campo y grano almacenado observa estrecha relación con las condiciones ambientales favorables para el desarrollo de ambos géneros en este estudio. Shelby y otros (1994) sugirieron que el clima seco justo antes del inicio del periodo de polinización es un factor importante para promover la mayor incidencia de *Fusarium* y la consiguiente producción de sus toxinas. Por su parte, Widstrom (1990) y Shephard (1996) indicaron que la mayor incidencia de *Fusarium* y la producción de toxinas se relacionan con climas secos y calientes. En campo, el periodo de floración del germoplasma del maíz evaluado en Río Bravo coincidió con un periodo de alrededor de 15 a 20 días con prácticamente nula precipitación pluvial, humedad relativa mayor al 60 % y temperaturas medias máximas superiores a 28 °C (figura 1). Aunque estas condiciones climáticas también son apropiadas para la infección exitosa del grano de maíz en campo por *Aspergilli* (Payne, 1987; Sauer, 1987; Bucio-Villalobos *et al.*, 2001), posiblemente la infección del género fue menor debido a las menores incidencias de propágulos vegetativos en el ambiente de la localidad de prueba en comparación con las mostradas por *Fusarium* (Bucio-Villalobos *et al.*, 2001).

En campo se detectaron algunos híbridos con grano blanco que presentaron reducidas incidencias de hongos micotoxigénicos (Tigre, H-437, H-436 y Asgrow 7 573) e incluso se observaron algunos híbridos que no mostraron infección por *Aspergilli* (UAP-1 851, DK-2 010 y Asgrow 7 573) (cuadro 4). Bucio-Villalobos y otros (2001) y Munkvold (2003) señalaron que los altos niveles de resistencia a hongos toxigénicos son difíciles de alcanzar debido principalmente a la inconsistencia de los resultados por efectos ambientales; técnicas de inoculación artificial deficientes;

ausencia de genes mayores y el alto costo de las evaluaciones en campo, especialmente de los niveles de micotoxinas en el grano. A la fecha se han detectado algunas fuentes de resistencia a *A. flavus* tales como Tex6, GT-MAS:GK, Oh516, LB31 y MI82 (Campbell y White, 1995; Hamblin y White, 2000; Walker y White, 2001). Sin embargo, se ha tenido poco éxito en la utilización y aprovechamiento de dichas fuentes de resistencia debido a problemas de adaptación y dificultades para incorporar la resistencia poligénica a germoplasma elite (Munkvold, 2003). También, en el caso de la infección por *Fusarium* se han identificado fuentes de resistencia en maíz y se ha determinado la naturaleza poligénica de dicha resistencia, aunque ésta última ha sido difícil de incorporarse en híbridos elite de maíz (King y Scott, 1981; Holley *et al.*, 1989; Headrick y Pataky, 1991). Los esfuerzos actuales en *Fusarium* se concentran en el mapeo de *loci* de caracteres cuantitativos (QTL) y la selección asistida por marcadores moleculares, aunque la varianza fenotípica explicada no sea mayor al 45 % (Pérez-Brito *et al.*, 2001). Entonces, el uso y aprovechamiento de los híbridos destacados en este trabajo requerirá de evaluaciones tanto en condiciones de campo como controladas para ratificar su posible resistencia a la infección por hongos toxigénicos. Posteriormente, otros estudios serán necesarios para el mejor aprovechamiento de la resistencia. Por ejemplo, se ha observado asociación entre la resistencia a hongos toxigénicos y al estrés ambiental por sequía (Munkvold, 2003); los híbridos resistentes muestran pericarpio de la semilla más grueso que los susceptibles, dicho pericarpio funciona como barrera a la infección (Hoenisch y Davis, 1994). Los híbridos con espigas de la mazorca más cerradas tienden a ser tolerantes a la infección por *Fusarium* en California, Estados Unidos (Warfield y Davis, 1998). Inclusive, los híbridos que no mantienen erguidas las mazorcas al alcanzar la madurez fisiológica muestran menores incidencias por *Fusarium* (Munkvold, 2003). Sin embargo, en ausencia de resistencia genética o marcadores genéticos de la misma, mucha de la selección para la obtención de bajos niveles de infección por hongos y sus toxinas es el resultado de la selección de características de mazorca y grano que reducen indirecta o físicamente la invasión de los hongos, más que a través de una reacción de resistencia específica a los patógenos. Todo lo anterior llevó a Duvick (2001) a plantear la producción de organismos genéticamente modificados (OGM) con resistencia a los hongos toxigénicos y/o a sus toxinas, ya sea reduciendo la infección del patógeno; insertando genes capaces de degradar las toxinas o bien, reduciendo la acumulación de toxinas al interrumpir su ruta de biosíntesis. Estrategias de mejoramiento genético del maíz que integren una o varias de las características antes descritas, seguramente tendrán éxito en la obtención de germoplasma con resistencia aceptable y consistente a hongos micotoxigénicos.

Conclusiones

1) Los hongos potencialmente toxigénicos detectados en maíz blanco o amarillo del género *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger* y *A. parasiticus*) muestran las mayores incidencias (superiores al 40%) en grano almacenado en el norte de Tamaulipas, mientras que en campo, las mayores incidencias las muestra *Fusarium* (mayores a 60 por ciento).

2) Los híbridos de maíz amarillo DK-697, DK-1060, Garst 8222, Garst 8 285, Garst 8 288 y Golden Acres 8 112, 8 311 y 8 460 mostraron las mayores incidencias combinadas de hongos toxigénicos; mientras que los maíces blancos Tigre, H-437, H-436 y Asgrow 7 573 presentaron las menores incidencias. Los híbridos de grano blanco UAP-1851, DK-2010 y Asgrow 7 573 no presentaron incidencia de *Aspergilli*. Dicho germoplasma deberá evaluarse para ratificar su posible tolerancia a la infección de hongos en la mazorca.

Agradecimientos

El presente trabajo de investigación fue financiado por el Instituto Politécnico Nacional (proyecto CGPI 20050254), por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y por la Fundación Produce Tamaulipas A. C. (proyecto 2055932A). Miguel Ángel Reyes-López y César A. Reyes-Méndez son miembros del SNI. Netzahualcóyotl Mayek-Pérez es miembro del SNI y es becario COFAA y EDI, ambos del IPN.

Bibliografía

- Albright, D. M. (2001), *Human Health Effects of Airborne Mycotoxin Exposure in Fungi-Contaminated Indoor Environments*, Estados Unidos, Professional Biosafety-American Society of Safety Engineers, noviembre: 26-28.
- Almeida, A. P.; B. Correa; M. A. B. Mallozzi; E. Sawazaki; L. M. Valente-Soares (2000), "Mycoflora and Aflatoxin/Fumonisin Production by Fungal Isolates from Freshly Harvested Corn Hybrids", *Braz. J. Microbiol.* 31: 321-326.
- Booth, C. (1971), *The genus Fusarium*, Kew Surrey, Reino Unido, Commonwealth Mycology Institute: 237 p.

- Bucio-Villalobos, C. M.; D. Guzmán-De Peña; J. J. Peña-Cabriales (2001), “Aflatoxin Síntesis in Corn Fields in Guanajuato, Mexico”, *Rev. Iberoam. Micol.* 18: 83-87.
- ; O. A. Martínez-Jaime; R. H. Morales-González (2005), “Contaminación con hongos en maíz recién cosechado en el estado de Guanajuato durante el año 2003”, *Memorias del VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y II Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Guanajuato, México*: 425-431.
- Campbell, K. W.; D. G. White (1995), “Inheritance of Resistance to *Aspergillus* Carrot and Aflatoxin in Corn Genotypes”, *Phytopathology* 85: 886-896.
- Chelkowski, J. (1989), *Fusarium: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*, Amsterdam, Elsevier.
- Desjardins, A. E.; G. Manandhar; R. D. Plattner; C. M. Maragos; K. Shresta; S. P. McCormick (2000), “Ocurrence of *Fusarium* Species and Mycotoxins in Nepalese maize and Wheat and the Effect of Traditional Processing Methods on Mycotoxin Levels”, *J. Agric. Food Chem.* 48: 1377-1483.
- Diario Oficial de la Federación* (2002), “Productos y servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. Norma Oficial Mexicana (NOM-188-SSA1-2002)”, México.
- Duvick, J. (2001), “Prospects for Reducing Fumonisin Contamination of Maize through Genetic Modification”, *Environ. Health Perspect.* 109: 337-342.
- Fandohan, P.; K. Hell; W. F. O. Marasas; M. J. Wingfield (2003), “Infection of Maize by *Fusarium* Species and Contamination with Fumonisin in Africa”, *Afr. J. Biotechnol.* 2: 570-579.
- Hamblin, A. M.; D. G. White (2000), “Inheritance for Resistance to Field Aflatoxin Accumulation in Maize Grain”, *Plant Breed.* 109: 292-303.
- Headrick, J. M., J. K. Pataky (1991), “Maternal Influence on the Resistance of Sweet Corn Lines to Kernel Infection by *Fusarium Moniliforme*”, *Phytopathology* 81: 268-274.
- Hoenisch, R. W.; R. M. Davis (1994), “Relationship Between Kernel Pericarp Thickness and Susceptibility to *Fusarium* Ear Rot in Field Corn”, *Plant Dis.* 78: 517-519.
- Holley, R. N.; P. B. Hamilton; M. M. Goodman (1989), “Evaluation of Tropical Maize Germ Plasm for Resistance to Kernel Colonization by *Fusarium Moniliforme*”. *Plant Dis.* 73: 578-580.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) (2005), *Indicadores del sector alimentario*, <http://www.inegi.gob.mx/economia>, consulta efectuada el 20 de marzo de 2006.

- Kedera, C. J.; R. D. Plattner; A. E. Desjardins (1999), "Incidence of *Fusarium spp.* and Levels of Fumonisin B₁ in Maize in Western Kenya", *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 41-44.
- Kilch, M. A.; J. I. Pitt (1988), *Aspergillus: A Laboratory Guide to Common Aspergillus Species and their Teleomorphs*, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO), Canberra, Australia.
- King, S. B.; G. E. Scott (1981), "Genotypic Differences in Maize to Kernel Infection by *Fusarium Moniliforme*", *Phytopathology* 71: 1245-1247.
- Martínez-Flores, R.; G. García-Aguirre (2002), "Inspección de aflatoxinas en maíz cultivado, almacenado y transportado en el estado de Tamaulipas, México, en 1998", *Anales del Instituto de Biología, Serie Botánica* 74: 313-321.
- Martínez-Garza, A. (1988), *Diseños experimentales. Métodos y elementos de teoría*, México, Trillas.
- Munkvold, G. P. (2003), "Cultura and Genetic Approaches to Managing Mycotoxins in Maize", *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 99-116.
- Nelson, P. E.; T. A. Toussoun; W. F. O. Marasas (1983), *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification*, E.U., Pennsylvania State University Press, University Park.
- _____; M. C. Dignani; E. J. Anaissie (1994), "Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of *Fusarium Species*", *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 479-504.
- Payne, G. A. (1987), "*Aspergillus Flavus* Infection of Maize: Silos and Kernels", en M. S. Zuber; E. B. Lillehoj; B. L. Renfro (eds.) (s.f.), *Aflatoxin in Maize: Proceedings of the Workshop*, México, CIMMYT:119-129.
- Peraica, M.; A. M. Dominan (2001), "Contamination of Food with Mycotoxins and Human Health", *Arth. Hig. Rada Toksikol.* 52: 23-35.
- Pérez-Brito, D.; D. Jeffers; D. González-de-León; M. Khairallah; M. Cortés-Cruz; G. Velázquez-Cardelas; S. Azpíroz-Rivero; G. Srinivasan (2001), "Cartografía de QTL de la resistencia a la pudrición de la mazorca (*Fusarium moniliforme*) en maíz de Valles Altos, México", *Agrociencia* 35: 181-196.
- Piff, J. I. (1979), *The genus Penicillium and its teleomorphic sttes: Eupenicillium and Talaromyces*, Nueva York, Academic Press.
- Raper, K. B.; D. I. Fennell (1965), *The genus Aspergillus*, Baltimore, Williams & Wilkins.
- Robinson-Fuentes, V. A.; L. García-Aguilar; L. J. González-Huape (2003), "Niveles de micotoxinas en maíz disponible en el estado de Michoacán", *Ciencia Nico-laíta* 40: 67-76.

- Rodríguez-Del Bosque, L. A. (1996), "Impact of Agronomic Factors on Aflatoxin Contamination in Preharvest Field Corn in Northeastern Mexico", *Plant Dis.* 80: 988-993.
- ; C. A. Reyes-Méndez; S. Acosta-Núñez; J. R. Girón-Calderón; I. Garza-Cano; R. Villanueva-García (1995), "Control de aflatoxinas en maíz en Tamaulipas", *Folleto Técnico* 17, México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias.
- Sauer, D. B. (1987), "Conditions that Affect Growth of *Aspergillus Flavus* and Production of Aflatoxin in Stored Maize", en M. S. Zuber; E. B. Lillehoj; B. L. Renfro (eds.), *Aflatoxin in Maize: Proceedings of the Workshop*, México, CIMMYT: 41-50.
- Shelby, R. A.; D. G. White; E. M. Bauske (1994), "Differential Fumonisin Production in Maize Hybrids", *Plant. Dis.* 78: 582-584.
- Shephard, G. S.; P. G. Thiel; S. Stockenstrom; E. Sydenham (1996), "Worldwide Survey of Fumonisin Contamination of Corn and Corn Based Products", *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 79: 671-686.
- Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2006), *Información agrícola anual y por estados*, México, Sagarpa, <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>, consulta efectuada el 24 de marzo de 2006.
- Walker, R. D.; D. G. White (2001), "Inheritance of Resistance to *Aspergillus* Ear Rot and Aflatoxin Production of Corn from CI2", *Plant Dis.* 85: 322-327.
- Widstrom, N. W.; W. W. McMillan; R. W. Beaver; D. M. Wilson (1990), "Weather Associated Changes in Aflatoxin Contamination of Preharvest Maize", *J. Prod. Agric.* 3: 196-199.

Evaluación de la neutralización de hidrolizados de paja de sorgo con carbonato de calcio e hidróxido de amonio para la producción de xilitol
Evaluation of the Neutralization of Hydrolysates of Sorghum Straw with Calcium Carbonate and Ammonium Hydroxide for the Xylitol Production

Sepúlveda-Huerta, E.¹; Ramírez de León, J. A.¹; Oliva Álvarez, M. A.; Herrera Guajardo, A.¹; González Cabriales, J. J.¹; Téllez Luis, S. J.^{1}; Vázquez Vázquez, M.¹*

Resumen

En los últimos años se han realizado muchos estudios sobre el aprovechamiento de materiales alternativos como materia prima para la síntesis de productos biotecnológicos. En el área de los recursos naturales destacan los materiales lignocelulósicos de origen vegetal. Entre los procesos alternativos para su aprovechamiento podemos citar la obtención de disoluciones de azúcares y su posterior transformación biotecnológica a una gran variedad de productos de alto valor añadido, tales como xilitol, ácido láctico, astaxantina, etc. El objetivo de este trabajo fue estudiar las condiciones de neutralización de los licores de paja de sorgo con carbonato de calcio e hidróxido de amonio con el propósito de aumentar el rendimiento del proceso. Al concentrar los hidrolizados de paja de sorgo aumenta la concentración de azúcares y del ácido presente, por lo que es necesario llevar a cabo una etapa de neutralización. Se tomó una alícuota de 25 mL de hidrolizado concentrado, el pH inicial del hidrolizado fue de 0.28. Se adicionó carbo-

¹ Departamento de Ciencia y Tecnología, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa Aztlán, Universidad Autónoma de Tamaulipas, calle 16 y Lago de Chapala, s/n. Col. Aztlán. Reynosa, Tam., México, 88740.

*e-mail: tellezl@uat.edu.mx

nato de calcio (de 0 a 10 g) y se agitó para llevarse a cabo la reacción y formar sulfato cálcico para después eliminarlo por medio de una bomba de vacío. En esta neutralización se midió el pH y después se tomó otra alícuota de 5 mL del hidrolizado tratado con carbonato de calcio y se llevó a un pH de 5, 6 o 7 con hidróxido de amonio 5 M. Al agregar el carbonato de calcio se observó un aumento del pH ($0.28 \pm 0.16 - 6.08 \pm 0.19$) y con la adición progresiva de CaCO_3 se mostró una disminución del volumen de hidrolizado ($25.0 \pm 0.0 - 5.75 \pm 1.50$ mL). Para ajustar el pH a 6 fueron necesarios 11.95 ± 0.37 mL de hidróxido de amonio, mientras que para el pH 7 se adicionaron 12.18 ± 0.32 mL. Los resultados obtenidos sugieren que es factible neutralizar el hidrolizado con carbonato de calcio e hidróxido de amonio para eliminar el ácido y utilizar el hidrolizado como medio de fermentación para la producción de aditivos.

Abstract

In the last years many studies has been carried out about the use of new materials as raw material for the synthesis of biotechnological products. In the area of environmental resources the lignocellulosic materials are the main studied. Among the alternative processes, the production of sugar solutions and their further biotransformation in great variety of products such as xylitol, lactic acid, or astaxanthin can be cited. The objective of this work was the study of the neutralization conditions of the hydrolysates of sorghum straw with calcium carbonate and ammonium hydroxide to increase the yield of this stage. A sample of 25 mL of concentrated hydrolysate was obtained; the initial pH of hydrolysate was 0.28. Calcium carbonate was added (from 0 to 10 g) with agitation to react and form calcium sulphate and then remove it by vacuum. During the neutralization the pH was measured, then a sample of 5 mL of the hydrolysate treated with calcium carbonate was obtained and adjusted to pH 5, 6 or 7 with ammonium hydroxide 5 M. When the calcium carbonate was added, an increase in pH was observed ($0.28 \pm 0.16 - 6.08 \pm 0.19$). The progressive addition of CaCO_3 gave a decrease in the volume of the hydrolysate obtained ($25.0 \pm 0.0 - 5.75 \pm 1.50$ mL). To adjust the pH to 6, 11.95 ± 0.37 mL of ammonium hydroxide was needed while to adjust to pH 7, 12.18 ± 0.32 mL were added. The results obtained suggested that it is feasible to neutralize the hydrolyzates with calcium carbonate and ammonium hydroxide to neutralize the acid of the hydrolysis and use the hydrolyzates as fermentative media for food additive production.

Introducción

En los últimos años se han llevado a cabo estudios para la búsqueda y el aprovechamiento de materiales alternativos, como materia prima en la síntesis de productos. Entre estas materia primas destacan el carbón y los recursos

naturales. En el campo de los recursos naturales, destacan los materiales lignocelulósicos, de origen vegetal.

Sobre la base de procedencia de los mismos se puede distinguir entre:

- *Materiales de origen forestal*. El grupo más importante, que constituye un 70% de la masa total de los materiales lignocelulósicos.
- *Materiales de origen agrícola*. Como los residuos de cosechas, paja, resto de podas, etc.
- *Materiales de origen urbano*. Entre los que cabe destacar residuos como papel de prensa o embalajes de cartón, así como hojas o el césped cortado de parques y jardines.
- *Materiales de origen industrial*. Principalmente residuos de procesos relacionados con la industria maderera (astillas, corteza, etc.) o los generados por las industrias alimentarias.

Entre las ventajas que presentan los materiales lignocelulósicos como materias primas para transformación industrial se han citado: enorme abundancia, amplia distribución geográfica, carácter renovable, fácil accesibilidad, en muchos casos, independientes de factores estacionales, Su bajo coste por unidad de masa.

A estos factores habría que añadir que los procesos que utilizan residuos como materia prima presentan beneficios en una doble vertiente: además de la comercialización de los productos finales, se obtiene la ganancia ecológica derivada de la desaparición del propio residuo que se ha procesado.

El interés de la utilización de estos materiales se basa en el deseo de aprovechar de forma racional las fuentes de materias primas naturales y renovables para obtener una amplia gama de productos adaptados a las exigencias del mercado. Un uso eficiente de los constituyentes de estos materiales es la limitación del impacto ambiental y la economía del proceso, factores clave en la búsqueda de métodos alternativos.

Actualmente, la única aplicación industrial de los materiales lignocelulósicos es la fabricación de pasta de papel. Entre los procesos alternativos para su aprovechamiento destacan los basados en la obtención de disoluciones de azúcares y su posterior transformación biotecnológica a una gran variedad de productos de alto valor añadido, que van desde moléculas sencillas (como xilitol, ácido láctico, etanol, etc.) a otras complejas (aromas o colorantes alimentarios) (Bustos, 2001).

En México, en 1998, el sorgo (*Sorghum bicolor L. Moench*) ocupa el tercer lugar en superficie de siembra, después del maíz (*Zeamays L.*) y frijol (*Phaseolus vulgaris L.*), y segundo lugar en cuanto a la producción en grano. Actualmente el área de

siembra del cultivo es de 1 252 millones de hectáreas con una producción anual de 4 023 millones de toneladas. Tamaulipas, Guanajuato, Jalisco, Michoacán y Sinaloa son los estados productores de grano de sorgo más sobresalientes del país (Kondo y cols., 1998). El cultivo del sorgo es uno de los más importantes en México, ocupa el tercer lugar después del maíz y el frijol. En 1999 se sembraron cerca de los dos millones de hectáreas. Los estados con mayor superficie de siembra son Tamaulipas, con más de un millón de hectáreas; Sinaloa, con más de 200 mil hectáreas y el Bajío (Guanajuato, Michoacán y Jalisco), con cerca de 500 mil hectáreas (Zavala y cols., 2002). Desde el año 2003, México ocupa el primer lugar mundial en producción de sorgo con 11 millones de toneladas al año. Asimismo, México ha alcanzado el récord mundial en rendimiento de sorgo hasta 17 toneladas por hectárea (Usabiaga, 2004).

Cuando se desea utilizar residuos agroindustriales para la producción biotecnológica de diferentes aditivos alimentarios, es necesario llevar a cabo una serie de etapas de fraccionamiento que varían en función del producto de interés. La mayoría de los residuos agroindustriales presentan una naturaleza lignocelulósica, cuyo fraccionamiento está condicionado por el hecho de que la celulosa, las hemicelulosas y la lignina son de naturaleza polimérica con un alto grado de entrecruzamiento, existiendo entre ellas uniones físicas y químicas; de tal modo que los procedimientos clásicos de fraccionamiento (cristalización, precipitación, extracción) no son satisfactorios para su separación individual, ya que el aislamiento de uno de los polímeros implica la degradación de la estructura de los otros (Patel y cols., 1992; Hofvendal y Hahn-Hägerdal, 1999).

La composición lignocelulósica de la paja de sorgo es en peso seco: celulosa 35.09 ± 0.76 %; hemicelulosa 23.96 ± 0.70 % (del cual xilano es el 19.16 ± 0.56 %); lignina de Klason 25.41 ± 0.60 %. (Téllez-Luis *et al.*, 2002a, b). La fracción de hemicelulosa se puede separar fácilmente por medio de una hidrólisis ácida donde se obtienen azúcares fermentables, principalmente xilosa, que se puede utilizar como medio de fermentación para producir xilitol (Canilha *et al.*, 2003).

Al utilizar un microorganismo u otro depende básicamente del producto que se quiera obtener, así como de las condiciones de operación que se pretendan emplear. En general, para la producción biotecnológica de ácido láctico se emplean bacterias por ser éstas más rápidas que los hongos, mientras que para la producción de xilitol se utilizan levaduras, ya que las bacterias por lo general no tienen la capacidad de fermentar los azúcares a xilitol. De acuerdo al origen, los compuestos inhibidores se dividen en tres grupos importantes: ácidos débiles, derivados del furano y compuestos fenólicos; estos compuestos limitan la utilización eficiente de los hidrolizados para la fermentación de etanol durante la fermentación. La fermentación

puede ser mejorada desarrollando métodos específicos de desintoxicación, elegir un microorganismo adaptado u optimizar la estrategia de fermentación (Palmqvist y cols., 1999).

El xilitol tiene muchas ventajas como aditivo, no participa en la reacción de Maillard por lo que no confiere color durante el almacenamiento, es poco metabolizado por lo que no contribuye a la obesidad y la incorporación de xilitol a las fórmulas aporta un sabor refrescante parecido al de mentol (Olinger y cols., 2001; Parajó y cols., 1998).

Materiales y métodos

Preparación de hidrolizado de paja de sorgo

La paja de sorgo fue molida, tamizada y seleccionada con un tamaño de partícula menor a 0.5 milímetros. Se determinó el contenido de humedad para la preparación de los hidrolizados con el fin de ajustar la cantidad de agua en que se adicionaron para la preparación de los hidrolizados. Se sometió a una hidrólisis ácida con ácido sulfúrico en una concentración de 2%, temperatura de autoclave de 122° C y tiempo de una hora. La relación sólido/líquido fue de 1/10. Después se filtró para obtener un líquido conteniendo principalmente xilosa, manosa, galactosa, glucosa, así como ácido acético y furfural (Téllez, 2001).

Neutralización con carbonato de calcio e hidróxido de amonio

Los hidrolizados de paja de sorgo se prepararon de acuerdo a las condiciones citadas en la literatura por Téllez (2001). Una vez obtenido el hidrolizado concentrado fue necesario neutralizarlo, para lo cual se tomó una alícuota de 25 ml de hidrolizado, se midió el pH inicial y se agregó a cada alícuota una cantidad de carbonato de calcio (de 0 a 10 g), se agitó y el sulfato de calcio formado durante la reacción fue eliminado por filtración al vacío. En esta neutralización previa se midió el pH y después se tomó otra alícuota de 5 ml para titularse con hidróxido de amonio 5M y elevar el pH hasta valores de 5, 6 o 7. Se registraron la cantidad de hidróxido de amonio utilizado, el volumen de hidrolizado, el pH, la concentración de azúcares finales.

Determinación de monosacáridos, ácidos orgánicos y etanol por HPLC

Se analizó la composición de los licores de paja de sorgo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Hewlett Packard serie 1100) con una columna de intercambio iónico para separación de polisacáridos y ácidos orgánicos (Transgenomic ICSEPICE-ION-300) y detector de índice de refracción. El eluyente utilizado fue ácido sulfúrico 0.005 N (0.145 mL/L) con un flujo de 0.4 mL/min; la temperatura de la columna fue de 45° C y el volumen de inyección fue de 10 µL. Los resultados se compararon contra un estándar de azúcares comerciales de concentración conocida (1 g/L).

Resultados

Al concentrarse los hidrolizados de paja de sorgo también se concentra la cantidad de azúcares y el ácido que se encuentra presente. Al mismo tiempo, al momento de neutralizar el licor con la sal de carbonato de calcio fue necesario utilizar mayor cantidad de sal para alcanzar un pH de 5-6. Al agregar más carbonato de calcio se observó una pérdida significativa de licor que queda embebido en el sulfato de calcio insoluble formado como producto de la reacción.

Tabla 1. Condiciones utilizadas para el ajuste de pH

<i>Condiciones</i>	<i>Valores</i>	<i>Unidades</i>
Hidrolizado	25	ml
Carbonato de calcio	1-10	g
Hidróxido de amonio	Lo necesario para ajustar el pH a 6 ó 7	ml
Ph inicial	0.28	
Ph Final	6 o 7	

Considerando lo anterior, se realizó un estudio donde se utilizó carbonato de calcio e hidróxido de amonio para disminuir la pérdida de licores. La tabla 1 muestra las condiciones utilizadas para el ajuste de pH.

En la tabla 2 se observa el comportamiento que se obtuvo al utilizar carbonato de calcio e hidróxido de amonio. El pH inicial del hidrolizado fue de 0.28. Conforme se adicionó el carbonato de calcio ocurrió un aumento del pH ($0.28 \pm 0.16 - 6.08 \pm 0.19$), observándose que un aumento en la concentración de CaCO_3 ocasionó una disminución en la cantidad de hidrolizado ($25.00 \pm 0.0 - 5.75 \pm 1.5$ ml). El pH final se ajustó con hidróxido de amonio y se registró el volumen utilizado, para el pH 6 ($11.95 \pm 0.37 - 0.08 \pm 0.03$ ml) de hidróxido de amonio y para pH 7 ($12.18 \pm 0.32 - 0.08 \pm 0.04$ ml) de hidróxido de amonio.

Tabla 2. Ajuste del pH del hidrolizado de paja de sorgo

<i>% de sal</i>	<i>CaCO₃ (g)</i>	<i>Promedio del vol. ml cuando se agregó el CaCO₃ (g)</i>	<i>Promedio del pH</i>	<i>pH 6</i>	<i>NH₄OH ml gastado pH 6</i>	<i>Ph7</i>	<i>NH₄OH ml gastado pH 7</i>
0	0	25.00 ± 0.00	0.28 ± 0.16	6.15 ± 0.17	11.95 ± 0.37	7.41 ± 0.36	12.18 ± 0.32
4	1	17.50 ± 0.58	0.44 ± 0.22	6.11 ± 0.10	9.38 ± 0.64	7.22 ± 0.24	9.50 ± 0.61
8	2	15.75 ± 2.36	0.35 ± 0.04	6.47 ± 0.32	7.38 ± 1.23	7.14 ± 0.01	7.53 ± 1.25
12	3	16.00 ± 5.35	0.36 ± 0.03	6.18 ± 0.29	6.48 ± 0.71	7.19 ± 0.09	6.63 ± 0.69
16	4	12.50 ± 4.20	0.78 ± 0.21	6.18 ± 0.14	2.88 ± 0.79	7.15 ± 0.15	3.03 ± 0.84
20	5	8.75 ± 1.26	1.38 ± 0.06	6.31 ± 0.42	1.65 ± 0.19	7.22 ± 0.25	1.80 ± 0.18
24	6	7.33 ± 0.58	5.01 ± 0.24	6.30 ± 0.26	0.15 ± 0.07	7.19 ± 0.21	1.53 ± 2.05
28	7	8.18 ± 1.73	5.77 ± 0.06	6.53 ± 0.33	0.08 ± 0.03	7.13 ± 0.06	0.10 ± 0.00
32	8	5.75 ± 1.50	6.08 ± 0.19	6.08 ± 0.19		7.17 ± 0.01	0.08 ± 0.04

Discusión

En el proceso de la hidrólisis de la paja de sorgo se utilizan ácidos diluidos para romper los enlaces entre los azúcares en la hemicelulosa. De los azúcares presentes destaca el alto contenido de xilosa y durante la hidrólisis se liberan sustancias que inhiben el crecimiento de algunos microorganismos. Una variable importante que determina el crecimiento del microorganismo en los medios de hidrolizados y que puede tener un efecto positivo o negativo es el pH.

El pH ácido de los hidrolizados de la paja de sorgo proviene de la hidrólisis con ácido sulfúrico. El hidrolizado es concentrado para eliminar agua y obtener una mayor cantidad de azúcares; como consecuencia, también se concentra el ácido sulfúrico de tal forma que se necesita una cantidad mayor de carbonato de calcio para ajustar el pH a 6-7, necesario para el crecimiento de los microorganismos.

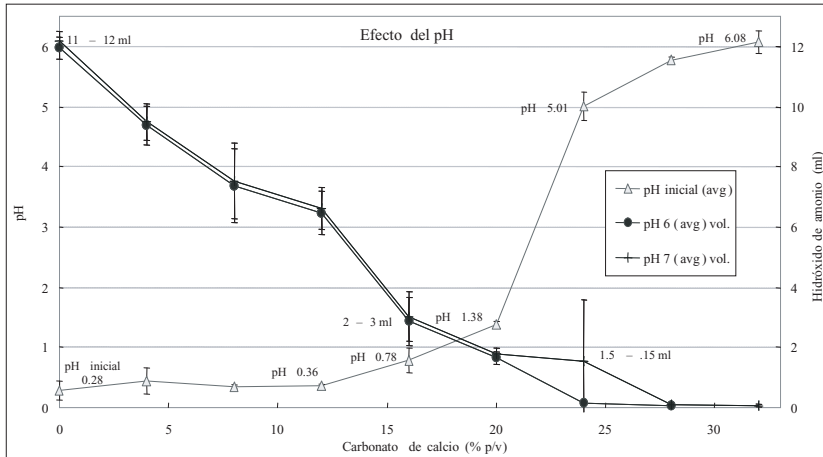
El carbonato de calcio se utilizó para eliminar una parte del ácido sulfúrico, en forma de sulfato de calcio, y posteriormente se ajustó el pH con hidróxido de amonio para obtener sulfato de amonio, el cual es una fuente de nitrógeno que puede ser aprovechada por los microorganismos.

En la figura 1 se muestra el efecto del carbonato de calcio y el hidróxido de amonio durante el ajuste del pH en hidrolizado de paja de sorgo. Puede observarse que conforme se incrementa la cantidad agregada de carbonato de calcio el pH se mantiene relativamente constante a un valor de 0.36, aumenta ligeramente a 1.38; y con un incremento menor en la cantidad de carbonato de calcio, el pH se incrementa rápidamente hasta un valor de 5.01 y continúa hasta un pH de 6.08. Este comportamiento es similar al que tienen los aminoácidos para llegar a su punto isoeléctrico.

La figura 1 sugiere que es necesario agregar 11-12 ml de hidróxido de amonio para alcanzar un pH 6 o 7 en 5 ml de hidrolizado de paja de sorgo concentrado, pero cuando se utiliza una combinación de carbonato de calcio e hidróxido de amonio, se necesita de un 15 a 20% de carbonato de calcio para alcanzar un pH de 1.38, donde se obtiene un volumen de hidrolizado de $12.50 \pm 4.20 - 8.75 \pm 1.26$ ml y después se ajusta el pH con 2-2.5 ml de hidróxido de amonio 5 molar para ajustar 5 ml de hidrolizado a un pH de 6 o 7. Esta combinación es adecuada en el sentido de que no se necesita una cantidad elevada de carbonato de calcio o de hidróxido de amonio con lo que se minimiza la concentración de sal de sulfato de calcio y se evita la dilución del hidrolizado. Esta combinación de materiales permite que el proceso sea rentable, sin embargo, la neutralización con la mezcla de carbonato de calcio e hidróxido de amonio no es técnicamente factible.

En la técnica de neutralización utilizada por Barrera (2002) fueron necesarios 60 g/L de carbonato de calcio para neutralizar el hidrolizado de paja de sorgo, lo cual fue suficiente para alcanzar un pH de 6.5 a 7 produciendo un hidrolizado con concentraciones normales (Barrera, 2002). Ambas técnicas utilizadas fueron adecuadas, pero la neutralización utilizando únicamente carbonato de calcio es un proceso factible y rentable.

Figura 1. Efecto del carbonato de calcio e hidróxido de amonio para ajustar el pH en hidrolizado de paja de sorgo



Conclusiones

No es rentable ajustar el pH con carbonato de calcio, ya que es necesario agregar cantidades mayores a 15% para ajustar el pH a 7 y únicamente se obtiene un volumen de 12 ml de hidrolizado de paja de sorgo.

Con una concentración de 60 g/L de xilosa en el hidrolizado durante la neutralización con carbonato de calcio se registró hasta un 68% de pérdida de hidrolizado después del proceso de clarificación, neutralización y filtración.

Bibliografía

- Barrera G., A. M. (2002), *Estudio de la producción de xilitol por Debaryomyces hansenii a partir de hidrolizados de paja de sorgo*, Tesis de Maestría, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán, Universidad Autónoma de Tamaulipas. Reynosa, Tamaulipas.
- Bustos V., Ma. G. (2001), *Optimización del proceso de hidrólisis químico del bagazo de la caña de azúcar empleando ácido clorhídrico*, Tesis de Maestría, Unidad

- Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán, Universidad Autónoma de Tamaulipas. Reynosa, Tamaulipas.
- Canilha, L.; J. Batista de Almeida; J. B. Silva; A. I. Nápoles Solenzal (2003), *Eucalyptus hydrolysate detoxification with activated charcoal adsorption or ion-exchange resins for xylitol production*, La Habana, Cuba, ICIDCA.
- Hofvendahl, K.; B. Hahn-Hagerdal (1999b), “Factors Affecting the Fermentative Lactic Acid Production from Renewable Resources”, *Enzyme Microbiol. Technol.* 26: 87-107.
- Kondo L., J.; M. J. García L.; S. R. Avendaño (1998), *El Ergot del sorgo: Su presencia en México y medidas preventivas para su control*, INIFAP/CIRNE A-083.
- Olinger, P. M.; T. Pepper (2001), *Xylitol, Alternative Sweeteners*, tercera edición revisada y extendida.
- Parajó, J. C.; H. Dominguez y J. M. Domínguez (1998), *Biotechnological production of xylitol. Part I: interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis*. Department of chemical Engineering, University of Vigo (Campus Orense).
- Patel, M. M.; R. M. Bhatt (1992), “Optimisation of the Alkaline Peroxide Pretreatment for the Delignification of Wheat Straw and its Applications”, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 53: 253-263.
- Palmqvist, E.; Hahn B-Hägerdal (1999), *Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition*.
- Usabiaga, A. J. (2004), Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (Sagarpa), núm. 124/04.
- Téllez Luis, S. J. (2001), *Estudio de la hidrólisis de paja de sorgo con ácido sulfúrico*, Tesis de Maestría, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán. Universidad Autonoma de Tamaulipas. Ciudad Reynosa, Tamaulipas.
- _____; J. A. Ramírez; M. Vázquez (2002a), “Mathematical Modelling of Hemicellulosic Sugar Production from Sorghum Straw”, *Journal of Food Engineering* 52, 285-291.
- _____; J. A. Ramírez; M. Vázquez (2002b), “Modelling of the Hydrolysis of Sorghum Straw at Atmospheric Pressure”, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 505-512.
- Zavala F. G.; P. E. Ortiz; T. N. E. García (2002), “Mejoramiento genético en sorgo para resistencia a ergot”, *Ciencia*, UANL, vol. v, núm. 3, julio-septiembre.

Cuantificación de glucosamina en quitina de residuos de camarón por HPLC

Quantification of Glucosamine from Shrimp Waste by HPLC

Sánchez-Machado, D. I.¹; López-Cervantes, J.^{1};
Gutierrez-Coronado, M. A.¹; Delgado-Rosas, K. E.¹*

Resumen

El presente trabajo describe un método HPLC para el análisis de glucosamina en quitina obtenida a partir de la fermentación de residuos de camarón. La quitina fue hidrolizada con ácido clorhídrico y la glucosamina obtenida fue derivatizada con 9-fluorenil metil cloroformato (FMOC). La separación se llevó a cabo en una columna Hypersil ODS C18 250 mm x 4.6 mm, 5 µm, a 38 °C y con detección ultravioleta a 264 nm. La fase móvil fue un gradiente de tres soluciones: fase A (30mM fosfato de amonio pH 6.5 en 15:85 metanol-agua), fase B (15:85 metanol-agua) y fase C (90:10 acetonitrilo-agua) a una velocidad de flujo de 1.20 ml/min. El método propuesto muestra una adecuada repetibilidad (RDS, 2.58%), límite de detección (2 µg/ml) y exactitud (89.05%). El método ha sido aplicado para la cuantificación de glucosamina en la determinación de la pureza de quitina de residuos de camarón.

Abstract

This work presents an HPLC method for the quantification of glucosamine in chitin. The method includes an acid hydrolysis of chitin. The chromatographic separation was achieved using a Hypersil ODS 5 µm column (250 x 4.6 mm) at 38°C, precolumn

¹ Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora, apartado postal 541, Cd. Obregón, Sonora, México.

* e-mail: jlópezc@itson.mx

derivatization with 9-fluorenylmethyl-chloroformate and ultraviolet detection ($\lambda = 264$ nm), the mobile phase was a mixture of phase A: 30 mM ammonium phosphate (pH 6.5) in 15:85 v/v methanol/water, phase B: 15:85 v/v methanol/water, and phase C: 90:10 v/v acetonitrile/water, with flow rate 1.2 ml/min. The HPLC method proposed showed adequate repeatability (RSD, 2.58%), accuracy (89.05% recovery) and sensitive detection limit (2 $\mu\text{g/ml}$). The method was successfully applied to the quantitation of glucosamine for the determination of the purity of chitin from shrimp waste.

Introducción

La quitina es un homopolímero que se encuentra en el exoesqueleto de insectos y crustáceos, y también en las paredes celulares de la mayor parte de los hongos y en muchas algas. La quitina es un polímero lineal similar a la celulosa, pero que consiste en residuos de *N*-acetilglucosamina con enlaces β -(1 \rightarrow 4). En la actualidad este biopolímero se obtiene industrialmente aislándolo de desperdicios generados en el procesamiento de crustáceos, tales como caparazones de camarón y jaiba (Pinelli *et al.*, 1998). Recientemente, se han establecido nuevas formas de utilizar la quitina. Una de las aplicaciones más importantes es para inmovilizar enzimas. Además, estos polímeros pueden servir como acarreadores no absorbibles de ingredientes altamente concentrados (colorantes, saborizantes y nutrientes), cuya descarga puede ser controlada por la lisozima (Luvian *et al.*, 1993).

La glucosamina es un amino azúcar. La glucosamina es un componente natural de las glicoproteínas encontradas en tejidos conectivos y membranas de la mucosa gastrointestinal. Además, tiene potencial terapéutico para el tratamiento de una variedad de enfermedades incluyendo artritis, enfermedades inflamatorias del intestino, y de daño inflamatorio general (Zhu *et al.*, 2005). También, los amino azúcares constituyen entre 5 y 12% de N_2 orgánico al suelo, y los más importantes son glucosamina, galactosamina, ácido murámico, y manosamina, aunque existe una diversidad de otros aminoazúcares. Las células fúngicas contienen en sus paredes grandes cantidades de glucosamina, aunque el exoesqueleto de los invertebrados y las paredes de célula bacterianas también hacen una cierta contribución al contenido de glucosamina.

Existe una gran variedad de métodos para la determinación de los amino azúcares después de la hidrólisis de la materia orgánica, como lo son cromatografía de gases, el cual es muy sensible y tiene una alta especificidad, pero el procedimiento de la derivatización de los productos de la hidrólisis es llevado a cabo con componentes volátiles; con excepción del método de detección amperiométrica, en HPLC también se necesita derivatización para determinar los amino azúcares, sin embargo, esto se puede realizar hoy automáticamente en sistemas HPLC como derivatización en pre-columna (Appuhn, 2004). Entre los reactivos que son utilizados en la derivatización pre-columna se incluyen fenilisotiocianato (PITC), orto-ftalaldehído (OPA), y cloruro de 9-fluoroenilmetil cloroformato (FMOC-Cl), (Haynes, 1991).

En toda industria moderna rentable destinada a la producción de alimentos se producen cantidades de residuos orgánicos que, de no ser utilizados en la generación de otros productos para el consumo humano o animal, representan un problema operacional y legal para la industria, y una fuente potencial de contaminación ambiental. Este problema es uno de los más críticos para la industria de la pesca a nivel mundial, debido a las grandes cantidades de residuos orgánicos que se generan y se descargan en el mar o en tierra (vertederos). Actualmente estos residuos orgánicos representan un 60% de la materia total resultante del procesado de pescadería para el consumo humano.

Dada la preocupación que genera la disposición de estos residuos como posibles contaminantes del medio ambiente (agua, suelos y aire) y la incapacidad de costear un sistema de manejo de desperdicios efectivos, se crea el interés en evaluar nuevas tecnologías alternas para su disposición que sean económicamente factibles.

El procesar el residuo de camarón no sólo resuelve un problema ambiental, sino que también ayuda a obtener productos tales como la quitina, la cual tiene un alto valor comercial esto dependiendo de su grado de pureza y de sus propiedades. El grado de pureza que se obtenga en la quitina depende del tratamiento que se le dé a la misma. Por ello, en este trabajo se propone un método HPLC para cuantificar la glucosamina presente en la quitina obtenida y así determinar su calidad. Por lo anterior en esta investigación se pretende desarrollar una alternativa para conocer la pureza de la quitina obtenida del fermentado de la cabeza de camarón. De esta manera se aprovecharan los desechos de la industria camaronícola.

El objetivo de este estudio fue analizar la pureza de la quitina de residuos de camarón a partir de la cuantificación de glucosamina, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Materiales y métodos

Patrones y reactivos químicos

Todas las soluciones fueron preparadas con agua ultra pura purificada con un sistema Nano pure Dlamon (Barnstead Internacional, Bodoque, Iowa). FMOC (9-fluorenil metil cloroformato) (Sigma, San Luis, Missouri, Estados Unidos) se disolvió en acetonitrilo (EMD Chemicals Inc. Darmstadt, Alemania, grado HPLC); el buffer de boratos fue preparado con ácido bórico y agua ajustando el pH a 8.5 con hidroxido de sodio 1M (Productos Químicos Monterrey, Nuevo León, México).

El reactivo para eliminar el FMOC sin reaccionar (Cleavage) se preparó utilizando hidróxido de sodio 0.85 M con hidroxilamina 0.5M y 2-metiltioetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos); la solución para ajustar el pH de la reacción (Quench) se preparó con ácido acético glacial y acetonitrilo (Productos Químicos Monterrey, Nuevo León, México). Los reactivos fosfato de amonio, metanol y acetonitrilo utilizados para la composición de la fase móvil fueron adquiridas en EMD Chemicals In.

Preparación de la muestra

Hidrólisis de la muestra

Se depositan 100 mg de quitina seca en tubos con rosca y se tratan con HCl 6N por 7 horas a una temperatura de 100°C. La muestra después de ser tratada es filtrada y lavada con agua grado HPLC; posteriormente se diluyen en matraces volumétricos de 100 ml. Previamente a la derivatización, 300 µl de la solución patrón o de muestra se pasan a un vial, y se llevan a sequedad en condiciones de vacío por 6 horas a 60°C.

Derivatización

Para llevar a cabo la derivatización, se tomaron los viales con el residuo seco y se redisolvieron con 300 µl de buffer de boratos a pH 8.5, posteriormente a la muestra ya disuelta se le agregan 300 µl del reactivo FMOC-Cl, y se agitan 90 segundos en el vortex, después de transcurrido el tiempo se añaden 180 µl del reactivo Cleavage y la solución se mezcla en el vortex y se deja reposar por 3.5 minutos. Posteriormente

se agregan 420 µl del reactivo Quench, se agita y se filtra utilizando una membrana millipore de 0.45 µm; luego la muestra está lista para ser analizada por HPLC.

Equipo y condiciones HPLC

Para el análisis se utilizó un cromatógrafo de líquidos equipado con un auto muestreador y un detector de fluorescencia controlado con un software (WinCrom), la temperatura de la columna se controla a 38°C con un calentador de columna; todo el equipo utilizado es proporcionado por GBC Instrumental, Australia. La separación se lleva a cabo con una columna de fase reversa 4.6 mm SGE Hypersil ODS C18, para el análisis cromatográfico se inyectan 5 µl de la muestra derivatizada.

La fase móvil está compuesta por una mezcla de tres soluciones de distinta composición: fase a: 30 mM fosfato de amonio (pH 6.5) disuelto en una mezcla de metanol-agua (15:85); fase b: metanol-Agua (15:85); y la fase c: acetonitrilo-agua (90:10).

La glucosamina es separada con un gradiente de elusión, el cual se muestra en la tabla 1. La velocidad de flujo utilizada fue de 1.20 ml/min. La longitud de onda del detector de fluorescencia es de 264 nm excitación y 316 nm de emisión.

Tabla 1. Programa de la bomba (flujo en gradiente)

<i>Tiempo (min)</i>	<i>% Eluyente A</i>	<i>% Eluyente B</i>	<i>% Eluyente C</i>
0	17	68	15
32	10.8	43.2	46
34.05	0	0	100
36.50	0	0	100
36.55	17	68	15
43	17	68	15

Resultados y discusión

La quitina es un polímero de la N-acetil-glucosamina. Por lo tanto, actualmente se dispone de diversos métodos para la cuantificación indirecta de quitina en bacterias, hongos, insectos y raíces. La hidrólisis de quitina puede ser enzimática o química, ácida o alcalina, y la subsiguiente medición de la glucosamina producida, se puede realizar por colorimetría, cromatografía de gas-líquidos o con HPLC. En este trabajo

se presenta el desarrollo de un método HPLC para la cuantificación de glucosamina, el cual fue aplicado a muestras de quitina obtenidas por fermentación láctica de residuos de camarón.

Ensayos preliminares

En los ensayos previos, tanto la glucosamina pura como la glucosamina obtenida de la hidrólisis de las muestras fueron convertidas en FMOC-derivados para producir un producto fluorescente. Los FMOC-derivados fueron detectados por ultravioleta y por fluorescencia. En fluorescencia, las longitudes de onda seleccionadas para excitación y emisión fueron 270 nm y 316 nm, respectivamente; mientras que para absorción UV la longitud óptima correspondió a 264 nm. En la figura 1 se muestran los cromatogramas para ambos tipos de detección. En el cromatograma del patrón la glucosamina se observa como tres picos con tiempos de retención de 18.24, 19.72 y 20.44 min. Este mismo perfil fue encontrado en los hidrolizados de quitina comercial y de quitina obtenida de la fermentación láctica de residuos de camarón. Además, la relación de los tres picos no varía entre los diferentes tipos de muestras, manifestándose mayor interacción entre el segundo y tercer picos. En la cuantificación de la glucosamina en los hidrolizados de quitina se seleccionó la detección por ultravioleta.

Preparación de la muestra

Para determinar la cantidad óptima del hidrolizado de la muestra a utilizar en el análisis, se llevaron a cabo ensayos preparando hidrolizados con 100, 200 y 300 mg de muestra en 5 y 10 ml de HCl 6 N. Posteriormente, los hidrolizados fueron filtrados al vacío con papel Whatmann núm. 41, y diluidos a 100 ml con buffer de boratos (pH 8.5). Con estos ensayos se determinó que la cantidad óptima de muestra a utilizar correspondía a los hidrolizados preparados a partir de 100 mg de muestra en 5 ml de HCl 6 N y diluidas a 100 ml de buffer de boratos que fueron sonificados por 1 min a temperatura ambiente.

Condiciones cromatográficas

Diferentes columnas cromatográficas han sido utilizadas para el análisis de aminoazúcares como la glucosamina, en este estudio se seleccionó una columna 25 cm

x 4.6 mm SGE Hypersil ODS C18 5 μ m. De acuerdo a las recomendaciones de López-Cervantes y otros autores, 2006, para la separación de FMOC-derivados fueron seleccionados como componentes de la fase móvil fase a: 30 mM fosfato de amonio; fase b: metanol-Agua (15:85); y fase c: acetonitrilo-Agua (90:10); y se llevaron ensayos variando la relación de los componentes en el gradiente de la bomba, velocidades de flujo de la fase móvil y temperaturas de la columna. Estos ensayos facilitaron optimizar las condiciones cromatográficas del método, lo cual permitió separar los tres picos que identifican a la glucosamina. En la tabla 2 se muestran las condiciones seleccionadas.

Tabla 2. Condiciones cromatográficas propuestas para la cuantificación de glucosamina

<i>Parámetro</i>	<i>Condiciones</i>
Columna	25 cm x 4.6 mm SGE Hypersil ODS C18 5 μ m
Eluyente	Fase a: 30 mM fosfato de amonio pH 6.5
	Fase b: metanol-Agua (15:85)
	Fase c: acetonitrilo-Agua (90:10)
Velocidad de flujo	1.2 mL/min
Detección	Ultravioleta: 264 nm
Temperatura	38°C

Identificación de glucosamina

Para confirmar la identificación de glucosamina a través de los tres picos observados en el cromatograma, se determinó el espectro de absorción de cada uno de los picos detectados en las muestras del hidrolizado de quitina, y se compararon con los observados en la solución estándar de glucosamina. Encontrándose que la serie de picos corresponden a la glucosamina. La figura 2 muestra el cromatograma de una muestra con los espectros de absorción de cada pico, lo cual indica que pertenecen al mismo compuesto. Otro método para la identificación de la glucosamina es la comparación de los cromatogramas de un blanco y del patrón con la muestra analizada, como se muestra en la figura 3.

Figura 1. HPLC cromatogramas de glucosamina en hidrolizados de quitina

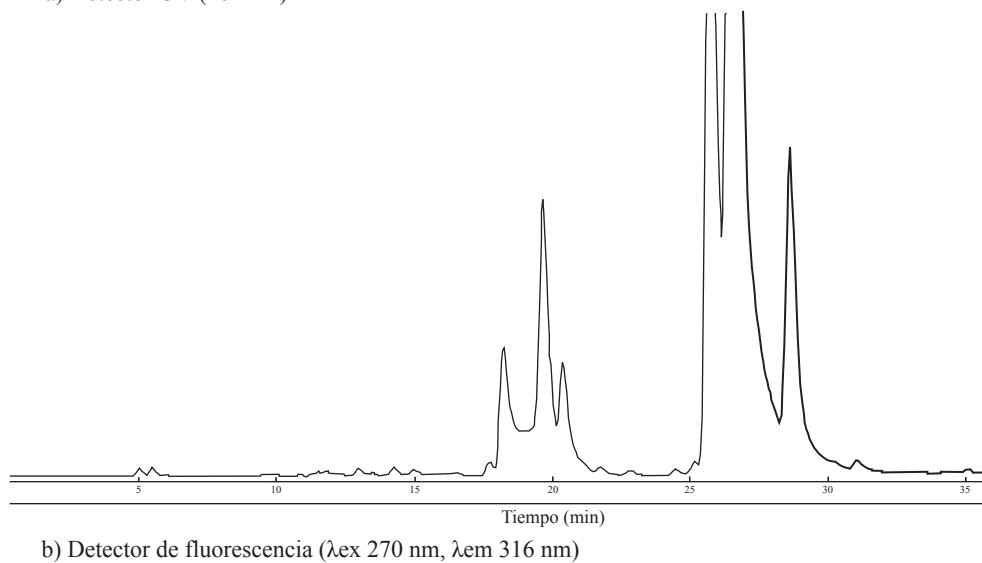
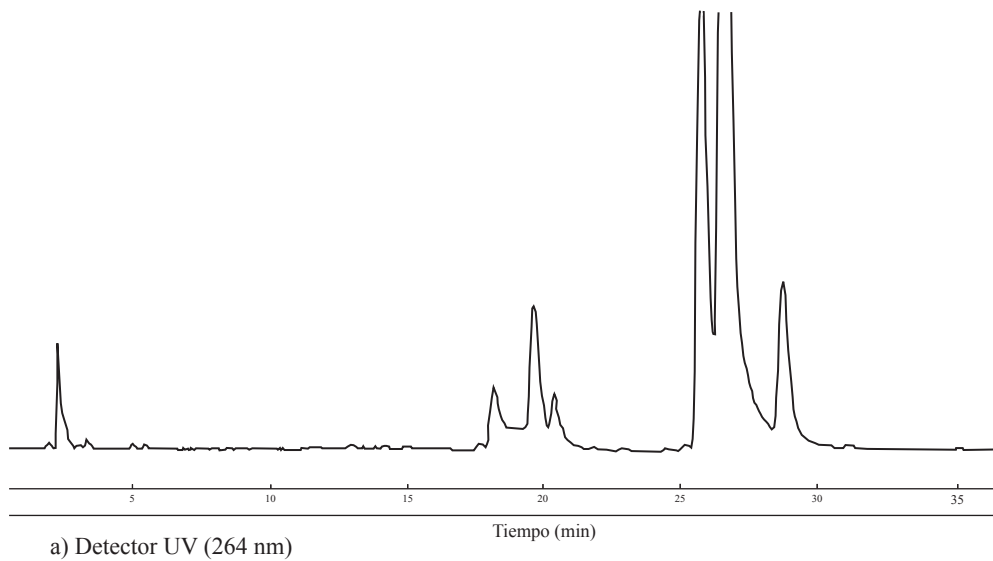


Figura 2. Cromatograma de la muestra con el espectro de absorción de la glucosamina

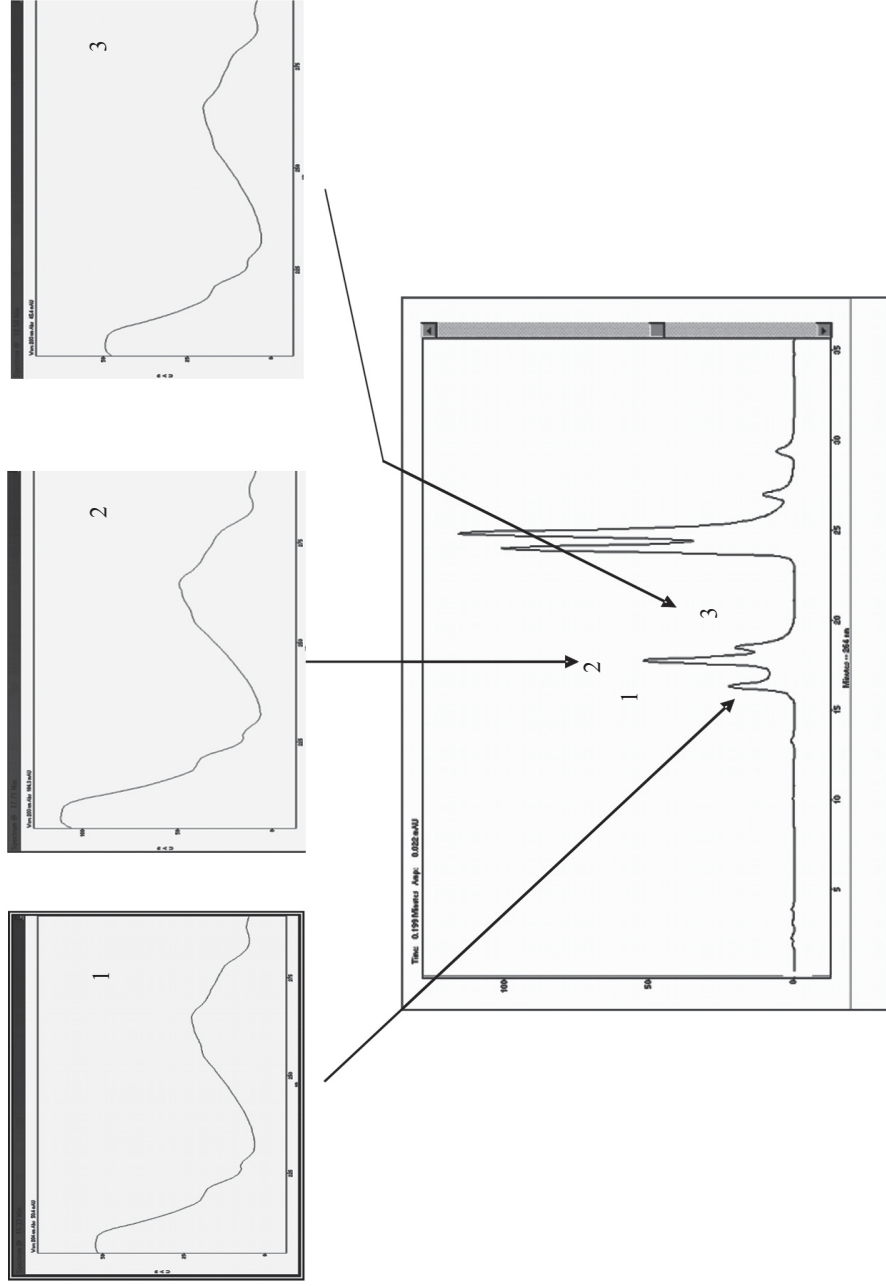
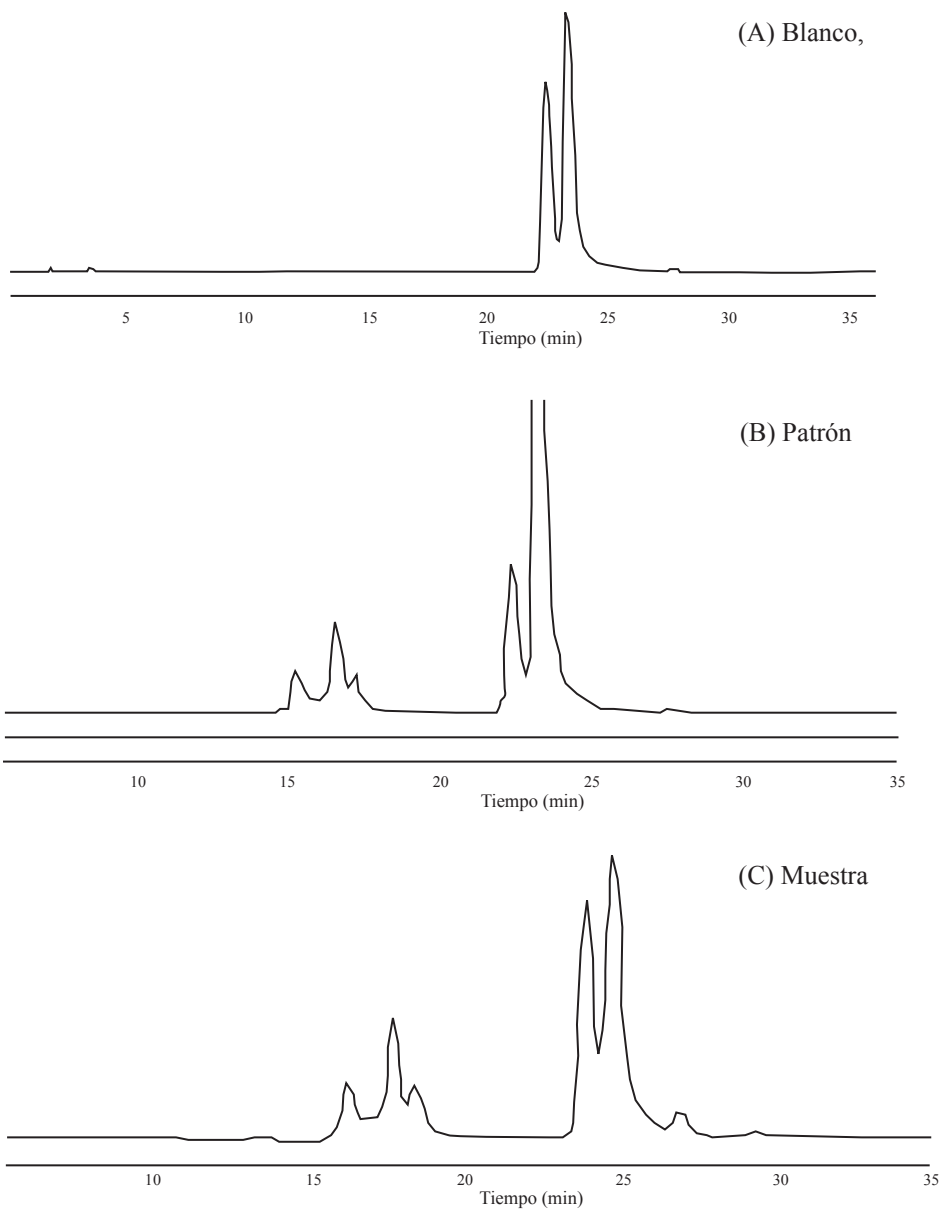


Figura 3. Comparación entre cromatogramas (A) Blanco, (B) Patrón, (C) Muestra



Validación del método

Linealidad

La curva de calibración fue determinada con cuatro diferentes concentraciones de la muestra patrón de glucosamina en el rango de 338 µg/ml hasta 1354 µg/ml, las cuales fueron inyectadas por duplicado (tabla 3). La recta patrón para glucosamina se obtuvo graficando la concentración contra el área del pico, $r^2 = 0.9995$, y según la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (2001), es adecuado, debido a que el valor recomendable para el coeficiente de correlación es ≥ 0.999 aunque en caso de impurezas se admite ≥ 0.990 .

La representación gráfica de la recta de regresión en un sistema de coordenadas, junto con los valores experimentales, permite visualizar la bondad del ajuste. La recta patrón es expresada matemáticamente como $y = ax + b$. Si la recta no pasa cerca del origen de coordenadas significa que el método a evaluar está afectado por un error sistemático por defecto o por exceso en el intervalo estudiado. Si existen diferencias apreciables significa que la linealidad no es buena.

Tabla 3. Datos de calibración de glucosamina

<i>Tiempo de retención (min)</i>	<i>Cantidad (µg/ml)</i>	<i>Área</i>
18.240	338.56	894 342
19.721	677.12	1 881 307
20.445	1 015.68	2 786 166
	1 354.24	3 683 757
$y = 2739 x - 6883$ $R^2 = 0.9995$		

Precisión

La precisión es conocer la variabilidad o el más-menos del método de ensayo. Esta variabilidad se puede deber a errores aleatorios. Para evaluar este parámetro se llevó a cabo el análisis de una misma muestra cuatro veces, los valores se muestran en la tabla 4, en donde se observa la desviación estándar relativa RSD (%), la cual es de 2.58.

Tabla 4. Valores de precisión del método

<i>Ensayos</i>	<i>Glucosamina mg/g materia seca</i>
1	688.2
2	706.4
3	719.6
4	731.1
Promedio	711.32
Desviación estándar	18.42
RSD (%)	2.58

Recuperación

Para llevar a cabo la recuperación del método, se añaden sobre una o varias muestras cantidades conocidas de un analito patrón. Lo anterior se realizó adicionando glucosamina (605 mg/g materia seca), antes de la hidrólisis de la quitina y después se cuantificó el contenido total por HPLC. Los datos se muestran en la tabla 5 (cuatro ensayos de la misma muestra), donde se observa que la recuperación es de 89.05%, la cual se considera aceptable debido al efecto que podrían tener las condiciones de la hidrólisis y la derivatización sobre la glucosamina.

Tabla 5. Valores de recuperación del método

<i>Ensayos</i>	<i>Glucosamina mg/g materia seca</i>
1	86.3
2	87.0
3	90.6
4	92.3
Promedio	89.05
Desviación estándar	2.87
RSD (%)	3.22

Análisis de la muestra

Humedad y cenizas

El muestreo se llevó a cabo analizando once muestras obtenidas de diferentes fermentaciones, realizando el análisis por duplicado bajo las condiciones ya establecidas del método. En la tabla 6 se muestran los valores obtenidos de humedad y de cenizas tanto de la muestra proveniente del residuo de camarón como de la quitina comercial.

El contenido de cenizas y humedad son parámetros de calidad importantes para determinar la pureza de la quitina, y éstos fueron comparados con los resultados de investigaciones previas. El contenido de humedad obtenido de la quitina del residuo de camarón es de 2.3%, el cual es similar al reportado por Shahidi y otros (1991), mientras que Cremades y otros investigadores (2001) reportan valores de cenizas de 1.09%, lo cual indica que el método para remover los minerales es eficaz encontrándose que tanto la quitina comercial como la obtenida del residuo de camarón son muy similares a las reportadas.

Tabla 6. Contenido de humedad y cenizas en quitina

	<i>Muestra</i>	<i>Humedad (%)</i>	<i>Cenizas g/100g materia seca</i>
Quitina residuo de camarón	1	2.33	1.07
	2	2.35	1.01
	3	2.39	1.07
Quitina comercial	1	3.41	1.02
	2	3.44	1.17
	3	3.12	1.04

Contenido de glucosamina en la quitina

La quitina obtenida de residuo de camarón y la quitina comercial presentan resultados muy similares en cuanto al contenido de glucosamina, los cuales son de 89.91% y 89.82%, respectivamente (tabla 7). El contenido de glucosamina representa la calidad de la quitina así como otros parámetros ya mencionados. La pureza de la quitina

obtenida a partir de los residuos de camarón es de 93.71% (89.91% glucosamina, 1.5% cenizas, 2.3% humedad); esto se puede deber, según Wu y otros (2004), a factores tales como el tipo y concentración de ácido, la temperatura y el tiempo de hidrolizado de la quitina, los cuales no son los óptimos para la recuperación de la glucosamina.

Tabla 7. Contenido de glucosamina en quitina

<i>Ensayos</i>	<i>Quitina del residuo de camarón</i>	<i>Quitina comercial</i>
1	914.6	972.8
2	863.8	815.8
3	919.1	906.1
Promedio	899.1	898.2
Desviación estándar	30.7	78.7
RSD (%)	3.41	8.76

Conclusión

En este trabajo se presenta un método HPLC sensible y reproducible para el análisis y cuantificación de glucosamina en quitina de la cabeza de camarón, utilizando una derivatización con FMOC. La validación del método se considera satisfactoria debido a que se obtuvieron niveles de recuperación de un 89% y una buena precisión del método con valores de coeficiente de variación mayores de 0.999, lo cual implica un gran potencial para la investigación y análisis de rutina.

De tal manera que al llevar a cabo el análisis del contenido de glucosamina en la quitina, se puede confirmar la pureza de la misma, así como también las condiciones óptimas de la hidrólisis; por lo tanto, el método debe ser aplicable para la determinación rutinaria de glucosamina y la pureza de la quitina en residuos de camarón.

Bibliografía

Appuhn, A.; R. G. Joergensen; M. Raubuch; E. Scheller y B. Wilke (2004), "The Automated Determination of Glucosamina, Galactosamine, Muramic Acid,

- and Mannosamine in Soil and Root Hydrolysates by HPLC”, *Plant Nutr. Soil Sci.* 167:17-21.
- Cremades, O.; E. Ponce; R. Corpas; J. F. Gutierrez; M. Jover; M. C. Álvarez-Ossorio (2001), “Processing of Crawfish (*Procambarus clarkia*) for the Preparation of Carotenoproteins and Chitin”, *J. Agric. Food Chem.* 49: 5468-5472.
- Haynes, Paul A. y David Sheumack (1991), “Applications of Automated Amino-acid Analysis Using 9-fluorenylmethyl Chloroformate”, *J. Chromatography* 588: 107-114.
- J. López-Cervantes; D. I. Sánchez-Machado; J. A. Rosas Rodríguez (2006), “Analysis of Free Amino Acids in Fermented Shrimp Waste by High-Performance Liquid Chromatography”, *J. of Chromatography* febrero, vol. 1105, (1-2): 106-110.
- Luvian, S. R.; G. A. A. Toledo (1993), *Comparación de métodos de extracción de quitina y quitosano a partir de cáscara de camarón y análisis preliminar de su producción en planta piloto*, CIAD, A.C.
- Pinelli, S. A.; G. A. Toledo; S. R. Luvian; B. I. Esquerria; C. I. Higuera (1998), “Métodos de extracción de quitina a partir de cáscara de camarón”, *Archivo Latinoamericano de Nutrición* 48: 58-61.
- Shahidi, F. y J. Synowiecki (1991), “Isolation and Characterization of Nutrients and Value-Added Products from Snows Crab (*Chionoectes opilio*) and Shrimp (*Pandalus borealis*) Processing Discards”, *J. Agric. Food Chem.* 39: 1527-1532.
- Wu, T.; Zivanovics; A. F. Draughon y E. C. Sams (2004), “Chitin and Chitosan-Value-Added Products from Mushroom Waste”, *J. Agric. Food Chem.* 52: 7905-7910.

Conversión microbiana de ácido ferúlico a vainillina

Microbial Conversion of Ferulic Acid to Vanillin

*De Faveri, D.¹; Torre P.¹; Aliakbarian, B.¹;
Domínguez, J. M.²; Perego, P.¹; Bustos, G.³; Converti, A.^{1*}*

Resumen

La manera más adecuada de disponer los residuos, desde el punto de vista medioambiental, es su conversión en productos con alto valor añadido. Entre las posibles alternativas para aprovechar los residuos agroindustriales, se ha detectado un creciente interés en la hidrólisis de su fracción lignocelulósica para obtener disoluciones ricas en ácido ferúlico y su sucesiva bioconversión en vainillina, uno de los principales compuestos aromáticos de interés para la industria alimentaria en el mundo entero.

En vista de una futura producción industrial de vainillina a partir de esos hidrolizados, este trabajo fue dirigido en medios semidefinidos, para la selección, de las mejores condiciones para realizar la transformación. Un análisis sobre cinco diferentes transformantes de *Escherichia coli* mostró que *E. coli* JM109 (pBB1) aseguró las más elevadas productividades volumétricas y específicas, así como las mayores velocidades de conversión del ácido ferúlico. El mejor cosustrato para sostener el metabolismo energético de esta cepa durante la bioconversión del ácido ferúlico en vainillina fue el extracto de levadura, mientras una relación entre los volúmenes del medio y del contenedor de 0.5 y 100 rpm fueron las mejores condiciones de agitación. Los mayores rendimientos de producto fueron obtenidos a 30°C después de tiempos

¹ Department of Chemical and Process Engineering “G. B. Bonino”, Via Opera Pia 15, I-16145 Génova, Italia.

² Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Vigo (Campus Ourense), edificio Politécnico, As Lagoas s/n, 32004 Ourense, España.

³ Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Boulevard E. C. Glez., 1201, col. Jardín, C.P. 89840. Cd. Mante, Tamaulipas, México.

*E-mail: converti@unige.it

de bioconversión relativamente cortos (1-2 h), como necesita un proceso industrial. Pruebas adicionales realizadas a concentraciones iniciales variables de ácido ferúlico evidenciaron una inhibición por exceso de sustrato responsable por una disminución exponencial de la productividad.

El reciclaje de biomasa de cuatro bioconversiones sucesivas demostró la posibilidad de emplear este sistema de células en reposo para la producción continua de vainillina. Entre los soportes de inmovilización testados (poliuretano, esponja sintética y vidrio poroso), la esponja sintética mostró ser el mejor material en términos de formación de vainillina y de productividad al término de las pruebas de inmovilización. Por tanto, ésta fue usada en bioconversiones continuas utilizando una columna de lecho fijo con células de *E. coli* JM109 (pBB1) inmovilizadas. El rendimiento máximo de vainillina ($Y_{VF} = 0.851$ mol/mol) fue obtenido a una velocidad de dilución de 0.022 h⁻¹. Con base en estos resultados prometedores, los esfuerzos futuros serán direccionados a la preparación y sucesiva bioconversión de disoluciones ricas en ácido ferúlico a partir de *corncobs*, un subproducto del procesamiento del maíz dulce.

Abstract

The most environmentally friendly way to dispose wastes is their conversion into high added value-products. Among the possible alternatives to exploit agroindustrial residues, increasing interest has been paying to the hydrolysis of their lignocellulosic fraction to give ferulic acid-rich solutions and their successive bioconversion to vanillin, one of the main flavouring compounds of concern for the food industry worldwide.

In view of future industrial production of vanillin from such hydrolyzates, this work has been addressed towards the selection, in semi-defined media, of the best conditions to perform the transformation. A screening among five different *Escherichia coli* transformants showed that *E. coli* JM109 (ppB1) ensured the highest values of the volumetric and specific productivities as well as the highest ferulic acid conversion rates. The most suitable co-substrate to sustain the energetic metabolism of this strain during ferulic acid-to-vanillin bioconversion was yeast extract, while a ratio of medium to vessel volume of 0.5 at 100 rpm were the best agitation conditions. The highest product yields were obtained at 30 °C after relatively short bioconversion times (1-2 h), as those required for an industrial process. Additional tests performed at variable starting ferulic acid levels (S_0) demonstrated the occurrence of excess substrate inhibition responsible for an exponential decrease in the specific productivity with increasing S_0 .

Biomass recycling from four successive bioconversion steps demonstrated the possibility of employing such a resting cell system for the continuous production of vanillin. Among the tested immobilization supports (polyurethane, synthetic sponge and porous glass) the synthetic sponge proved to be the best material in terms of both vanillin formation ($C_v = 0.080$ g/L) and productivity ($Q_v = 0.019$ g/L h) at the end of

entrapment tests. Thus, it was used in continuous bioconversions using a fixed-bed column with immobilized *E. coli* JM109 (pBB1) cells. The highest vanillin yield ($Y_{p/S} = 0.851$ mol/mol) was obtained at a dilution rate of 0.022 /h.

On the basis of these promising results, future attempts will deal with the preparation and subsequent bioconversion of solutions rich in ferulic acid from corn cobs, a by-product from sweet corn processing.

Introducción

El creciente interés de la industria alimentaria en el uso de biocatalizadores como una respuesta al aumento de la demanda de productos naturales (Murray y cols., 1988), recientemente está estimulando la búsqueda de rutas alternativas para producir vainillina (Ramachandra Rao y Ravishankar, 2000).

La vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) es un importante compuesto sabroso y aromático que se extrae principalmente del frijol o vaina de la orquídea tropical vainilla. Pero menos del 1% de la producción de vainillina en el mundo proviene de la vainilla natural, ya que su costo es también muy alto (de dos mil a cuatro mil pesos por kg^{-1}) con respecto al (< 15 pesos por kg^{-1}) de la vainillina sintetizada por procesos químicos (Lomascolo y cols., 1999; Muheim y Lerch, 1999). El alto y variable costo de la vainillina natural se debe a varias causas, como la escasa disponibilidad de las vainas de vainilla, fluctuaciones de los rendimientos de la cosecha asociadas al clima, decisiones políticas y económicas, cultivo intensivo, polinización, cosecha y maduración de las vainas, pues el uso de un sustrato natural o catalizador podría permitir que el mismo producto sea clasificado como natural (Schreier, 1992), se espera una producción biotecnológica de este compuesto.

La vainillina es usada tanto en aplicaciones alimentarias como de otro tipo, en fragancias y preparaciones farmacéuticas. La vainillina sintética es usada como un intermediario en la producción de herbicidas, agentes antiespumantes o medicinas (Hocking, 1997) y productos caseros, así como deodorantes y lustradores de pisos. A causa de su propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Burri y cols., 1989; Davidson y Naidu, 2000), la vainillina podría ser usada como conservante de alimentos, pero este campo de uso potencial es entorpecido por su fuerte olor en las concentraciones inhibitorias requeridas (Gould, 1996).

La gran diferencia entre los precios de la vainillina natural y la sintética, así como el incremento de la demanda por sabores “naturales” y “saludables” han estimulado un gran interés de la industria de aromas para producir vainillina natural de otras fuentes naturales de bioconversión. Esta común orientación en la produc-

ción de sabores y fragancias fue analizada extensivamente (Cheetham, 1993, 1997; Hagedorn y Kaphammer, 1994; Rosazza y cols., 1995; Häusler and Münch, 1997; Krings y Berger, 1998).

Para que sea económicamente viable, se tiene que encontrar un precursor, químicamente cerrado de la vainillina, barato y fácilmente disponible. El ácido ferúlico, un producto muy conocido de la degradación de la lignina por descomposición de hongos (Kirk, 1971) y bacterias (Betts and Dart, 1988), fue estudiado a fondo como materia prima (Rosazza y cols., 1995), siendo un compuesto fenólico natural. El ácido ferúlico libre puede ser producido a partir de residuos agrícolas comunes, así como de cereal y pulpa de remolacha a través de una combinación de tratamientos físicos y enzimáticos (Williamson y cols., 1998). Varias bacterias pertenecientes a diferentes géneros son capaces de metabolizar el ácido ferúlico como única fuente de carbono conduciendo a la producción de vainillina, ácido vainílico y ácido protocatequico como intermediarios catabólicos (Sutherland y cols., 1983; Gurujeyalakshmi y Mahadevan, 1987). *Pseudomonas fluorescens* se mostró capaz de producir ácido vainílico y ácido ferúlico (Andreoni y cols., 1995; Barghini y cols., 1998), con la formación de vainillina como un intermediario (Narbad y Gasson, 1998).

Recientemente concentraciones interesantes de vainillina han sido obtenidas a partir del ácido ferúlico usando las bacterias gram-positivas *Amycolatopsis* sp. (Rabenhost y Hopp, 1997) y *Streptomyces setonii* (Müller y cols., 1998). Sin embargo, puesto que la optimización del proceso parece ser muy difícil, la obtención de nuevas cepas recombinantes capaces de producir específicamente la vainillina es atractiva.

Este trabajo tiene como objetivo la optimización de un proceso continuo para la producción de la vainillina a partir de soluciones acuosas de ácido ferúlico con un reactor de células inmovilizadas para futuras aplicaciones, utilizando hidrolizado destoxificado de zuros de maíz.

Materiales y métodos

Crecimiento y mantenimiento de los microorganismos

Una investigación de productores de vainillina se realizó entre diversas especies recombinantes de *Escherichia coli* (DH5 α , JM109, JM Promega, Novablu, SureII y XL10gold), pertenecientes a la colección del Departamento de Agrobiología y Agroquímica de la Universidad de Tuscia, Viterbo, Italia. El mejor productor de vainillina, *E. coli* JM109 (pBB1), expresa ambas, feruloil-scoa sintetasa y feruloil-scoa

hidratasa/aldolasa de *P. fluorescens* BF13. El plásmido recombinante pBB1 se generó clonando un fragmento de cinco mil-bp, incluyendo los primeros tres genes de la ruta superior del ácido ferúlico y la región entera del promotor de la cepa de *P. fluorescens* BF13 degradante el ácido ferúlico, en el vector con bajo número de copias dpJB3Tc19 (Blatny y cols., 1997). El fragmento donador contiene una mutación dirigida en el gene de la vainillina deshidrogenasa (*vdh*), que previene la oxidación de la vainillina al ácido vainílico en experimentos de bioconversión con ácido ferúlico como sustrato. La secuencia de DNA del operón del ácido ferúlico entero de *P. fluorescens* BF13 está disponible en la base de datos de la secuencia del nucleótido EMBL bajo la accesión núm. AJ536325.

Las células fueron mantenidas a 4°C en placas de Petri que contenían medio de Luria-Bertani (LB) y 100 mg/L de ampicilina. El precultivo se preparó en 5 mL del mismo medio sin agar. Las células se transfirieron en frascos Erlenmeyer de 250 mL (EF) que contenían 25 mL del medio LB (Sambrook y cols., 1989) y ampicilina (100 mg/L), o tetraciclina (15 mg/L), y después se cultivaron durante la noche en un agitador rotatorio a 37°C (200 rpm). El medio (LB) fresco (30 mL) más el antibiótico se sembró con 0.6 mL del precultivo antes mencionado en varios EF de 100 mL. Las células se recolectaron por centrifugación (seis mil rpm, 10 min) durante la parte final de la fase log y se lavaron con tampón fosfato salino M9 a pH 7.4 (6 g/L Na₂HPO₄, 3 g/L del KH₂PO₄, 1 g/L NH₄Cl y 0.5 g/l de NaCl).

Bioconversiones discontinuas

Todas las bioconversiones discontinuas se realizaron en EF de 250 mL. La investigación se realizó a 30°C en un medio de bioconversión compuesto de esta solución suplementada con ácido ferúlico (0.3-0.4 g/L) y 50 mg/L de extracto de levadura (EL) como co-sustrato usando una concentración de inóculo (X_o) de cerca de 5 g/L. Las pruebas a temperatura variable se realizaron bajo las siguientes condiciones: concentración inicial de ácido ferúlico (C_{Fo}) = 0.19 g/L; $22 \leq T \leq 37^\circ\text{C}$; $X_o = 5.6$ g/L. Las bioconversiones a C_{Fo} variable se realizaron bajo las siguientes condiciones: $0.20 \leq C_{Fo} \leq 2.0$ g/L; $T = 30^\circ\text{C}$; $X_o = 5.0$ g/L. Otras pruebas se realizaron usando el medio LB (1% v/v) o triptona (100 mg/L) como co-sustratos en vez de EL, usando $X_o = 3.0$ -3.5 g/L. La optimización de las condiciones de agitación se hizo disminuyendo la proporción del volumen del medio (V_m) con respecto al de los frascos ($V_f = 250$ mL) a partir de 0.5 a 0.2 y/o subiendo la velocidad rotatoria a partir del 100 a 200 rpm. Otra prueba de bioconversión con adición inicial de N₂ se utilizó como referencia anaerobia.

La viabilidad a largo plazo de *E. coli* JM109 (pBB1) se comprobó a través de un sistema de cuatro bioconversiones sucesivas de 20 horas en EF a $C_{Fo} = 0.94$ g/L y $X_o = 0.94$ g/L, donde las células de la prueba precedente se centrifugaron (seis mil rpm, 10 min), lavaron y reutilizaron posteriormente.

Las desviaciones estándar de las concentraciones del ácido vainílico variaron en rangos de 3.2-6.5% y 1.5-6.1%, respectivamente; por lo tanto, no se consideró esencial ningún análisis estadístico adicional de datos. No se observó ninguna formación del alcohol vainílico bajo las condiciones experimentales usadas para estos experimentos; una reducción limitada de vainillina al alcohol correspondiente ocurrió solamente cuando las células se reutilizaron para varios ciclos.

Procedimiento y optimización de la inmovilización

Un vidrio poroso, un poliuretano reticulado y una esponja sintética, se usaron como soportes de inmovilización. Para evaluar la capacidad de cada material de atrapar la biomasa, se inoculó una suspensión de células en EF de 250 mL, cada uno conteniendo 50 mL de solución salina M9 y 0.6 g de materiales flexibles o 10 g de vidrio poroso. El tiempo del contacto entre las células y cada material varió de acuerdo al diseño estadístico mencionado. Las células inmovilizadas se recolectaron por filtración estéril, se incubaron a tiempos variables en el medio fresco LB (50 mL) más 100 mg/L de ampicilina, recuperadas por filtración estéril y finalmente usadas en el proceso de bioconversión.

Para seleccionar el soporte más conveniente para el proceso, se realizaron bioconversiones discontinuas de acuerdo a un diseño factorial 2^2 central compuesto repetido para cada uno de los tres materiales y los resultados se evaluaron por la metodología de superficie de respuesta (RSM) (Montgomery, 2001). La concentración y productividad de la vainillina se seleccionaron como variables de respuesta del estudio estadístico. Los rangos probados de las variables independientes, es decir, los tiempos de contacto (t_c) e incubación (t_i) fueron 24-72 horas y 6-42 horas, respectivamente. Los resultados experimentales se trataron con la ecuación:

$$y = b_o + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 \quad (1)$$

Donde b_o es el coeficiente de intercepción, b_1 y b_2 los términos lineales, b_{12} el término de interacción, y x_1 y x_2 los valores codificados de las variables independientes mencionadas, t_c y t_i , respectivamente.

Bioconversiones en continuo

Las pruebas continuas se realizaron en un reactor de lecho fijo, que consistía en una columna de altura 75 cm con un diámetro interno de 4 cm y provista de una cubierta externa para la recirculación del agua (Converti y cols., 1991; Converti, 1994). La columna fue operada a 30°C y se llenó hasta 50 centímetros con piezas de esponja sintética (1 x 0.7 cm) que contenían las células atrapadas y los granos de vidrio (de 1 cm de diámetro), en una relación de 0.20 de esponjas por g de vidriol, para evitar que ocurrieran aumentos demasiado altos de la presión. El volumen de trabajo fue de 450 mL y la concentración de ácido ferúlico en la alimentación se mantuvo a 0.20 g/L.

Determinaciones analíticas

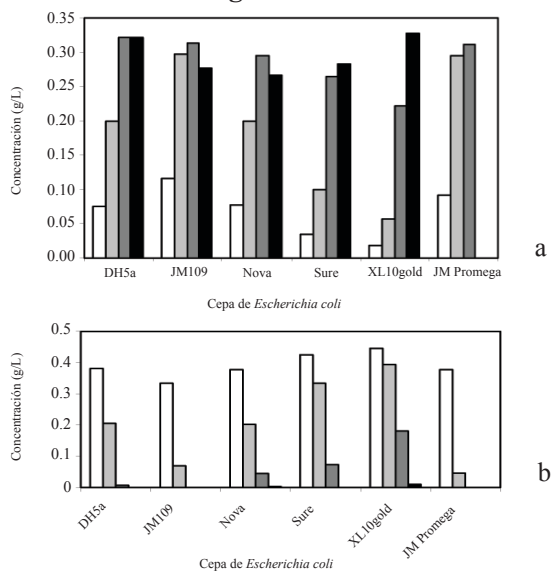
La concentración de biomasa se determinó por densidad óptica medida a 600 nm y expresada como peso seco. Las concentraciones del ácido vainílico, la vainillina y el ácido ferúlico se determinaron por HPLC 1100, Hewlett Packard (Palo Alto, California), provisto de una columna Vydac 201TP54 C18 de fase reversa (Hesperia, California) a 35°C, usando un detector de UV/Vis, Hewlett Packard (Palo Alto, California) a $\lambda = 254$ nm. La fase móvil se usó a un flujo de 0.5 mL/min y consistió de 40% de metanol y 60% de una solución preparada adicionando 6.8 g/L de KH_2PO_4 en agua y ajustando el pH a 2.5 con H_3PO_4 . Los datos de adquisición y proceso se controlaron por el software Rev. A.09.03 Chem Station, Agilent Technologies (Palo Alto, California).

Resultados y discusión

Bioconversiones discontinuas

Selección del mejor productor de vainillina a partir de ácido ferúlico

Fue investigada la capacidad de seis cepas de *E. coli*, transformadas con el plásmido pBB1, a saber DH5 α , JM109, Nova, Sure, XL10gold y JM Promega, de producir vainillina a partir de ácido ferúlico. Los principales datos recogidos después de diversos tiempos de bioconversión, en términos de concentraciones del producto o del sustrato residual, se ilustran en la figura 1, mientras que la tabla 1 muestra los valores de los principales parámetros cinéticos así como los rendimientos de bioconversión.

Figura 1.


a) Producción de vainillina. b) Consumo de ácido ferúlico por diferentes cepas recombinantes de *E. coli* después de diferentes tiempos de bioconversión (h): (□) 1, (▤) 4, (▥) 20, (■) 72. $X_o = 4.6-5.8$ g/L; $C_{Fo} = 0,3-0,4$ g/L; $T = 30^\circ\text{C}$

Tabla 1. Parámetros de bioconversión de ácido ferúlico a vainillina

T ($^\circ\text{C}$)	<i>DH5a</i>	<i>JM109</i>	<i>Novablue</i>	<i>SureII</i>	<i>XL10gold</i>	<i>JMPromega</i>
$Y_{V/F}^o$ (mol _V /mol _F)	0.903	0.959	0.905	0.720	0.591	0.986
$Y'_{V/F}$ (mol _V /mol _F)	0.844	0.726	0.701	0.739	0.875	0.000
Q_V^o (g _V L ⁻¹ h ⁻¹)	0.075	0.115	0.078	0.035	0.019	0.085
Q_V^o (g _V g _{DM} ⁻¹ h ⁻¹)	0.013	0.022	0.017	0.008	0.004	0.018
Q_F^o (g _F L ⁻¹ h ⁻¹)	0.106	0.153	0.110	0.062	0.041	0.110
Q_F^o (g _F g _{DM} ⁻¹ h ⁻¹)	0.018	0.029	0.024	0.013	0.008	0.024

Bioconvertidas por diferentes cepas de *E. coli* transformadas con el plásmido pBB1. $X_o = 4.6-5.8$ g/L; $T = 30^\circ\text{C}$. $Y_{V/F}^o$ = Rendimiento inicial de vainillina en relación al ácido ferúlico consumido; $Y'_{V/F}$ = Rendimiento final de vainillina en relación al ácido ferúlico consumido; Q_V^o = Productividad volumétrica inicial; q_V^o = Productividad específica inicial; Q_F^o = Velocidad volumétrica de consumo del ácido ferúlico; q_F^o = Velocidad específica de consumo del ácido ferúlico.

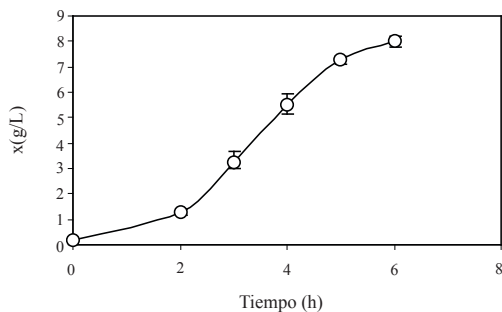
Se observa que *E. coli* JM Promega y JM109 exhibieron los rendimientos más altos al principio (1 hora), mientras *E. coli* DH5 α y XL10gold se comportaron como los más eficaces al final de la biotransformación (72 horas). Además, la vainillina producida por *E. coli* JM Promega se oxidó completamente a ácido vanílico después de un tiempo largo de bioconversión.

Curva del crecimiento de *E. coli* JM109 (pBB1)

Para maximizar el rendimiento de conversión de ácido ferúlico a vainillina, todas las bioconversiones se realizaron usando las células cultivadas de *E. coli* JM109 (pBB1) en medio LB y recogidas al final de la fase exponencial, correspondiendo a OD a 600 nm de 2.3-2.7 y concentraciones de biomasa de 1.2-1.4 g_{DM}/L. El respecto de este protocolo fue impuesto por el metabolismo energético desfavorable antes mencionado de las células no proliferantes.

Los datos experimentales de la curva de crecimiento (figura 2) se usaron para estimar los parámetros cinéticos de crecimiento. La productividad celular volumétrica media, la velocidad específica de crecimiento específico y el tiempo de duplicación fueron 1.2 g L⁻¹ h⁻¹, 0.29 h⁻¹ y 2.4 h, respectivamente, mientras que los valores de estos parámetros referidos únicamente a la fase exponencial 2.2 g L⁻¹ h⁻¹, 0.60 h⁻¹, 1.1 h, respectivamente. Comparando con la literatura se muestra que el medio LB permitió un crecimiento notablemente más lento de las células con respecto a las fuentes de carbón comunes. Por ejemplo, el transformante usado mostró en el medio LB un tiempo de duplicación más de dos veces de largo que la cepa salvaje ($t_d = 0.5$ h) bajo condiciones óptimas del crecimiento en glucosa (Brock y cols., 1995; Schlegel, 1996).

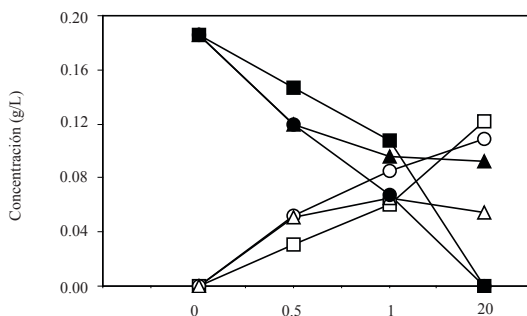
Figura 2. Curva de crecimiento de *E. coli* JM109(pBB1) en medio LB $X_o = 0,19$ g/L; $T = 37^\circ\text{C}$



Efecto de la temperatura

La figura 3 muestra los efectos simultáneos de temperatura y tiempo de reacción en la bioconversión de ácido ferúlico a vainillina. Los mejores rendimientos en producto se obtuvieron a 30°C (tabla 2), después de tiempos relativamente cortos de bioconversión ($1 < t < 2$ h), como los requeridos para un proceso industrial. Por el contrario, después de un tiempo más largo ($t \approx 20$ h), la biotransformación fue afectada por un aumento de temperatura. A 37°C un consumo marcado de la vainillina producida fue observado después de 20 horas probablemente debido a un aumento de la actividad antes mencionada. Los valores máximos de las productividades volumétrica ($0.091 \text{ g}_V \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y específica ($0.018 \text{ g}_V \text{ g}_{DM}^{-1} \text{ h}^{-1}$) se alcanzaron a 30°C después de solamente 1 hora de bioconversión.

Figura 3.



Efecto de la temperatura en la producción de vainillina (símbolos vacíos) y consumo de ácido ferúlico (símbolos llenos) por *E. coli* JM109(pBB1) en solución salina M9 suplementada con extracto de levadura. $C_{F_0} = 0,19 \text{ g/L}$; $X_0 = 5,6 \text{ g/L}$; T (°C): (□) 22, (○) 30, (△) 37.

Efecto del co-sustrato en el medio de bioconversión

Puesto que la vainillina se produce usando una ruta metabólica alternativa a la glicólisis que no implica ninguna formación de ATP (Rosazza y cols., 1995), las células no proliferantes necesitan catabolizar un poco de co-sustrato carbonoso energético para sostener su viabilidad a largo plazo en proceso continuo. La signi-

ficación de los componentes complejos de los medios se demostró por Rabenhorst (1996), que observó una influencia fuerte del co-sustrato (extracto de levadura e hidrolizado de caseína) y de la aireación en dirigir el metabolismo del eugenol de una nueva cepa aislada de *Pseudomonas* a la producción de ciertos compuestos aromáticos (ácido vainílico, ácido ferúlico y alcohol coniferílico) en vez de una mezcla cruda.

Tabla 2.

T ($^{\circ}\text{C}$)	22	30	37
$Y_{V/F}^{\circ}$ ($\text{mol}_V/\text{mol}_F$)	0 998	0 996	0 986
$Y_{V/F}^f$ ($\text{mol}_V/\text{mol}_F$)	0 837	0 748	0 747
Y_{V/F_o}° ($\text{mol}_V/\text{mol}_F$)	0 324	0 480	0 472
Y_{V/F_o}^f ($\text{mol}_V/\text{mol}_F$)	0 838	0 777	0 690
Y_{V/F_o}^m ($\text{mol}_V/\text{mol}_F$)	0 838	0 865	0 750
t (h)	20	4	6
Q_V^m ($\text{g}_V \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	0 062	0 091	0 090
q_V^m ($\text{g}_V \text{g}_{\text{DM}}^{-1} \text{h}^{-1}$)	0 011	0 018	0 018
Q_F^m ($\text{g}_F \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	0 078	0 132	0 132
q_F^m ($\text{g}_F \text{g}_{\text{DM}}^{-1} \text{h}^{-1}$)	0 014	0 024	0 024

Influencia de la temperatura en la bioconversión de ácido ferúlico a vainillina por *E. coli* JM109(pBB1). $S_o = 0.19 \text{ g/L}$ $X_o = 5.6 \text{ g/L}$ $Y_{V/F}^{\circ} =$ Rendimiento inicial de vainillina en relación al ácido ferúlico consumido; $Y_{V/F}^f =$ Rendimiento final de vainillina en relación al ácido ferúlico consumido; $Y_{V/F_o}^{\circ} =$ Rendimiento inicial de vainillina en relación al ácido ferúlico inicial; $Y_{V/F_o}^f =$ Rendimiento final de vainillina en relación al ácido ferúlico inicial; $Y_{V/F_o}^m =$ Rendimiento máximo de vainillina en relación al ácido ferúlico inicial; $t =$ Tiempo de alcance de Y_{V/F_o}^m ; $Q_V^m =$ Productividad volumétrica máxima de vainillina; $q_V^m =$ Productividad máxima específica de vainillina; $Q_F^m =$ Velocidad volumétrica máxima de consumo de ácido ferúlico; $q_F^m =$ Velocidad específica máxima de consumo de ácido ferúlico.

* Valores máximos detectados al inicio de las bioconversiones.

Después se probó *E. coli* JM109 (pBB1) en experimentos discontinuos de bioconversión para seleccionar el mejor co-sustrato para la transformación de ácido ferúlico a vainillina. Para identificar los componentes del medio que podían sostener la producción de la vainillina, se prepararon tres tampones de bioconversión, usando EL o triptona como suplemento, o añadiendo directamente medio LB que contiene ambos ingredientes. La cantidad de los ingredientes solos fueron los mismos que en el medio LB. Los resultados de estas pruebas, que fueron realizadas en una concentración inicial de biomasa de 5.1 g_{DM}/L, se ilustran en la figura 4. Se puede observar que el EL era un mejor agente estimulante, proporcionando, después de sólo tres horas de bioconversión, los valores máximos de concentración de vainillina (84 mg/L) y un rendimiento molar (0.56 mol/mol) cerca de 27% más alto que los obtenidos con triptona. Por otra parte, el uso del medio LB no dio lugar a ningún aumento apreciable en el rendimiento de la conversión con respecto al EL (solamente 3.6%); por lo tanto, las bioconversiones sucesivas se realizaron usando el último cosustrato, que es notoriamente más barato.

Efecto de la concentración inicial de ácido ferúlico

Las bioconversiones adicionales que usaron concentraciones de ácido ferúlico en el rango de 0.20 a 2.0 g/L se realizaron para evidenciar la ocurrencia posible de inhibición por exceso de sustrato así como para seleccionar el mejor rango de C_{F_0} para futuras aplicaciones en continuo. Ambas concentraciones de vainillina (C_V) y sustrato residual (C_F) se normalizaron a C_{F_0} , así para comparar fácilmente los resultados de las bioconversiones realizadas bajo condiciones totalmente diferentes. La disminución progresiva de la pendiente de las curvas de C_V/C_{F_0} y de C_F/C_{F_0} (figura 5), con el aumento de C_{F_0} , puso en evidencia un +fenómeno de inhibición por sustrato que fue responsable de la desaceleración progresiva de la conversión.

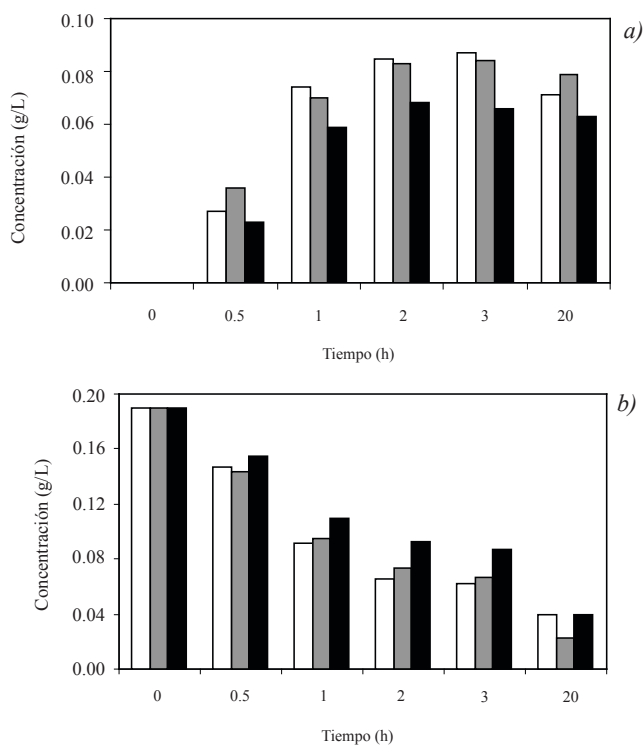
El efecto de inhibición, que fue cualitativamente similar al observado para la fermentación alcohólica en medios sintético y naturales (Ciftci y cols., 1983; Converti y cols., 1986), puede ser descrito por el modelo empírico:

$$q_v^o = q_v^o_{max} - K_I e^{K_2 C_{F_0}} \quad (2)$$

Donde q_v^o es la productividad específica de vainillina al inicio de la bioconversión.

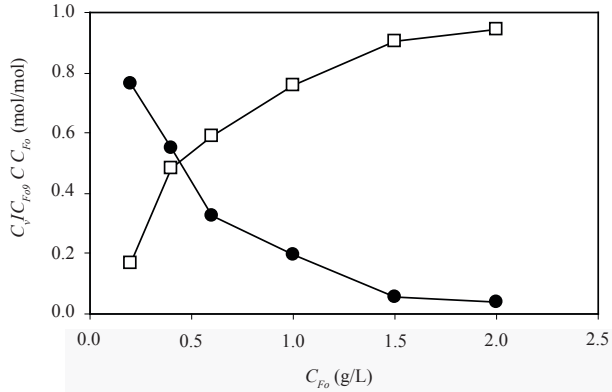
Graficando los datos experimentales de q_v^o contra C_{F_o} y usando una técnica simple de progresiva minimización del error, se trazó una línea recta ($r^2 = 0.969$), de la cual se estimaron los valores siguientes de las constantes de la Ec. (2): $q_{v_{max}}^o = 0.036 \text{ g}_V \text{ g}_{DM}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $K_1 = 0.0147 \text{ g}_V \text{ g}_{DM}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $K_2 = 0.411 \text{ L/g}_F$. Puesto que el valor del $q_{v_{max}}^o$ obviamente depende del biosistema bajo investigación, la carencia de estudios cinéticos en la producción de vainillina por la especie recombinante seleccionada no permite ninguna comparación con datos de la literatura.

Figura 4.



a) Producción de vainillina b) consumo de ácido ferúlico por *E. coli* JM109(pVB1) en tres diferentes medios de bioconversión: (□) solución salina M9 suplementada con LB, (■) extracto de levadura o (■) triptona $C_{F_o} = 0.19 \text{ g/L}$; $X_o = 5.1 \text{ g/L}$; $T = 30^\circ\text{C}$ Velocidad de rotación = 150 rpm

Figura 5.



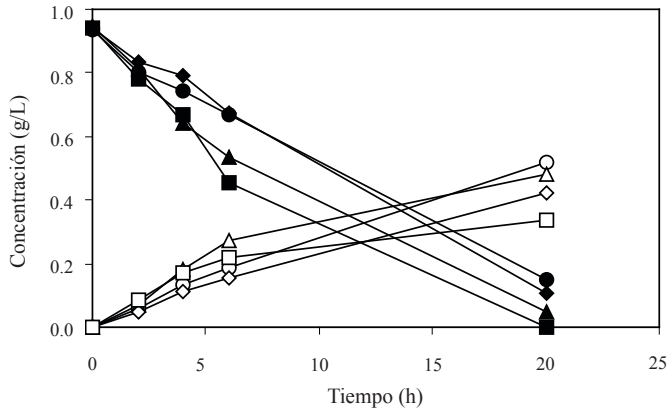
Efecto de la concentración inicial del ácido ferúlico (●); producción de vainillina y (□) consumo de ácido ferúlico después de 2 h de bioconversión por *E. coli* JM109(pBB1) en solución salina M9 suplementada con extracto de levadura. $X_o = 4.9-5.0$ g/L; $T = 30^\circ\text{C}$

De cualquier manera, es posible tener una idea del significado del fenómeno de inhibición observado a través de una comparación con las inhibiciones observadas para otros biosistemas. Mientras que el valor de K_I compara al estimado para la inhibición de la glucosa de la fermentación de hidrolizado de almidón de maíz (Converti y cols., 1986), K_2 en este trabajo es sobre una orden de magnitud más alto. Así, la inhibición del sustrato en la producción de vainillina fue más fuerte que el efecto observado en los sistemas de fermentación comunes, probablemente debido a la imposibilidad de las células no proliferantes de satisfacer los crecientes requerimientos de manutención.

Efecto del reciclaje de biomasa en etapas sucesivas de bioconversión

Es importante, para aplicaciones industriales, evaluar la viabilidad de una posible recuperación y de una reutilización de biomasa. Para este propósito, las células se emplearon en una primera bioconversión de 20 horas, realizada a $C_{F_o} = 0.94$ g/L. Después se centrifugaron, lavaron, y reutilizaron en tres etapas sucesivas de bioconversión. Los principales resultados de estas pruebas (figura 6) no evidencian ninguna pérdida apreciable de la capacidad de las células de convertir el ácido ferúlico a vainillina dentro de las primeras seis horas, incluso después de tres operaciones de reciclaje sucesivas.

Figura 6. I



Influencia de sucesivas operaciones de reciclaje de biomasa en la capacidad de *E. coli* JM109(pBB1) de producir vainillina (símbolos vacíos) a partir de ácido ferúlico (símbolos llenos). Secuencia de bioconversión: (○) 1ª, (△) 2ª, (◇) 3ª, (□) 4ª.

Medio de bioconversión: solución salina M9 suplementada con extracto de levadura. $X_o = 0.94$ g/L; $C_{Fo} = 0.94$ g/L; $T = 30^\circ\text{C}$

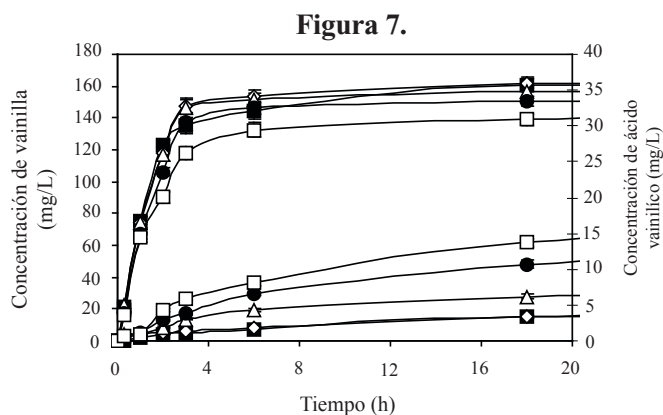
Una estabilidad a largo plazo del biosistema parece confirmar la importancia de sustancias naturales (como el extracto de levadura) como co-substratos esenciales para mantener el metabolismo basal de células recicladas empleadas en bioconversiones que no son sostenidas desde el punto de vista bioenergético (Torre y cols., 2004a). Por el contrario, la concentración de vainillina al final de la bioconversión (cerca de 20 horas) mostró una disminución notable y progresiva (arriba del 35%) en favor de la formación de ácido vainílico. Como previamente propusieron Torre y cols. (2003), esta observación se puede atribuir al aumento progresivo de la actividad oxidásica no específica antes dicha.

De acuerdo a estos resultados, parece razonable concluir que las células recicladas de *E. coli* JM109 (pBB1) podrían ser empleadas provechosamente para la producción de vainillina en continuo o en bioconversiones discontinuas repetidas (Ghigliazza y cols., 1996), a condición de que el tiempo de residencia no sea más largo de seis horas. Para este propósito, los resultados de la figura 5 sugieren que el rendimientos de conversión cercano a 90% o aún más alto se podrían alcanzar solamente usando concentraciones de ácido ferúlico en la alimentación o al principio del ciclo abajo de $C_{Fo} = 0.6$ g/l.

Efecto de la agitación en la bioconversión del ácido ferúlico a vainillina

Para estudiar el efecto de la aireación sobre la producción de vainillina en EF, seguimos un simple protocolo, que fue similar al descrito por Jansen y cols. (1984) para la producción de 2.3-butanodiol y extensamente revisado con respecto a la producción del xylitol por Parajó y cols. (1998a, b), es decir, aumentando simultáneamente la velocidad de agitación de 100 a 200 rpm y disminuyendo la relación entre los volúmenes del medio y del recipiente (V_m/V_f) desde 0.5 a 0.2.

Como se muestra en la figura 7, la concentración de vainillina aumentó progresivamente tanto con el tiempo como con el nivel de aireación hasta un valor de umbral de 160-162 mg/L y después disminuyó a 146 mg/L bajo condiciones excesivamente aerobias ($V_m/V_f = 0.2$ en 200 rpm). En particular, el ácido ferúlico consumido fue casi totalmente bioconvertido a vainillina (0.98 mol/mol) bajo condiciones óptimas ($V_m/V_f = 0.5$; 100 rpm), mientras que este rendimiento mostró una disminución bajo exceso de aireación. Un comportamiento opuesto se observó para el ácido vainílico, que fue producido de todos modos en concentraciones bajas (hasta 9.2 mg/L), bajo aerobiosis intermedia. Como fiable, el alto nivel de aireación asegurado por $V_m/V_f = 0.2$ a 200 rpm causó un aumento de la concentración final de este compuesto, probablemente debido al estímulo de la actividad oxidásica antes dicha. Además, la formación de este producto fue favorecida claramente por el incremento del tiempo de bioconversión.



Conversiones molares de ácido ferúlico en vainillina (datos superiores) y ácido vainílico (datos inferiores) contra el tiempo. Condiciones de bioconversión: (■) $V_m/V_f = 0.5$, 100 rpm (bajo adición de N_2); (◇) $V_m/V_f = 0.5$, 100 rpm; (△) $V_m/V_f = 0.5$, 200 rpm; (●) $V_m/V_f = 0.2$, 100 rpm; (□) $V_m/V_f = 0.2$, 200 rpm; $C_{Fo} = 165$ mg/L; $X_o = 3.0-3.5$ g_{DM}/L; $T = 30^\circ C$

Los resultados de la figura 7 presentados juntos precisan que los mejores resultados de biotransformación se obtuvieron bajo condiciones limitadas de oxígeno ($V_m/V_f = 0.5$, 100 rpm) y condiciones anaerobias (adición de N_2). Sin embargo, la condición anterior podría ser preferible para un sistema donde un cosustrato tiene que ser metabolizado aeróbicamente para mantenerlo energéticamente.

Bioconversiones en continuo

Selección del soporte de inmovilización

Para seleccionar el soporte más apropiado para la producción en continuo de vainillina en columna de lecho fijo, tres diversos materiales porosos, específicamente vidrio poroso, poliuretano y esponja sintética, fueron seleccionados entre los mencionados en la literatura como buenos soportes celulares (Huysman y cols., 1983; Converti, 1994), y después probados por su capacidad en la inmovilización de *E. coli* JM109 (pBB1). Los datos experimentales de estas pruebas de inmovilización se muestran en la tabla 3.

Aunque el vidrio poroso aseguró el rendimiento más alto de atrapamiento celular ($EY = 65\%$ de remoción de la biomasa después de $t_c = 72$ h) así como la concentración más alta de vainillina ($C_v = 0.126$ g/L), mostró, bajo mismas condiciones de atrapamiento, una productividad más baja ($Q_v = 0.013$ g L⁻¹ h⁻¹) a $t_c = 24$ h y $t_i = 6$ h que el poliuretano ($Q_v = 0.020$ g L⁻¹ h⁻¹) y la esponja sintética ($Q_v = 0.019$ g L⁻¹ h⁻¹). Ambos materiales porosos flexibles exhibieron valores interesantes también de C_v (0.091 g/L con poliuretano y 0.080 g/L con esponja sintética), lo que sugiere su uso para la operación en continuo en reactor de células inmovilizadas. Las superficies de respuesta para C_v y Q_v , marcadas seleccionando los tiempos del contacto e incubación como las variables independientes (Torre y cols., 2004b), demostraron que la producción de vainillina podría ser optimizada simultáneamente aumentando t_c y disminuyendo t_p , mientras que una reducción de ambas variables independientes permitiría la maximización de la productividad, sin importar el soporte de inmovilización.

Las tendencias generales de las superficies de respuesta observadas (resultados no mostrados) demostraron que un incremento de t_c ocasionó aumentos del grado de atrapamiento celular y de la concentración de vainillina, y una disminución de la productividad, probablemente debido a la ocurrencia de limitación de la transferencia de masa en el medio de bioconversión. Por lo tanto, la concentración del producto y

productividad más altas se obtuvieron a $t_c = 72$ y 24 horas, respectivamente. Por otra parte, el modelo estadístico mostró que una disminución del tiempo de incubación maximizó simultáneamente C_v y Q_v . El valor óptimo de esta variable independiente para ambas respuestas ($t_i = 6$ h) estaba cerca del detectado para la producción máxima de vainillina por células libres ($t = 4$ h) (Torre y cols., 2003), evidenciando así la ausencia de cualquier limitación del transporte en el medio de incubación.

Tabla 3. Resultados experimentales de las pruebas de inmovilización de células *E. coli* JM109(pBB1) de acuerdo a un diseño 2² factorial central

Pruebas	t_c (h)	t_i (h)	Soporte	EL (%)	C_v (g/L)	Q_v (g L ⁻¹ h ⁻¹)
1	72	42	Poliuretano recirculado	17.6	0.065	0.003
			Esponja sintética	34.0	0.069	0.008
			Vidrio poroso	64.5	0.092	0.004
2	24	6	Poliuretano recirculado	11.3	0.040	0.020
			Esponja sintética	34.7	0.056	0.019
			Cristal poroso	53.0	0.039	0.013
3	24	42	Poliuretano recirculado	11.3	0.033	0.004
			Esponja sintética	34.7	0.058	0.007
			Cristal poroso	53.0	0.000	0.000
4	72	6	Poliuretano recirculado	17.6	0.091	0.005
			Esponja sintética	34.0	0.080	0.005
			Cristal poroso	64.5	0.126	0.005
5	48	24	Poliuretano recirculado	14.3	0.050	0.009
			Esponja sintética	35.4	0.060	0.011
			Cristal poroso	58.6	0.030	0.007

t_c = Tiempo de contacto entre la biomasa y el soporte; t_i = tiempo de incubación de las células; EY = rendimiento del atrapamiento celular; C_v = concentración final de vainillina; Q_v = productividad volumétrica de vainillina.

Con base en estas observaciones, la esponja sintética se eligió como el mejor material para pruebas en continuo porque aseguró los valores más altos de C_v y de Q_v bajo todas las condiciones probadas, además de su disponibilidad comercial y estabilidad a largo plazo (Converti y cols., 1991; Converti, 1994). Los valores del nivel

de significación (p) demostraron (resultados no mostrados) que los modelos matemáticos usados para la optimización de C_V y de Q_V fueron altamente significativos y describieron bien a la región de las variables independientes bajo investigación.

Pruebas a diferentes velocidades de dilución

Las bioconversiones en continuo se llevaron a cabo en una columna de lecho fijo con células atrapadas de *E. coli* JM109(pBB1) en esponja sintética. La concentración inicial de ácido ferúlico permaneció a 0.200 g/L y la velocidad de dilución (D) varió en el rango de 0.011-0.033 h⁻¹.

Se obtuvieron condiciones de estado estacionario a $D = 0.022$ h⁻¹ después de cerca de 150 h, en las cuales la concentración y la productividad volumétrica medias de vainillina fueron $C_V = 0.050$ g/L y $C_V D = 1.10$ mg L⁻¹ h⁻¹, respectivamente.

El ácido ferúlico se consumió apenas parcialmente, siendo que solamente 0.120 g/L fueron detectados en el efluente. Así para mejorar el consumo de sustrato y producción de vainillina, D fue disminuida a 0.011 h⁻¹; aunque el consumo de ácido ferúlico se mejoró (de 0.084 a 0.164 g/L), no fue preferentemente dirigido a la acumulación de vainillina, obteniéndose sólo 0.033 g/L de aldehído producido bajo estas condiciones, correspondiendo a $C_V D = 0.37$ mg L⁻¹ h⁻¹. A velocidades de dilución intermedias ($D = 0.018$ h⁻¹), la concentración y productividad de vainillina fueron $C_V = 0.052$ g/L y $C_V D = 0.93$ mg L⁻¹ h⁻¹ (tabla 4), mientras se consumieron 0.108 g/L de ácido ferúlico.

Tabla 4. Resultados en condiciones de estado estacionario de las bioconversiones en continuo de ácido ferúlico a vainillina realizadas en columna de lecho fijo con células de *Escherichia coli* JM109(pBB1), atrapadas en esponja sintética

D (h ⁻¹)	C_V (g/L)	Y_{VF} (mol/mol)	$C_V D$ (mg L ⁻¹ h ⁻¹)
0 0111	0 033	0 261	0 371
0 0178	0 052	0 671	0 925
0 0222	0 050	0 851	1 10
0 0267	0 030	0 514	0 801
0 0030	0 007	0 069	0 198

D = Velocidad de dilución; C_V = Concentración de vainillina; Y_{VF} = Rendimiento de vainillina; $C_V D$ = Productividad de vainillina.

Desde los resultados del rendimiento molar ($Y_{V/F}$) contra D bajo condiciones en estado estacionario (tabla 4), es evidente que un incremento del tiempo de residencia desde 45 a 90 h logró una fuerte reducción (de 0.851 a 0.261 mol/mol) de la fracción de ácido ferúlico destinado a la producción de vainillina. Es probable que, bajo estas condiciones, el tiempo de residencia fuera tan largo que llevó el sistema a una condición de escasez de co-sustrato (extracto de levadura).

De acuerdo a la hipótesis anterior, el consecuente bajo nivel de acetil-CoA podría llegar a ser insuficiente para mantener la actividad de la feruloil-CoA sintetasa, la primera enzima implicada en la bioconversión de ácido ferúlico a vainillina (Priefert y cols., 2001), por ello, volviéndose el factor limitante del proceso desde el punto de vista bioenergético. Un balance de materia para la fuente de carbono (resultados no mostrados) indicó que una fracción significativa del ácido ferúlico se oxidó completamente a dióxido de carbono; esto sugiere que el microorganismo podría tener activado una respuesta metabólica para enfrentar las condiciones de estrés energético. Como resultado, el microorganismo puede tener expresado una fuerte actividad oxidásica, que ya se propuso en trabajos previos (Torre y cols., 2003), probablemente responsable por la oxidación de una porción significativa de vainillina a ácido vainílico y el consumo subsiguiente de este intermediario a través del ciclo de Krebs. La disminución rápida de $Y_{V/F}$ a $D > 0.022 \text{ h}^{-1}$ puede ser atribuida, en adición a la fácil lavada de las demás células, también por una inhibición por exceso de sustrato de la actividad de una de las enzimas de la ruta de degradación del ácido ferúlico.

Aunque el rendimiento de vainillina en relación con el consumo de ácido ferúlico obtenido en este trabajo fue satisfactorio a $D = 0.022 \text{ h}^{-1}$ ($Y_{V/F} = 0.851 \text{ mol/mol}$), la fracción de sustrato sin convertir fue siempre muy alta. Estos resultados sugieren que el desempeño de la bioconversión se podría mejorar significativamente a través de una mejora de la tecnología de bioconversión, antes de proceder al uso de fuentes naturales de ácido ferúlico.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Educación italiano, Universidad e Investigación (MIUR), PRIN prot. 2004090003.

Bibliografía

- Andreoni, V.; S. Bernasconi; G. Bestetti (1995), "Biotransformation of Ferulic Acid and Related Compounds by Mutant Strains of *Pseudomonas Fluorescens*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: 830-835.
- Barghini, P.; F. Montebove; M. Ruzzi; A. Schiesser (1998), "Optimal Conditions for Bioconversion of Ferulic Acid into Vanillic Acid by *Pseudomonas Fluorescens* BF13 Cells", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 309-314.
- Betts, W. B.; R. K. Dart (1988), "Screening of Fungi and Bacteria for Their Ability to Degrade Insoluble, Lignin-Related Aromatic Compounds", *Microbios.* 55: 85-93.
- Blatny, J. M.; T. Brautaset; H. C. Winther-Larsen; K. Haugan; S. Valla (1997), "Construction and Use of a Versatile Set of Broad-Host-Range Cloning and Expression Vectors Based on the RK2 Replicon", *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 370-379.
- Brock, T. D.; M. D. Madigan; J. M. Martinko; J. Parker (1995), *Microbiología*, Milán, Città Studi Edizioni.
- Burri, J.; M. Graf; P. Lambelet; J. Löiger (1989), "Vanillin: More than a Flavouring Agent-A Potent Antioxidant", *J. Sci. Food Agric.* 48: 49-56.
- Cheetham, P. S. J. (1993), "The Use of Biotransformations for the Production of Flavours and Fragrances", *Trends Biotechnol.* 11: 478-488.
- _____ (1997), "Combining the Technical Push and the Business Pull for Natural Flavours", *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 55: 1-49.
- Ciftci, C.; A. Constantinides; S. S. Wang (1983), "Optimization of Conditions and Cell Feeding Procedures for Alcohol Fermentation", *Biotechnol. Bioeng.* 25: 2007-2023.
- Converti, A. (1994), "Large Pore-Matrices in Continuous Fermentation Processes", *Mat. Eng.* 5: 473-492.
- _____; P. Perego; M. Del Borghi; F. Parisi; G. Ferraiolo (1986), "Kinetic Considerations About the Study of Alcoholic Fermentations of Starch Hydrolysate", *Biotechnol. Bioeng.* 28: 711-717.
- _____; M. Del Borghi; C. Sommariva (1991), "Ethanol Production in an Entrapped Yeast Cell Column", *Chem. Eng. J.* 47: B1-B10.
- Davidson, P. M.; A. S. Naidu (2000), "Phyto-phenols", en A. S. Naidu (ed.), *Natural Food Antimicrobial Systems*, CRC Press LLC, Boca Raton, Londres, pp. 265-294.
- Ghigliazza, R.; A. Lodi; A. Converti; C. Nicolella; R. Rovatti (1996), "Influence of the Ratio of the Initial Substrate Concentration to Biomass Concentration on the Performance of a Sequencing Batch Reactor", *Bioproc. Eng.* 14: 131-137.
- Gould, G. W. (1996), "Industry Perspectives on the Use of Natural Antimicrobials and Inhibitors for Food Applications". *J. Food Protection*, suplemento: 82-86.

- Gurujeyalakshmi, G.; A. Mahadevan (1987), "Dissimilation of Ferulic Acid by *Bacillus Subtilis*", *Curr. Microbiol.* 16: 69-73.
- Hagedorn, S.; B. Kaphammer (1994), "Microbial Biocatalysis in the Generation of Flavour and Fragrance Chemicals", *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 773-800.
- Häusler, A.; T. Münch (1997), "Microbial Production of Natural Flavors", *ASM News* 63: 551-559.
- Hocking, M. B. (1997), "Vanillin: Synthetic Flavouring from Spent Sulfite Liquor", *J. Chem. Educ.* 74: 1055-1059.
- Huysman, P.; P. van Meenen; P. van Assche; W. Verstraete (1983), "Factors Affecting the Colonization of Non Porous and Porous Packing Materials in Model Upflow Methane Reactors", en *Proc. Eur. Symp. on Anaerobic Waste Water Treatment*, Holanda, Noordwijkerhout: 187.
- Jansen, N. B.; M. C. Flickinger; G. T. Tsao (1984), "Production of 2,3-butanediol from D-xylose by *Klebsiella Oxytoca* ATCC 8724", *Biotechnol. Bioeng.* 26: 362-369.
- Kirk, T. K. (1971), "Effects of Microorganisms on Lignin", *Annu. Rev. Phytopatol.* 9: 185-210.
- Krings, U.; R. G. Berger (1998), "Biotechnological Production of Flavours and Fragrances", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 1-8.
- Lomascolo, A.; C. Stentelaire; M. Asther; L. Lesage-Meessen (1999), "Basidiomycetes as New Biotechnological Tools to Generate Natural Aromatic Flavours for the Food Industry", *Trends Biotechnol.* 17: 282-289.
- Montgomery, D. C. (2001), *Design and Analysis of Experiment*, quinta ed., Nueva York, Wiley.
- Muheim, A.; K. Lerch (1999), "Towards a High-Yield Conversion of Ferulic Acid to Vanillin", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 456-461.
- Müller, B.; T. Münch; A. Muheim; M. Wetli (1998), *Process for the Preparation of Vanillin*, European Patent 0885968.
- Murray, W. D.; S. J. B. Duff; P. H. Lanthier; D. W. Armstrong; F. W. Welsh; R. E. Williams (1998), "Development of Biotechnological Processes for the Production of Natural Flavours and Fragrances", en G. Charalambous (ed.), *Frontiers of Flavor*, Amsterdam, Elsevier: 1.
- Narbad, A.; M. J. Gasson (1998), "Metabolism of Ferulic Acid to Vanillin Using a Novel CoA-Dependent Pathway in a Newly-Isolated Strain of *Pseudomonas Fluorescens*", *Microbiology* 144: 1397-1405.
- Parajó, J. C.; H. Domínguez; J. M. Domínguez (1998a), "Biotechnological Production of Xylitol, part 2: Operation in Culture Media Made With Commercial Sugars", *Biores. Technol.* 65: 203-212.

- _____; H. Domínguez; J. M. Domínguez (1998b), “Biotechnological Production of Xylitol, part 3: Operation in Culture Media Made from Lignocellulose Hydrolysates”, *Biores. Technol.* 66: 25-40.
- Priefert, H.; J. Rabenhorst; A. Steinbüchel (2001), “Biotechnological Production of Vanillin”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 296-314.
- Rabenhorst, J. (1996), “Production of Methoxyphenol-Type Natural Aroma Chemicals by Biotransformation of Eugenol with a New *Pseudomonas sp.*”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 470-474.
- _____; R. Hopp (1997), “Process for the Preparation of Vanillin and Suitable Microorganisms”, **European Patent 0761817**.
- Ramachandra, Rao S.; G. A. Ravishankar (2000), “Vanilla Flavour: Production by Conventional and Biotechnological Routes”, *J. Sci. Food Agric.* 80: 289-304.
- Rosazza, J. P. N.; Z. Huang; L. Dostal; T. Volm; B. Rousseau (1995), “Review: Biocatalytic Transformations of Ferulic Acid: An Abundant Aromatic Natural Product”, *J. Ind. Microbiol.* 15: 457-471.
- Sambrook, J.; E. F. Fritsch; T. Maniatis (1989), *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2a. ed., Cold Spring Harbor, Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schlegel, H. G. (1996), *Microbiologia*, Milán, Zanichelli.
- Schreier, P. (1992), “Bioflavours: an Overview”, en R. L. S. Patterson; B.V. Charlwood; G. MacLeo; A. A. Williams (eds.), *Biotrasformation of Flavours*, Cambridge, The Royal Society of Chemistry, p. 1.
- Sutherland, J. B.; D. L. Crawford; A. L. Pometto III (1983), “Metabolism of Cinnamic, *p*-coumaric and Ferulic Acids by *Streptomyces Setonii*”, *Can. J. Microbiol.* 29: 1253-1257.
- Torre, P.; C. Guarino; A. Converti; P. Barghini; M. Ruzzi; S. Sato (2003), “Effects of Temperature and Starting Substrate Concentration on Ferulate-to-Vanillin Bioconversion by *Escherichia Coli* JM109(pBB1)”, *Farmácia e Química*, São Paulo, Brasil, 36(3): 39-42.
- _____; D. De Faveri; P. Perego; A. Converti; P. Barghini; M. Ruzzi; F. P. Faria (2004a). “Selection of Co-Substrate and Aeration Conditions for Vanillin Production by *Escherichia Coli* JM109/pBB1”, *Food Technol. Biotechnol.* 42:193-196.
- _____; D. De Faveri; P. Perego; M. Ruzzi; P. Barghini; R. Gandolfi; A. Converti (2004b), “Bioconversion of Ferulate into Vanillin by *Escherichia Coli* JM109/pBB1 in an Immobilized-Cell Reactor”, *Annals Microbiol.* 54: 517-527.
- Williamson, G.; P. A. Kroon; C. B. Faulds (1998), “Hairy Plant Polysaccharides: A Close Shave with Microbial Esterases”, *Microbiology* 144: 2011-2023.

**Probióticos en el comportamiento de pollos
de engorda en la fase de iniciación**
*Probiotics on Performance of Broiler Chickens
in the Starter Phase*

*Martínez-González, J. C.¹; Martínez-Herrera, F.;
Soto-Castillo, J. J.; Castillo-Rodríguez, S. P.*

Resumen

El presente trabajo de investigación se realizó en la Unidad Avícola Experimental de la UAM Agronomía y Ciencias de la Universidad Autónoma de Tamaulipas en Cd. Victoria, Tamaulipas, México. El objetivo fue evaluar el efecto de la adición de un probiótico (Progain®), sobre el comportamiento de pollos de engorda en la fase de iniciación. Se utilizaron 100 pollos, de una línea comercial sin sexar. Se colocaron en una criadora tipo batería durante la primera semana y se proporcionó alimento y agua ad libitum, además de la adición de 60 ml de Progain/día/100 pollos en el agua (periodo de adaptación). Los pollos se vacunaron contra el Newcastle. La duración del experimento fue de cuatro semanas y se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con cuatro tratamientos (I = Testigo; sólo agua natural; II = Progain 10; III = Progain 15; y IV = Progain 20) y cinco repeticiones por tratamiento. Los pollos se dividieron en grupos de cinco por peso. Las variables evaluadas fueron ganancia de peso semanal, ganancia de peso total y peso vivo mediante el análisis de varianza para el diseño antes descrito. No se encontró efecto significativo ($P > 0.05$) de los tratamientos para ganancia de peso en la primera, segunda y tercera semana. Sin embargo, en la ganancia total y final se observaron efectos significativos ($P < 0.05$)

¹ Unidad Académica Multidisciplinaria Agronomía y Ciencias de la Universidad Autónoma de Tamaulipas; Centro Universitario Victoria, Apartado Postal 149, Ciudad Victoria, Tamaulipas, México, e-mail: jmartinez@uat.edu.mx

de los tratamientos. La ganancia de peso en la primera, segunda, tercera y cuarta semana fueron 88.3, 214.6, 229.0 y 320.8 g/semana, respectivamente. Mientras que las ganancias totales fueron 861.4, 847.6, 799.0 y 905.2 g para los tratamientos I, II, III y IV, respectivamente.

Abstract

The present work was carried out in the Experimental Poultry Unit of the UAM Agronomía y Ciencias of the Universidad Autónoma de Tamaulipas in Cd. Victoria, Tamaulipas. The objective was to evaluate the effect of adding probiotic (Progain®), on the performance of broilers chickens on starter phase. 100 chickens of a commercial line without sex were used. The chicks were placed in a battery during the first week and received concentrate and water *ad libitum*. 60 ml of Progain/day/100 chickens were added into the water (adaptation period). The chickens were vaccinated against the Newcastle. The experiment had four weeks of duration. The experimental design was completely randomized, with four treatments (I = Control; only natural water; II = Progain 10; III = Progain 15; and IV = Progain 20) and five repetitions for treatment. The chickens were divided in five groups for weight. The variables evaluated were gained weekly weight, total gained weight; and body weight by analysis of variance for the design described. There was not significant effect ($P > 0.05$) of the treatments for gained weight in the first, second and third week. However, in the total and final gained weight the treatments were significant ($P < 0.05$). The averages of weight in the first, second, third and quarter week were 88.3, 214.6, 229.0 and 320.8 g/week, respectively. While total gained weight was 861.4, 847.6, 799.0 and 905.2 g for the treatments I, II, III and IV, respectively.

Introducción

En la actualidad, México afronta una demanda cada vez más creciente de alimentos de origen animal y vegetal para consumo humano, por lo que la producción de alimentos es uno de los mayores problemas que enfrenta el sector agropecuario. Además, existe un desequilibrio entre la producción de alimentos y el crecimiento demográfico, lo que obliga a realizar investigaciones para aumentar la producción de alimentos, buscando en un principio satisfacer las demandas actuales y asegurar la autosuficiencia.

Asimismo, la proteína de origen animal (carne, leche y huevos) se ha convertido en una parte importante de la dieta del ser humano y su producción se debe incrementar. La forma más sencilla de lograrlo es alimentar a los animales con granos y concentrados. Sin embargo, esto cada día se dificulta más en países como México,

donde la competencia por estos alimentos por parte de la población humana hace prácticamente imposible su uso.

En México, la avicultura enfrenta un periodo de crisis debido a los altos costos de producción, principalmente en el rubro de alimentación (Cuca y Avila, 1982), ya que está representa más del 60% de los costos totales de la producción. Solucionar este aspecto, sin menoscabo de la productividad, ha motivado la búsqueda de diversas alternativas. Dentro de las cuales se pueden señalar los aditivos alimenticios. Como aditivo alimenticio se entiende cualquier sustancia o mezclas de sustancias que están presentes en el alimento; este aditivo puede ser nutritivo o no nutritivo, fisiológicamente activo o inerte, estar intencionalmente y provocar algunos cambios en el individuo (Saldaña, 1984). Khajareen y otros autores (1983) proponen cuatro mecanismos para explicar el efecto estimulante en el crecimiento de los aditivos alimenticios: *a)* se suprimen los microorganismos responsables de la infección leve no reconocible; *b)* se reduce la producción de toxinas microbianas depresoras del crecimiento; *c)* los agentes antimicrobianos reducen la destrucción microbiana de los nutrientes esenciales en el canal gastrointestinal; y *d)* hay un aumento en la eficiencia de la absorción y utilización de los nutrientes. Entre estos compuestos se incluyen los reguladores del crecimiento, los anabólicos, los promotores del crecimiento, las enzimas, los ionóforos, los antibióticos, los probióticos, ácidos orgánicos, agentes de repartición, etc.

El crecimiento animal requiere de un alimento que esté correlacionado con la masa corporal total, para que corresponda a un incremento de los tejidos y órganos individuales. Los cambios de peso corporal se asocian íntimamente con las alteraciones del metabolismo de las proteínas. Los productos que ejercen una influencia sustancial y directa sobre el crecimiento pueden clasificarse como reguladores del crecimiento.

En la actualidad, varios fármacos y un gran número de productos de fermentación se están vendiendo para su uso en los animales de granja, atribuyéndoles la virtud de estimular el desarrollo o mejorar de algún modo la salud y el rendimiento del animal. Un uso extensivo de los andrógenos, estrógenos, progestágenos y hormonas del crecimiento tiene lugar para estimular el desarrollo y engorde de los animales productores de carne.

Recientemente con la posibilidad de encontrar residuos antimicrobianos o anabólicos en la carne, se ha dirigido la atención de los productores a las sustancias promotoras del crecimiento que se utilizan en la producción animal, a su modo de acción y aún más, a los aspectos de salud relacionados al uso de estas sustancias (Henrique, 1998). Los promotores de crecimiento (olaquinox, lasolacida, monensina, etc.) han sido objeto de estudios intensivos desde que fueron introducidos por primera vez a la

ganadería. Los promotores del crecimiento disminuyen la población de las bacterias intestinales de las aves que causan una disminución en el rendimiento. Las aves libres de patógenos crecen más rápido con más eficiencia, por lo que no respondieron a la acción de los promotores de crecimiento. En cambio los pollitos convencionales tenían un rendimiento casi igual al de los pollitos libres de patógenos cuando se les administró los promotores de crecimiento (Walton, 1982).

Los antibióticos se utilizan comúnmente en el nivel subterapéutico para promover el crecimiento, mejorar la conversión de alimento, reducir la mortalidad y para mejorar la eficiencia reproductiva. Si bien los antibióticos no pueden corregir errores en la alimentación o en la explotación, su acción será en todo caso tanto más eficaz, cuanto más bajo sea el nivel sanitario de la explotación. Esto debido a las diferentes maneras como actúan los antibióticos, que como sugieren McDonald y otros autores (1973), reducen o eliminan la actividad de los gérmenes patógenos que causan “infecciones subclínicas”; eliminan las bacterias del animal; estimulan el crecimiento de los microorganismos que sintetizan nutrientes conocidos o no identificados; reducen el crecimiento de los microorganismos que compiten con el huésped por los nutrientes y aumentan la capacidad de absorción del intestino.

Por otro lado, en todo el mundo hay preocupación por los problemas de residuos químicos en la carne, leche y huevos; lo que ha creado el deseo de buscar alternativas para sustituir a los antibióticos y ciertas hormonas (Henrique, 1998). Es probable que los probióticos desempeñen un papel muy importante para eliminar el problema de los residuos químicos (Wren, 1989). Aunque el concepto probiótico no ha sido definido completamente se sabe que son preparaciones de bacterias y levaduras que son utilizadas para el control de enfermedades y mayor productividad en los animales. Examinando las evidencias actuales se puede afirmar que los probióticos no serán capaces de reemplazar completamente los antibióticos u otras sustancias químicas, pero ellos pueden ayudar a reducir considerablemente el uso de estos compuestos químicos (Wren, 1989). La adición de probióticos en el alimento de aves es una alternativa para mejorar la utilización del mismo y así reducir los costos de producción (Hoyos, 1987; Males y Jonhson, 1990; Fatec, 1997). Los probióticos ayudan a establecer un equilibrio satisfactorio de microorganismos gastrointestinales y a formar sustancias que mejoran este equilibrio (Esminguer y Olentine, 1980).

Los probióticos optimizan el proceso de digestión de manera natural, favoreciendo la flora intestinal y/o digestiva. Los beneficios del uso de los probióticos en los pollos son: mayor ganancia de peso y mejor condición de salud.

En otro orden, las acciones benéficas de la utilización de probióticos en la nutrición animal incluyen (Hoyos, 1987; Cromwell *et al.*, 1991):

1. Cambio de flora microbiana y reducción de *E. Coli*.
2. Síntesis de lactato con subsiguiente reducción de Ph digestivo.
3. Colonización del canal digestivo.
4. Producción de sustancias antibióticas.
5. Reducción de grupos aminotóxicos y niveles de amonía en el canal gastrointestinal y sangre.
6. Estimulan la flora natural.
7. Mejor digestión, mejor aprovechamiento y asimilación de la ración.
8. Reducción de diarrea y menor mortalidad.

Sin embargo, Pollman (1986) señala que existen efectos negativos como:

1. Competencias de nutrientes con organismos del canal digestivo.
2. Disminución de la utilización de carbohidratos.

El probiótico es un producto que está hecho a base de microorganismos vivos y que se utiliza como aditivo en la alimentación animal o bien en aplicaciones para la conservación de alimentos, como es el caso de los ensilajes (Hoyos, 1987; Wren, 1989; Males y Jonhson, 1990). El probiótico (Progain®) es un producto natural y seguro para todo tipo de ganado, aumenta la digestión de los alimentos, ayudando al sistema del animal a aprovechar más completamente la proteína y otros nutrientes, promueve el crecimiento rápido y/o reduce el consumo de alimento. Se recomienda para aves, marranos, caballos, vacas y becerros, carneros, chivos, conejos, etc. El probiótico se emplea en animales débiles y enfermos para darle fuerza y prevenir pérdidas. Las principales ventajas de este producto son: aumento de peso rápido; mejora de sabor y calidad de la canal; reducción de consumo de alimento; aumento de producción y huevos; disminución de tiempo de engorda; reducción de problemas sanitarios y las aves son más vigorosas y alertas (anónimo, s/f).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de diferentes dosis de un probiótico (Progain®) en el agua de bebida de pollos de engorda en la etapa de iniciación y su efecto sobre la ganancia de peso semanal.

Materiales y métodos

La presente investigación se llevó a cabo en la Nave Avícola Experimental de la Unidad Académica Multidisciplinaria Agronomía y Ciencias de la Universidad Au-

tónoma de Tamaulipas, en Cd. Victoria, Tamaulipas, localizada a 23°42'58" LN y 99°09'14" LO y a 330 m sobre el nivel del mar (INEGI, 2005).

Antes de realizar el experimento la nave fue limpiada, desinfectada con una solución yodada (Isodine) y las paredes fueron quemadas y encaladas. Además, las baterías y todos los materiales que se utilizaron en esta investigación fueron debidamente lavados y desinfectados con una solución yodada (Isodine).

Se utilizaron 100 pollos de engorda de una línea comercial sin sexar; los cuales fueron colocados en una criadora tipo batería durante la primera semana y se les proporcionó alimento y agua a libre voluntad, además de la adición de 60 ml de Progain/día en el agua, por cada 100 pollos (periodo de adaptación), también la primera semana se les aplicó la vacuna contra el Newcastle. El alimento suministrado fue de una marca comercial elaborado para pollos de engorda en la etapa de iniciación (22% PC) y se ofreció *ad libitum*.

Para el presente experimento se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos y cinco repeticiones por tratamiento; las unidades experimentales consistieron en grupos de cinco pollitos, procurando que fuesen los más homogéneos en cuanto a peso.

El trabajo tuvo una duración de cuatro semanas con un periodo de adaptación de una semana. Los tratamientos estudiados en el presente trabajo fueron: I = Testigo, sólo agua natural; II = Progain 10; 1.87 ml de Progain en el agua; III = Progain 15; 3.75 ml de Progain en el agua; y IV = Progain 20; 5.62 ml de Progain en el agua.

La dosificación se realizaba diariamente para lo cual se diluía el probiótico en el agua de bebida, buscando que los pollos en cada tratamiento consumieran en su totalidad el tratamiento (suministro de agua dos veces al día).

Las variables que se midieron fueron: ganancia de peso semanal, ganancia de peso total y peso final, para lo cual se pesaron las aves semanalmente en una báscula electrónica. La evaluación de los datos se realizó mediante el análisis de varianza, descrito para el diseño antes mencionado (Cochran y Cox, 1981).

Resultados y discusión

Ganancia de peso semanal

En el presente experimento la ganancia de peso en la primer semana durante la etapa de iniciación de pollos de engorda de una línea comercial fue de 88.3 g, la cual puede ser considerada como baja debido a que los pollitos durante este tiempo deberían

tener una ganancia aproximada de 125 g (NRC, 1984). Asimismo, Castillo (1987), Castillo (1987a), Vásquez (1986) y Romero (1986) mencionan que los pollos a una semana de edad tenían un peso de aproximado de 110 g. En otros trabajos Progain mostró aumentar la eficiencia de alimentos en 20 a 25% sobre el testigo y en granjas comerciales para la producción de pollos en engorda Progain ha aumentado el peso de 37 a 42% más que el testigo (anónimo, s/f).

No se observaron efectos ($P > 0.60$) del tratamiento sobre la ganancia de peso en la primer semana. Similarmente, Dueñes (1997) y Legorreta (1996) mencionan que la ganancia de peso no se afectó por la adición de un probiótico (Probios 180R) en el alimento de pollos de engorda. En el cuadro 1 se presentan las medias de ganancia de peso semanal por tratamiento, en el que se puede observar que los pollos que recibieron el tratamiento con media dosis de la recomendación comercial ganaron más peso que aquellos del tratamiento comercial (95.8 vs 82.6 g), sin que se observaran diferencias significativas ($P > 0.05$).

Igualmente, los tratamientos con Progain no afectaron ($P > 0.05$) las ganancias de peso en la segunda y tercera semana, pero sí en la cuarta semana tal y como se puede observar en el cuadro 1.

Cuadro 1. Ganancia de peso semanal de pollos alimentados con una dieta con Progain durante la fase de iniciación

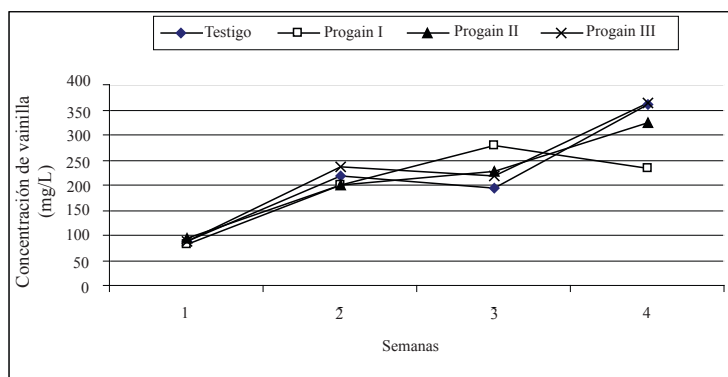
<i>Tratamiento</i>	<i>Semanas</i>				
	<i>N</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Testigo	5	88.0	216.4	194.6	361.8a*
Progain 10	5	95.8	201.0	226.4	323.8a*
Progain 15	5	82.6	202.4	278.6	234.4b*
Progain 20	5	86.8	238.6	216.4	363.2a*
Total	20	88.3	214.6	229.0	320.8

*a,b son diferentes ($P < 0.05$).

En el cuadro 1 se presentan las medias de ganancia de peso correspondientes a las semanas de estudio, donde se observa que no existen tendencias lineales en cuanto al comportamiento de los animales con relación a los tratamientos (figura 1). Debido a que los pollos que recibieron algún tratamiento con probiótico, mostraron comportamientos inconstantes a través del periodo de estudio, inclusive fueron superados por los del grupo testigo. Lo cual está en contra de lo que se cita en la literatura (Hoyos,

1987; Wren, 1989; anónimo, s/f), donde se menciona que la utilización de los probióticos mejora la ganancia de peso hasta en un 25% con relación al testigo.

Figura 1. Ganancia de peso por semana de pollos tratados con un probiótico (Progain) en el agua de bebida durante la fase de iniciación



Sin embargo, en la cuarta semana se observaron efectos significativos ($P < 0.06$) del tratamiento sobre la ganancia de peso correspondiente a esa semana. Cabe destacar que la media general de ganancia de peso fue de 320g, la cual es inferior a la mencionada por Castillo (1987a) y la NRC (1984). Asimismo, en el cuadro 1, se puede observar que los pollos que recibieron el tratamiento de la dosis comercial fueron los que mostraron el peor comportamiento (234 g), mientras que los pollos con el tratamiento de 1.5 dosis comercial alcanzaron una ganancia de 363 g.

Ganancia de peso total

En el presente experimento, la media general para la ganancia de peso total durante la fase de iniciación para pollos de engorda de una línea comercial fue de 920.8 g, la cual es similar a la mencionada por Vásquez (1986), quien encontró una media de ganancia de peso total de 916.0 g; sin embargo, este valor se puede considerar como bajo, debido a que la NRC (1984) señala que los pollos de engorda a la cuarta semana deben tener un peso medio de 1 100 g, como lo reportaron Romero (1986) y Khajarnern y otros autores (1983).

En el cuadro 2 se presentan las medias de ganancia de peso total por tratamiento. Se observa que los pollos con el tratamiento II (dosis comercial de Progain) fueron los que mostraron la menor ganancia total de peso (799 g), mientras que los pollos que recibieron el tratamiento III (Progain 1.5) alcanzaron una ganancia de 905 g.

Cuadro 2. Medias de ganancias de peso total y final de pollos en la etapa de iniciación tratados con un probiótico en el agua de bebida

<i>Tratamientos</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	
		<i>Peso total</i>	<i>Peso final</i>
Testigo	5	861.4ab*	931.0ab*
Progain 1 (7.5 Ml)	5	847.6ab*	912.2ab*
Progain 2 (15.0 Ml)	5	799.0b	867.2b
Progain 3(22.5 Ml)	5	905.2a	972.6a
Total	20	853.3	920.0

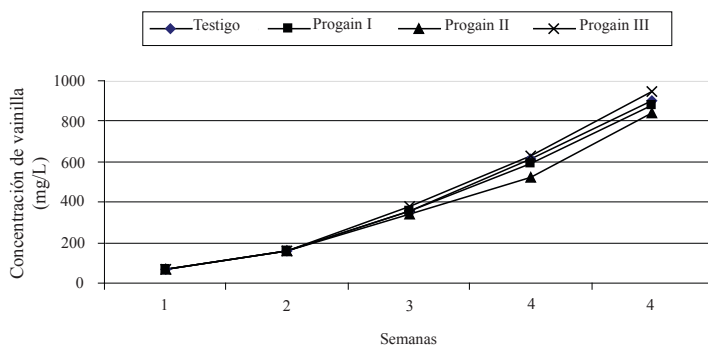
*ab son diferentes (P<0.05)

Peso final

En cuanto a la media general para peso final en este experimento fue de 920.8 g, la cual se puede considerar baja, con relación a la encontrada por Castillo (1987), quien obtuvo una ganancia de peso final durante la etapa de iniciación de 1 106 g. Este autor menciona que los pollos que recibieron el promotor de crecimiento (olaquinox) ganaron más peso (+47 g) que los testigos. En el cuadro 2 se observan las medias por tratamiento, donde se aprecia que los pollos con el tratamiento II (Progain a dosis comercial) fueron los que tuvieron el menor peso final (867 g), mientras que los pollos del tratamiento III (Progain a 1.5 dosis comercial) mostraron el mayor peso final con 972.6, lo que representó una ganancia de 12%. Estos resultados son contradictorios a los mencionados por Hoyos (1987) y Wren (1989), quienes señalan que los animales que reciben probióticos tienen un mejor comportamiento que los del grupo testigo, situación que en este experimento no sucedió.

En la figura 2 se presentan las ganancias de peso por semana para la fase de iniciación.

Figura 2. Ganancia de peso semanal de pollos tratados con un probiótico (Progain) en el agua de bebida durante la fase de iniciación



Conclusiones

Bajo las condiciones del presente trabajo se concluye que la adición del probiótico Progain no mejoró la ganancia semanal de peso de los pollos. Solo se observó que el probiótico mejora la ganancia de peso final y total, pero de manera inconstante.

Es necesario realizar mayor investigación, buscando la manera de controlar otras variables como son consumo de alimento, conversión alimenticia, mortalidad, etc., para determinar la utilidad del uso de los probióticos.

Bibliografía

- Anónimo (s/f), *Progain*. Garden World Products, Laredo, Texas.
- Castillo C., S. (1987), “Antibióticos y olaquinox como promotores de crecimiento en pollos de engorda.”, *Seminario de Investigación II*, Cd. Victoria, Tamaulipas, Facultad de Agronomía-UAT: 23.
- Castillo R.; S. P. (1987a), “Niveles de olaquinox en la alimentación de pollos de engorda en la etapa de iniciación”, *Seminario de Investigación II*, Cd. Victoria, Tamaulipas, Facultad de Agronomía-UAT: 28.
- Chochran, W. G.; G. M. Cox (1981), *Diseños experimentales*, México, UATHEA.
- Cromwell, G. L. (1989), *Industria Porcina*. Department of Animal Sciences, University of Kentucky: 7-9.

- Cuca, M.; E. Ávila (1982), *La alimentación de las aves de corral*, Chapingo, México, Colegio de Postgraduados-ENC-INIP-SAG.
- Dueñas, J. J., S. P. Castillo, J. J. Soto; J. C. Martínez (1997), “Lactobacilos en la alimentación de pollos de engorda”, *Memorias, XXVI Reunión de la Asociación Mexicana de Producción Animal*, Chapingo, México: 189-192.
- Esminger, M. E.; C. G. Olentine (1990), *Alimentos y nutrición de los animales*, Buenos Aires, Argentina, El Ateneo.
- Fatec. (1997), “Fatec. Probiótico Calsporin”, *Boletín Informativo*, São Paulo 12 p.
- Henrique A. P. F. (1998), *Efeito de probióticos, antibióticos e ácidos orgânicos e suas combinações sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte. [dissertação]*, Pirassununga, São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos.
- Hoyos, G. (1987), *Probiótico: Tecnología de Vanguardia en Síntesis Porcina* 6:33-39.
- INEGI (2005), *Anuario estadístico del estado de Tamaulipas, edición 2005*, Aguascalientes, Ags., Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática: 289.
- Khajareem, S. J. M.; Bunsidhi D.; Yodserance S. (1983), “Los efectos promotores de Bayo-n-ox, la lincomicina y el ácido arsenílico en pollos de engorda”, *Boletín Informativo*, México, Bayer de México, S. A.
- Legorreta, C. R., J. Dueñas, L.; J. C. Martínez, G. (1996), “Probióticos en la alimentación de pollos de engorda en la fase de iniciación”, *Memoria. VIII Encuentro Regional de Investigación Científica del Golfo de México*, Cd. Victoria, Tamps., Academia Tamaulipeca de Investigación Científica y Tecnológica: 155 (resumen).
- Males, J. R.; B. Johnson (1990), “Probiotics- What are they? What do they do?”, *J. Anim. Sci.* 68 (suppl. 1):504 (abstract).
- McDonald, P. R. A. Eduards; J. F. D. Greenhalg (1973), *Nutrición Animal*, Zaragoza, Acribia: 414-418.
- NRC (1984), *Nutrient Requeriments of Poultry*, National Research Council, Washington, D.C., National Academy Press.
- Pollman, D. S. (1986), “Probiotics in Pig Diets”, W. Haresing, D. J. Cole (eds.), *Recent Advances in Animal Nutrition*, Londres, Butterworths.
- Romero, V.G. (1986), “Sustitución de un concentrado comercial por pulpa de cítricos y/o melaza en raciones para pollos de engorda”, *Seminario de investigación II*, Facultad de Agronomía-UAT. Cd. Victoria, Tamaulipas, Facultad de Agronomía-UAT: 28.
- Saldaña, G. G. A. (1984), “Digestibilidad *in vivo* de raciones completas que incluyen diferentes niveles de monensin”, *Seminario de Investigación II*, Cd. Victoria, Tamps., Facultad de Agronomía-UAT: 35.

- Vázquez, C. J. (1986), “Diferentes niveles de olaquinox en pollos de engorda”, *Seminario de Investigación II*, Cd. Victoria, Tamaulipas, Facultad de Agronomía-UAT, p. 28.
- Walton, J. R. (1989), *Industria Porcina*, Chester High Road, Neston, Wirral, Reino Unido, Departamento de Ciencias Veterinarias, Universidad de Liverpool: 6-10.
- Wren, W. B., (1989), *Probióticos. Programas prácticos para ganado*, Large Animal Veterinary.

Aplicación de la biotecnología para utilización de lignocelulosa y avances sobre bioproducción de xilitol

Application of Biotechnology for Utilization of Lignocellulose and Advances on Xylitol Bioproduction

*Silva, S. S.^{*1}; Cunha, M. A. A.¹; Santos, J. C.¹; Carvalho, W.¹;
Sarrouh, B. F.¹; Branco, R.¹; Coelho, T.C.¹; Santos, D. T.¹; Campos, J. R.²*

Resumen

El uso de biomasa renovable como sustrato en procesos biotecnológicos es una alternativa sostenible y adecuada que permite la producción de nuevos alimentos, productos químicos y farmacéuticos evitando el daño al medio ambiente. Brasil es un país conocido por su gran cantidad de recursos renovables, tales como el bagazo de caña de azúcar generado a partir de las industrias azúcar-alcohol. Esta biomasa puede ser utilizada de forma exitosa en varios bioprocesos para la obtención de productos de alto valor agregado como el xilitol. El xilitol es un alcohol de azúcar anticariogénico con importantes propiedades tecnológicas y biomédicas. La producción microbiana de xilitol usando residuos lignocelulósicos como sustrato constituye un desafío para la biotecnología moderna y goza de varias ventajas económicas en comparación con los procesos químicos convencionales. En este sentido, el grupo de investigación ha centrado sus esfuerzos en diferentes estrategias para la bioproducción de xilitol a partir del bagazo de caña de azúcar, incluyendo estudios con células inmovilizadas que utilizan diferentes soportes y biorreactores.

* e-mail: silvio@debiq.faenquil.br

¹ Facultad de Ingeniería Química de Lorena-Faenquil, Departamento de Biotecnología, Rodovia Itajubá-Lorena km 74.5-12600-000, Lorena, São Paulo, Brasil.

² Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Boulevardd. E.C.Glez. 1201, col. Jardín, C.P. 89840, México, Cd. Mante, Tamaulipas, C.P. 89840.

Abstract

The use of the renewable biomass as substrate in biotechnological processes is a sustainable and good alternative which to allow the production of new foods, chemicals and pharmaceuticals without environmental damage. Brazil is well known as a country with wide renewable resources such as sugarcane bagasse generate by sugar-alcohol industries. This biomass can be successful used in several bioprocesses for obtaining of high aggregate value products like xylitol. Xylitol is a sugar-alcohol anticariogenic with important technological and biomedical properties. The microbial production of xylitol using lignocellulosic residues as substrate is a challenge for the modern biotechnology and has several economic advantages in comparison with the conventional chemical process. In this way, our research group has dedicated efforts in different strategies for xylitol bioproduction from sugarcane bagasse, including studies with immobilized cells utilizing different supports and bioreactors.

Introducción

El uso de recursos renovables conlleva amplias implicaciones en el mundo actual. La biomasa celulósica tiene gran importancia en el impacto medioambiental, en relación con su deterioro, el calentamiento global y el cambio climático. De hecho, actualmente la agricultura en general está aumentando y deben de desarrollarse nuevos procesos tecnológicos compatibles con la sostenibilidad energética. En este sentido, el uso de recursos renovables en los procesos tecnológicos resulta fundamental para generar nuevos alimentos y energías. El uso de biomasa renovable como sustrato en procesos biotecnológicos es una alternativa adecuada y sustentable. Brasil está reconocido como un país con potenciales recursos renovables como es el caso del bagazo de caña de azúcar. Este residuo agroindustrial se genera a partir de las industrias del alcohol de azúcar y representa una importante biomasa con posibilidades de ser utilizada en procesos biotecnológicos. Esta biomasa puede ser usada con éxito en varios bioprocessos para elaborar productos químicos y materias primas.

El bagazo de caña de azúcar, un residuo obtenido después del triturado de la caña para extraer el caldo, es el residuo lignocelulósico más abundante en Brasil, generando aproximadamente 116-millones de toneladas por año (Cunha y cols., 2005). Aunque la mayoría del bagazo ha sido empleado por la propia industria de la caña de azúcar para la generación de energía, existe un excedente de este residuo agroindustrial, por lo que se han evaluado varias alternativas de uso. Las tecnologías estudiadas incluyen la producción de xilitol, etanol, papel, enzimas y otros (Domínguez

y cols., 1996). Entre estas alternativas la producción de xilitol se muestra como la más atractiva, dado que el xilitol es un compuesto de gran valor añadido que puede usarse en un gran número de industrias, incluyendo la alimentaria, odontológica, cosmética y farmacéutica.

La eficiencia y la productividad de este poliol mediante procesos de fermentación depende principalmente de los microorganismos y de las condiciones empleadas en el proceso. En los últimos diez años, el Grupo de Bioprocesos y Microbiología Aplicada del Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería Química de Lorena, Brasil, ha estado estudiando los factores que afectan a la biosíntesis de xilitol a partir de residuos lignocelulósicos. La meta principal de este proyecto de investigación es desarrollar una tecnología de bajo costo para la producción de xilitol a gran escala. El objetivo de este trabajo es presentar algunos resultados de los avances alcanzados por el grupo, relacionados con los parámetros microbiológicos en la producción de xilitol mediante procesos biotecnológicos usando células de levadura de *Candida guilliermondii* FTI 20037 en diferentes condiciones experimentales.

Debido a lo limitado de la información científica y técnica existente respecto al uso de sistemas de células inmovilizadas en relación con la bioconversión de la xilosa a xilitol, los autores han dedicado su esfuerzo a conseguir una mejor evaluación de estos sistemas. Se han desarrollado algunos estudios como por ejemplo el uso de sistemas celulares atrapados en alginato cálcico y sistemas de células absorbias en cristal poroso (Carvalho y cols., 2003 y Marton y cols., 2003), y más recientemente el uso de matrices de alcohol polivinilo como soporte de inmovilización en la bioproducción de xilitol. Los sistemas biocatalíticos inmovilizados ofrecen algunas ventajas sobre los sistemas de células libres, tales como la protección ante condiciones ambientales adversas, la posibilidad de reutilización de las células, el uso de altas densidades celulares que posibilitan mayores velocidades de procesado y elevadas tasas de dilución operando en continuo. Además, las células o enzimas inmovilizados ofrecen un prometedor potencial para la mejora en la eficiencia de los bioprocesos. En este trabajo se presentan los principales aspectos biotecnológicos de los procesos de fermentación que se relacionan con la producción de xilitol.

Materiales y métodos

Microorganismos

En todos los experimentos se empleó el filtrado de levadura de *Candida guilliermondii* FTI 20037, obtenido en el Departamento de Biotecnología de la Facultad de In-

geniería Química de Lorena, Faenquil, Lorena; Brasil [1]. El cultivo fue mantenido en agar inclinado de extracto de malta a 4°C. Este cultivo posee la particularidad de crecer usando la xilosa como fuente de carbono.

Cultivo del inóculo

Las células de levadura *Candida guilliermondii* FTI 20 037, descritas por Barbosa y cols. (1998), se mantuvieron a 4°C en agar inclinado de extracto de malta. Una muestra de células fue transferida a Erlenmeyers de 125 mL que contenían 50 mL de medio de crecimiento (30 g L⁻¹ de xilosa, 3 g L⁻¹ de sulfato amónico, 0.1 g L⁻¹ de cloruro de calcio y un 10% v/v de extracto de salvado de arroz). El inóculo fue cultivado en un agitador rotatorio a 200 rpm y 30°C durante 24 horas. Más tarde, las células fueron colectadas por centrifugación (2 000 x g, 15 min), aclaradas con agua destilada estéril, centrifugadas y resuspendidas en agua destilada estéril para obtener una suspensión con alta concentración de células.

Obtención y preparación de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar

El hidrolizado hemicelulósico se obtuvo a partir de la hidrólisis ácida de bagazo de caña de azúcar, según se ha descrito previamente (Carvalho y cols., 2003).

Condiciones de fermentación

Las fermentaciones se realizaron en frascos Erlenmeyer de 125 mL con agitación o en fermentadores de lecho fijo (1 y 2.5 L), usando xilosa o hidrolizado hemicelulósico y añadiendo nutrientes como se describe arriba. El sistema de fermentación estaba equipado con controladores de pH, pO₂, temperatura y aireación.

Métodos analíticos

Se prepararon diluciones adecuadas de muestras por filtración a través de un filtro de 0.22 micron (Waters Set-pak Cartridge -Millipore Corp., Estados Unidos).

La xilosa, glucosa, arabinosa, ácido acético y xilitol se analizaron en Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), usando una columna Bio-Rad Aminex HPX-87 H a 45 °C y $\text{SO}_4 \text{H}_2$ 0.02 N como eluente a una tasa de flujo de 0.6 mL min^{-1} .

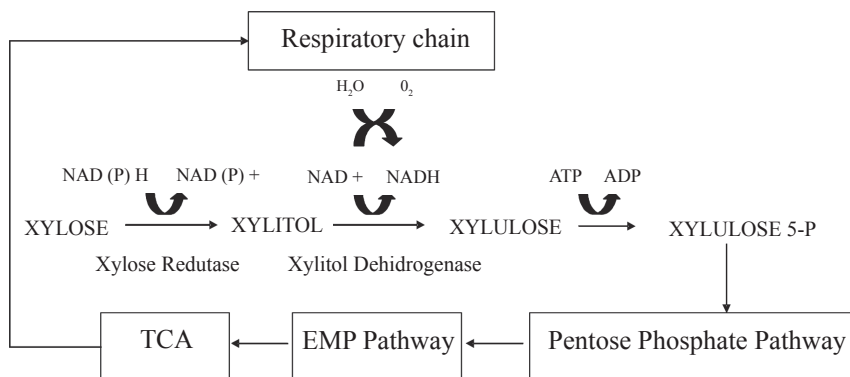
El crecimiento fue monitorizado mediante la medida de la turbidez a 600 nm. La masa celular se estimó usando una relación entre la densidad óptica y el peso seco celular.

El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$) se determinó bajo condiciones estándar de fermentación por el método de “gassing-out” descrito por Pirt (Cunha y cols., 2005).

Resultados y discusión

En las levaduras fermentadas con xilosa, ésta se redujo por la xilosa- reductasa NADPH- y/o NADH-dependiente (XR) a xilitol, el cual es entonces oxidado a xilulosa principalmente por la xilitol-deshidrogenasa NAD^+ -dependiente (XDH). Seguidamente, la xilulosa es fosforilada por la xilulosa- kinasa a xilulosa 5-fosfato, que puede entonces introducirse en la ruta de la pentosa fosfato y consecuentemente en las rutas glicolíticas (figura 1).

Figura 1. Esquema simplificado del metabolismo de la xilosa mediante levaduras fermentadoras de xilosa



La síntesis biológica del xilitol está regulada por varios parámetros fisiológicos y, bajo todas las condiciones estudiadas, esta cepa de levadura (*Candida guilliermondii* FTI 20037) fue capaz de excretar xilitol a diferentes tasas (Cunha, Converti y cols.,

2006; Morita y Silva, 2000). La cepa ha demostrado, además, capacidad para crecer en un medio rico en xilosa, lo que no es común en la mayoría de las cepas de levaduras. El uso de bagazo de caña de azúcar como sustrato (el cual es rico en xilosa) en procesos fermentativos para la producción de xilitol, consiste inicialmente en azúcares liberados a partir de la porción hemicelulósica mediante un proceso de hidrólisis ácida suave. Este proceso está acompañado por la formación de cantidades considerables de productos de descomposición de la hemicelulosa, tales como el furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético y otros productos derivados de la degradación de la lignina. Estos compuestos químicos interfieren negativamente con el crecimiento de las células de levadura (Cunha, Rodríguez y cols., 2006) y con la adicional fermentación del xilitol (Rodríguez y cols., 2001; Silva y cols., 1997; Mussato y Roberto, 2001). Así pues, el uso de esta biomasa hidrolizada como medio de fermentación para el crecimiento de microorganismos resulta crítico y se necesitan varios tratamientos para extraer estos productos. El crecimiento celular en este hidrolizado y la formación de xilitol dependen del tratamiento y de las condiciones de fermentación empleadas. En el presente trabajo el tratamiento empleado fue capaz de reducir algunos compuestos tóxicos en el hidrolizado, así se observó un buen funcionamiento de *C. Guilliermondii* en el xilitol excretado en el caldo (Cunha, Converti y cols., 2006; Domínguez y cols., 2006; Silva y cols., 1998). El efecto de algunos parámetros contrarcorriente en este bioproceso fue determinado. El efecto de la temperatura no resultó muy significativo, los mejores resultados en la producción de xilitol se alcanzaron a los 30 °C. Para medios sintéticos es posible llevar a cabo este proceso de fermentación a pH bajo (3-4), pero en los sustratos hemicelulósicos los mejores funcionamientos en fermentación ocurrieron a un valor alto de pH (5.3-6.0). Este hecho es debido a la presencia de inhibidores como el ácido acético en los hidrolizados y su efecto sobre la membrana celular (Cunha, Converti y cols., 2006). La producción de xilitol se estimuló por altas concentraciones de xilosa, y los mejores valores de $Y_{p/s}$ (0.83 g g⁻¹) se alcanzaron usando 70 g L⁻¹ de la xilosa inicial. La presencia de glucosa, ácido acético y furfural mostraron un efecto negativo sobre la biosíntesis de xilitol (Pirt, 1975). La tasa de aireación resultó el principal factor fisiológico que afecta a la producción de xilitol, y los mejores resultados se alcanzan usando un ingreso bajo de oxígeno o limitando su entrada. En el presente trabajo, la máxima producción de xilitol (41.76 g L⁻¹) a partir del bagazo de caña de azúcar y la máxima productividad volumétrica de xilitol (0.87 g L⁻¹ h⁻¹) se lograron bajo un tiempo de agitación de 400 min⁻¹ y una tasa de aireación de 0.45 v.v.m (Morita y Silva, 2000). Bajo estas condiciones, mediante el control de la tasa de aireación, el $K_L a$ para la máxima producción de xilitol es aproximadamente de 27 h⁻¹. Este resultado puede explicarse por el efecto del oxígeno en el metabolismo de la xilosa y la regeneración de cofactores para la enzima xilosa-reductasa. Un

modelo matemático simple adaptado para este bioproceso mostró que entre el 10 y el 30% de la producción de xilitol no estuvo asociada con el crecimiento celular.

Experimentos llevados a cabo con células inmovilizadas y reciclado de células han mostrado un considerable incremento en la productividad volumétrica del xilitol. Algunos soportes como el alginato cálcico, cristal poroso, zeolita (figura 2), alcohol polivinilo (figura 3) y bagazo de caña de azúcar (figura 4) han sido utilizados para la inmovilización de *C. Guilliermondii*. Todos ellos presentaron resultados interesantes en el bioproceso.

Figura 2. Fotografía de microscopía electrónica de barrido mostrando células de *Candida guilliermondii* inmovilizadas en zeolita

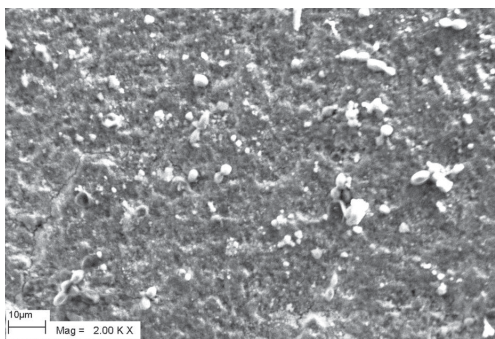
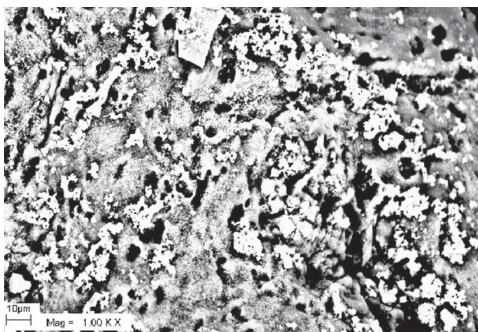


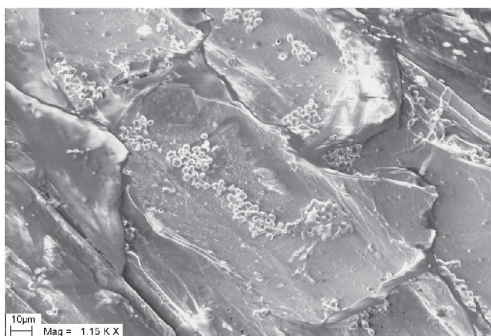
Figura 3. Fotografía de microscopía electrónica de barrido mostrando células de *Candida guilliermondii* inmovilizadas en PVA-criogel



Las matrices de hidrogel de alcohol polivinilo como PVA-cryogel (Cunha, Rodríguez y cols., 2006) PVA-cryogel (Cunha, Rodríguez y cols., 2006) y PVA-LentiKats

(Cunha, Converti y cols., 2006) han mostrado un buen rendimiento en los procesos de bioconversión de xilosa a xilitol. Estas matrices presentan mayor resistencia mecánica que otras matrices de polímeros naturales como el alginato, además, poseen una estructura macroporosa y no son tóxicas para los microorganismos. Resultó posible usar estos soportes para ciclos fermentativos sucesivos y, como resultado, la producción de xilitol, el factor de rendimiento y la productividad volumétrica aumentaron con el reciclado progresivo de células (Cunha, Rodrigues y cols., 2006).

Figura 4. Fotografía de microscopía electrónica de barrido mostrando células de *Candida guilliermondii* inmovilizadas en bagazo de caña de azúcar



El bagazo de la caña de azúcar se considera un interesante soporte de inmovilización debido a su abundancia y bajo costo. Los resultados experimentales mostraron que el bagazo de caña de azúcar tiene un gran potencial para ser usado en la inmovilización celular durante los procesos fermentativos en la producción de xilitol [18].

De acuerdo con los resultados, los ensayos biotecnológicos para la producción de xilitol se muestran eficientes y pueden obtenerse altas tasas de producción de xilitol bajo condiciones controladas de fermentación. Para desarrollar un proceso de fermentación eficaz en aplicaciones a gran escala se requiere un control adecuado de la entrada de oxígeno que permita la formación de xilitol a partir del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar. La levadura de *Candida guilliermondii* usada en este bioproceso es potencialmente útil para la producción de xilitol a partir de sustratos hemicelulósicos, debido a los elevados rendimientos de xilitol alcanzados, comparables con los obtenidos en medios sintéticos. Las técnicas de inmovilización celular pueden contribuir a la obtención de mejores resultados de bioconversión. Realmente, algunos parámetros a contracorriente están bajo estudio en nuestros laboratorios, así

como estudios acerca de las propiedades biomédicas del xilitol obtenido mediante procesos biotecnológicos.

Bibliografía

- Barbosa, M. F. S.; M. B. Medeiros; I. M. Mancilha; H. Scheneider; H. Lee (1988), “Screening of Yeasts for Production of Xylitol from D-Xylose and Some Factors which Affect Xylitol Yield in *Candida guilliermondii*”, *Journal of Industrial Microbiology* 3: 241-251.
- Carvalho, W.; S. S. Silva; J. C. Santos; A. Converti (2003), “Xylitol Production by Ca-Alginate Entrapped Cells: Comparison of Different Fermentation Systems”, *Enzyme and Microbial Technology* 32: 553-559.
- Converti, A; P. Perego; P. Torre; S. S. Silva (2000), “Mixed Inhibitions by Methanol, Furfural and Acetic Acid on Xylitol Production by *Candida Guilliermondii*”, *Biotechnology Letters* 22: 1861-1865.
- ; J. M. Domingues; P. Perego; S. S. Silva; M. Zilli (2000), “Wood Hydrolysis and Hydrolysate Detoxification for Subsequent Xylitol Production”, *Chemical Engineering and Technology* 23(11): 1013-1020.
- Carvalho, W; J. C. Santos; L. Canilha; J. B. Almeida; M. G. A. Felipe; I. M. Mancilha; S. S. Silva (2004), “A Study on Xylitol Production from Sugarcane Bagasse Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate by Ca-Alginate Entrapped Cells in a Stirred Tank Reactor”, *Process Biochemistry* 3: 2135-2141.
- Cunha, M. A. A.; S. S. Silva; W. Carvalho; J. C. Santos (2005), “Uso de células imobilizadas em gel de PVA: uma nova estratégia para produção biotecnológica de xilitol a partir de bagaço de cana-de-açúcar”, *Semina: Ciências Agrárias* 26 T(1): 59-68.
- ; R. C. B. Rodrigues; J. C. Santos; A. Converti; S. S. Silva (2006), “Repeated-batch Xylitol Bioproduction Using Yeast Cells Entrapped in PVA-Hydrogel”, *Current Microbiology* (in press).
- ; A. Converti; J. C. Santos; A. Converti; S. S. Silva (2006), “Yeast Immobilization in LentiKats®: A New Strategy for Xylitol Bioproduction from Sugarcane Bagasse”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22: 65-72.
- Domínguez, J. M.; S. G. Cheng; G. T. Tsao (1996), “Pretreatment of Sugar Cane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate for Xylitol Production by Yeast”, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57/58: 49-56.

- Marton, J. M.; M. G. A. Felipe; A. Pessoa JR, A. (2003), “Avaliação de carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana empregando planejamento de experimentos”, *Revista Analytica* 3.
- Morita, T. A.; S. S. Silva (2000), “Effect of Initial pH on Biological Synthesis of Xylitol Using Xylose-Rich Hydrolysate”, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84-86: 751-759.
- Mussato, S. I; I. C. Roberto (2001), “Hydrolysate Detoxification with Activated Charcoal for Xylitol Production by *Candida Guilliermondii*”, *Biotechnology Letters* 23: 1681-1684.
- Pirt, S.J. (1975), *Principles of Microbe and cell cultivation*. Blackwell Scientific Publications.
- Rodrigues, R. C. L. B; M. G. A. Felipe; J. B. Almeida; M. Vitolo; P. V. Gómez (2001), “The Influence of pH, Temperature and Hydrolysate Concentration on the Removal of Volatile and Nonvolatile Compounds from Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate Treated with Activated Charcoal Before or After Vacuum Evaporation”, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 18: 299-311.
- Santos, J. C.; A. Converti; W. Carvalho; S. I. Mussato; S. S. Silva (2004), “Influence of Aeration Rate and Carrier Concentration on Xylitol Production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate in Immobilized-Cell Fluidized Bed Reactor”, *Process Biochemistry* 40: 113-118.
- Silva, S. S.; M. G. A. Felipe; I. M. Mancilha (1998), “Factors that Affect the Biosynthesis of Xylitol by Xylose-Fermenting Yeasts- A Review”, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 70-2: 331-339.
- Silva, S. S.; S. I. Mussatto; J. C. Santos; D. T. Santos; J. Polizel (2006), “Cell Immobilization and Xylitol Production Using Sugarcane Bagasse as Raw Material”, *Applied Biochemistry and Biotechnology* (en prensa).
- Silva, S. S.; A. Quesada-Chanto; M. Vitolo (1997), “Up Stream Parameters Affecting the Cell Growth and Xylitol Production by *Candida guilliermondii* FTI 20037”, *Zeitschrift für Natur*, v. 52 C, pp. 359-363.

**Aprovechamiento del bagazo de caña
para la producción de xilitol**
*Use of the Sugar Cane Bagasse
for The Production of Xylitol*

*Rodríguez Durán, N. A.; Bustos Vázquez, G.;
Gámez García, S.; López González, P.; Compeán Ramírez, E.*

Resumen

La caña de azúcar es uno de los principales productos agrícolas de México y se industrializa principalmente para la obtención de sacarosa. Actualmente, el consumo de este edulcorante ha disminuido debido a nuevas tendencias nutricionales o a la utilización en la industria de los alimentos de otros endulzantes más económicos. Un cambio de “industria azucarera” a “industria del cultivo de caña” permitiría un aprovechamiento integral de dicho cultivo. La presente revisión bibliográfica trata sobre la situación de la industria azucarera, el porqué de la importancia del aprovechamiento del bagazo de caña para la producción de xilitol, así como de las características y opciones de producción de este edulcorante. También se mencionan investigaciones realizadas en torno a la producción biotecnológica de xilitol a partir de materiales lignocelulósicos.

Abstract

The sugar cane is one of the principal agricultural products of Mexico and it becomes industrialized principally for the obtaining of saccharose. At present, the consumption of this sweetener has diminished due to new nutritional tendencies or the use in the industry of foods of other economic sweeteners. A change of “sugar industry” to “industry of the cane culture” would allow an integral advantage of this culture. The present bibliographical review treats on the situation of the sugar industry, because of the importance of the use of the sugar cane bagasse for the production of xylitol, as well as of the characteristics and options of production of this sweetener. Also there

are mentioned investigations realized concerning the biotechnological production of xylitol from lignocellulosics materials.

Introducción

La caña de azúcar es una gramínea tropical del género *Saccharum*, que pertenece a la misma familia que la del sorgo y el maíz, la composición del tallo es de aproximadamente 75% de agua y el 25% de fibras y sólidos solubles. El jugo del tallo está constituido por sacarosa, glucosa, fructosa, minerales, proteínas, gomas, polisacáridos, ácidos orgánicos y compuestos misceláneos de menor importancia enumerados por lo general como un porcentaje de los sólidos del jugo (James, 1999).

La caña de azúcar se cultiva prácticamente en todas las regiones tropicales y subtropicales de la tierra. En México, este cultivo es uno de los seis principales productos agrícolas junto con el maíz, el frijol, el trigo, el café y el sorgo, ocupando este país el sexto lugar a nivel mundial con el 3.34% de la producción, y siendo Brasil el mayor productor con un 28.6% (ver tabla 3) (Procaña, 2002; Ramírez Juárez, 2001).

En Tamaulipas su producción representa el 34.9% de la producción total del estado, obteniendo el sexto lugar a nivel nacional con el 4.71%, mientras que el primer lugar lo ocupa el estado de Veracruz con un 37.29% (ver tablas 1 y 2).

Productos y subproductos del cultivo de caña de azúcar

La caña de azúcar es industrializada en los ingenios azucareros para obtener sacarosa como producto principal, girando su economía en torno a este edulcorante, cuya demanda decrece debido al surgimiento de tendencias nutricionales en las que lo cotizado son los alimentos bajos en calorías, además de la aparición en el mercado de edulcorantes naturales de menor costo y ligeramente mayor poder edulcorante como los Jarabes de Maíz Ricos en Fructosa (JMRF).

Los productos secundarios que se obtienen a partir de la caña de azúcar son melazas o mieles, bagazo, cachaza de los filtros, cenizas de los hornos y gases de combustión. Estos subproductos pueden utilizarse como materias primas para una amplia gama de derivados (James, 1999; Mesa Oramas, 2004; Sagarpa, 2004).

La melaza o miel final es un subproducto que tiene dos usos principales: uno es en la alimentación de ganado (sola o mezclada con fuentes de celulosa como el baga-

Tabla 1. Información sobre la siembra y producción en Tamaulipas, México en el año de 2004

<i>Ciclo</i>	<i>Grupo</i>	<i>Producto</i>	<i>Superficie sembrada (ha)</i>	<i>Superficie cosechada (ha)</i>	<i>Producción obtenida (ton)</i>	<i>%*</i>
Primavera Verano	Básicos	Sorgo grano	195 330	108 474	168 315	2.62
		Maíz grano	93 245	36 839	59 607	0.93
		Frijol	6 124	1 561	1 141	0.02
Otoño/ invierno	Hortalizas	Chile verde	2 310	2 288	69 233	1.08
		Sorgo grano	711 806	708 210	2 636 005	41.10
	Básicos	Maíz grano	82 570	81 445	439 824	6.86
		Cártamo	65 921	59 251	25 825	0.40
		Algodón semilla	2 141	1 745	2 084	0.03
		Frijol	1 676	1 558	1 191	0.02
Forrajes	Sorgo forrajero en verde	2 849	2 342	78 426	1.22	
	Cebolla	4 786	4 786	155 334	2.42	
Perennes	Industriales	Caña de azúcar	58 434	56 878	2 231 225	34.79
		Naranja	35 190	34 745	509 420	7.94
	Frutas	Limón	3 318	3 274	35 832	0.56
Producción total en Tamaulipas					6 413 462	

* % correspondiente a la producción obtenida respecto al total producido en Tamaulipas.
Fuente: SIAP, 2004

Tabla 2. Información sobre la siembra, cosecha, producción y rendimiento de caña de azúcar de los estados productores de este cultivo en México

	Superficie (ha)		Producción (ton)	Rendimiento (ton/ha)	%*
	Sembrada	Cosechada			
Veraacruz	236 023	235 833	17 657 647	74.88	37.29
Jalisco	61 905	58 075	5 544 856	95.48	11.71
Oaxaca	54 636	54 632	3 540 148	64.80	7.48
San Luis Potosí	62 469	56 722	3 430 500	60.48	7.24
Chiapas	28 513	28 506	2 448 326	85.89	5.17
Tamaulipas	58 434	56 878	2 231 225	39.23	4.71
Sinaloa	28 025	27 444	2 065 700	75.27	4.36
Tabasco	28 383	27 329	1 909 544	69.87	4.03
nayarit	28 127	26 373	1 810 265	68.64	3.82
Puebla	12 369	12 309	1 597 385	129.77	3.37
Morelos	16 771	12 315	1 428 563	116.00	3.02
Quintana Roo	22 780	21 763	1 271 162	58.41	2.68
Michoacán	16 620	14 135	1 242 918	87.93	2.62
Colima	9 132	9 132	888 011	97.24	1.88
Campeche	8 255	6 259	287 532	46.01	0.61
Total	672 442	647 696	47 353 782	73.11	100.00

* % correspondiente a la producción de caña de azúcar del estado respecto al total producido en México.
Fuente: SIAP, 2004.

Tabla 3. Información sobre la superficie cultivada y la producción de caña de azúcar en los principales países productores de este cultivo en el 2003

<i>País</i>	<i>Superficie cultivada</i>		<i>Producción</i>	
	<i>Ha</i>	<i>% *</i>	<i>Tm</i>	<i>%*</i>
Brasil	5 303 560	25.99	386 232 000	28.60
India	4 300 000	21.07	290 000 000	21.48
China	1 328 000	6.51	93 900 000	6.95
Tailandia	970 000	4.75	74 071 952	5.49
Pakistán	1 086 00	5.32	52 055 800	3.86
México	639 061	3.13	45 126 500	3.34
Colombia	435 000	2.13	36 600 000	2.71
Australia	423 000	2.07	36 012 000	2.67
Cuba	1 041 200	5.10	34 700 000	2.57
Estados Unidos	403 390	1.98	31 178 130	2.31

* Participación en el mundo-año: 2003.

Fuente: FAO, 2004.

zo) y el otro en la producción de alcohol, ya sea como combustible líquido renovable o para la elaboración de ron (James, 1999; Mesa Oramas, 2004).

Mientras que la cachaza de los filtros se utiliza por lo general como fertilizante, abono orgánico (sustituyendo el empleo de compuestos químicos), y a veces como un aditivo para los alimentos de los animales (James, 1999; Mesa Oramas, 2004).

El bagazo o megazo es el residuo de la molienda de la caña que sale del último molino, contiene el azúcar no extraído, fibra leñosa (aproximadamente 40% de celulosa, 30% de hemicelulosa y 20% de lignina) y de un 45 a un 55% de agua. Se utiliza principalmente como combustible directo en la fábrica, permitiendo la cogeneración de energía eléctrica durante el proceso de fabricación de azúcar; los excedentes se pueden emplear para la producción de furfural, generación de electricidad, de metano o metanol, forrajes, carbón activado, sustrato en la producción de setas y/o xilitol, así como para la fabricación de pulpa, cartón, papel y tableros (Cabrera *et al.*, 2004; Gámez *et al.*, 2004; James, 1999; Mesa Oramas, 2004; Rangel *et al.*, 2005).

El bagazo puede considerarse un contaminante cuando no se emplea en su totalidad como combustible en los ingenios azucareros y el excedente es solamente desechado. Esto implica una pérdida económica, ya que no se genera ninguno de los posibles ingresos monetarios que se obtendrían de la fabricación de los derivados ya mencionados, en especial se pierde la oportunidad de producir un edulcorante competitivo en el mercado. El aditivo en cuestión es el xilitol, sobre el cual ya se han realizado estudios estableciéndose su factibilidad de producción a partir de licores, obtenidos con el tratamiento del bagazo con ácidos débiles y altas temperaturas (hidrólisis ácida) o con enzimas (hidrólisis enzimática), fermentados con diversos microorganismos capaces de efectuar la bioconversión de xilosa a xilitol. Además, la biomasa generada también podría utilizarse como proteína unicelular (Aguilar R., 2000; Aguilar *et al.*, 2002; Bustos Vázquez, 2001; Bustos *et al.*, 2003; Gámez, 2003; Gámez *et al.*, 2004; Rangel *et al.*, 2005; Rodríguez Chong *et al.*, 2004).

Situación de la industria azucarera

En México la industria azucarera es una actividad de suma importancia dentro del sector primario de la economía nacional, sin embargo, el proceso de obtención de azúcar presenta niveles de obsolescencia que orillan a los ingenios hacia la pérdida de materias primas e insumos generando contaminantes y reduciendo sus ganancias. Por lo que se necesitan llevar a cabo profundas transformaciones en aspectos

tecnológicos, en eficiencia y en aprovechamiento de los co-productos (Sagarpa, 2004).

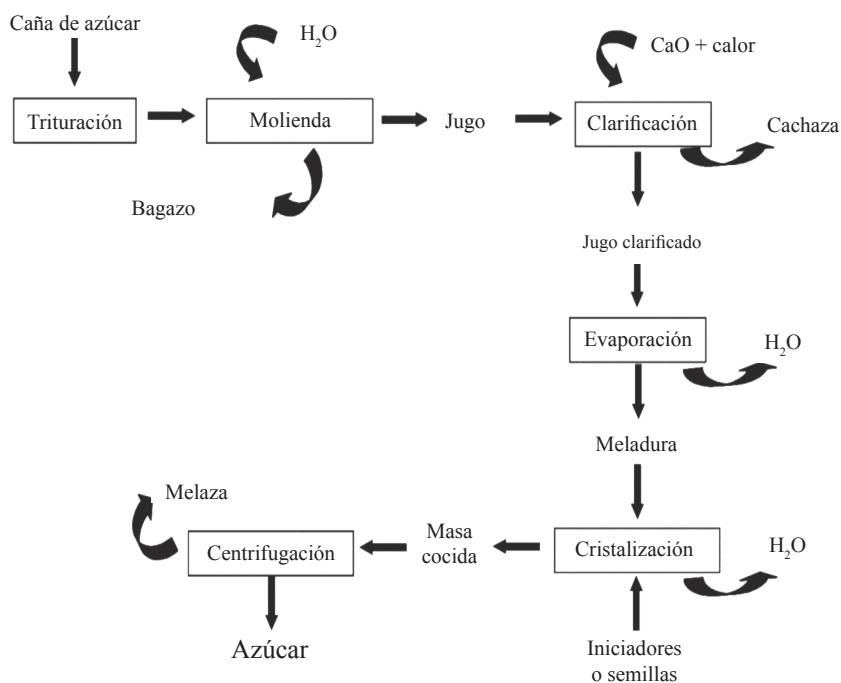
La industria azucarera se ha visto desfavorecida por el rápido desarrollo del mercado de edulcorantes diferentes del azúcar que ocupan en la actualidad un alto porcentaje del mercado total de edulcorantes en el mundo. Aunque el azúcar continúa siendo el edulcorante de mayor preferencia a nivel mundial, se apreció una tendencia (a mediados de los años 90) a sustituirla por otros, ya sean calóricos o artificiales. Otro factor que ha contribuido a esta tendencia favorable a la sustitución del azúcar es la mayor preocupación que han prestado algunos países hacia las cuestiones dietéticas y hábitos de alimentación por parte de los consumidores finales (Mesa Oramas, 2004).

El Jarabe de Maíz Rico en Fructosa (JMRF) es un edulcorante que compite comercialmente con la sacarosa; éste se obtiene después de moler el maíz y utilizar sus propiedades principales para otros productos. En la década comprendida entre 1975 y 1985, los Estados Unidos de América iniciaron una política de sustitución del azúcar por JMRF, que es un edulcorante más barato y del cual ellos mismos son productores. De esta manera iniciaron la sustitución de sus importaciones de sacarosa por un insumo local, creando subsidios directos a la producción de maíz y permitiendo así a los productores del edulcorante tener una materia prima muy económica. Este país se convirtió de netamente importador de edulcorantes (dependiente de la producción extranjera) a un exportador neto de edulcorantes (Félix, 2002; Nova González y Peña Castellanos, 2002).

En la actualidad la industria azucarera debe enfrentar tres grandes problemas: la injusta y desleal competencia con otros edulcorantes (por ejemplo los JMRF), la falta de eficiencia energética que le hace poco competitiva y la contaminación que produce. Debido a estos factores se han reducido significativamente las áreas de cultivo de caña y se ha provocado el cierre de muchos ingenios, dejando sin ocupación a miles de campesinos y obreros. Por lo tanto, el desarrollar una buena alternativa para utilizar al máximo cada uno de los productos y subproductos derivados de la caña de azúcar contribuirá al mejoramiento de las condiciones económicas de este grupo de la sociedad. Es decir, es necesario diversificar la gama de productos del sector mediante la implementación de sistemas alternativos para la producción de energía y combustibles, aditivos alimentarios, la producción de alimento animal y de otros derivados, lo cual apunta a obtener ventajas comerciales y estratégicas (Cabrera *et al.*, 2004; Horta Nogueira *et al.*, 1999; Sagarpa, 2004)

La industria azucarera diversificada es definida como un sistema flexible, capaz de reaccionar, variando la correlación entre los volúmenes fabricados de cada producto, a fin de operar siempre en el rango de máxima ganancia. Un central azucarero

Figura 1. Diagrama del proceso de la obtención de la azúcar de caña



diversificado permite un mejor aprovechamiento de los residuos de la agroindustria, es decir, un aprovechamiento integral del cultivo de caña con el menor impacto ecológico. En la figura 1 se muestra un diagrama de proceso de la caña de azúcar obteniendo como producto fundamental al azúcar, sin llevar a cabo un aprovechamiento integral (Horta Nogueira *et al.*, 1999).

Producción de xilitol

El xilitol es un poliol que se emplea como edulcorante calórico de baja intensidad. Es un pentitol o polialcohol de cinco carbonos que proviene de la reducción de la xilosa y se presenta en la naturaleza en pequeñas cantidades, en las levaduras, hongos, líquenes, en algunas frutas y verduras. Asimismo se forma en el cuerpo humano como un intermedio normal en el metabolismo de la glucosa (Cruz Freire, 2005; Cubero *et al.*, 2002; García 2005; Larosa, 2000; Rangel *et al.*, 2005).

El xilitol, como el resto de los polioles, tiene un reducido valor energético debido a que son parcialmente absorbidos en el intestino delgado. Así, una gran parte del poliol alcanza el intestino grueso, donde es biológicamente degradado a ácidos grasos, metano y anhídrido carbónico, entre otros productos. Dichos ácidos grasos son parcialmente absorbidos por el intestino grueso, entrando en el metabolismo intermedio (García, 2005; James, 1999; Larosa, 2000; Rangel *et al.*, 2005).

En cuanto a su poder edulcorante, éste es similar al de la sacarosa y varía de 0.85 a 1.25 dependiendo del pH, concentración, temperatura y otros factores. Una concentración de 10 % de xilitol tiene una dulzura igual a un 10 % de sacarosa (Cruz Freire, 2005; García, 2005; Rangel *et al.*, 2005).

Una característica organoléptica importante es que su ingestión produce una sensación de frescura similar al mentol. Además, es un producto que no produce caries, ya que no es metabolizado por los microorganismos específicos (*Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*) presentes normalmente en la flora bucal. Al no ser un sustrato para la placa dental no produce acidez en la cavidad bucal, lo cual sí sucede cuando se consume glucosa, lo cual constituye una ventaja, pues un bajo pH favorece la retención y crecimiento de los microorganismos responsables de las caries. Su ingestión, incluso, puede estabilizar las caries existentes, pues con el gran efecto refrescante que ocasiona en la boca provoca un aumento del flujo de saliva, lo que favorece la limpieza y protección de los dientes, además baja el desarrollo de la placa dental e inhibe el crecimiento de las bacterias asociadas a la caries (Cubero *et al.*, 2002; Delgado *et al.*, 2004; García, 2005; James, 1999; Larosa, 2000; Rangel *et al.*, 2005).

El xilitol no lleva a cabo la reacción de Maillard, por lo cual no provocan oscurecimiento ni disminuyen el valor biológico de las proteínas. El xilitol no es utilizado por la mayoría de los microorganismos, por lo tanto los productos hechos con xilitol tienen menor riesgo de sufrir una descomposición (Cubero *et al.*, 2002; Cruz Freire, 2005; Rangel *et al.*, 2005).

El xilitol se utiliza en diversos productos, algunos de ellos son los siguientes (Cubero *et al.*, 2002; Larosa, 2000; James, 1999):

- En productos que no producen caries, como por ejemplo preparaciones para la higiene oral ya sea pastas dentales o tópicos, aprovechando su beneficio dental, su poder edulcorante (casi igual al de la sacarosa) y la sensación de frescor en la boca.
- En preparaciones farmacéuticas, por ejemplo pastillas, tabletas, jarabes y en soluciones para uso parenteral. Se emplea en estos productos porque tiene una

baja higroscopicidad, una buena compresibilidad y un bajo punto de fusión. En cuanto a la alimentación parenteral, su uso se justifica en que puede sustituir a la dextrosa por el hecho que el xilitol no es insulino-dependiente, ya que se metaboliza en el ciclo pentosa-fosfato, formándose agua y anhídrido carbónico siendo independiente de la insulina, además por tener la ventaja de que por esterilización con calor las soluciones no se coloran.

- En alimentos dietéticos o productos para diabéticos, como por ejemplo gomas de mascar, chocolates, caramelos, jaleas, dulces, mermeladas, bebidas, helados. Se emplea en estos productos por su aportación baja de calorías y por no necesitar de insulina para ser metabolizado.

El xilitol es un edulcorante que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza en ciertas frutas, hortalizas y cereales, pero en muy pequeñas cantidades por lo que su extracción de estas fuentes resulta poco rentable. Industrialmente, se prepara a partir de la D-xilosa, obtenida por hidrólisis de hemicelulosa proveniente de materiales lignocelulósicos, mediante una reducción catalítica en presencia de níquel (ver figura 5) (Badui Dergal, 1999; Cubero *et al.*, 2002; García, 2005; Larosa, 2000; Mussatto y Roberto, 2004; Parajó *et al.*, 1997).

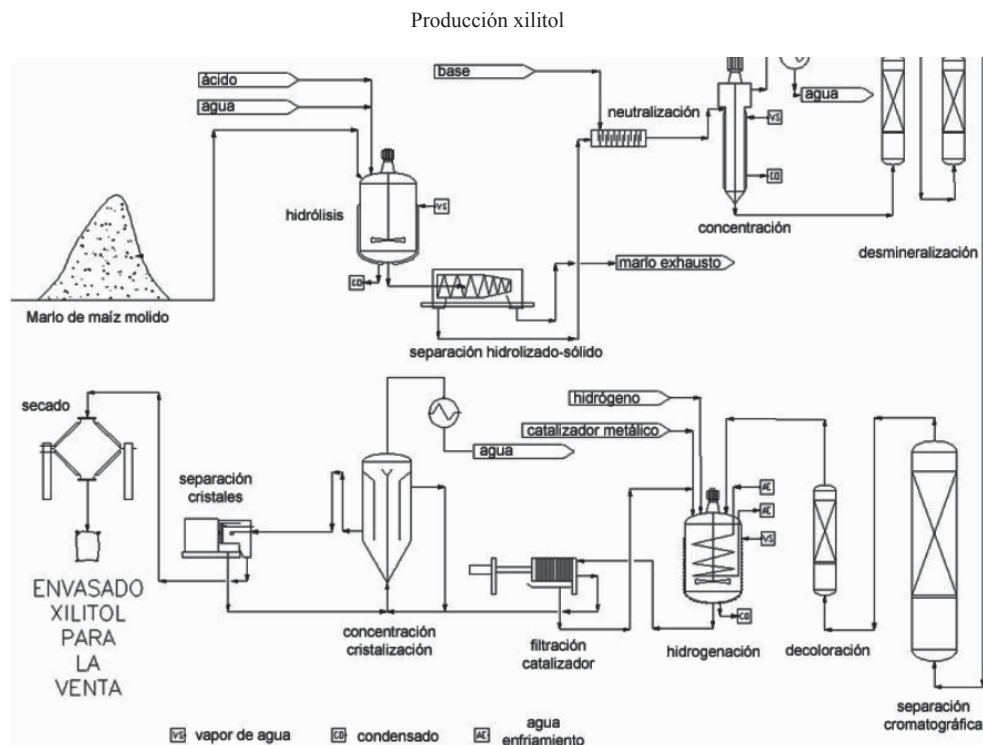
Los materiales lignocelulósicos son tratados con procedimientos adecuados para obtener licores de xilosa que además contienen otros monosacáridos, pero en menor concentración. Estos materiales son entre otros: el marlo del maíz, la corteza de las frutas secas (nueces, almendras, avellanas), paja, pulpa de madera, plantas de algodón, bagazo de caña, cáscara del arroz y otros subproductos agrícolas; todos ellos contienen pentosanos (de un 20 a 35 % de xilano, polímero de xilosa, en base seca) los cuales muchas veces están asociados con la lignina y la celulosa (Larosa, 2000; Rangel *et al.*, 2005).

Por hidrólisis ácida, en condiciones moderadas, se obtienen dichas pentosas, siendo en nuestro caso de interés la D-xilosa. Dicha pentosa, según la materia prima empleada, la acompañan otras pentosas (arabinosa y ribosa). El ácido a emplear puede ser el ácido sulfúrico, pudiendo utilizarse asimismo otros, incluso ácidos débiles. Se mezcla el material lignocelulósico molido con la solución ácida y se calienta a temperatura de ebullición (aproximadamente 100°C) (Larosa, 2000).

Una vez efectuada la hidrólisis el licor obtenido contiene la D-xilosa, la cual deberá ser sometida a la hidrogenación para llegar al xilitol. Previamente es necesario separarla del material sólido y proceder a la neutralización. Una vez neutralizado el hidrolizado se concentra y desmineraliza (Larosa, 2000; Rangel *et al.*, 2005).

Según la materia prima empleada, como fuera indicado, la D-xilosa presente en la solución puede estar acompañada por otras pentosas que se deben eliminar. Para

Figura 2. Proceso de producción de xilitol por síntesis química



Fuente: Larosa, 2000

ello, se trata la solución pasándola a través de una columna para una separación cromatográfica. Posteriormente, la solución así tratada se decolora haciéndola pasar a través de una columna de carbón activo, luego de lo cual la D-xilosa en solución se hidrogena. Esta etapa se efectúa en un reactor (idóneo para trabajar a presión a aprox. 30 bar g) con vigorosa agitación, en presencia de un catalizador metálico (Ni-Raney u otros catalizadores metálicos: por ejemplo paladio o rutenio) e hidrógeno. Concluida la hidrogenación, la solución se filtra para recuperar el catalizador, el que será reutilizado en la hidrogenación sucesiva. En el caso de que se emplee Ni como catalizador durante este proceso la solución adquiere color, siendo necesario tratarla con una resina de intercambio iónico (resina catiónica) para despojarla del Ni. La solución que contiene xilitol se concentra, el xilitol se cristaliza, se separa, se seca y se envasa en

bolsas o en recipientes idóneos para su almacenamiento y transporte (Larosa, 2000; Rangel *et al.*, 2005).

El proceso para obtener al xilitol por vía fisicoquímica o síntesis química mediante la hidrogenación de la xilosa tiene la desventaja de tener un alto costo de producción, ya que utiliza catalizadores químicos costosos, condiciones ambientales drásticas y varias etapas de purificación (Mussatto y Roberto, 2004; Rangel *et al.*, 2005).

Una vía alternativa a la síntesis química es el proceso fermentativo, la cual utiliza como catalizador un microorganismo bajo condiciones moderadas de presión, temperatura y concentración. Actualmente se realizan estudios para lograr la optimización de las condiciones de fermentación con la finalidad de lograr una producción de xilitol mucho más rentable (Cruz Freire, 2005; García, 2005; Larosa, 2000; Mussatto y Roberto, 2004; Parajó *et al.*, 1997; Rangel *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que las levaduras son las mejores productoras de xilitol, especialmente aquellas del género *Candida*, las cuales reducen la xilosa a xilitol bajo la acción de una enzima denominada xilosa reductasa que es NADP-dependiente. La cantidad de xilitol y la productividad del mismo dependerán de las condiciones de cultivo y del tipo de cepa que se utilice. Otra de las levaduras sobre la que se han realizado investigaciones acerca de su producción de xilitol es la *Debaryomyces hansenii* (Canilha *et al.*, 2003; Cruz Freire, 2005; Rangel *et al.*, 2005).

El xilitol tiene ventajas sobre los demás edulcorantes, principalmente sobre la sacarosa, ya que ésta es cariogénica, tiene un alto contenido calórico y ocasiona un aumento en la demanda de insulina. Éstas son las razones por las cuales los nutricionistas recomiendan bajar el consumo de azúcar en nuestra dieta, sobre todo para los diabéticos, pero también para aquellas personas con tendencia a la obesidad y por las que este grupo de consumidores podrían preferir al xilitol (Cubero *et al.*, 2002; Delgado *et al.*, 2004).

La ventaja del xilitol sobre los edulcorantes intensivos o no nutritivos es que en los años más recientes se ha puesto en duda el consumo de éstos por posibles afectaciones a la salud humana; para algunos de ellos ha sido prohibida su producción y consumo en diversos países, aunque en varios de estos edulcorantes su inocuidad ha sido estudiada y por lo cual ha sido permitido su uso siempre y cuando se respete la IDA (Ingesta Diaria Admisible) (Aguilar, 2004; Áviles, 2001; León Espinosa de los Montero *et al.*, 2000; Nova González y Peña Castellanos, 2002).

En la actualidad se registra un gran movimiento mundial hacia el consumo de productos naturales de origen orgánico. Se estima que este movimiento se incrementará al menos en los próximos diez años, lo que puede motivar una estabilidad en

el consumo de los edulcorantes intensivos e inclusive una reducción de los niveles actuales, cediendo espacio al azúcar y otros endulzantes de origen orgánico, como lo es el xilitol obtenido por procesos biotecnológicos; de ahí su ventaja sobre el sintetizado químicamente, además de la reducción de costos de producción que se puede lograr cuando se optimicen las condiciones de fermentación (Nova González y Peña Castellanos, 2002).

El xilitol obtenido por fermentación puede ser considerado como “natural” lo cual lo pone en ventaja, ya que muchos consumidores tienen la creencia de que lo “artificial o “químico” es nocivo para la salud, dando preferencia a lo de origen “natural” aunque realmente la toxicidad de una sustancia no depende de si es de origen “natural” o “artificial”, sino de su composición química y de las condiciones de su consumo (Fernández Monge *et al.*, 2000; Vázquez Vázquez, 2005).

Producción de xilitol a partir de materiales lignocelulósicos

Se han realizados diversos estudios con la finalidad de aprovechar materiales lignocelulósicos para la producción de xilitol. Ya se han encontrado condiciones de hidrólisis ácida en las cuales se obtiene una mayor concentración de xilosa (monosacárido a partir del cual se produce el xilitol) a partir de bagazo de caña y paja de sorgo. Esta información se obtuvo de la caracterización de la hidrólisis ácida cuantitativa de estos materiales, empleando diferentes ácidos, variando sus concentraciones, la temperatura y los tiempos de proceso. De esta manera se determinó el contenido en polisacáridos y lignina, así como los porcentajes de xilosa y otros azúcares fermentecibles en los licores obtenidos en esas diferentes condiciones de proceso (R. Aguilar, 2000; Aguilar *et al.*, 2002; Bustos *et al.*, 2003; Bustos Vázquez, 2001; Gámez, 2003; Gámez *et al.*, 2004; Rodríguez Chong *et al.*, 2004; Luis Téllez, 2000).

Un procedimiento necesario para que los hidrolizados puedan ser empleados como medios de cultivos es el de enriquecimiento. Lo investigado por Ramírez y otros autores (2003) establece dos composiciones óptimas, una para la producción de xilitol y otra para la de biomasa, utilizando como inóculo *Candida parapsilosis* en medios de xilosa comercial enriquecidos con peptona, extracto de malta y extracto de levadura.

Otro dato encontrado es que durante la hidrólisis ácida y la concentración de dichos licores se forman sustancias que son tóxicas para los microorganismos, las cuales desfavorecen la producción de xilitol e incluso inhiben el crecimiento microbiano. Un tratamiento que está reportado para ayudar a la eliminación de estas sus-

tancias es la detoxificación con carbón activado, el cual después de ser optimizado, para el hidrolizado que se va a emplear como medio de cultivo, permite una mayor producción de xilitol que cuando no se aplica, pero ésta sigue siendo menor que cuando se emplean medios de xilosa comercial (Canilha *et al.*, 2003; Parajó *et al.*, 1996; Rivas *et al.*, 2002; Nadia Rodríguez, 2005; Sepúlveda *et al.*, 2004; Sepúlveda Huerta *et al.*, 2005).

Se realizó un estudio para determinar el efecto de la concentración inicial de xilosa, el pH y la temperatura sobre la producción de xilitol en medios de xilosa comercial inoculados con *Candida parapsilosis*; esto con la finalidad de determinar condiciones de cultivo rentables en las que la producción de xilitol sea adecuada a partir de la menor concentración inicial de xilosa y del pH más bajo posible, evitando así concentrar excesivamente los hidrolizados que se quieran utilizar como medios de cultivo, ya que esto ocasiona una acidez tan baja que hace necesario el gasto excesivo de álcali y una pérdida elevada de hidrolizado durante la operación de neutralización. Se encontró que la concentración inicial de xilosa (15 g/L para formación de biomasa, 45 y 60 g/L para xilitol) y la temperatura de incubación (26°C fue más favorable) si tienen un efecto significativo mientras que el pH no (5 ó 6) (Nadia Rodríguez, 2005).

Con la finalidad de utilizar al hidróxido de potasio como álcali para la neutralización de hidrolizados obtenidos con ácido fosfórico, se realizó una investigación sobre el efecto de la presencia de sales de fosfato, en medios de cultivo de xilosa comercial inoculados con *Candida parapsilosis* sobre la producción de xilitol, utilizando como condiciones de fermentación pH, temperatura y concentración de sustrato reportadas como adecuadas para la producción de dicho poliol. Ello a partir del hecho de que las sales de fosfato de potasio (las cuales se formarían en dicha reacción) son empleadas, en pequeñas concentraciones, como micronutrientes en la producción de xilitol en medios inoculados con levaduras del género *Candida*. Como resultado se observó que existe un efecto significativo de la concentración de sales de acuerdo al análisis de varianza unifactorial aplicado y que entre menor fue la concentración de sal inicial estimada mayor fue la producción de xilitol y de biomasa formada (Nadia Rodríguez, 2005).

También existe la co-producción de carotenoides y xilitol por *Phaffia rhodozyma* en medios con xilosa comercial, en el cual se observó que el perfil de carotenoides depende de la concentración inicial de sustrato, también se verificó que en estos medios se acumula xilitol hasta con rendimientos de 0.5 a 0.6 g/g, pero que luego se reducen por ser asimilado el xilitol por el microorganismo cuando se disminuye la concentración de xilosa (Parajó *et al.*, 1997).

Conclusiones

El xilitol, como ya se mencionó, tiene ventajas como edulcorante sobre la sacarosa, sin embargo, podría ser una alternativa para formar parte del aprovechamiento integral del cultivo de caña. Las perspectivas competitivas del mercado azucarero para el mediano plazo son las de un mercado protegido, saturado por la oferta y disputado por endulzantes alternativos (origen orgánico y artificial) que restringen los niveles de demanda potenciales de la sacarosa. Si la fracción hemicelulósica del bagazo de caña obtenido del proceso de producción de azúcar es utilizado como materia prima para la producción biotecnológica de xilitol, se aprovecharía un subproducto de la industria azucarera para obtener un producto natural que puede abarcar el mercado de los que no quieren consumir calorías o no pueden ingerir glucosa en exceso (personas con problemas de salud como la diabetes y la obesidad) sin perjudicar la producción de sacarosa, la cual puede abarcar el mercado tradicional y junto con otros productos obtenidos del aprovechamiento del resto de las fracciones del bagazo y de los otros subproductos de la caña de azúcar se puede estabilizar y mejorar la situación financiera de los ingenios azucareros.

Bibliografía

- Aguilar, José Armando (2004), “Alimentación y nutrición. ¿Dulce alternativa? Edulcorantes artificiales”, Revista *Consumidor*: 58-61.
- Aguilar, R. (2000), *Estudio de la hidrólisis de bagazo de caña de azúcar con ácido sulfúrico*, Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Tamaulipas.
- _____; J. A. Ramírez; G. Garrote; M. Vázquez (2002), “Kinetic Study of the Acid Hydrolysis of Sugar Cane Bagasse”, *J. Food Eng.* 55: 309-318.
- Áviles, Rosario (2004), *Edulcorantes. Mitos y realidades. Clia alimentaria*, Consejo Latinoamericano de Información Alimentaria, A. C., 4: 4.
- Badui Dergal, Salvador (1999), *Química de los alimentos*, capítulo 2, Addison Wesley Longman de México, S. A. de C. V.
- Bustos, G.; J. A. Ramírez; G. Garrote; M. Vázquez (2003), “Modelling of the Hydrolysis of Sugar Cane Bagasse Using Hydrochloric Acid”, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 104: 51-68.

- Bustos Vázquez, M. G. (2001), *Optimización del proceso de hidrólisis químico del bagazo de la caña de azúcar empleando ácido clorhídrico*, Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Tamaulipas.
- Cabrera, Sandra L.; Alfonso Gómez A.; Alfredo Martínez; Rodolfo Quintero, *Bio-combustibles a partir de recursos lignocelulósicos: estudio del caso, bagazo de caña en México*, publicación electrónica revisada en el 2004, http://serpiente.dgsca.unam.mx/pue/IV_CONGRESO_PONENCIAS_AAMEE/Miercoles_13/TEMA%202/SESION%20TECNICA/SANDRA%20ALFONSO%20ALFRED O.pdf
- Canilha, Larissa; João Batista de Almeida e Silva; Ana Irene Nápoles Solenzal (2003), “Eucalyptus hydrolysate Detoxification with Activated Charcoal Adsorption or Ion-Exchange Resins for Xylitol Production”, *Process biochemistry* 1-3.
- Cruz Freire, J. M. (2005), “Aprovechamiento de la cascarrilla para la producción de aditivos alimentarios”, *Memoria de Encuentro Académico Avances en el Aprovechamiento Biotecnológico de Productos Agropecuarios*.
- Cubero, N.; A. Monferrer; J. Villalta (2002), *Aditivos alimentarios*, Madrid, Mundi-Prensa.
- Delgado, Jorge Enrique; Sandra Patricia Castañeda L.; Nereid Sissis; A. Álvarez; Ciro Cabal Martínez, “Comparación del crecimiento *In Vitro* de *Streptococcus Mutans* y *Lactobacillus Acidophilus* con edulcorantes”, *Cariología*, publicación electrónica revisada en el 2004, <http://www.encolombia.com/focvol57no19699-cariologia16.htm>
- FAO (15 de abril de 2004), Colombia, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Observatorio Agrocadenas.
- Félix, Fernando (2002), “La paradoja de Kaldor y el comercio de azúcar entre los EE.UU. y México”, trabajo de investigación, Programa de doctorado en economía: 12-18.
- Fernández Monge, Mercedes; Nagore Picaza; Roberto Xalabarder; Catalina Bernadas; Ángel del Pino; Juan Mora; Ana Llorente (2000), AZTI-Difusión tecnológica, Servicio de Información Alimentaria, Información sobre aditivos alimentarios: 1-6.
- Gámez, Sara (2003), *Evaluación del ácido fosfórico como catalizador de la hidrólisis del bagazo de la caña de azúcar*, Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Tamaulipas.
- Gámez, Sara; José A. Ramírez; Gil Garrote; Manuel Vázquez (2004), “Manufacture of Fermentable Sugar Solutions from Sugar Cane Bagasse Hydrolyzed with Phosphoric Acid at Atmospheric Pressure”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (13): 4172-4177.

- García, Nancy (2005), “Ganancias ligeras. Qué hay de nuevo: saboree el éxito que este prometedor producto representa, y satisfaga un continente completo. La autoridad para el emprendedor”, *ENTREPRENEUR* 13(1): 200-202.
- Horta Nogueira, Luiz Augusto; Juan Mario Gamarra Caballero; Electo Silva Lora; Felipe Ponce Arrieta; Ricardo Carpio Carrasco (1999), *Estudio alternativo de la caña de azúcar como recurso alimenticio y energético, un modelo integrado*, Conferencia Internacional “Caña de azúcar: una agenda multidimensional para el siglo XXI”, FAO y GEPLACEA (Grupo de Países de Latinoamérica y el Caribe Exportadores de Azúcar), Santo Domingo, República Dominicana del 19 al 22 de octubre de 1999, publicación electrónica revisada en el 2004, <http://www.fao.org/sd/SPdirect/EGre0056.htm>
- James C.; P. Chen (1999), *Manual del azúcar de caña*, México, Limusa.
- Larosa, Rodolfo (2000), *Alcoholes azúcares: xilitol*, publicación electrónica revisada en el 2004, http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/biodie_lar/xilitol.htm
- León Espinosa de los Monteros, M. T.; M. T. Rueda Domingo; M. D. Castillo Sánchez; M. León Espinosa de los Monteros; R. Ceballos Atienza; S. Fernández Lloret (2000), “Estudio de los aditivos alimentarios y su repercusión en la población infantil”, *Medicina de Familia* 1 (1): 25-30.
- Mesa Oramas, Jesús, *Producción y mercado de azúcar de caña*, publicación electrónica revisada en el 2004, <http://www.monografias.com/trabajos10/azuc/azuc.shtml>
- Mussatto, S. I. e I. C. Roberto (2004), “Kinetic Behavior of *Candida Guilliermondii* Yeast During Xylitol Production from Highly Concentrated Hydrolysate”, *Process Biochemistry* 39: 1433-1439.
- Nova González, Armando y Lázaro Peña Castellanos (2002), *El mercado internacional del azúcar, edulcorantes, alcohol y melaza*, Centro de Estudios de la Economía Cubana, La Habana, Universidad de La Habana, publicación electrónica revisada en el 2004, http://www.nodo50.org/cubasigloXXI/economia/nova4_310802.htm
- Parajó, J. C.; H. Domínguez; J. M. Domínguez (1996), “Charcoal Adsorption of Wood Hydrolysates for Improving Their Fermentability: Influence of the Operational Conditions”, *Bioresource Technology* 57: 179-185.
- Procaña, Asociación colombiana de productores y proveedores de caña de azúcar (2002), *Historia de la caña de azúcar. Saccharum officinarum*, publicación electrónica revisada en el 2004, <http://www.procana.org/canazuc.htm>
- Ramírez, J. A.; I. A. Santos; J. M. Cruz; M. Vázquez (2003), *Optimisation of culture media for Candida parapsilosis NRRL Y-2315*, 4 (2): 81-89.

- Ramírez Juárez, Jorge (2001), *La globalización y el sector agropecuario en México*, publicación electrónica revisada en el 2004, <http://www.uv.mx/iiesca/revista2001-1/globalizacion.htm>
- Rangel L., E.; D. Livas L.; A. B. Escudero; R. J. Gómez; M. G. Aguilar U. (2005), “Producción de xilitol a partir de una cepa autóctona obtenida de bagazo de caña de azúcar en presencia de inhibidores”, *Memoria de Encuentro Académico Avances en el Aprovechamiento Biotecnológico de Productos Agropecuarios*, febrero 2005.
- Rivas, B.; J. M. Domínguez; H. Domínguez; J. C. Parajó (2002), “Bioconversion of Posthydrolysed Autohydrolysis Liquors: An Alternative for Xylitol Production from Corn Cobs”, *Enzyme and Microbial Technology* 31: 431-438.
- Rodríguez Chong, A.; J. A. Ramírez; G. Garrote; M. Vázquez (2004), “Hydrolysis of Sugar Cane Bagasse Using Nitric Acid. A Kinetic Assessment”, *J. Food Eng.* 61: 143-152.
- Rodríguez, Nadia (2005), *Estudio de la detoxificación de hidrolizados de bagazo de caña y de la producción de xilitol por Candida parapsilosis en medios de xilosa*, Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Tamaulipas.
- Sagarpa (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación), *La auditoría ambiental en los ingenios azucareros. Un ejemplo de productividad en este sector industrial*, publicación electrónica revisada en el 2004, <http://www.sagarpa.gob.mx/Forma/documentos/auditoria.htm>
- Sagarpa-SIAP (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación-Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera), *Tamaulipas. Avance de siembras y cosechas (riego + temporal)*, 31 de diciembre de 2004.
- Sepúlveda, Erisema; José Alberto Ramírez De León; Simón Josías Téllez Luis; Manuel Vázquez Vázquez (2004), “Efecto del carbón activado en la eliminación de compuestos fenólicos para la producción óptima de xilosa en hidrolizados de paja de sorgo”, *Libro de resúmenes, 16° Encuentro Nacional de Investigación Científica y Tecnológica del Golfo de México*: 17.
- Sepúlveda Huerta, E.; J. A. Ramírez de León; M. Vázquez Vázquez (2005a), “Producción de xilitol en hidrolizados de paja de sorgo detoxificados utilizando *Candida parapsilosis*”, *Memoria de Encuentro Académico Avances en el Aprovechamiento Biotecnológico de Productos Agropecuarios*.
- SIAP (Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera) (31 de julio de 2004), *Avance de Siembras y Cosechas. Perennes 2004* (cierre preliminar).
- Téllez Luis, S. J. (2000), *Estudio de la hidrólisis de paja de sorgo con ácido sulfúrico*, Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Tamaulipas.

Vázquez Vázquez Manuel (2005), “Producción de astaxantina por microorganismos crecidos en residuos agropecuarios lignocelulósicos”, *Memoria de Encuentro Académico: Avances en el Aprovechamiento Biotecnológico de Productos Agropecuarios*.

Empleo de transglutaminasa microbiana en la industria alimentaria

Use of Microbial Transglutaminasa in Food Industry

*Del Ángel, J. A.¹; Rodríguez Durán, N. R.¹; Ramírez de León, J. A.²; Bustos Vázquez, G.¹;
Velázquez de la Cruz, G.²; Rodríguez Durán, N. A.¹*

Resumen

Actualmente se realizan diversas investigaciones en torno a los aditivos alimentarios, entre éstas la aplicación de algunas enzimas. La Transglutaminasa ha generado gran interés en cuanto a su producción y aplicación en diversos productos. Dicha enzima promueve interacciones proteína-proteína, enlaces ϵ -(γ -glutamil) lisina, que modifican las propiedades de los componentes y, por lo tanto, las características de los productos. La transglutaminasa microbiana ha presentado algunas ventajas sobre la obtenida de otras fuentes y se ha empleado ampliamente en productos de pescado, así como en productos horneados, cárnicos, lácteos y cereales. En el presente trabajo se presenta una revisión sobre la transglutaminasa y sus aplicaciones en alimentos.

Abstract

Nowadays diverse investigations are realized around the food additives, between these the application of some enzymes. The Transglutaminase has generated great interest as for its production and application in diverse products. This enzyme promotes interactions protein - protein, links ϵ (γ -glutamil) lisina, which modify the properties of the components and therefore the characteristics of the products. The Transglutaminasa

¹ Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Boulevard Enrique Cárdenas González 1201, colonia Jardín, Cd. Mante, Tamaulipas, 89840, México.

² Departamento de Ciencia y Tecnología, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa Aztlán, Universidad Autónoma de Tamaulipas, calle 16 y Lago de Chapala, s/n., col. Aztlán. Reynosa, Tamps.

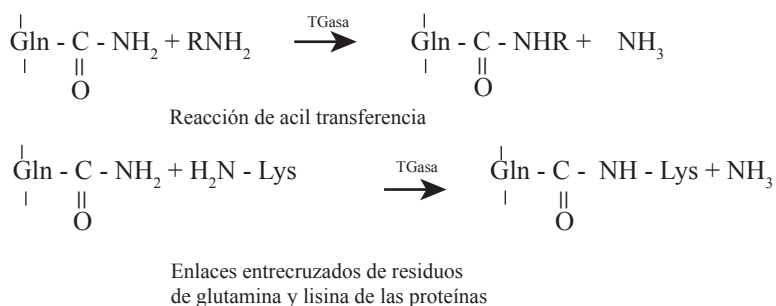
microbial has presented some advantages on the obtained one of other sources and has used widely in products of fish, as well as in baked, pertaining to meat, lacteal products and cereals. In the present work one presents a review on the Transglutaminasa and its applications in food.

Introducción

En la actualidad buena parte de las investigaciones en ciencia de los alimentos está encaminada a estudiar ciertos aditivos alimentarios que mejoren las características de los productos y que además hagan más eficiente y eficaz la producción de los mismos. Las enzimas son compuestos que por su especificidad tienen una gran importancia en la industria.

La transglutaminasa (Tgasa) es una enzima que ha generado gran interés debido a la habilidad de modificar las propiedades funcionales de las proteínas mediante enlaces covalentes entrecruzados. La Tgasa (E. C. 2.3.2.13) es una transferasa que cataliza las reacciones de acil transferencia entre los grupos γ -carboxiamida de los residuos de glutamina en proteínas y pépticos (figura 1). Cuando el grupo ϵ -amino de la lisina actúa como acil aceptor produce polimerización y entrecruzamientos inter o intramoleculares vía enlaces ϵ -(γ -glutamil) lisina. La Tgasa endógena es la responsable de la gelificación espontánea de pastas de surimi a bajas temperaturas, (5-40°C) esto ha promovido el estudio de la Tgasa endógena en productos marinos, así como la evaluación de Tgasa de otras fuentes y su aplicación en productos marinos (N. Haard y B. Simpson, 2000; T. Soeda y cols. 2005).

Figura 1. Reacciones catalizadas por la transglutaminasa



La transglutaminasa presente en el tejido de diversas especies (mamíferos, aves y peces) ha sido aislada para utilizarse como aditivo. Sin embargo, en la actualidad la mejor fuente de Tgasa es la producción biotecnológica, empleando microorganismos como: *Streptovorticillium mobaraense* (S. Y. Lu y cols., 2003) y *Streptovorticillium ladakanum*, y utilizando diversas fuentes de nutrientes como glicerol (S. J. Téllez y cols., 2004c) y algunos desechos agroindustriales (S. J. Téllez y cols., 2004a). Al mismo tiempo se busca mejorar la producción de Transglutaminasa microbiana (MTgasa), modificando las condiciones crecimiento del microorganismo (M. Y. Zheng y cols., 2001; G. L. Yan y cols., 2005). Actualmente se estudia también la producción de Tgasa a partir de *Bacillus circulans* (L. H. D. Soares y cols., 2003; C. F. V. de Souza y cols., 2006). La MTgasa es calcio-independiente lo cual le da ventaja sobre la Tgasa de otras fuentes (K. Yokohama y cols., 2004).

Aplicaciones

Las interacciones proteína-proteína desempeñan un papel importante en las propiedades funcionales de los alimentos proteicos. La manipulación del número y naturaleza de cada una de estas interacciones de proteínas durante el procesamiento permite controlar las propiedades funcionales del alimento sin afectar su calidad nutricional (J. A. Gerrard, 2000).

Debido a que la MTgasa es una enzima que promueve entrecruzamientos entre moléculas de proteína, ayuda a mejorar las propiedades de firmeza, elasticidad, viscosidad, estabilidad térmica y capacidad de retención de agua de productos alimenticios (C. Kuraishi y cols., 2001). La MTgasa logra enlaces entrecruzados en la mayoría de proteínas alimentarias como caseína, globulina de soya, gluten, actina, miosina y proteínas de huevo. (K. Yokohama y cols., 2004).

La Transglutaminasa es ahora ampliamente usada en productos procesados de pescados y mariscos, surimi y derivados, productos cárnicos, pastas, productos lácteos, productos horneados, (C. Kuraishi y cols., 2001), y se han reportado estudios de tratamientos de MTGasa en películas protéicas (C. H. Tang y cols., 2005; H. Chambi y C. Grosso, 2006; H. M. Lai e I. C. Chiang, 2006).

Productos cárnicos

La MTgasa se ha empleado en productos cárnicos con la finalidad de aprovechar carnes de baja calidad, en la elaboración de salchicha, igualando las propiedades de tex-

tura de los productos elaborados con carne normal (K. Katayama y cols., 2006). De la misma manera se estudia la aplicación de la enzima en la obtención de salchichas bajas en sal y bajas en grasa en las que la textura, de los productos reestructurados de carne, puede alcanzar niveles aceptables usando Tgasa como agente ligante, aun remplazando un porcentaje de carne en la elaboración de éstos. (K. B. Chin y K. B. Chung, 2003).

Productos lácteos

La propiedad de la Tgasa de formar enlaces entrecruzados es también explotada en la industria de la leche y sus derivados (E. Ozrenk, 2006). Las proteínas de la leche son modificadas por la acción de la Tgasa y esta cualidad es importante para la aplicación de la enzima en la fabricación de productos lácteos (M. M. O'Sullivan, 2002). Se estudian también los efectos de la enzima en las propiedades reológicas y mecánicas de sistemas lácteos (D. Jaros y cols., 2006) por actuar sobre la caseína, así como también sobre las proteínas del suero, las cuales pueden tratarse con Tgasa para producir aditivos para la industria alimentaria (V. D. Truong y cols., 2004).

Pan y cereales

En productos de cereales y panificación se han realizado estudios para mejorar las propiedades de textura, encontrándose beneficios al adicionar la enzima debido a las interacciones proteicas promovidas. Las características visuales y de textura de productos horneados son mejoradas notablemente (C. Collar, 2005). Su aplicación para la mejora de pastas como fideos y tallarines también se ha reportado (J. P. Wu, 2005; H. Seo, 2003). Además en los productos de trigo se busca que mejoren las características de productos elaborados con harina de arroz y otros componentes (M. M. Moore, 2006).

Pescado, mariscos y surimi

La mayoría de las investigaciones del empleo de transglutaminasa en este tipo de alimentos se ha centrado en el estudio de las propiedades de los geles de surimi, donde se ha reportado que la adición de Tgasa en bajas concentraciones mejora las propiedades

mecánicas de los productos reestructurados (K. Seguro y cols., 1995; S. T. Jiang y cols., 2000; J. Yongsawatdigul y P. Piyadhamviboon, 2005). Sin embargo, estudios más recientes sobre la aplicación de transglutaminasa en productos reestructurados de mariscos y porciones de filete de pescado han demostrado que es posible que mejoren las propiedades de procesamiento del pescado con la adición de esta enzima, y la pérdida de materia prima podría ser reducida al mínimo (C. Armbrust, 2003).

En estudios realizados incorporando MTGasa producida por *Streptoverticillum latakanaum* a productos reestructurados de pescado, de diferentes especies, se observó que la enzima aumentó las propiedades mecánicas de productos reestructurados de una manera más eficiente e indujo la disminución de los valores de agua extraída (del 6% al 7%). Se determinó también que pueden elaborarse productos bajos en sal usando la MTGasa como agente ligante. Los resultados mostraron, de la misma manera, la viabilidad de producir MTGasa a partir de desechos agrícolas y la posibilidad de aplicarla a productos reestructurados de pescado (J. A. Ramírez y cols., 2002; J. A. Ramírez y cols., 2005; S. J. Téllez Luis y cols., 2002; S. J. Téllez-Luis y cols., 2004b).

También se han realizado investigaciones para conocer el efecto combinado del empleo de la MTGasa con otros tratamientos, como es el caso de las altas presiones en la elaboración de reestructurados de pescado, donde se mostró que la presurización mejora las propiedades mecánicas de geles elaborados con pastas tratadas con MTGasa (R. M. Uresti, y cols., 2006).

Entre los estudios realizados con mariscos, destaca una investigación en la cual se adiciona transglutaminasa microbiana a músculo salado de calamar y a partir de esta pasta se preparan geles térmicos; se encontró que la adición de MTGasa logra reforzar la elasticidad del gel (S. H. Park y cols., 2005).

Conclusión

De manera general se concluye que la transglutaminasa es una enzima de gran interés para la industria de alimentos, que puede ser empleada como aditivo para mejorar las propiedades mecánicas de alimentos proteicos. Además, la transglutaminasa puede ser de origen microbiano, obtenida a partir de diversos residuos agroindustriales.

Bibliografía

Armbrust, C., H. D. Werlein; B. M. Watkinson (2003), "Transglutaminase-Application and Properties in Fish Products", *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 99 (5): 181-187.

- Chambi, H.; C. Grosso (2006), “Edible Films Produced with Gelatin and Casein Cross-Linked with Transglutaminase”, *Food Research International* 39 (4): 458-466.
- Chin, K. B.; B. K. Chung (2003), “Utilization of Transglutaminase for the Development of Low-Fat, Low-Salt Sausages and Restructured Meat Products Manufactured with Pork Hams and Loins”, *Asian-australasian Journal of Animal Sciences* 16 (2): 261-265.
- Collar, C.; C. Bollain; A. Angioloni (2005), “Significance of Microbial Transglutaminase on the Sensory, Mechanical and Crumb Grain Pattern of Enzyme Supplemented Fresh Pan Breads”, *Journal of Food Engineering* 70 (4): 479-488.
- Gerrard, J. A. (2002), “Protein-Protein Crosslinking in Food: Methods, Consequences, Applications”, *Trends in Food Science & Technology* 13 (12): 391-399.
- Haard, N.; B. Simpson (2000), *Seafood Enzymes*, E.U., Marcel Dekker, Inc.
- Jaros, D.; C. Partschefeld; T. Henle; H. Rohm (2006), “Transglutaminase in Dairy Products: Chemistry, Physics, Applications”, *Journal of Texture Studies* 37 (2): 113-155.
- Jiang, S. T.; J. F. Hsieh; M. L. Ho; Y. C. Chung (2000), “Microbial Transglutaminase Affects Gel Properties of Golden Threadfin-Bream and Pollack Surimi”, *Journal of Food Science* 65 (4): 694-699.
- Ramírez, J. A.; J. A. Del Ángel; G. Velázquez; M. Vázquez (2005), “Production of Low-Salt Restructured Fish Products from Mexican Flounder (*Cyclopsetta chittendeni*) Using Microbial Transglutaminase or Whey Protein Concentrate as Binders”, *European Food Research and Technology*, ISSN: 1438-2377 (paper) 1438-2385 (en línea).
- Katayama, K.; K. B. Chin; S. Yoshihara; M. Muguruma (2006), “Microbial Transglutaminase Improves the Property of Meat Protein and Sausage Texture Manufactured with Low-Quality Pork Loins”, *Asian-australasian Journal of Animal Sciences* 19 (1): 102-108.
- Kuraishi, C.; K. Yamazaki; Y. Susa (2001), “**Transglutaminase: Its Utilization in the Food Industry**”, *Food Reviews International* 17 (2): 221-246.
- Lai, H. M.; I. C. Chiang (2006), “Properties of MTGase Treated Gluten Film”, *European Food Research and Technology* 222 (3-4): 291-297.
- Lu, S. Y.; N. D. Zhou; Y. P. Tian; H. Z. Li; J. Chen (2003), “Purification and Properties of Transglutaminase from *Streptoverticillium Mobaraense*”, *Journal of Food Biochemistry* 27 (2): 109-125.
- Moore M. M.; M. Heinbockel; P. Dockery; H. M. Ulmer; E. K. Arendt (2006), “Network Formation in Gluten-Free Bread with Application of Transglutaminase”, *Cereal Chemistry* 83 (1): 28-36.

- Nakahara C.; P. Nozawa; N. A. Seki (1999), "Comparison of Cross-Linking of Fish Myofibrillar Proteins by Endogenous and Microbial Transglutaminases", *Fisheries Science* 65 (1): 138-144.
- O'Sullivan M. M.; A. L. Kelly; P. F. Fox (2002), "Influence of Transglutaminase Treatment on Some Physico-Chemical Properties of Milk", *Journal of Dairy Research* 69 (3): 433-442.
- Ozrenk, E. (2006), "The Use of Transglutaminase in Dairy Products", *International Journal of Dairy Technology* 59 (1): 1-7.
- Park S. H.; S. Y. Cho; M. Kimura; H. Nozawa; N. Seki (2005), "Effects of Microbial Transglutaminase and Starch on the Thermal Gelation of Salted Squid Muscle Paste", *Fisheries Science* 71 (4): 896-903.
- Ramirez J.; R. Uresti; S. Téllez; M. Vázquez M. (2002), "Using Salt and Microbial Transglutaminase as Binding Agents in Restructured Fish Products Resembling Hams", *Journal of Food Science* 67 (5): 1778-1784.
- Seguro K.; Y. Kumazawa; T. Ohtsuka; S. Toiguchi; M. Motoki (1995), "Microbial Transglutaminase and Epsilon-(Gamma-Glutamyl)Lysine Cross-Link Effects on Elastic Properties of Kamaboko Gels", *Journal of Food Science* 60 (2): 305-311.
- Seo H.; W. S. Shin; S. Yoon; S. Lee (2003), "Effect of Microbial Transglutaminase on Physical and Textural Properties of Noodles made with Korean Wheat Flour (Geurumil)", *Food Science and Biotechnology* 12 (1): 1-8.
- Soares L. H. D.; F. Assmann; M. A. Z. Ayub (2003), "Production of Transglutaminase from *Bacillus Circulans* on Solid-State and Submerged Cultivations", *Biotechnology Letters* 25 (23): 2029-2033.
- Soares L. H. D., F. Assmann; M. A. Z. Ayub (2003), "Purification and Properties of a Transglutaminase Produced by a *Bacillus Circulans* Strain Isolated from the Amazon Environment", *Biotechnology and Applied Biochemistry* 37: 295-299.
- Soeda T.; A. Hokazono; T. Ozawa; H. Fujiwara (2005), "Characteristics and Mechanism of Binding of Foods by Microbial Transglutaminase", *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 52 (5): 207-211.
- Tang C. H.; Y. Jiang; Q. B. Wen; X. Q. Yang (2005), "Effect of Transglutaminase Treatment on the Properties of Cast Films of Soy Protein Isolates", *Journal of Biotechnology*, 120 (3): 296-307.
- Téllez-Luis S. J.; J. J. González-Cabrales; J. A. Ramírez; M. Vázquez (2004a), "Production of Transglutaminase by *Streptoverticillium Ladakanum* NRRL-3191 Grown on Media Made from Hydrolysates of Sorghum Straw", *M. Food Technology and Biotechnology* 42 (1): 1-4.

- Téllez-Luis S. J.; J. A. Ramírez; M. Vázquez (2004b), “Application in Restructured Fish Products of Transglutaminase Obtained by *Streptoverticillum Ladakanum* in Media Ma de From Hydrolysates of Sorghum Straw”, *Journal of Food Science* 69 (1): M1-M5.
- ; J. A. Ramírez; M. Vázquez (2004c), “Production of Transglutaminase by *Streptoverticillum Ladakanum* NRRL-3191 using Glycerol as Carbon Source”, *Food Technology and Biotechnology* 42 (2): 75-81.
- ; R. M. Uresti; J. A. Ramírez; M. Vázquez (2002), “Low-Salt Restructured Fish Products Using Microbial Transglutaminase as Binding Agent”, *Journal of the Science of Food and Agricultural* 82: 953-959.
- Truong V. D.; D. A. Clare; G. L. Catignani; H. E. Swaisgood (2004), “Cross-Linking and Rheological Changes of Whey Proteins Treated with Microbial Transglutaminase”, *Journal of Agricultural And Food Chemistry* 52 (5): 1170-1176.
- Uresti R. M.; G. Velázquez; M. Vázquez; J. A. Ramírez; J. A. Torres (2006), “Effects of Combining Microbial Transglutaminase and High Pressure Processing Treatments on the Mechanical Properties of Heat-Induced Gels Prepared from Arrowtooth Flounder (*Atheresthes Stomias*)”, *Food Chemistry* 94 (2): 202-209.
- Wu J. P.; H. Corke (2005), “Quality of Dried White Salted Noodles Affected by Microbial Transglutaminase”, *Journal of the Science of Food And Agriculture* 85 (15): 2587-2594.
- Yan G. L.; G. C. Du; Y. Li; J. Chen; J. J. Zhong (2005), “Enhancement of Microbial Transglutaminase Production by *Streptoverticillum Mobarraense*: Application of a Two-Stage Agitation Speed”, *Process Biochemistry* 40 (2): 963-968.
- Yokoyama K.; N. Nio; Y. Kikuchi (2004), “Properties and Applications of Microbial Transglutaminase”, *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (4): 447-454.
- Yongsawatdigul, J.; P. Piyadhamviboon (2005), “Effect of Microbial Transglutaminase on Autolysis and Gelation of Lizardfish Surimi”, *Journal Of The Science Of Food And Agriculture* 85 (9): 1453-1460.
- Zheng M. Y.; G. C. Du; W. F. Guo; J. Chen (2001), “A Temperature-Shift Strategy in Batch Microbial Transglutaminase Fermentation”, *Process Biochemistry* 36 (6): 525-530.

Establecimiento de un proceso de producción de etanol a partir de caña de azúcar utilizando cepas autóctonas selectivas

Designing an Ethanol Production Process from Sugar Cane Using Selective Wild Strains

Aguilar Uscanga, M. A.¹; Gómez Rodríguez, J.

Resumen

Este trabajo forma parte de una línea de investigación que se está realizando en este Instituto y está dirigido a mejorar el proceso fermentativo de la producción de etanol. Para ello este trabajo se dividió en tres partes: la primera consistió en el aislamiento y la selección de microorganismos productores de etanol, los cuales fueron obtenidos a partir de diferentes sustratos como: jugo de caña, uvas, melazas y meladuras. En la segunda etapa se realizó la adaptación a altas concentraciones de glucosa y etanol de las cepas seleccionadas; para ello se efectuaron diferentes pruebas experimentales a diferentes concentraciones de glucosa (20, 22, 24, 26 % p/v) y etanol (0, 2, 4 % p/v), y se determinaron las mejores condiciones para llevar a cabo la fermentación con las levaduras seleccionadas. Finalmente, en la tercera etapa se realizaron cinéticas a nivel fermentador utilizando melazas como fuente de carbono a una concentración de 20 por ciento. Paralelamente, se realizaron pruebas cualitativas de actividad Killer de las cepas seleccionadas.

Resultados obtenidos: en la primera etapa de la presente investigación se aislaron 103 levaduras, seleccionándose sólo 17 (las cuales mostraban rendimientos de etanol por arriba de 0.3 g de etanol/g de azúcar). En la segunda etapa se encontraron las

¹ Instituto Tecnológico de Veracruz-UNIDA-Dpto. de Ing. Eléctrica y Electrónica. Av. Miguel A. de Quevedo 2779, col. Formando Hogar, Veracruz, Ver. C.P. 91860, México, tel. (229) 934-57-01 ext. 209, fax: 934-57-01 ext. 201, e-mail: gaguilar@itver.edu.mx

mejores condiciones para la producción de etanol en función de la concentración de sustrato y a la acción inhibitoria del etanol como producto final. Finalmente en la tercera etapa se encontró que las cepas JC-1-14, JC-3-7 y U-1-4 fueron las mejores dados sus rendimientos y productividades (0.39, 0.41, 0.42 g/g y 0.38, 0.39, 0.43 g/Lh), lo que les infiere la característica de osmotolerante (resistencia a 20% de azúcares) y resistentes a etanol (5 y 6% de etanol). De estas cepas, la levadura JC-3-7 no presentó efecto *killer*, mientras que las cepas JC-1-14 y U-1-4 mostraron este efecto.

Abstract

This work is directed towards improving the fermentative process of ethanol production. To this end this work was divided into three parts: the first consisted of isolating and selecting ethanol producing microorganisms, which were obtained from different substrates, such as cane juice, grapes, molasses and cane syrup. The second stage consisted of adapting the selected strains to high concentrations of glucose and ethanol through different experiments carried out at several concentrations of glucose (20, 22, 24, 26% w/v) and ethanol (0, 2, 4% w/v). The best conditions to carry out fermentation with the selected yeasts were determined. Finally in the third stage, bioreactor kinetics were carried out using cane syrup as the carbon source at 20% w/v concentration. At the same time, killer qualitative tests were done on the selected strains.

In the first stage of this research, 103 yeasts were isolated, from which only 17 were selected based on their yields of more than 0.3 g ethanol/g sugar. The best conditions for ethanol production based on substrate concentration and inhibitory activity by the final product, ethanol, were found in the second stage. Finally, in the third stage, it was discovered that JC-1-14, JC-3-7 and U-1-4 strains were the best given their yields and productivities (0.39, 0.41, 0.42 g/g and 0.38, 0.39, 0.43 g/lh, respectively). These results indicate an osmotolerant characteristic (resistance to 20% sugar) and ethanol resistance (5 and 6% ethanol). Of these three yeast strains, only JC-1-14 and U-1-4 showed killer activity.

Introducción

El alcohol etílico se puede considerar uno de los más antiguos productos orgánicos conocidos. Su producción por fermentación data del milenio V a. C., en la antigua Mesopotamia, en la elaboración de vinos. Posteriormente, se extendió a Egipto, Grecia y Roma. Este proceso ha sido, a lo largo de la historia, uno de los más estudiados, dando origen al descubrimiento de la participación de los microorganismos en la producción de diferentes compuestos de difícil acceso por la síntesis orgánica.

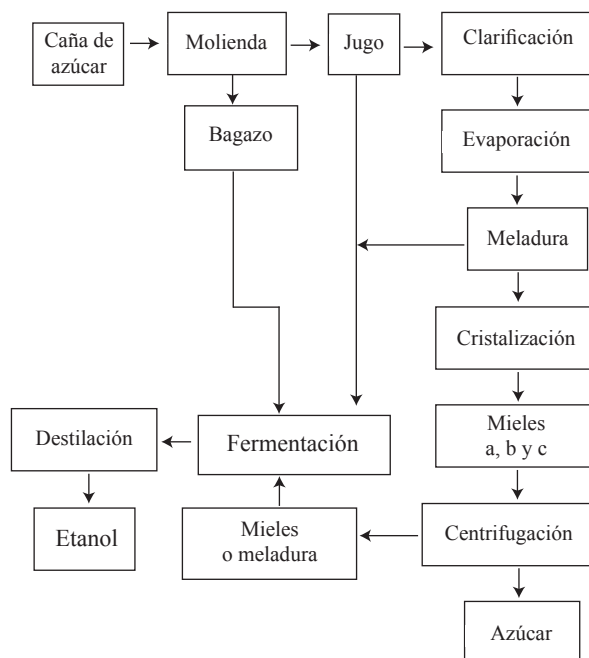
El etanol producido mediante la vía fermentativa puede ser utilizado en diferentes industrias, especialmente en la química, farmacéutica y alimenticia. De sus usos se destacan: fabricación de perfume, solvente, combustible, algunos productos farmacéuticos, bebidas y licores.

La panorámica alcoholera en el mundo ha cambiado su tendencia con el transcurso del tiempo. A partir de los años cuarenta, los alcoholes producidos por la síntesis química comenzaron a sustituir a los alcoholes fermentativos. Esta situación condujo a que a finales de los años sesenta, la inmensa mayoría del alcohol industrial utilizado se obtuviera por vía de la catálisis del etileno, mientras que el alcohol de fermentación quedaba para satisfacer las demandas de consumo humano. Sin embargo, a partir del alza de los precios del petróleo en el mercado internacional, que se produjo en el año 1973, y en la medida que la producción de alcohol por fermentación comienza a ser competitiva, en lo que a costo se refiere, con la petroquímica, se inicia una urgente búsqueda de mejoras tecnológicas, diseño de nuevas tecnologías como la investigación de fuentes potenciales de materia prima. Holanda reporta la ampliación de sus capacidades, utilizando los cereales como fuente de carbono; se promueve, de igual forma, la producción de alcohol agrícola (a partir de residuos de cosecha), fundamentalmente, en los países en vía de desarrollo. Japón realiza estudios sobre mejoras en la tecnología de producción de alcohol, a partir de mieles, además de realizar investigaciones conjuntas con Estados Unidos para la utilización de glucosa como sustrato. Australia e Inglaterra consideran la conversión de carbohidratos renovables en este producto. Países de América, como Paraguay, Costa Rica, Bolivia y Argentina, valoran las potencialidades de producción de etanol a partir de productos intermedios y subproductos del proceso de fabricación de azúcar, destacándose el caso de Brasil, que ha establecido desde hace más de 20 años una política alcoholera de aumento considerable de su producción, especialmente con fines carburantes.

La materia prima esencial en la producción de alcohol está constituida por la fuente de carbono, la que proporciona la energía requerida para la producción del mismo; ésta puede ser adquirida por materias celulósicas (como la madera y el bagazo de caña), materias amiláceas (como el maíz y la yuca) y materias azucaradas (como el jugo de caña y remolacha). Evidentemente, la caña de azúcar presenta características que la hacen apropiada para esta producción, no sólo por su alta eficiencia agrícola, sino también porque ofrece la posibilidad de disponer de un producto fibroso: el bagazo, el cual puede ser utilizado con fines combustibles (Kim *et al.*, 1981).

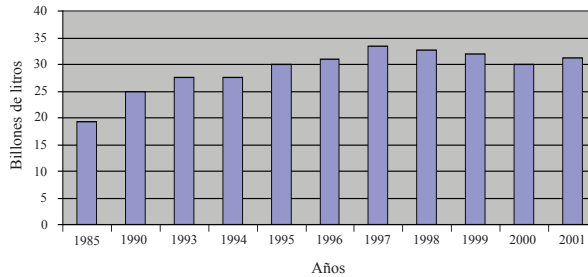
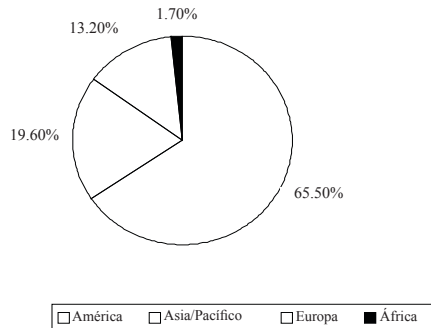
La producción de alcohol por vía fermentativa es la forma más económica de obtenerla a través de las diferentes materias primas obtenidas de la caña, tales como: bagazo, jugo, melazas y mieles intermedias (véase figura 1).

Figura 1. Diagrama de flujo para la producción de etanol a partir de la caña de azúcar



La producción mundial de alcohol se ha incrementado en forma acelerada y en el uso como combustible tiene su mayor demanda. En 1985 la producción fue de 19.2 billones de litros; en 1997 se obtuvo la máxima producción de etanol con un total de 33.4 billones de litros; después de ese año se han producido valores similares por debajo de esa cantidad. La producción para el 2001 fue de 31.3 billones de litros (figura 2), del cual 18.2 billones de destinan al consumo de combustible, 10.0 billones a la industria y 3.1 billones a bebidas.

El 65.5% de la producción mundial de alcohol se concentra en América, el 19.6% en Asia, 15% en Europa y África. No se han registrado cambios significativos en la estructura mundial de la producción de alcohol (figura 3). Brasil produce 11.9 billones de litros, lo cual se asocia a su alto volumen de producción de caña y de azúcar; este país tiene la posibilidad de producir alcohol directamente del jugo o por mieles intermedias. La producción de alcohol en una gran proporción se destina por los países productores a su mercado interno.

Figura 2. Producción mundial de etanol (Licht, 2001)**Figura 3. Continentes productores de alcohol (Licht, 2001)**

Técnicamente el proceso de producción de alcohol es relativamente sencillo y existen tecnologías a nivel mundial para ello. En México, el proceso de elaboración de alcohol se hace a partir de melazas, jugos de caña y mieles, usando las propiedades de algunos microorganismos para metabolizar azúcares y producir en forma residual alcohol etílico que generalmente es de baja graduación y elimina el agua por destilación. Para este proceso industrial a partir de melaza de caña, se realizan varias operaciones como son: la preparación de mostos, fermentación continua y destilación-rectificación. En México, la falta de modernización de las plantas y el control de desechos es una de las principales limitantes. La industria alcoholera de México está inmersa en una fuerte recesión, producto de la crisis económica general, los precios de la materia prima y la propia contracción de la oferta de alcohol etílico.

Lo anterior ha llevado a que en la zafra 2002 hayan operado 17 destilerías de un total de 30 que operaban hace 20 años (tabla 4).

Tabla 4. Ingenios productores de alcohol

Aarón Sáenz	El Carmen
Calipam	Pujilic
Constancia	San Cristóbal
La Providencia	San Nicolás
El Mante	San Pedro
El Potrero	San Sebastián
Emiliano Zapata	Tamazula
Independencia	La Gloria
La Joya	

Fuente: Cámara Nacional de las Industrias Azucare-
ra y Alcoholera, SHCP y World Trade Atlas-México,
2002

Del total de fábricas de alcohol, nueve se ubican en ingenios localizados en el estado de Veracruz: Constancia, El Carmen, El Potrero, San Nicolás, Independencia, La Providencia, San Cristóbal, San Pedro y La Gloria. Veracruz produce 41 millones de litros que equivalen al 68.0% del total nacional. En la década del noventa, la producción de alcohol varía significativamente, ya que en 1994 se registra la mayor reducción en la producción de menos 13.52% y en el 2000 se tuvo un incremento de 19.21 por ciento.

La producción de etanol en los ingenios presentan grandes rezagos tecnológicos, algunos de los problemas que más generan pérdidas son la inhibición de levaduras altamente productoras de etanol cuando se encuentran inmersas en ambientes ricos en solutos, como es el caso de un medio con grandes concentraciones de azúcar. Por otro lado, también se presenta una fuerte inhibición y posterior muerte de las células cuando el producto generado (etanol) alcanza determinada concentración final (entre 4 y 7 % p/v); finalmente dado el carente control higiénico en los ingenios, se presentan serios problemas respecto a la contaminación por otros microorganismos ajenos a la generación del metabolito deseado.

En la fermentación alcohólica, la molécula de glucosa se oxida parcialmente hasta formar piruvato, obteniendo así su energía para sus funciones vitales metabólicas, posteriormente el piruvato se reduce para formar etanol y CO₂, presentando un rendimiento máximo teórico de 0.51 g/g. Este es el proceso de fermentación que lleva a cabo *Saccharomyces cerevisiae* y algunas (pocas) bacterias.

Su importancia industrial es evidente, lo que hace interesante la búsqueda de nuevas alternativas para mejorar su producción (rendimientos cercanos al teórico y máxima productividad). Por ello, uno de los objetivos de este trabajo fue el aislar y seleccionar cepas de levaduras osmotolerantes, resistentes a etanol y con actividad *killer*, con el fin de lograr que el microorganismo que se implante en el proceso a nivel industrial, pueda crecer en melazas concentradas (altas de azúcares), resistir altas concentraciones de etanol (>7%) y con actividad *killer* para su propio control sobre la contaminación por otros microorganismos presentes en el medio.

Materiales y metodos

Aislamiento y Selección. Los microorganismos fueron asilados de cuatro tipos de uvas diferentes con base en sus características físicas como color, tamaño, forma, así como de diferentes locales. Tres tipos de jugos de caña fueron recolectados de locales en el mercado Hidalgo y muestras de melaza y meladura del ingenio San Pedro y La Gloria.

A estas muestras se les agregó: 0.1 g/l de antibiótico y 2 g/l de sulfato de amonio, y se incubaron por 48 horas a 30°C y 250 rpm. Posteriormente, se utilizó la técnica de siembra en placa por extensión para el asilamiento de colonias de levaduras. El criterio de selección de levaduras fue la producción de etanol en función de su rendimiento y productividad.

Adaptación de cepas seleccionadas. Primero se activaron las cepas en medio básico (g/l): glucosa 50, extracto de levadura 1, sulfato de amonio 2, sulfato de magnesio heptahidratado 0.2 y fosfato de potasio monobásico. Luego se incubó a 30°C y 250 rpm. Después se le dieron diferentes pretratamientos con la finalidad de ambientar la levadura a las diferentes condiciones de estrés a las cuales estaría sujeta (con la finalidad de seleccionar a levaduras osmotolerantes, productoras de altas concentraciones de etanol). Los pretratamientos fueron tres, realizados de la siguiente manera:

- 18% w/v glucosa, 1% w/v etanol.

APROVECHAMIENTO BIOTECNOLÓGICO DE PRODUCTOS AGROPECUARIOS II

- 22% w/v glucosa, 2 % w/v etanol
- 24% w/v glucosa, 4 % w/v etanol

Finalmente, se hizo un diseño completamente al azar (con un inóculo de 3×10^6 células /ml): $4 \times 3 \times 2$, donde:

- 4 = Concentraciones de glucosa (20, 22, 24, 26 %p/v)
- 3 = Concentraciones de etanol (0, 2, 4% p/v)
- 2 = Duplicado

Los arreglos experimentales fueron ordenados de la siguiente manera:

<i>Experimento</i>	<i>Concentración de azúcar (% w/v)</i>	<i>Concentración de etanol (% w/v)</i>
1	20	0
2	20	2
3	20	4
4	22	0
5	22	2
6	22	4
7	24	0
8	24	2
9	24	4
10	26	0
11	26	2
12	26	4

Pruebas a nivel fermentador de la cepa selectiva. Las cinéticas se realizaron con melazas a una concentración de azúcar de 20% p/v como fuente de carbono, además de extracto de levadura y diferentes sales, según la formulación del medio básico. No hubo un control de temperatura (oscilando en promedio en 35- 37°C), ni se esterilizó con la finalidad de tener condiciones similares a los ingenios productores de etanol. El inóculo fue de 3×10^6 células viables, la capacidad de trabajo fue de 8 litros. Se tomaron muestras cada ocho horas.

Actividad killer. A las cepas seleccionadas, se les determinó la actividad *killer* por el método de Rosini (1983).

Análisis de Biomasa. La densidad óptica (DO) fue medida a 620nm, empleando un espectrofotómetro Cintra 10, en celdas de metacrilato con una trayectoria óptica de 10mm; se realizaron las diluciones adecuadas para tener valores de absorbencia menores a 0.8.

Análisis de Sustratos y Productos. La concentración de sacarosa, glucosa, fructosa, etanol fue determinada mediante HPLC, utilizando una columna Aminex XPX-87H de Biorad específica para la separación de azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes, columna de exclusión molecular e intercambio catiónico combinada. La fase móvil empleada fue H₂SO₄ 5mM. El detector utilizado fue de índice de Refracción. Las condiciones fueron: 0.4ml/min., 40°C. A su vez, el volumen inyectado fue de 20µl, utilizando un automuestreador Waters 1 700 plus. Las muestras fueron centrifugadas a 10 mil rpm por 10 minutos a 4°C y congeladas. El software empleado fue el Data Apex v.2.0 calculando el área del pico y la concentración de la muestra mediante una correlación con estándares previamente realizados.

Resultados y discusión

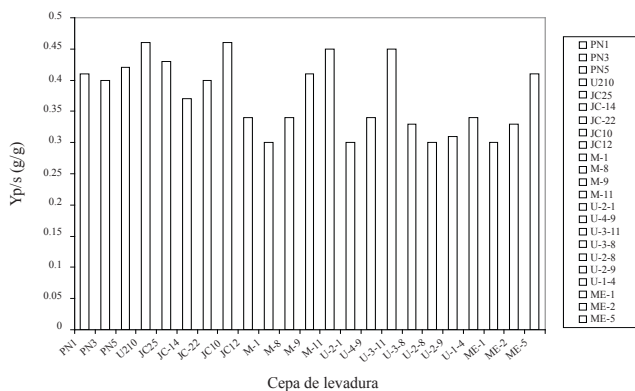
En la primera parte de este trabajo se aislaron 112 cepas de levaduras, de las cuales 58 de ellas se seleccionaron por su capacidad de producir etanol. Posteriormente, estas cepas fueron incubadas en un medio con glucosa y etanol (de acuerdo a los porcentajes mencionados en la sección de materiales y métodos), con el propósito de inducir las cepas a ser tolerantes a altas concentraciones de etanol y glucosa. Estas pruebas preliminares mostraron que el 61% de las cepas fueron afectadas por la presencia de etanol y glucosa al 8% (w/v), lo cual se vio reflejado en el rendimiento en biomasa y etanol obtenido (por abajo de 0.04 y 0.28% g/g, respectivamente). Sólo 23 de estas cepas fueron capaces de crecer favorablemente y producir etanol, obteniendo rendimientos entre 0.30 y 0.49 %, como se muestra en la tabla 1.

En la segunda parte, se seleccionaron sólo las cepas cuyos rendimientos eran por arriba de 0.30 (gg⁻¹). Un tratamiento de readaptación fue hecho de nuevo, el cual consistió en incubar las cepas de levaduras ocho veces consecutivamente en un medio con 2 y 8% (w/v) de etanol y glucosa inicial, respectivamente. Al final del último pase, se evaluó su capacidad fermentativa. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1.

Tabla1. Rendimientos de etano de las cepas crecidas a 2% de etanol y 8% de glucosa inicial (w/v)

Cepa	$Y_{p/s}$ (g/g)	Cepa	$Y_{p/s}$ (g/g)	Cepa	$Y_{p/s}$ (g/g)
U21	0.30	M 11	0.30	PN1	0.44
U22	0.24	M 12	0.33	PN3	0.40
U23	0.22	M 13	0.22	PN5	0.45
U24	0.12	M 14	0.18	U210	0.42
U26	0.11	ME2	0.41	JC1	0.22
U34	0.13	U17	0.02	JC13	0.05
U36	0.18	U110	0.03	JC14	0.37
U49	0.34	U42	0.02	JC21	0.15
U38	0.08	U43	0.03	JC6	0.16
U310	0.25	U46	0.02	JC25	0.44
U311	0.33	U11	0.01	JC8	0.01
U27	0.09	U31	0.03	JC12	0.38
U28	0.30	U32	0.03	JC22	0.31
U29	0.31	U33	0.05	JC23	0.27
U210	0.41	U37	0.08	JC10	0.44
U211	0.04	U12	0.16	ME1	0.30
M4	0.24	U13	0.24	ME6	0.24
M5	0.12	U14	0.34	ME3	0.22
M6	0.11	M8	0.34	ME10	0.25
M7	0.18	M9	0.41	ME5	0.41

Figura 1. Rendimiento de etanol obtenido en la última etapa por las 23 cepas en un medio con 2% de etanol y 8% de glucosa inicial



Como podemos observar, las cepas muestran un comportamiento similar de adaptación que el obtenido en la etapa anterior, siendo las cepas U210, M11, U311 y la JC10 quienes mantuvieron sus rendimientos (por arriba del 45% g/g), sin modificar sus propiedades fermentativas. Por esta razón decidimos continuar el estudio de la tolerancia a etanol y altas concentraciones de glucosa con estas cuatro cepas de levaduras. La siguiente etapa fue incrementar la concentración inicial de glucosa y etanol para evaluar la resistencia a éstos de las cuatro cepas, incluyendo en este caso a una cepa de colección *Saccharomyces cerevisiae*, con el fin de comparar sus actividades fermentativas y metabólicas. Las condiciones experimentales probadas se muestran en la tabla 2. Las figuras 2 y 3 muestran los resultados obtenidos a estas condiciones.

Tabla 2. Condiciones experimentales a diferentes concentraciones de glucosa y etanol

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Glucosa % (w/v)	20	20	20	22	22	22	24	24	24	26	26	26
Etanol % (w/v)	0	2	4	0	2	4	0	2	4	0	2	4

Figura 2. Rendimiento de etanol obtenido a diferentes concentraciones iniciales de etanol (2, 4 y 6% w/v) y de glucosa (18, 20, 22 y 24 % w/v)

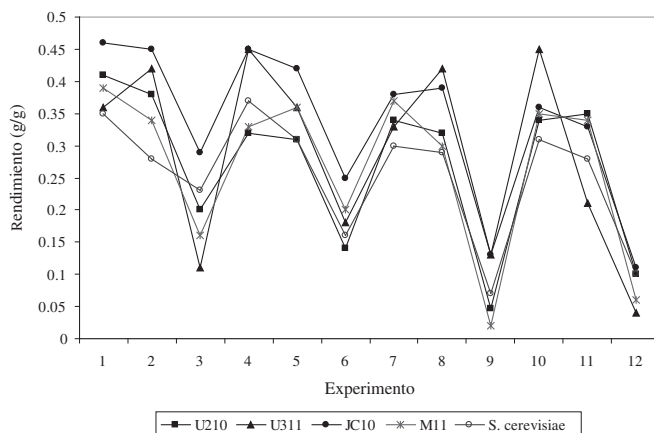
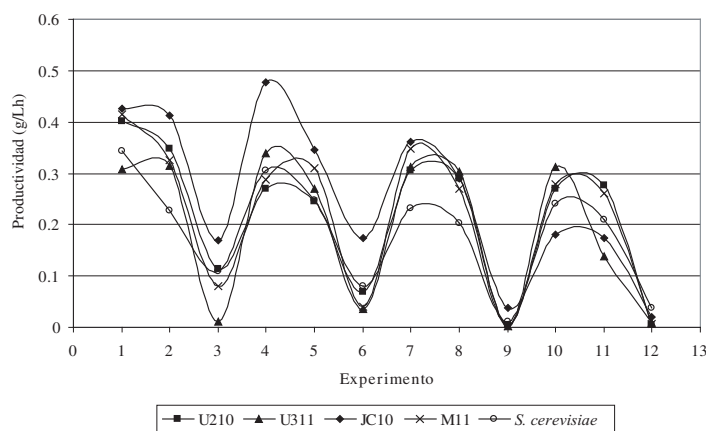


Figura 3. Productividad obtenida a diferentes concentraciones de etanol (2, 4 y 6% w/v) y de glucosa inicial (18, 20, 22 y 24 % w/v) para todas las levaduras

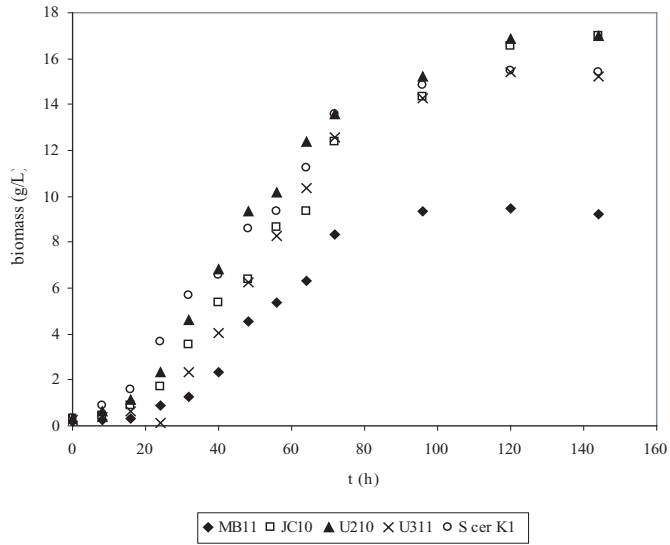


Como se puede observar, el rendimiento y la productividad son más afectadas en concentraciones iniciales altas de etanol (4% w/v) que a una alta concentración de glucosa en todos los casos. Las cepas U311 y U210 fueron las que mostraron mayor resistencia y osmotolerancia, ya que el rendimiento y la productividad permanecen prácticamente constantes entre 18-26% w/v glucosa y 2% w/v etanol.

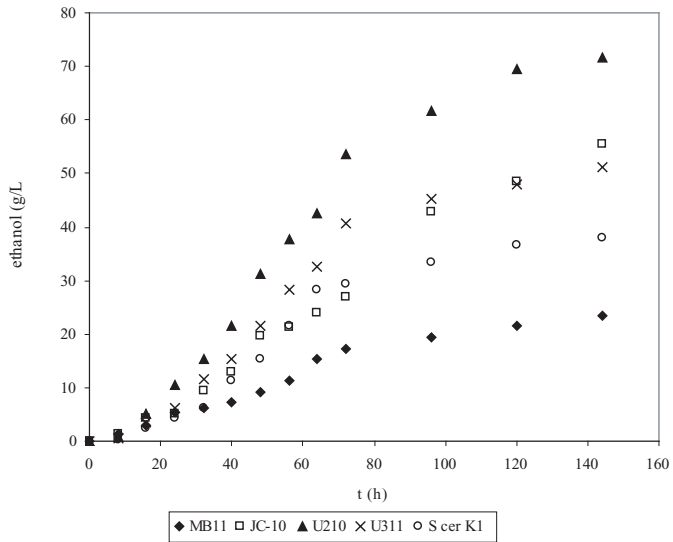
Se realizaron pruebas a nivel fermentador de 20 L bajo condiciones no estériles y usando melazas (20% de contenido de azúcares fermentables), con el fin de evaluar su capacidad fermentativa bajo condiciones similares a las realizadas en un ingenio. La figura 4 muestra los perfiles cinéticos obtenidos para estas cinco cepas. Como podemos observar, la mayor parte de las cepas alcanzaron niveles elevados de biomasa (16 g/l) después de las 145 horas de fermentación, a excepción de la cepa MB2, que sólo alcanzó 9.3 g/l a las 95 horas, lo que indica que en esta cepa hubo un efecto de inhibición más marcado que para las otras cuatro, causado por la concentración de glucosa y etanol. La cepa U210 fue la que presentó una mayor producción de etanol en esta etapa (aproximadamente 71 g/l) y la que agotó totalmente el sustrato.

Altas concentraciones de sustrato inhiben el crecimiento y formación de producto, y pueden afectar el metabolismo de los microorganismos. Muchos autores han reportado que la inhibición por sustrato empieza a ser significativa en el rango de 5-25% (w/v) de azúcar, con una completa inhibición del crecimiento a una concentración de glucosa de 25-40% (w/v), dependiendo de la cepa (Jones *et al.*, 1981; Strehaiano, 1984; Aguilar, 1998; Attfield y Ketsas, 2000; Malacrino *et al.*, 2005). En nuestro estudio podemos concluir que de todas las cepas probadas y seleccionadas:

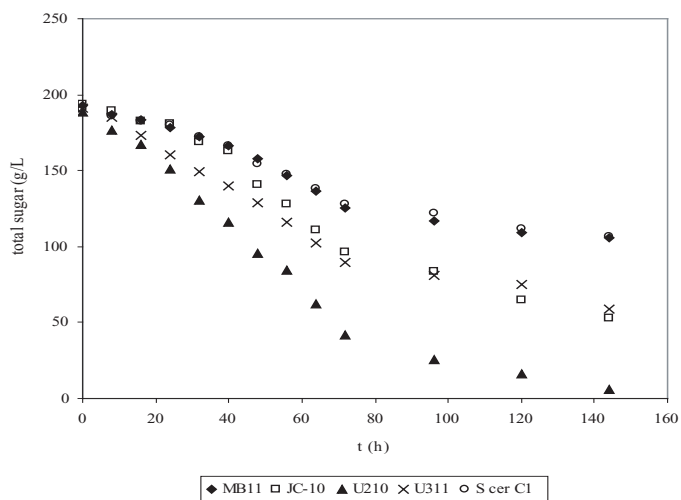
Figura 4. Estudio comparativo de los perfiles cinéticos de las cepas seleccionadas y *S. cerevisiae* K1 en melazas a 200 g/l de azúcares



a) Biomasa



b) Etanol



c) Azúcares totales

JC10, U311 y la U210 son cepas muy interesantes y prometidas a nivel industrial, ya que ellas muestran una buena tolerancia a (20% w/v) y una alta producción de etanol (entre 5 y 7 % w/v) en comparación con la cepa comercial comúnmente utilizada (*Saccharomyces cerevisiae*). *S. cerevisiae* mostró una baja tolerancia tanto a glucosa como a etanol, pues cuando alcanzó una concentración de etanol del 4% w/v, se observó que se detuvo su actividad metabólica y por ende su crecimiento, consumo de sustrato (90 g/l de azúcar residual) y formación de producto.

Finalmente, se determinó la actividad *killer* de estas cepas y de *Saccharomyces cerevisiae* K2 y *S. cerevisiae* C1 (cepas *killer* y sensible), las cuales fueron usadas como testigos para evaluar la actividad *killer* o sensibilidad de las cepas seleccionadas. Como podemos observar en la tabla 3, todas las levaduras presentaron actividad *Killer* (+) y sólo *S. cerevisiae* C1 mostró sensibilidad a la toxina (-).

Tabla 3. Identificación de la actividad *killer* en las cepas seleccionadas

Cepa	K (+-)
JC10	+
U311	+
MB11	+
U210	+
<i>S. cerevisiae</i> C1	-

Conclusión

Estos resultados proporcionan información sobre el comportamiento de las levaduras seleccionadas y una contribución del material biológico (microorganismo), para su uso en los ingenios, pudiendo con ellas trabajar a elevadas concentraciones de melazas (por arriba de 20 g/l) y lograr así un consumo o agotamiento completo del sustrato (en el caso de la cepa U210) y una buena producción de etanol (más 7%). Ello implicaría que al haber un agotamiento de sustrato y una mayor producción de etanol, los volúmenes de vinazas obtenidos se verían disminuidos, lo que impacta en una menor contaminación y un menor precio de producción del etanol. Es importante remarcar que aún será necesario llevar a cabo estudios más completos para determinar las condiciones de fermentación apropiadas para las otras tres cepas y para mejorar la productividad buscando alternativas como por ejemplo establecer un cultivo por lote alimentado o continuo.

Bibliografía

- Aguilar, M. G. (1998), *Caractérisation cinétique et métabolique d'une souche de Brettanomyces*, Toulouse, Francia, Tesis doctoral, I.P.N.
- Attfield, P.V.; S. Ketsas (2000), "Hyper Osmotic Stress response by Strains of Baker's Yeasts in High Sugar Concentration Medium", *Lett. in App. Microbiol.* 31: 323-327.
- Bevan, E.A.; M. Makower (1963), "The Physiological Basis of the Killer Character in Yeasts", en S. J. Gert (ed.), *Genetics today. Proceeding of the 11th International Congress of Genetics* 1: 202-203.
- Carrasco, P.; A. Querol; M. Del Olmo (2001), "Analysis of the Stress Resistance of Commercial Wine Yeast Strains", *Arch. Microbiol.* 175: 450-457.
- Dombek, K. M.; L. O. Ingram (1987), "Ethanol Production During Batch Fermentation with *Saccharomyces Cerevisiae* Enzymes and Internal pH", *Appl and Environ Microbiol* 53 (6): 1286-1291.
- Fattohi, N. (1994), "Determination of Molasses and Yeast Components by GC and HPLC", *Zuckerind* 119: 554-560.
- Ghaly, A.E.; E. I. Taweel (1995), "Effect of Nutrient Supplements Addition on Ethanol Production from Cheese Whey Using *Candida Pseudotropicalis* under Batch Conditions", *Appl. Biochem. Biotechnol.* 53: 107-131.
- Jones, R. P.; N. Pamment; P. F. Greenfield (1981), "Alcohol Fermentation by Yeasts. The Effect of Environmental and Other Variables", *Process Biochem.* 16: 42-45.

- Lange, H.; J. M. Bavouzet; P. Taillandier; C. Delorme (1993), "Systematic Error and Comparison of Four Methods for Assessing the Viability of *Saccharomyces Cerevisiae* Suspensions", *Biotechnol. Tech.* 7: 223-228.
- Malacrino, P.; E. Tosi; G. Caramia; R. Prisco; G. Zapparoli (2005), "The Vinification of Partially Dried Grapes: A Comparative Fermentation Study of *Saccharomyces Cerevisiae* Strains Under High Sugar Stress", *Letters in App. Microbiol.* 40: 466-472.
- Petering, J. E.; M. R. Symons; P. Langridge; Paul A. Henschkl (1991), "Determination of Killer Yeast Activity in Fermenting Grape Juice by Using a Marked *Saccharomyces* Wine Yeast Strain", *App. And Envirom. Microbiol.*: 3232-3236, noviembre.
- Strehaiano, P. (1984), *Phénomènes d'inhibition et fermentation alcoolique*, Toulouse, Francia, Tesis doctoral en Ciencias, I. P. N.

Procesamiento de levadura para la obtención de derivados: diferentes alternativas

Yeast Processing to Obtain Products: Several Alternatives

Otero, M. A.¹

Resumen

Se presenta una comparación entre diferentes procesos para el fraccionamiento de la biomasa de levadura obtenida por fermentación primaria o como subproducto. El empleo de la levadura como fuente de proteínas para la alimentación directa de seres humanos si bien no es objeto de estudio en la actualidad, posee derivaciones de interés para ulteriores desarrollos. Los procesamientos intensivos y de bajo tonelaje son en estos momentos los más atractivos para empresas pequeñas y medianas, sobre todo los que emplean levaduras marginales del proceso como la fermentación alcohólica y la producción de cerveza.

Abstract

A comparison among different processes for the fractionation of primary or marginal yeasts is presented. The utilization of yeast biomass as protein source for food, although is not being focused nowadays it has nonetheless other derivations that opens new possibilities for further development. The intensive processing with low tonnages are currently the most attractive for small and medium ventures, mainly those that use marginal yeast from fermentation processes as ethanol and beer.

¹ Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), Apartado postal 4026, La Habana, C.P. 10400, Cuba, email: miguel.otero@icidca.edu.cu

Introducción

En adición a la explotación tradicional de la biomasa de levadura en la industria alimenticia como suplemento nutricional o saborizante, esta materia prima es a la vez una magnífica fuente para la producción de otros muchos compuestos de importancia industrial. Esta posibilidad ha comenzado a llamar la atención de numerosos grupos de investigación en el mundo acerca de las potencialidades de las levaduras en la industria biotecnológica moderna (Dixon, 1999; Mahan, 1995).

En general se conoce que las levaduras contienen alrededor de 50% de proteínas que pueden ser aisladas por diferentes métodos bien alcalinos o ácidos y, posteriormente, ser precipitadas para obtener concentrados o aislados de proteínas. Su valor nutricional es alto, y si se eliminan los ácidos nucleicos y los lípidos, la proteína resultante es de una excelente calidad (Caballero-Córdoba y Sgarbieri, 2000).

Varios preparados proteicos a partir de esta biomasa han sido empleados como suplementos nutricionales o saborizantes (Rose, 1986; Dziezak, 1987). La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es la fuente tradicional de invertasa, que se utiliza en la producción de bebidas, en la industria repostera y en la agricultura, así como para fines investigativos y tecnológicos. Los ácidos nucleicos son también un producto importante. La producción industrial de AN está basada en la extracción salina o básica a partir de levaduras, por ser este microorganismo el que posee una relación RNA/DNA más elevada y por tanto reduce los costos de purificación (Gierhart y Potter, 1978). El RNA aislado puede ser transformado en nucleótidos saborizantes (5'-mononucleótidos). Estos compuestos se preparan por hidrólisis enzimática con 5'-fosfodiesterasas. Incidentalmente, las raicillas de la cebada germinada son ricas en esta enzima y han sido utilizadas en estos fines. Puede obtenerse la enzima de otras fuentes microbianas como son el hongo *Penicillium citrinum* y la bacteria *Streptomyces aureus*.

Los polisacáridos son igualmente componentes básicos de las paredes celulares a los que imprimen rigidez y fortaleza. El glucano insoluble de *Saccharomyces cerevisiae* ha sido probado frente una serie de estados patológicos mostrando un significativo efecto inmunomodulador; por otra parte, puede ser utilizado como fibra dietética o espesante en formulaciones de alimentos (Newman, 1994).

Los lípidos en levaduras son una mezcla de triacilglicéridos, fosfolípidos y esteroides. No se encuentran en ellos los ácidos grasos de cadena larga con número impar de átomos de carbono presentes en la biomasa de muchas bacterias y la levadura crecida sobre n-alcános. El Grupo Asesor de Proteínas (PAG) ha llamado la atención en sus líneas guías acerca de la utilización de la biomasa microbiana, del carácter no metabólico de estos ácidos grasos y su acumulación en el organismo. En esta fracción se encuentran también cantidades importantes de ergosterol, precursor del ergocalciferol (vitamina D₂).

Materiales y métodos

El desarrollo experimental y los métodos empleados en la obtención de los resultados que se discuten en el presente trabajo pueden ser encontrados en la literatura citada y responden a los diferentes tratamientos de la biomasa de levadura.

Resultados y discusión

Composición de levaduras

La composición de un microorganismo nos proporciona el valor y la aplicabilidad del mismo y su posible explotación industrial. Las levaduras más conocidas por su volumen de producción son la levadura panadera y la levadura marginal de la producción de cerveza. Aunque se ha informado una amplia variación en la composición de estas dos fuentes, la tabla 1 muestra una compilación de valores industriales de estas dos levaduras, ambas del género *Saccharomyces*, las de mayor disponibilidad actual.

Si bien se puede aducir que la magnitud de estos valores no es exacta, la importancia del análisis de composición de las levaduras está en la valoración de su utilidad para una multitud de propósitos industriales. Es así que la tabla conforma una guía para la orientación extremadamente útil (Ingledeew *et al.*, 1977).

Uso de las levaduras como fuente de proteínas en la alimentación humana

Las levaduras contienen entre 5 y 13% de ácidos nucleicos en dependencia de su tasa de crecimiento y la fase que se esté analizando (Bueno *et al.*, 1985). Las levaduras primarias usualmente son cultivadas de forma que se alcancen elevadas productividades independientemente del sustrato empleado por lo que en ocasiones el cultivo se lleva a cabo de modo continuo. Así, el incremento de la productividad es expresado en kg de levadura por m³ de medio por hora y, por tanto, se puede calcular a partir de la concentración celular másica, X expresada en kg/m³ multiplicada por la tasa de dilución D en h⁻¹.

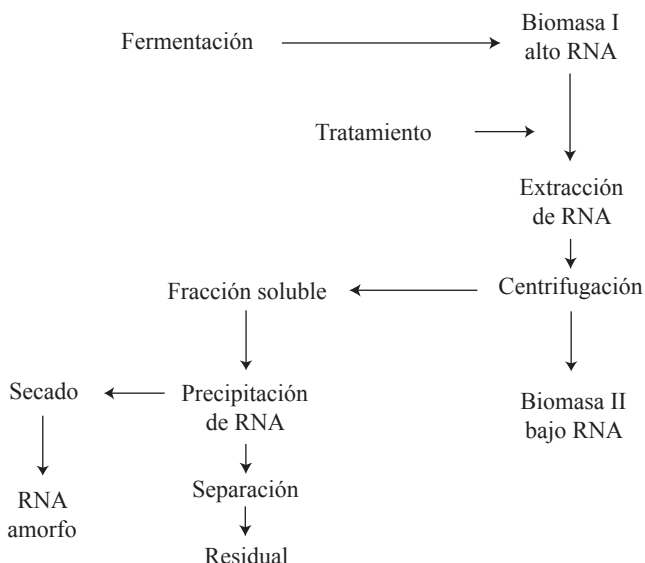
Tabla 1. Composición aproximada de las levaduras panadera y marginal de cerveza producidas industrialmente

<i>Componente*</i>	<i>Levadura panadera</i>	<i>Marginal de cerveza</i>
Carbohidratos	180-440	390-600
Proteínas	380-590	370-420
Cenizas	45-75	73-81
Ácidos nucleicos (ADN + ARN)	52-95	39-43
Lípidos	40-50	
Fósforo	10-19	14-20
Potasio	20-21	17
Calcio	0.6-0.75	1.3
Hierro	0.02-0.03	0.1
Magnesio	1.3-1.65	2.3
Manganeso	0.0059	0.0057
Cromo	0.0005-0.0025	
Selenio	0.005	
Pantotenato (Coenzima A)	0.065-0.10	0.110-0.120
Tiamina (Vit B1)	0.090 -0.165	0.092-0.150
Riboflavina (Vit B2)	0.040-0.100	0.035-0.045
Ácido nicotínico/niacina (NAD)	0.30-0.585	0.450
Piridoxina (Vit B6)	0.020-0.040	0.043-0.050
Biotina (biocytin)	0.0006-0.0013	0.001
Inositol (phospholipids)	3.0	3.9-5.0

A una temperatura y composición de medio dadas, los ribosomas sintetizan proteínas a una tasa fija, o lo que es igual, trabajan a un nivel de eficiencia único. De esta forma, si el crecimiento precisa de una velocidad de suministro de proteínas mayor para poder multiplicarse de acuerdo con la μ ($=D$) impuesta, se requiere entonces una mayor cantidad de ribosomas incorporados a la síntesis para cumplimentar las necesidades del cultivo. Bajo estas condiciones, el contenido de RNA aumentará como una función directa de la μ . En experimentos llevados a cabo en nuestros laboratorios, haciendo crecer sobre mieles finales una cepa de *Candida utilis*, a valores de D entre 0.15 h^{-1} y 0.52 h^{-1} , se encontraron variaciones del contenido de RNA entre 7 y 13% (Bueno *et al.*, 1985).

El RNA puede extraerse de las células microbianas por diferentes métodos. El esquema muestra una de estas alternativas.

Figura 1. Proceso industrial para la producción de RNA de con fines saborizantes



La biomasa de levadura como fuente de materia prima para la elaboración de saborizantes y potenciadores del sabor

Extractos de levadura

Los extractos de levadura son concentrados de los componentes solubles de las células y son obtenidos de forma predominante a partir de la autólisis. Esto significa, que la hidrólisis de sus componentes se lleva a cabo sin la adición de otras enzimas. Su uso principal es en la industria alimenticia como saborizantes y en la industria microbiológica en procesos que requieren de formas complejas de nitrógeno para su propagación y síntesis de metabolitos secundarios (Dziezak, 1987; Vasallo, 2001).

Los extractos se obtienen fundamentalmente de levaduras de crecimiento primario o subproducto de otros procesos fermentativos (cerveza), en especial de cepas *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas sobre mieles finales. Otras cepas también

empleadas son *Kluyveromyces fragilis* (propagadas en suero de leche o mieles) o *Candida utilis* (Dziezak, 1987).

Por adición de otras enzimas y mezcla con otras fuentes de proteínas como trigo, residuos cárnicos o de procesamiento de la soja, se pueden obtener nuevos productos dentro de esta misma línea con diferentes propiedades, de interés para la industria alimenticia o microbiológica (Otero, resultados no publicados).

Otros métodos utilizados en la producción de extractos son:

- Termólisis (calentamiento a 100°C).
- Plasmólisis (altas concentraciones de sales a temperaturas moderadas).
- Desintegración mecánica.

La duración de la autólisis depende de muchos factores pero en general varía desde 15 horas hasta más de 60 horas. Los compuestos solubles a final del proceso se separan de las paredes celulares insolubles y se concentran en evaporadores de película descendente u otro tipo de evaporador disponible. Para aplicaciones fermentativas, el concentrado puede ser sometido a procesos de filtrado nuevamente. Una posterior concentración a vacío y una corta esterilización conducen a los productos típicos siguientes:

- Extractos líquidos (con sólidos entre 50 y 65%).
- Pastas altamente viscosas (70 a 80%).
- Polvos secos obtenidos por *spray*. Estos son equipos especiales.

Los extractos son utilizados en la industria alimenticia en una amplia variedad de alimentos en los que pueden incluirse desde 0.2% en las salsas cárnicas hasta 95% en las sales de aderezo. Su incorporación en productos derivados de la carne, no sólo imparte un sabor único, sino que reduce el empleo de extractos de carne mucho más caros. El aroma y sabor de los extractos está dado por la mezcla de los aportados por los aminoácidos individuales:

Las propiedades antioxidantes de los extractos de levadura provienen de su contenido de glutatión, los productos de la reacción de Maillard y los aminoácidos sulfurados.

El glutatión es un tripéptido de glutamato, cisteína y glicina. La levadura fresca contiene aproximadamente 0.65 % (base seca). Algunas propiedades del glutatión son:

- Promueve la destoxificación de agentes xenobióticos.

- Desempeña un papel importante en la eliminación de radicales libres.
- Anticarcinogénico. Inhibe las mutaciones.
- Potencia la respuesta inmune. Promueve la proliferación de linfocitos.
- Reduce la replicación del VIH.

Para demostrar la utilización de los extractos y autolizados, se presenta en la tabla la formulación de dos salsas cárnicas (*brown sauce*).

Tabla 2. Aroma/sabor obtenidos al calentar aminoácidos puros y glucosa a 180 °C

<i>Aminoácido</i>	<i>Aroma/sabor</i>	<i>Aminoácido</i>	<i>Aroma/sabor</i>
Glicina	Caramelo	Metionina	Patatas asadas
Alanina	Caramelo	Fenilalanina	Violetas
Valina	Chocolate	Tirosina	Caramelo
Leucina	Queso horneado	Asparagina	Caramelo
Isoleucina	Queso horneado	Acido glutámico	Café
Prolina	Tortas y pasteles	Histidina	Pan de maíz
Hidroxiprolina	Galletas	Lisina	Pan fresco
Arginina	Azúcar quemada		

Tabla 3. Aminoácidos: efectos y aplicaciones

<i>Aminoácido</i>	<i>Efecto y aplicación</i>
Alanina y ácido asparagínico	Enmascaramiento de sabores ácidos (jugos de frutas, etcétera).
Triptófano y metionina	Propiedades antioxidantes (grasas).
Triptófano e histidina	Propiedades antioxidantes (leche en polvo).
Histidina	Antioxidante (salsas congeladas). Inhibición de la rancidez (bizcochos) en combinación con glucosa.
Cisteína	Antioxidante (mejoramiento de la calidad del pan).
Metionina	Aumento de la calidad nutricional (alimento animal).
Lisina	Suplemento a proteínas de cereal (en combinación con treonina y triptófano).
Glicina	Enmascaramiento de sabores pungentes causados por endulzantes artificiales. Bacteriostático.

Enriquecimiento nutricional

La levadura se caracteriza por un elevado contenido de proteínas de una excelente calidad que contiene cantidades importantes de todos los aminoácidos, excepto los sulfurados metionina y cisteína. En adición son la fuente principal de vitaminas del complejo B en la naturaleza y contienen minerales de importancia metabólica como el Ca, Mg, Mn etc., por lo que pueden ser incorporadas a los sistemas de alimentos para su fortalecimiento nutricional (Vilela *et al.*, 2000).

Los contenidos de cenizas oscilan entre 7 y 9%, lo que asegura un suministro importante de los minerales mencionados e indica el valor nutricional de este alimento. Los comprimidos de levadura de cerveza han sido consumidos tradicionalmente para el tratamiento de algunas enfermedades cutáneas como el acné, trastornos gastrointestinales y fuente de vitaminas, carbohidratos complejos, etcétera. Contienen también polisacáridos de alto peso molecular como β -(1.3) glucanos que son comprobados inmunoestimulantes (Macdonald, 1995; Spring, 1996; Spring, 1998).

La levadura de cerveza seca se produce por lavado y deshidratación de las células recuperadas de la etapa de fermentación cuando se ha considerado que no es ya posible reciclarlas al proceso. El perfil de aminoácidos de la levadura de cerveza se ofrece en la tabla 4.

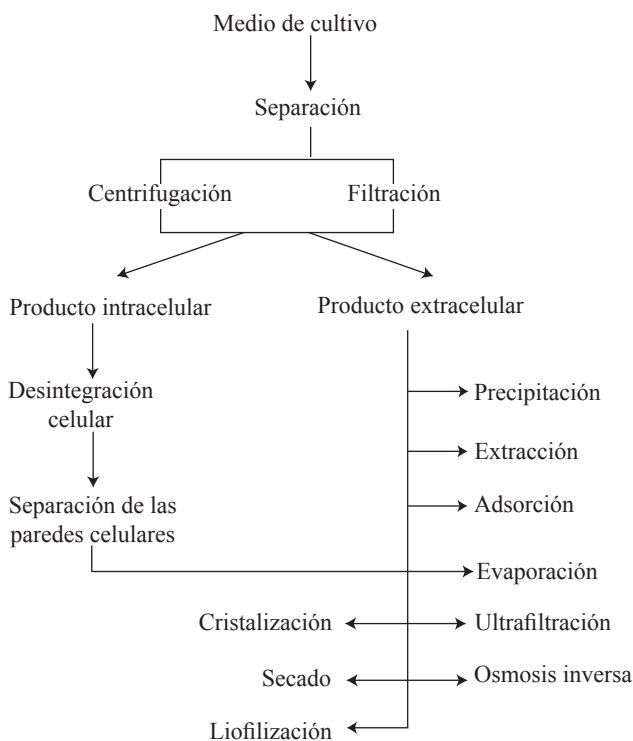
Tabla 4. Composición en aminoácidos de la levadura de cerveza desamargada

<i>Aminoácido</i>	<i>%</i>	<i>Aminoácido</i>	<i>%</i>
Alanina	6.0	Arginina	4.3
Aspartato	8.4	Cisteína	0.2
Glutamato	11.3	Glicina	4.1
Histidina	2.2	Isoleucina	3.9
Leucina	6.3	Lisina	6.5
Metionina	1.2	Fenilalanina	3.9
Prolina	3.9	Serina	4.3
Treonina	4.1	Triptófano	1.4
Tirosina	2.4	Valina	5.1

Aislamiento de productos

Los procesos básicos empleados en el aislamiento de un compuesto microbiano se muestran en el esquema de la figura 3. Después de producida la biomasa, el fluido es procesado para facilitar las operaciones siguientes, esto es, se separan las células del medio fermentado.

Figura 3. Esquema de operaciones empleadas en el aislamiento de productos microbianos



Fraccionamiento de levaduras

Se han propuesto esquemas de fraccionamiento de levaduras a partir de autolizados frescos, sin embargo, la práctica común en la industria desarrolla procesos de obten-

ción de los diferentes compuestos de forma aislada con una pobre eficiencia de utilización de la biomasa. En este tipo de procesos caen producciones de especialidades bioquímicas de alto valor agregado y elevadísimos precios como: glutatión, factor de tolerancia a la glucosa, NADH, FMN, FADH₂, enzimas como alcohol deshidrogenasa (ADH), glucosa isomerasa, etc. Otras tendencias se encaminan en la obtención simultánea de aditivos para alimentos a partir de tecnologías más simples y sin implicar elevados grados de pureza como concentrados de proteínas, extractos de levadura y concentrados de polisacáridos de pared celular, y por último los esquemas diseñados para la obtención de tantos productos como sea posible obtener simultáneamente, por ejemplo: invertasa, extracto de levadura, ergosterol, polisacáridos, fosfolípidos, etcétera.

Fraccionamiento de levaduras a partir de autolizados

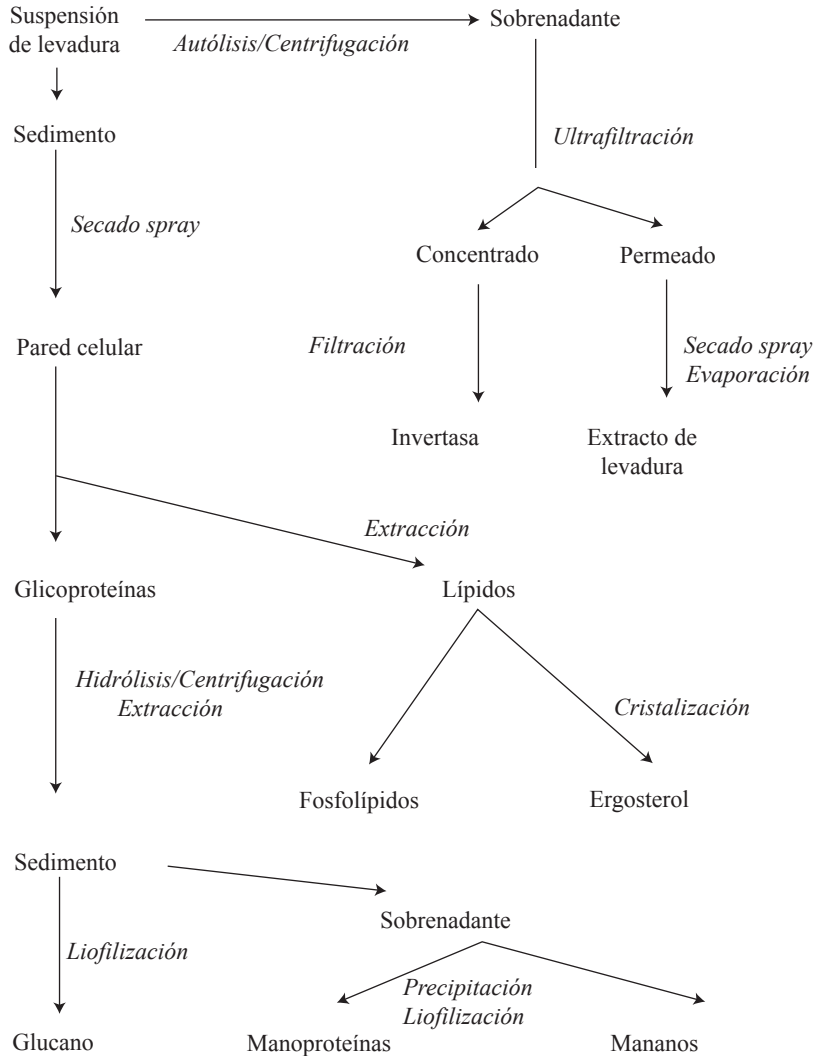
La figura 5 muestra el esquema general propuesto para el fraccionamiento multi-componente de extracto de levadura panadera (Kollar *et al.*, 1992).

Después de autolizada la suspensión de levadura, proceso que se realiza a 50°C en presencia de NaCl y etanol por 24 horas, la suspensión se centrifuga de inmediato. El sobrenadante se somete a un proceso de ultrafiltración y el concentrado, con la enzima invertasa, se filtra a vacío y se evapora. El permeado se seca directamente por atomización y se obtiene extracto de levadura en polvo.

El sedimento de la centrifugación se lava y se seca. Esta etapa de secado puede obviarse y proceder a las extracciones siguientes a partir de las células húmedas. La extracción con etanol al 95% rinde la fracción lipídica que se extrae 3-4 veces con n-hexano para obtener el ergosterol que se cristaliza a 2°C después de la evaporación.

Los fosfolípidos se aíslan de residuo de la extracción de ergosterol. Los solventes se evaporan y el concentrado se diluye en una solución de 50% de acetona en agua. La mezcla se agita mecánicamente y la espuma formada rinde una fracción que contiene 70% de fosfolípidos. El sedimento remanente de la extracción de los lípidos es la fuente de β-glucanos, mismos que se aíslan por tratamientos sucesivos con álcali y ácido a 100°C. Del extracto alcalino se pueden aislar las manoproteínas por precipitación a pH 4.5 y el líquido remanente se precipita con etanol rindiendo una fracción rica en mananos.

Figura 5. Fraccionamiento de levadura autolizada



El fraccionamiento propuesto sólo ha sido llevado hasta nivel de planta piloto, sin embargo, perspectivamente presenta aspectos muy interesantes en cuanto a pro-

ducciones versátiles que pueden compensar los elevados costos de producción. La accesibilidad al mercado para la realización comercial de estos productos es el punto neurálgico de esta tecnología.

Producción de derivados de levadura

El procedimiento permite la producción de diferentes productos, tales como:

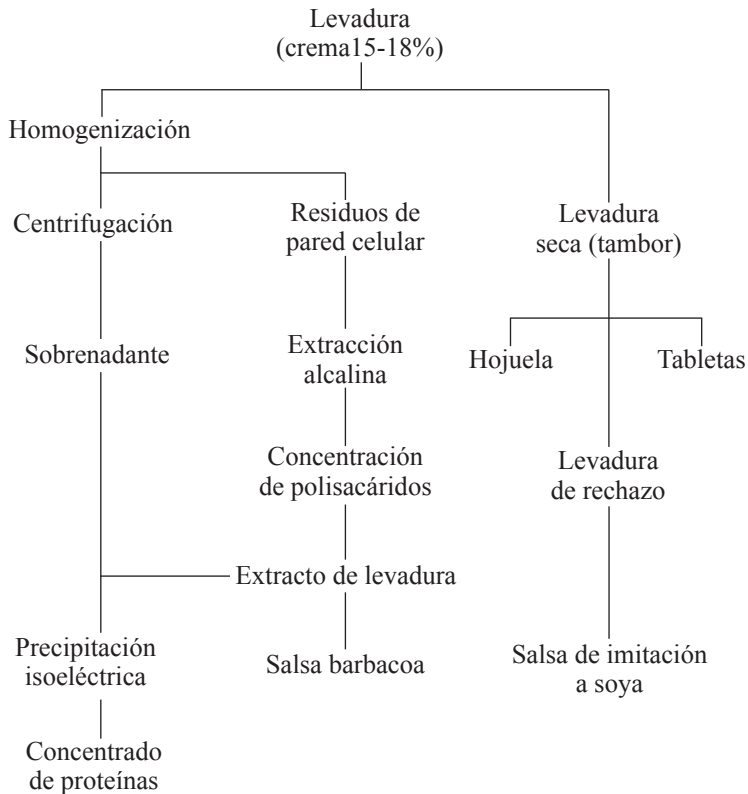
- Hojuelas de levadura.
- Tabletas de levadura.
- Salsa de mesa a base de extracto de levadura.
- Concentrados de proteína.
- Salsa de imitación de soja.

Las inversiones requeridas para el procedimiento de una tonelada de levadura está por debajo de 2 millones de dólares con una rentabilidad superior al 53 por ciento. Las inversiones se recuperan en 0.75 años. La producción de ingredientes alimentarios a partir de levadura revaloriza su biomasa alrededor de 25 veces.

Existe un importante mercado internacional para productos derivados de levadura que alcanza un nivel de operaciones del orden de los miles de millones de dólares anualmente (Anon, 1994). El crecimiento de este mercado puede atribuirse a diferentes factores, como factibilidad de procesamiento de los alimentos en el hogar o centros de consumo colectivo; la necesidad de aumentar la estabilidad de los alimentos en el almacén o en la vidriera de ventas; la satisfacción de necesidades de índole dietética, como el bajo contenido de colesterol, entre otros; la disminución de los costos de producción y la suplementación de nutrientes en programas de alimentación masiva subsidiados para sectores de bajos ingresos, etcétera.

Dentro de la amplia gama de aditivos e ingredientes que se comercializan, algunos resultan de especial interés por su variedad de aplicaciones o por las fuentes de materias primas a partir de las que se producen. La biomasa microbiana, y en particular la de las levaduras, es una fuente de productos de interés alimentario conocida básicamente por su capacidad de generar CO₂ en las industrias panadera y de bebidas alcohólicas. La figura 1 muestra un esquema simplificado de producción de ingredientes alimentarios a partir de levaduras.

Figura 6. Esquema simplificado de producción de aditivos alimentarios de levadura



Fuente: Otero *et al.*, 2000.

La tabla 5 ofrece la composición de los concentrados de proteína de levadura. Los niveles de proteína están en el entorno de 70 %. El nivel de ácidos nucleicos resulta inferior a 3%. Este factor es importante desde que las interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos para formar nucleoproteínas afectan significativamente la solubilidad de las mismas. El remanente de hidratos de carbono no incide en la funcionalidad de éstos.

Tabla 5. Composición química de concentrados de proteínas y extracto de levadura de cerveza* (g/100g)

	<i>Concentrado de proteína</i>	<i>Proteínas de pared celular</i>	<i>Extracto de levadura</i>
Humedad	5.02 ± 0.35	3.29 ± 0.54	30.05 ± 1.33
Proteína	71.40 ± 1.20	72.31 ± 0.86	36.04 ± 0.37
Hidrato de carbono	15.31 ± 0.75	19.02 ± 0.32	8.81 ± 0.39
Ácidos nucleicos	3.00 ± 0.31	0.29 ± 0.35	13.93 ± 1.03
Lípidos	4.10 ± 0.13	4.10 ± 0.31	0.10 ± 0.09

* Todas las determinaciones por duplicado.

Algunas propiedades funcionales de los concentrados de proteína se muestran en la tabla 6. Aunque las propiedades analizadas no presentan diferencias significativas entre las proteínas extraídas de las paredes celulares, estas últimas presentaron una menor solubilidad. Esto se debe a las condiciones de extracción alcalina que induce elevados grados de desnaturalización.

Tabla 6. Propiedades de hidratación, enlace de aceite y capacidad emulsionante de las proteínas aisladas de levadura de cerveza*

	<i>Concentrado de proteína</i>	<i>Proteínas de pared celular</i>	<i>Proteína de C. utilis</i>
Capacidad de retención de agua [%]	424 ± 12.51	408 ± 11.77	224
Capacidad de enlace de aceite [%]	92.0 ± 0.92	103,0 ± 1.25	90
Capacidad de emulsión** [g aceite/g]	144 ± 3.31 ^a	139 ± 2.98 ^a	—

* Todos los valores medias de determinaciones triplicadas ** Concentración de proteína 2.5%, pH 6.0 frente a aceite de maíz.

Los residuos celulares son ricos en polisacáridos estructurales y de reserva. Éstos se obtienen después de la separación del extracto diluido y poseen una funcionalidad limitada. El tratamiento de extracción alcalina de las proteínas remanentes en los residuos duplica la CRA e incrementa 20 veces la CEA. Los resultados se ofrecen en la tabla 7. Producto del tratamiento, el contenido de hidratos de carbono se eleva hasta 88% en los residuos tratados.

Tabla 7. Composición de residuos de pared celular antes y después de la extracción alcalina (g/100 g)

	<i>Residuos de homogenización</i>	<i>Residuos de extracción</i>
Humedad	ND	2.0±0.15
Proteína	36.0±1.01	3.7±0.21
Hidratos de carbono	48.0±0.99	88.3±1.03
ARN	4.8±0.22	2.0±0.19
Lípidos	6.4±0.10	1.5±0.09

ND= no determinado.

Elaboración de salsa para carnes a partir de extracto de levadura y salsa de imitación a soja

La producción y utilización del extracto de levadura es conocida desde hace tiempo en la industria alimenticia como materia prima (4) y existen numerosas firmas productoras de una gran tradición en el mercado internacional, lo que limita su lanzamiento al mercado por un productor emergente. Sin embargo, si a partir de éste se elabora un producto terminado, cualitativamente diferente, los espacios de introducción se abren. La producción de salsas de mesa como saborizantes directos al consumidor es una alternativa interesante (Otero *et al.*, 1998).

La tabla 8 muestra algunas variantes de salsas de diferentes tipos, elaboradas a partir de extractos de levadura suplementados con productos tradicionales en el mercado.

De las variantes analizadas resultó más promisoría la muestra número 4, que asemeja a las salsas tipo barbacoa y resulta un aderezo apropiado para carnes asadas.

La levadura seca, rechazada en la producción de hojuelas o tabletas, genera una fracción que puede resultar altamente contaminante. Esta puede ser reprocesada en la producción de una salsa con sabor semejante a las salsas de soja obtenidas por hidrólisis de las proteínas presentes en el frijol. El proceso comprende la hidrólisis ácida a temperaturas de 120-160°C, neutralización y centrifugación. El proceso solubiliza alrededor del 90% del producto sometido al tratamiento. Posteriormente, se eleva el contenido salino hasta 18-20 por ciento. La evaluación sensorial de esta salsa en comparación con una salsa comercial no rindió diferencias significativas.

Tabla 8. Formulaciones para la elaboración de salsas de mesa a partir de extracto de levadura

<i>Formulaciones</i>						
<i>Producto (% base húmeda)</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>	<i>VI</i>
Extracto de levadura	48.7	41.5	49.4	47.8	47.4	57.0
Agua	36.7	31.2	37.2	35.9	35.6	43.0
Pasta de ajo comercial	13.2	11.2	13.4	12.9	no	no
Pimienta en polvo	1.4	1.2	no	1.4	no	no
Azúcar refinada	no	14.9	no	no	17.0	no
Mezcla de hierbas*	no	no	no	2.0	no	no

* Producto comercial compuesto de varios tipos de hojas secas: cilantro, tomillo, etc.

Tabla 9. Cálculo del valor de producción y rentabilidad de una planta con capacidad para procesar 1 ton de levadura operando con tres esquemas diferentes de producción*

<i>Indicador</i>	<i>Hojuelas, 8% humedad</i>	<i>Tabletas, 8% humedad</i>	<i>Salsa cárnica</i>	<i>Conc. de proteínas + Conc. de polisacáridos</i>	<i>= total</i>
Producción, t	0.92	0.90	1.94	0.92	
Costo producción**	2246.69	1908.88	1032.75	156.65	
Comercialización** (15% sobre facturación)	1518.00	1909.23	1184.33	341.82	
Impuestos** (40% sobre facturación)	4048.00	5091.43	3158.42	911.65	
Total de gastos**	7812.69	8909.60	5375.30	1253.52	6628.82
Precio unitario***	11.00	14.14	4.07	2.48	
Valor de producción**	10120.00	12728.57	7895.56	2279.12	10174.68
Ganancias**	2307.31	3520.36	1025.60	3545.86	
Rentabilidad, %	42.86	46.89	81.82	53.49	
Recuperación, años	0.70	1.06	2.60	0.75	

* Cálculos a través de programa Prospin. Costos utilizados, los vigentes en el nordeste brasileño para 1996. Precios de los productos. 80% de sus similares en el mercado mundial.

**Costo calculado en dólares americanos.

***Dólares americanos/kg.

Balance económico de la producción

La tabla 9 ofrece el balance económico para las tres líneas de producción considerándolas de forma independiente. No se incluye la producción de la salsa de imitación por depender, en el presente enfoque, del volumen variable de la levadura seca de rechazo. La producción de hojuelas de levadura es la de más baja rentabilidad, y aun así, presenta un tiempo de recuperación de la inversión de 1.15 años. Las otras dos alternativas ofrecen índices muy superiores.

Bibliografía

- Bueno, G. E.; M. A. Otero; M. M. Klibansky; A. C. González (1985), "Nucleic Acid Reduction from Yeast: Activation of Intracellular RNase", *Acta Biotechnol* 1: 91-100.
- Caballero-Córdoba, G.M.; V. C. Sgarbieri (2000), "Nutritional and Toxicological Evaluation of Yeast (*Saccharomyces Cerevisiae*) Biomass and A Yeast Protein Concentrate", *J. Sci. Food Agric.* 80: 341-51.
- Dixon, B. (1999), "Yeasts: Rising Stars in Biotechnology", *ASM News* 65 (1): 2-3.
- Dziejak, J (1987), "Yeast and Yeast Derivatives. Applications", *Food Technol.* 32: 122-125.
- Gierhart, D. L.; N. N. Potter (1978), "Effects of Ribonucleic Acid Removal Methods on Composition and Functional Properties of *Candida Utilis*", *J. Food Sci.* 43: 1705-1713.
- Ingledew, W. M.; L. A. Langille; G. S. Menegazzi; C. H. Mok (1977), "Spent Brewers Yeast-Analysis, Improvement, and Heat Processing Considerations", *MBAA Technical Quarterly* 14: 231-237.
- Kollar, R.; E. Sturdik; J. Sajbidor (1992), "Complete Tractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass", *Food Biotechnol.* 6: 225-237.
- Macdonald, F. (1995), "Use of Immunostimulants in Agricultural Applications", en *Biotechnology in the Feed Industry*, Proceedings of the 11th Annual Symposium (T. P. Lyons y K. A. Jacques, eds.), Nottingham, Reino Unido, Nottingham University Press, pp. 97-103.
- Mahan, D. C. (1995), "Selenium Metabolism in Animals: What Role does Selenium Yeast Have?", en *Biotechnology in the Feed Industry*, Proceedings of the 11th Annual Symposium (T. P. Lyons y K. A. Jacques, eds.), Nottingham, Reino Unido, Nottingham University Press: 257-267.

- Newman, K. E. (1994), “Mannan-Oligosaccharides: Natural Polymers with Significant Impact on the Gastrointestinal Microflora and the Immune system”, en *Biotechnology in the Feed Industry*, Proceedings of the 10th Annual Symposium (T. P. Lyons y K. A. Jacques, eds.), Nottingham, Reino Unido, Nottingham University Press: 167-174.
- Otero, M. A.; A. J. Cabello; M. C. Vasallo; L. García; J. C. López (2000), “Tecnología para la utilización integral de la levadura de cerveza en la industria alimenticia”, *Arch. Latinoamer. Nutr.* 50 (4): 361-365.
- ; M. C. Vasallo; O. Verdecia; V. M. Fernández; D. Betancourt (1996), “Process for the Complete Fractionation of Baker’s Yeast”, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 67: 67-71.
- ; A. J. Cabello; M. C. Vasallo; L. García; J. C. López (1998), “Preparation of an Imitation Soy Sauce from Hydrolyzed Dried Yeast *Candida utilis*”, *J. Food Proc. Preserv.* 22: 471-483.
- Rose, A. H. (1986), *Biotechnology in Food Processing*, Park Ridge, Nueva Jersey, Noyes Publication: 115-128.
- Spring, P. (1996), *Effects of Mannanoligosaccharide on Different Cecal Parameters and on Cecal Concentrations of Enteric Pathogens in Poultry*, Tesis Doctoral, Zurich, Suiza, Swiss Federal Institute of Technology.
- (1998), “Mannanoligosaccharide. Its Logical Role as a Feed Additive for Piglets”, en *Biotechnology in the Feed Industry*, Proceedings of the 14th Annual Symposium (T. P. Lyons y K. A. Jacques, eds.), Nottingham, Reino Unido, Nottingham University Press.
- Vasallo, M. C.; M. A. Otero; L. García; J. R. Dopico; J. C. López (2001), “Effect of Homogenization as Pretreatment for the Improvement of Autolysis Efficiency of *Kluyveromyces fragilis*”, *Food Sci. & Technol. Internat.* 7 (5): 445-450.
- Vilela, E. S. D.; V. C. Sgarbieri; I. D. Alvim (2000), “Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levadura (*Saccharomyces* sp.)”, *Rev. Nutr.* 13 (3): 185-92.

Panorama general de la biotecnología aplicada al desarrollo de bioproductos para la agricultura en Cuba

General Overview of the Biotechnology Applied to Develop Bioproducts for the Agriculture in Cuba

Díaz de Villegas, M. E.¹; Altuna, B.; Villa, P.

Resumen

La aplicación de técnicas de la biotecnología moderna en el sector agroalimentario, dentro de las prácticas de agricultura sostenible y de la conservación de la biodiversidad, es una necesidad imperiosa para aumentar la producción de alimentos.

El desarrollo y empleo de bioproductos (biopesticidas, biofertilizantes y bioestimulantes), en la agricultura, está siendo objeto de gran atención, por científicos y productores, como una alternativa para la reducción del empleo de pesticidas y fertilizantes químicos con el fin de disminuir la contaminación ambiental producida por los mismos.

Los bioplaguicidas producidos por vía biotecnológica, constituidos por cepas activas de microorganismos para combatir plagas y enfermedades encabezados por el *Bacillus thuringiensis* (Bt) y el hongo *Trichoderma* spp., han sido los más extendidos en Cuba; sin embargo, en los últimos años, se han venido ejecutando varios proyectos de investigación encaminados al desarrollo de productos formados por los metabolitos activos tales como el antifúngico foliar Glutucid, cuyo principio activo contiene: sideróforos, ácido salicílico y sustancias antimicrobianas, el Biomal, bioherbicida constituido por fitotoxinas, producidos ambos por fermentación sumergida de la *Pseudomonas aeruginosa* PSS.

¹ Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), Apartado Postal 4026, La Habana, C. P. 10400, Cuba, email: mariaelena.diaz@icidca.edu.cu

De igual forma, se han venido desarrollando productos bioestimuladores entre los que se encuentran el Bioenraiz, cuyo principio activo es la hormona de crecimiento vegetal ácido Indol acético (AIA), producido por la bacteria *Rhizobium* sp., la cual ejerce una acción positiva sobre la formación de las raíces y la iniciación de los pelos laterales de la raíz, lo que favorece la germinación de las plantas; y el Biojas constituido por el ácido jasmónico (AJ), y elaborado a partir del hongo *Botryodiplodia theobromae*, con un amplio espectro de respuestas fisiológicas en cultivos.

En el presente trabajo se presenta una panorámica general de las etapas comprendidas en el desarrollo de bioproductos y regulaciones de bioseguridad, las características de la producción biotecnológica de los productos y metabolitos antes mencionados, así como las potencialidades de las levaduras en el control biológico de enfermedades postcosecha de frutas tropicales.

Abstract

Application of modern biotechnological techniques in agro foods sector as a part of sustainable agriculture y the conservation of biodiversity is an imperious necessity in order to increase food production.

Developed and employ of bioproducts (biopesticides, biofertilizer and bioestimulants) in agriculture have been taking into account by Scientifics and producing, as an alternative in order to reduce the application of chemical pesticides and fertilizers and also environmental contamination that they produce.

Bioplaguicidas produced by biotechnological methods constituted by active strains of microorganisms against pests and diseases, as *Bacillus thuringiensis* (Bt) and the mould *Trichoderma* spp., have been used at length in Cuba, nevertheless in recent years there have been carried out research projects with de objective of developed a products constituted by active metabolites as foliar antifungal Gluticid, which active principle contain: siderophores, salicylic acid and antimicrobial metabolites and Biomal, bioherbicide constituted by phytotoxins produced by *Pseudomonas aeruginosa* PSS.

At the same time there have been developed bioestimulants as Bioenraiz which active principle is indolacetic acid (IAA), produced by the bacteria *Rhizobium* sp., that make positive action in the formation of root and the beginning of lateral hair and Biojas constituted by jasmonic acid (JA), produced by the fungi *Botryodiplodia theobromae*.

Present paper show a general overview of stage in the developed of bioproducts and biosecurity regulations, the characteristics of the biotechnological production of the products and metabolites above mention and potentialities of yeasts in the biological control of postharvest disease of tropical fruits.

Introducción

Para satisfacer las necesidades humanas actuales es necesaria una agricultura acorde con las urgencias e intereses de nuestros países en tanto se preserva el medio ambiente y los recursos naturales para las futuras generaciones.

Teniendo en cuenta los aspectos antes mencionados, las tendencias en el mundo actual son hacia el reemplazo al menos parcial de los fertilizantes y pesticidas químicos por los bioproductos correspondientes, cuyo impacto en el mercado dependen esencialmente del desarrollo de las metodologías para producir biomasa y/o los metabolitos activos, así como los formulados que reúnan los requisitos de viabilidad si se trata de productos constituidos por la biomasa y en general que sean compatibles con las plantas hospederas y de eficacia probada.

La biotecnología ha abierto nuevas posibilidades en diferentes aspectos de la agricultura, entre los que se encuentra la producción de nuevos insumos agrícolas como biofertilizantes y bioplaguicidas (De Peña, 2004).

Siguiendo esta tendencia mundial, en Cuba en las últimas décadas se ha incrementado la producción de biopesticidas a base *Trichoderma harzianum*, *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, y *Verticillium lecanii* mediante tecnologías semi-industriales e industriales (Fernández, O., 2001), así como de biofertilizantes entre los que se encuentran los micorrízicos a base de propágulos de hongos micorrizógenos de *Glomus* sp. y bacterianos constituidos fundamentalmente por *Azotobacter chroococcum* que han permitido al país contar con recursos propios para la protección fitosanitaria de los cultivos y la fertilización, con lo que se ha logrado reducir el uso de los agroquímicos en la agricultura y proteger el medio ambiente.

El desarrollo científico nacional y la necesidad de contar con productos biológicos competitivos han impulsado la investigación dirigida a la utilización de los procesos biotecnológicos en función de obtener bioplaguicidas bajo tecnologías de avanzada.

En el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), se han desarrollado, desde la pasada década, diferentes investigaciones dentro del Programa Nacional de Biotecnología Agrícola, donde se han obtenido las tecnologías para la producción por vía fermentativa de los bioestimuladores: ácido indol acético (AIA) que es el principio activo del producto Bioenraiz y el producto Biojas, constituido por el ácido jasmónico elaborado a partir del hongo *Botryodiplodia theobromae* (Klibansky y cols., 1998; Altuna y cols., 1996; Gutiérrez y cols., 1996).

Como parte de estas investigaciones también se han desarrollado biopesticidas constituidos por los metabolitos activos y no la biomasa, entre los que se encuentran el Gluticid, que es un antifúngico foliar que contiene metabolitos antimicrobianos, ácido salicílico y sideróforos y un bioherbicida formado por fitotoxinas ambos producidos a partir de la *Pseudomonas aeruginosa* PSS (Villa y cols., 2004).

El presente trabajo ha tenido como objetivo presentar las características de la producción biotecnológica de los productos y metabolitos antes mencionados, las potencialidades de las levaduras en el control biológico de enfermedades postcosecha de frutas tropicales, y una panorámica general de las etapas comprendidas en el desarrollo de bioproductos y regulaciones de bioseguridad.

Bioestimuladores constituidos por metabolitos secundarios

Las auxinas fueron las primeras fitohormonas reconocidas y detectadas químicamente en el siglo XIX. Entre los compuestos con actividad auxínica se han reportado los indoles y derivados fenilacéticos y dentro de ellos, el ácido indol-3-acético (AIA) que es considerado la auxina más activa en planta desde el punto de vista fisiológico (Altuna y cols., 2005).

Esta fitohormona está involucrada en una diversa variedad de respuestas al crecimiento y desarrollo de las plantas, cuyo mecanismo de acción no está completamente elucidado, entre las que pueden citarse: la estimulación de la división celular, iniciación de la formación de raíces y de la floración de callos, entre otras (Glick, y cols., 1999; Frankenberger y Arshad, 1995).

Las plantas son capaces de sintetizarlas, pero también responden a las aplicaciones exógenas de las mismas durante ciertas fases de crecimiento y condiciones de cultivo.

Por otra parte, la biosíntesis de AIA no se limita solamente a las plantas superiores, diversos microorganismos son también buenos productores de las mismas pero la concentración alcanzada varía entre las diferentes especies y cepas, y está condicionada a las condiciones de cultivo; fase del crecimiento del microorganismo y disponibilidad de los sustratos, dentro de los cuales se ha demostrado la importancia del triptófano como precursor de su síntesis para lograr elevadas concentraciones.

Dentro de estos microorganismos se encuentran las Rhizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas (PGPR), entre las que se encuentran las del género *Rhizobium* (Altuna y cols., 2005).

El producto bioestimulador Bioenraiz[®], desarrollado en el ICIDCA, se obtiene mediante cultivo sumergido empleando una cepa de *Rhizobium spp*, que produce el ácido indol acético (AIA) a una concentración de 350-400 mg/L, según procedimiento patentado (Altuna, 2005).

Otros de los reguladores del crecimiento vegetal lo constituye el ácido jasmónico (AJ), el cual junto a sus compuestos derivados constituyen un grupo de sustancias endógenas, identificadas en una gran variedad de especies vegetales (Soberón y cols., 2005). Fue aislado en 1971 a partir de sobrenadantes de cultivos del hongo *Lasiodiplodia theobromae* e identificado como potente inhibidor del crecimiento y senescencia de las plantas (Aldridge y cols., 1975).

El uso de microorganismos para la producción de AJ ha demostrado ser prometedor, entre las especies más representativas que se reportan se encuentran las de *Botryodiplodia theobromae* y *Gibberella fujikuroi* (Almeida y cols., 1999).

A partir de la década del ochenta, se pudo demostrar otros efectos tales como: incremento de rendimientos agrícolas en fresa, soja y caña de azúcar; estimulación de la formación de tubérculos en *Discorea spp* (Koda y Kikuta, 1991) y un especial papel en los mecanismos de defensa de las plantas (Kitahara y cols., 1991).

Teniendo en cuenta las características antes mencionadas del ácido jasmónico, en el ICIDCA se ha trabajado en el desarrollo del producto Biojas[®] que contiene ácido jasmónico, en una concentración entre 600-700 mg/L, el cual se obtiene mediante un proceso fermentativo estático del hongo *Botryodiplodia theobromae*, con un medio de cultivo barato y sencillo sin necesidad de un inductor externo. La aplicación del caldo fermentado ha permitido el incremento en el cultivo de fresa (20%), papa (35%), así como la reducción del ataque de insectos como la *Chinche harinosa* en cultivos de piña; y en cultivos de toronja se logró adelantar la maduración externa entre 15 y 30 días, observando que en donde se aplica el producto disminuye la presencia de plagas y enfermedades (Altuna y cols., 2002).

Biopesticidas constituidos por los metabolitos activos a partir de pseudomonas

Con vistas a la protección del medioambiente en las últimas décadas, se ha incrementado el interés en el empleo de microorganismos para el control biológico de patógenos, con el fin de disminuir el uso de agroquímicos, cuya definición por la Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB) es la utilización de organismos vivos o de sus productos, para evitar o reducir las pérdidas o daños causados por los organismos nocivos (Pérez, 2004).

Entre los microorganismos destacados como agentes de biocontrol contra bacterias y hongos fitopatógenos se encuentran las *Pseudomonas* fluorescentes, por presentar las características de colonizar de forma rápida y agresiva las raíces de las plantas, así como suprimir los microorganismos patógenos mejorando el crecimiento de la planta y el rendimiento de la cosecha (De Souza y cols., 2003; Keel y cols., 1996) por la producción de metabolitos como sideróforos, sustancias antibióticas (De Souza y cols., 2003; Duffy y Défago, 1999; Nagarajkumar y cols., 2004; Walsh y cols., 2001) y compuestos volátiles (Lugtenberg y Dekkers, 1999).

Sideróforos

Son pigmentos extracelulares, fluorescentes amarillo-verdoso, solubles en agua, que actúan como agentes quelantes del Fe (III), se acomplejan con el mismo, dando lugar a los complejos sideróforos-Fe (III). Estos metabolitos basan su acción en la competencia que se establece en la rizósfera por el ión férrico entre las *Pseudomonas* spp. y el microorganismo patógeno, impidiendo que estos iones presentes en el suelo, queden disponibles al patógeno para iniciar la infección (Leeman y cols., 1996; Loper y Buyer, 1991).

La producción de sideróforos en cultivo sumergido, por cepas de *Pseudomonas* spp., está influenciada fundamentalmente por la concentración de hierro en el medio. Elevadas concentraciones de hierro inhiben la producción de sideróforos (Laine y cols., 1996; Bultreys y Gheysen, 2000; Díaz de Villegas y cols., 2002).

Antibióticos

Los antibióticos son un grupo de compuestos orgánicos químicamente heterogéneos de bajo peso molecular. A bajas concentraciones, estas sustancias son perjudiciales para el crecimiento o actividad metabólica de muchos microorganismos (Thomashow y cols., 1997).

Existen numerosos estudios sobre los antibióticos producidos por *Pseudomonas* sp., debido a que éstas comúnmente habitan en la rizósfera y filósfera. También se pueden aislar de ambientes naturales, utilizan un amplio rango de sustratos, así como son fáciles de cultivar y manipular genéticamente, lo que las convierte entre las más utilizadas para la experimentación (Whipps, 2001). Entre los más reportados se encuentran: 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG) (De Souza y cols., 2003);

fenacinas (PHZ) (Cartwright, 1995); pirrolnitrin (PRN); pioluteorin (PLT) (Dowling, O'Gara, 1994).

Considerando que las *Pseudomonas* spp. basan su acción fundamentalmente por los metabolitos antes mencionados, en el ICIDCA se desarrolló la tecnología de producción de un antifúngico foliar a partir de la *Pseudomonas aeruginosa* PSS, constituido por el sideróforo pioverdin, ácido salicílico y metabolitos antimicrobianos.

Durante ensayos realizados en condiciones controladas y de campo, resultó efectivo; en el control del moho azul del tabaco producido por el hongo *Peronospora tabacina*; en el control de *Phytophthora infestans* en papa reduciendo 70% la infección; y contra el tizón temprano (*Phytophthora infestans*) del tomate con buenos resultados, comparado con los pesticidas químicos Mancozeb y Ridomil, siendo este resultado novedoso al aplicarse en el país por primera vez un producto biológico como antifúngico foliar (Stefanova, 2000).

Fitotoxinas

Existe una variedad de microorganismos, entre los que se encuentran hongos y bacterias patógenos de plantas, que reciben considerable atención con el fin de utilizarlos, junto a las fitotoxinas que ellos producen, como herbicidas biológicos (Duke y Abbas, 1994; Duke y cols., 1991). En muchos aspectos los patógenos de plantas ejercen el mismo efecto sobre las malezas que las fitotoxinas producidas por ellos, por lo que potencialmente pueden emplearse como herbicidas uno u otro, sin embargo, las toxinas ofrecen un espectro de acción más amplio que el patógeno que las produce, lo que resulta de mayor interés pues es conocido que los cultivos son atacados por distintos tipos de malezas que deben ser eliminadas (Abbas y Duke, 1995; Kremer, 1998).

Entre los microorganismos que pueden inhibir selectivamente el crecimiento de las plantas indeseables e impedir la germinación de las semillas, y/o el desarrollo de las mismas, mediante la producción de fitotoxinas, se encuentran las del género *Pseudomonas* (Bender y cols., 1999). La producción de bioherbicidas constituidos por las fitotoxinas producidas por cepas de *Pseudomonas*, ofrece una alternativa para su aplicación en el manejo integrado de malezas. La *Pseudomonas aeruginosa* PSS produce fitotoxinas de naturaleza peptídica de muy bajo peso molecular en cultivos líquidos, según los estudios realizados en el ICIDCA. La evaluación de la efectividad *in vitro* del bioherbicida a una concentración de fitotoxinas de 45 mg/mL, sobre la germinación de diferentes semillas de malezas ocasionó la necrosis o

el desarrollo atrofiado de las radículas que emergieron y mostró un comportamiento similar al producido por los herbicidas de tipo hormonal. La aplicación foliar del bioherbicida sobre *Eleusine indica*, *Amaranthus dubius*, *Portulaca oleracea*, *Oxalis violacea*, en condiciones controladas, mostraron resultados notables con diferencia en cuanto al comportamiento sobre las distintas especies y un efecto de contacto muy rápido. Las dicotiledóneas han sido más sensibles que las gramíneas (Díaz de Villegas y cols., 2005).

Levaduras para el control de enfermedades postcosecha en frutas

Las frutas para ser consumidas deben estar exentas de residuos tóxicos debido a los plaguicidas y a los microorganismos patógenos.

El uso de fungicidas químicos se ve limitado por diversas razones entre las que se encuentran regulaciones para garantizar la salud humana, y la contaminación ambiental, así como el desarrollo de cepas de patógenos que atacan postcosechas resistentes a dichos fungicidas, todo lo cual ha motivado la búsqueda de otras alternativas para el control de estos patógenos.

El control biológico puede ser una de las alternativas a considerar porque su empleo reduce el impacto negativo al medio ambiente y, específicamente, el empleo de antagonistas, entre las que se encuentran las levaduras, planteadas por diversos autores como una de las alternativas más promisorias, como parte del manejo integrado de plagas reduciendo el uso de pesticidas químicos (Droby y cols., 1998; Chand-Goyal y Spotts, 1996; Benítez Ahrendts y Carrillo, 2004).

Un antagonista ideal debe reunir las siguientes características: estabilidad genética, eficacia a bajas concentraciones, requerimientos nutricionales simples, supervivencia bajo condiciones medioambientales adversas, crecimiento satisfactorios en fermentadores con sustratos baratos, baja patogenicidad para la planta y no producción de metabolitos potencialmente tóxicos para humanos, resistencia a los pesticidas más frecuentemente usados y compatibilidad con otros tratamientos químicos y físicos (Wilson y Wisniewski, 1994). Las levaduras cumplen un buen número de los requisitos antes mencionados por lo que están recibiendo atención especial (Chalutz y Droby, 1998).

Adicionalmente a las características antes mencionadas, las levaduras poseen otras propiedades que las hacen recomendables como agentes de biocontrol: crecen

y colonizan rápidamente la superficie de las frutas y limitan los nutrientes a microorganismos patógenos (Bouzerda, y cols., 2003).

Etapas comprendidas en el desarrollo de un bioproducto

Una comercialización exitosa de los bioplaguicidas y biofertilizantes es el resultado de los procesos de desarrollo de los mismos, y frecuentemente está limitada por la falta de conocimientos y experiencia en la producción y formulación de los agentes de control biológico (Slininger y cols., 2003).

Los biopesticidas comerciales deben reunir los siguientes requisitos generales:

- Producción económicamente viable.
- Mantener estabilidad durante su almacenamiento.
- Adecuada persistencia en el campo.
- Fácil manipulación, mezclado y aplicación.
- Efectividad en el control de plagas y enfermedades.

Etapas que comprende el desarrollo de estos bioproductos:

1. Aislamiento e identificación de microorganismos efectivos para combatir las plagas y enfermedades que se desee y que no dañe las cosechas.

El aislamiento debe comenzar por las áreas donde ellos naturalmente crecen. La evaluación de un número mayor de agentes de biocontrol promisorios incrementa las posibilidades de encontrar una cepa efectiva.

2. Desarrollar procesos de fermentación minimizando el costo con un máximo de rendimiento y calidad.

Los factores de calidad incluyen:

- Eficacia en el control de plagas y enfermedades.
- Estabilidad durante el secado y almacenamiento.
- Compatibilidad con el hospedero.
- Adecuada persistencia en campo.

3. Generalización de la aplicación del producto y registro del mismo.
4. Comercialización.

Selección de cepas comerciales para el biocontrol

El hecho de que sólo una pequeña proporción de cepas haya llegado a productos comerciales, en parte se debe a diversas características comunes a la siguiente estrategia de selección:

- Poco conocimiento de las características de la plaga, como su resistencia a los pesticidas químicos.
- Evaluación de pocos microorganismos como candidatos a agentes de biocontrol.
- Los microorganismos seleccionados por los resultados *in vitro* y en condiciones controladas, no replican en condiciones de campo.

El aislamiento de las cepas debe comenzar en áreas donde ellos naturalmente están presentes. La evaluación de un número mayor de supuestos agentes de biocontrol incrementa las posibilidades de encontrar una cepa efectiva.

- Estudio de las condiciones de cultivo para producir biomasa y/o metabolitos activos empleando las medidas de bioseguridad.
- Optimización de los parámetros de fermentación: pH, temperatura, luz, aireación, agitación, tiempo y tamaño del inóculo.
- Tipo de fermentación por emplear: sumergida o en estado sólido.
- Estudios de efectividad del producto en ensayos *in vitro*, condiciones controladas y campo.
- Evaluación económica preliminar y del proceso tecnológico.
- Escalado del procedimiento tecnológico cumpliendo las medidas de bioseguridad.
- Aislamiento e identificación de los metabolitos activos.
- Evaluación técnico-económica y de mercado.
- Pruebas toxicológicas.
- Registro.
- Comercialización.

Desarrollo de adecuadas formulaciones

La aplicación exitosa de un microorganismo y/o los metabolitos que ellos producen, requiere del desarrollo de adecuadas formulaciones, adyuvantes y soportes.

En el caso de los microorganismos se requiere que el mismo se mantenga vivo y activo en el suelo, para lo cual es necesario encontrar y desarrollar apropiadas matrices sólidas y formulaciones líquidas para estabilizar las bacterias y hongos durante los procesos de almacenamiento y aplicación.

Seguridad biológica

La bioseguridad es una disciplina que existe en Cuba desde hace tiempo, quizá no como la concebimos hoy en día, y no con el nombre de bioseguridad, pero siempre ha estado presente en las prácticas de laboratorio donde se manipulan agentes biológicos con el nombre de “buenas prácticas de laboratorio”.

Cuando oímos hablar de bioseguridad, enseguida pensamos en niveles de contención, instalaciones de alto riesgo y máxima seguridad, o en algo muy peligroso de origen biológico que se debe controlar, y no estamos muy lejos de la realidad.

Niveles de seguridad

Según el riesgo relativo que entrañan los microorganismos infectantes que se manipulan en el laboratorio, la construcción, el diseño y también los medios de contención el Manual de Bioseguridad de la OMS los clasifica en cuatro categorías:

- Laboratorio básico.
- Laboratorio básico con cabina de seguridad biológica u otros dispositivos apropiados de protección personal o contención física.
- Laboratorio de contención.
- Laboratorio de contención máxima.

Nivel de contención biológica 1

Le corresponde el nivel de riesgo I, que indica escaso riesgo individual y comunitario. Se aplicarán las medidas del laboratorio básico. No necesita ningún equipo especial de contención.

Nivel de contención biológica 2

Le corresponde el nivel de riesgo II, indicador de riesgo individual moderado y riesgo comunitario limitado.

Nivel de contención biológica 3

Le corresponde el nivel de riesgo III, indicador de riesgo individual elevado y riesgo comunitario escaso.

Nivel de contención biológica 4

Le corresponde el nivel de riesgo IV, indicador de elevado riesgo individual y comunitario. Los laboratorios de contención máxima en funcionamiento deben estar supervisados por las autoridades sanitarias nacionales o de otro tipo.

Bibliografía

- Abbas, H. K.; S. O. Duke (1995), "Phytotoxins from Plant Pathogens as Potential Herbicides", *J. Toxicol-Toxin Review* 14: 523-543.
- Aldridge, D.; S. Gatts; D. Giles; W. Turner (1971), "Metabolites of Lasiodiplodia Theobromae", *J. Chem. Soc. Sec. C.*, 1623-1627.
- Almeida, G.; M. Klibansky; B. Altuna; F. Eng; S. Legrá; S. Armenteros (1999), "Algunas consideraciones acerca de la utilización de fuentes carbonadas en la producción de ácido jasmónico", *Rev. Iberoam. Micol.* 16: 146-148.
- Altuna, B.; M. Klibansky; F. Eng; T. González (1996), "Ácido jasmónico nuevo regulador en el crecimiento de plantas. Identificación en cepas de *B. theobromae*", *Rev. Sobre los de Caña de Azúcar*, xxx (1): 16-21.
- ; M. Klibansky; F. Eng; G. Almeida (2002), "Estudio de la función del ácido jasmónico en la protección de plantas", Forum Tecnológico Especializado, Manejo integrado de plagas MIP.
- ; G. Michelena; M. Klibansky; M. León; F. Eng (2005), "Producción por vía microbiológica de ácido indolacético a partir de *Rhizobium* sp.", patente, cer-

- tificado núm. 23030, concedido por resolución núm. 3856/2004 (int. Cl.7), C 12P 1/100.
- Bender, C. L.; F. Alarcón-Chaidez; D. C. Gross (1999), “*Pseudomonas Syringae* Phytotoxins: Mode of Action, Regulation, and Biosynthesis by Peptide and Polyketide Synthetases”, *Microbiol. Mol. Rev.* 63: 266-292.
- Benítez Ahrendts, M. R.; L. Carrillo (2004), “Levaduras inhibidoras de *Penicillium*”, *Rev. Argent. Microbiol.* 36: 182-186.
- Bouzerda, L.; H. Boubaker; E. H. Boudyach; O. Akhayat; A. Ben Aoumar (2003), “Selection of Antagonistic Yeasts to Green Mold Disease of Citrus in Morocco”, *Agriculture & Environment* 1 (1): 215-218.
- Bultreys, A.; D. Gheysen (2000), “Production and Comparison of Peptide Siderophores from Strains of Distantly Related Pathovars of *Pseudomonas Syringae* and *Pseudomonas Viridiflava* LMG 2352”, *Appl. Environment. Microbiol.* 66: 325-331.
- Cartwright, D. K.; W. S. Chilton; D. M. Benson (1995), “Pyrrolnitrin and Phenazine Production by *Pseudomonas Cepacia* Strain 5,5 B a Biocontrol Agent of *Rhizoctonia Solani*”, *Appl. Env. Microbiol. Biotechnol.* 43: 211-216.
- Chalutz, E.; S. Droby (1998), “Biological control of postharvest disease”, en G. J. Boland; L. D. Kuykendall (eds.), *Plant-Microbe Interactions and Biological Control*, Nueva York, Marcel Dekker: 157-170.
- Chand-Goyal, T.; R. A. Spotts (1996), “Control of Postharvest Pear Diseases Using Natural Saprophytic Yeast Colonists and Their Combination with a Low Dosage of Thiabendazole”, *Postharvest Biol. Technol.* 7: 51-64.
- De Peña, M. (2004), *La Biotecnología como factor de desarrollo para América Latina y el Caribe: Retos y oportunidades*, Concepción, Chile, Foro Global de Biotecnología.
- De Souza, J. T.; D. M. Weller; J. Raaijmakers (2003), “Frequency, Diversity and Activity of 2,4-diacetylphloroglucinol-Producing Fluorescent *Pseudomonas* Spp., in Dutch Take-All Decline Soils”, *Phytopathology* 93 (1).
- Díaz de Villegas, M. E.; P. Villa; A. Frías (2002), “Evaluation of the Siderophores Production by *Pseudomonas Aeruginosa* PSS”, *Rev. Latinoam. Microb.* 44: 112-117.
- _____; A. Bell; B. Altuna; M. A. González; R. García; E. Paredes; R. Gallardo; E. Torres; M. Carbonero (2005), “Influencia del pH y la temperatura en la producción de las fitotoxinas producidas por la *Pseudomonas aeruginosa* PSS. Evaluación de su efectividad en el control de malezas”, *Revista Fitosanidad*.
- Dowling, D. N.; F. O’Gara (1994), “Metabolites of *Pseudomonas* Involved in the Biocontrol of Plant Disease”, *Trends Biotechnol.* 12: 133-141.

- Droby, S.; L. Cohen; A. Daus; B. Weiss; B. Horev; H. Chalutz; M. Keren-Tzur; A. Shachnai (1998), "Commercial Testing of Aspire: A Yeast Preparation for the Biological Control of Postharvest Decay of Citrus", *Biol. Contr.* 12: 97-101.
- Duffy, B. K.; G. Défago (1999), "Environmental Factors Modulating Antibiotic and Siderophore Biosynthesis by *Pseudomonas Fluorescens* Biocontrol Strains", *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2429-2438.
- Duke, S. O.; H. K. Abbas (1994), "Natural Products with Potential use as Herbicides", *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.* 582: 348-362.
- ; H. K. Abbas; C. D. Boyette; M. Gohbara (1991), "Microbial Compounds with the Potential of Ferbicidal Use", *Brighton Crop Protection Conference, Weeds*, 1: 155-164.
- Fernández L. O. (2001), "Tendencias actuales en el desarrollo y producción de bioplaguicidas. Comercialización. Situación en Cuba", La Habana, Conferencia en el *IV Encuentro de Agricultura Orgánica, ACTAF*, Comisión de Productos para la Agricultura orgánica.
- Frakenberger, W. T.; M. Arshad (1995), *Phytohormones in Soils Microbial Production and Function*, Marcel Dekker (ed.), Nueva York.
- Glick B. R.; C. L. Patten; G. Holguin; D. M. Penrose (1999), *Overview of Plant Growth-Promoting Bacteria in Biochemical and Genetic Mechanisms. Used by Plant Growth Promoting Bacteria*, Imperial College Press.
- Kitahara, T.; Y. Warita; M. Abe; M. Seya; Y. Takagi (1991), "Stereo selective Synthesis of Methyl Epijasmonate", *Agric. Biol. Chem.* 55: 1013-1017.
- Klibansky, M.; B. Altuna; L. González; F. Eng (1998), *Desarrollo tecnológico y validación de ácido Indol Acético obtenido por vía biotecnológica*, Cuba, Informe presentado al Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA), Programa de Biotecnología Agrícola.
- Koda, Y.; Y. Kikuta (1991), "Possible involvement of Jasmonic Acid in tuberization of yam plants", *Plant Cell Physiol.* 32: 629-633.
- Kremer, R. J. (1998), "Microbial Interactions With Weed Seeds and Seedling and its Potential for Weed Management", en J. L. Hatfield; D. D. Buhler; B. A. Steward (eds.), *Integrated Weed and Soil Management. Sleeping Bear Press*: 161-179.
- Laine, M. H.; M. T. Karwoski; L. Raaska; T. Mattila-Sandholm (1996), "Antimicrobial Activity of *Pseudomonas Spp.* Against Food Poisoning Bacteria and Moulds", *Lett. Appl. Microbiol.* 22: 214-218.
- Leeman, M.; F. M. Den Ouden; J. A. Van Pelt; F. P. M. Dirx; H. Steijil; P. A. H. M. Bakker; B. Schippers (1996), "Iron Availability Affects Induction of Systemic Resistance to Fusarium Wilt of Radish in Commercial Greenhouse Trials by Seed Treatment with *Pseudomonas Fluorescens* wcs 374", *Phytopathology* 85:149-155.

- Loper, J. E.; J. S. Buyer (1991), "Siderophores in Microbial Interactions on Plant Surfaces", *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 5-13.
- Lutenberg B. J.; L. C. Dekkers (1999), "Wath Makes *Pseudomonas* Bacteria Rizosphere", *Minireview Enviromental Microbiology* 1 (1), 9-13.
- Miersch, O.; J. Schmidt; G. Sembdner; K. Shreiber (1989), "Jasmonic Acid Like Substances from Culture Filtrate of *Botryodiplodia Theobromae*", *Phytochemistry* 28: 1303-1305.
- Nagarajkumar, M.; R. Bhaskaran; R. Velazhahan (2004), "Involvement of Secondary Metabolites and Extracellular Lytic Enzymes Produced by *Pseudomonas Fluorescens* in Inhibition of *Rhizoctonia Solani*, the Rice Sheath Blight Pathogen", *Microbiological Research* 159: 73-81.
- Pérez, N. (2004), *Control biológico: Estrategias para su implementación. Manejo Ecológico de Plagas*. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario Rural-CEDAR, ISBN: 959-46-083-3, mayo 2004: 127-154.
- Slininger, P. J.; R. W. Behle; M. A. Jackson; D. A. Schisler (2003), "Discovery and Development of Biological Agents to Control Crops Pests", *Neotrop Entomol.* 32: 183-195.
- Soberón, J. R.; E. N. Quiroga; A. R. Sampietro; M. A. Vattuone (2005), *Jasmonatos*, <http://www.biologia.edu.cu>
- Stefanova, M. (2000), *Eficiencia del producto Biológico Gluticid*, informe interno, Proyecto CITMA Nacional, INISAV: 36.
- Thomashow, L. S.; D. M. Weller (1996), "Current Concepts in the use of Introduced Bacteria for Biological Disease Control: Mechanisms and Antifungal Metabolites", en G. Stacey y N. Keen (eds.), *Plant Microbe Interactions*, Nueva York, Chapman and Hall, 1: 187-235.
- Villa, P.; A. Bell; A. Frías; M. E. Díaz Villegas; J. Martínez; I. Gutiérrez; E. Torres; D. Redondo; Y. Hernández; M. Stefanova; I. Alfonso; H. Budzieckiwezc (2004), *Memorias del V Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agrícola*, 21-25 de junio 2004, Boca Chica, Rep. Dominicana, Taller III: Biosíntesis de metabolitos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS para el control de hongos fitopatógenos.
- Walsh, U. F.; J. P. Morrissey; F. O'Gara (2001), "*Pseudomonas* for Biocontrol of Phytopathogens: From Functional Genomics to Commercial Exploitation", *Current Opinion in Biotechnology* 12: 289-295.
- Whipps, J. M. (2001), "Microbial Interactions and Biocontrol in the Rhizosphere", *J. Exp. Bot.* 52:487-511.
- Wilson, C. L.; M. E. Wisniewski (1994), *Biological Control of Postharvest Diseases. Theory and Practice*, Boca Raton, Estados Unidos, CRC Press.

*Aprovechamiento biotecnológico
de productos agropecuarios II*
se terminó de imprimir en febrero de 2008.
Tiraje: mil ejemplares.

La biotecnología permite la bioconversión de residuos agroindustriales en productos de interés comercial mediante el uso de microorganismos. Además del interés económico que implica para la producción de productos de mayor valor agregado (enzimas, proteína unicelular, pigmentos, antibióticos, etc.), la utilización de subproductos agroindustriales tiene incidencia en la preservación del medio ambiente al considerar el desarrollo de tecnologías orientadas hacia una transformación sustentable de los recursos naturales. La búsqueda de materias primas de bajo costo y fácil adquisición para utilizarse como sustratos fermentables (fuentes de carbono o de nitrógeno), constituye uno de los retos más interesantes de la biotecnología actual. Por ello, es de especial importancia la investigación dirigida a encontrar medios de cultivo alternativos que sean económicamente competitivos. En este sentido, existen diversos subproductos de la agroindustria que podrían ser utilizados como sustratos no convencionales para la obtención de productos de interés económico como los aditivos alimentarios.

El cuerpo académico Ciencia y Tecnología Agroalimentaria en colaboración con el cuerpo académico de Alimentos y Nutrición a través de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos (Somenta), lleva a cabo el encuentro académico: Avances en el Aprovechamiento Biotecnológico de Productos Agropecuarios con la participación de grupos de investigación internacionales, quienes comparten los avances científicos y tecnológicos en el área del aprovechamiento de productos agrícolas para la producción de aditivos alimentarios.

Ciencia/tecnología

