

TUES

T-UES

1994

1506

1506

C965

C965

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

1994

FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA

ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA

Ep. 2



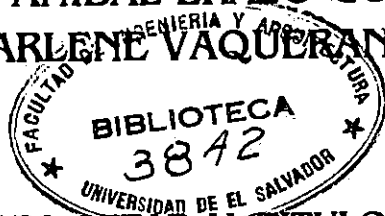
**"OPTIMIZACION DE LOS EFECTOS DE CONCENTRACION
DE LEVADURA Y TIEMPO DE AGITACION EN LA RUPTURA
DE PARED CELULAR DE *Saccharomyces uvarum* RESIDUAL
DE LA ETAPA DE FERMENTACION DE CERVECERIAS"**

PRESENTADO POR:

SILVIA MARGARITA CUELLAR LEMUS

JOSE ANIBAL ERAZO CORNEJO

XENIA MARLENE VAQUERANO CASTRO



15100979

15100979

PARA OPTAR AL TITULO DE:

INGENIERO QUIMICO

JUNIO DE 1994

SAN SALVADOR,

EL SALVADOR,

CENTRO AMERICA.



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA

TRABAJO DE GRADUACION

"OPTIMIZACION DE LOS EFECTOS DE CONCENTRACION
DE LEVADURA Y TIEMPO DE AGITACION EN LA RUPTURA
DE PARED CELULAR DE Saccharomyces uvarum RESIDUAL DE
LA ETAPA DE FERMENTACION DE CERVECERIAS"

PRESENTADO POR:

SILVIA MARGARITA CUELLAR LEMUS
JOSE ANIBAL ERAZO CORNEJO
XENIA MARLENE VAQUERANO CASTRO

COORDINADORA:

ING. DELMY DEL CARMEN RICO PEÑA



ASESORAS:

DRA. ELVIA BERENICE HUEZO DE OLIVA

ING. EUGENIA SALVADORA GAMERO RODRIGUEZ

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:
DR. FABIO CASTILLO FIGUEROA

SECRETARIO GENERAL:
LIC. MIRNA ANTONIETA PERLA DE ANAYA

FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA

DECANO:
ING. JOAQUIN ALBERTO VANEGAS AGUILAR

SECRETARIO:
ING. JOSE RIGOBERTO MURILLO CAMPOS



ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Delmy del Carmen Rico Peña".

ING. DELMY DEL CARMEN RICO PEÑA
DIRECTORA

AGRADECIMIENTOS

Especiales agradecimientos a la COMUNIDAD ECONOMICA EUROPEA en la persona del Dr. Mauro Bregola, Coordinador del Proyecto Na 85/19 para la Rehabilitación de la Universidad de El Salvador, por el financiamiento parcial brindado a este proyecto; y a LA CONSTANCIA S.A. en las personas del Sr. Gerhard Michael Hausinger, Gerente Técnico; Ing. José Reynaldo Escobar, Jefe del Departamento de Control de Calidad y a la Dra. Sulma Yanira Reyes de Serpas, Jefa del Departamento de Control de Calidad, Sección Microbiología, por la apertura mostrada y colaboración brindada al desarrollo de este proyecto de investigación para esta universidad.

Es necesario destacar la paciencia, dedicación y orientación brindadas por nuestras asesoras: Ing. M.Sc. Delmy del Carmen Rico Peña, Dra. Elvia Berenice Huevo de Oliva e Ing. Eugenia Salvadora Gamero Rodríguez.

Aunque desearíamos mencionar a cada uno de los que contribuyeron con el desarrollo de este trabajo, nos permitimos agradecer de manera especial a las siguientes personas: Ing. Gerardo Merino, Ing. Carlos Vargas, Ing. Mario Antonio Bermúdez, Ing. Rodolfo Ramírez Treminio, Srta. Sandra Lorena Recinos, Sr. Juan Rodolfo Mendoza, Sr. Manuel Antonio Morán.

No podemos olvidar a nuestros familiares, seres queridos y amigos que con su constante apoyo nos alentaron para llegar hasta el final.

Silvia, Aníbal y Marlene.

DEDICATORIA

A Dios Padre Todopoderoso, que es tan lindo que perdonó todo lo que me había alejado de El; a Dios Hijo, Jesús, quien dejó su palabra escrita para que conociéramos su infinita misericordia; a Dios Espíritu Santo, quien me da la fortaleza para seguir adelante en los momentos más difíciles; y a mi Virgencita María, quien con su amor de Madre Celestial me guarda y me da su ejemplo de sencillez y humildad.

A la memoria de mis abuelitas Mariana y Lolita; de mi primo Rafael Eduardo; a la de mi papá, Don Juan Francisco Cuéllar, de quien recibí esa enseñanza de honestidad, responsabilidad, amor al trabajo y a "estar siempre activa"; y a la de aquél que fue mi mejor amigo, pero que la vida se encargó de separarnos.

A mi madrecita bella, Angelita de Cuéllar, quien me dio el ejemplo de la fortaleza y resignación ante la Voluntad de Dios y a quien quiero de todo corazón por ser la mamá más "arrecha" que hay sobre la tierra.

A mis tíos Eduardo, Margoth "Cocó" y Flor; a mis hermanos Juan Francisco, Ana María Guadalupe y Luis Edgardo; y a todos mis sobrinitos.

A mis amigos Evelyn Velásquez y Juan Ricardo Salazar por apoyarme aún cuando riera o llorara; y a todas las personas que de una u otra manera forman parte del edificio de mi vida.

Silvia Margarita Cuéllar Lemus.

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a Dios Todopoderoso, a mis padres Leonidas Erazo y Nicolasa del Carmen quienes siempre me han brindado su apoyo, amor y comprensión en los momentos más difíciles; "Me siento orgulloso de tener padres como ustedes".

Así mismo a mi esposa Doris con quien he compartido momentos felices, y difíciles a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A mi hija Marcella quien es mi inspiración, y quien ha transformado mi vida, proporcionándome la felicidad de ser padre de una persona tan maravillosa.

A mis hermanos René, Alex, Salvador, Idalia, Ivonne, y Carolina Ramos, quienes siempre me apoyaron y me dieron fuerzas para superarme .

A Fernando Ramos mi cuñado quien es una persona sincera, sencilla y un excelente amigo.

José Erazo

DEDICATORIA

A mis padres, ANA JULIA y HORACIO ARNOLDO, por haberme dado la vida y todo su amor, por haberme enseñado que toda experiencia es positiva, que toda persona es valiosa , que todo ser vivo merece respeto y que la mejor manera de mostrar amor es actuar y no hablar.

A la memoria de mi madre, mi mejor amiga, por haberme heredado su vitalidad, alegría, positivismo y sencillez, por brindarme los recuerdos mas bellos que guarda mi memoria y las enseñanzas mas sublimes que alimentan mi ser.

A mi padre, verdadero artífice de la culminación de esta meta, por haberme heredado su fortaleza, serenidad y sentido de justicia, por ser mi apoyo incondicional y estar siempre atento a mis pasos, por ser ejemplo de firmeza, definición y claridad de principios, discreción y honestidad, por ser motivo principal de mi inspiración.

A USTEDES, MAMA Y PAPA, LES DEDICO ESTE ESFUERZO PORQUE NO PUEDO EXPRESAR CON PALABRAS LO ORGULLOSA QUE ESTOY DE SER SU HIJA.

LENE.

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo principal la optimización de los efectos de concentración de levadura y tiempo de agitación en la ruptura de pared celular de Saccharomyces uvarum residual de la etapa de fermentación de cervecería para la producción de extracto de levadura, con lo cual se está dando continuidad a los proyectos de investigación de esta Escuela relacionados con el aprovechamiento de desechos industriales, para este caso, los residuos sólidos de la fermentación alcohólica en la producción de cerveza, que se caracterizan por una alta demanda bioquímica de oxígeno (entre 3,000 y 16,000 mg/dm³) generando contaminación en el medio ambiente si son descargados directamente a los ríos y de los que al aplicar las técnicas adecuadas aún puede aprovecharse el alto contenido de proteínas y vitaminas del complejo B de las levaduras cosechadas.

Se realizó un enfoque de las generalidades del extracto de levadura y sus características; la disponibilidad de levadura residual en la cervecería La Constancia S.A. y sus características; el método de producción de extracto de levadura aplicando pretratamiento enzimático con papaína, 4 horas combinado con ruptura mecánica de pared celular, utilizando perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro como partículas abrasivas.

Se logró un porcentaje de ruptura de pared celular de 92.11% a una concentración de levadura del 40 % p/v y un tiempo de agitación de 5 minutos, fijando la velocidad de agitación en 3,450 rpm por características propias del equipo utilizado.

Se obtuvo extracto de levadura con un rendimiento promedio de 8.64 gramos de extracto seco por cada 100 gramos de crema de levadura al 40 % p/v; con este rendimiento se estima que es posible producir 149.1 Kg diarios de extracto de levadura al utilizar los 4,110 L por día de crema de levadura residual de La Constancia S.A.

Los análisis de calidad del extracto producido reportaron un contenido de proteínas de 12.17 % p/p en base seca, lo cual amerita revisión del método de producción empleado, dado que se esperaban valores alrededor de 45 % p/p en base seca. Así mismo, se obtuvo un valor ligeramente elevado en cuanto al contenido de cenizas, 17.94 % p/p en base seca, comparado con el 10 % P/p de extractos comerciales.

En cuanto a las pruebas de calidad microbiológica, resultaron negativas tanto para Escherichia coli como para salmonelas, con un recuento total de bacterias aeróbicas mesófilas de 165 unidades formadoras de colonias por gramo.

Respecto a vitaminas, se reportó la presencia de vitaminas B₁ y B₆ en concentraciones de 29 y 9.75 µg/g de extracto de levadura respectivamente.

También se realizó una prueba de crecimiento de Acetobacter sp. utilizando un medio de cultivo que contenía extracto de levadura comercial y otro con el extracto de levadura producido experimentalmente. En ambos casos resultó positivo el crecimiento de Acetobacter sp., con lo que se verificó la presencia de vitaminas del complejo B en el extracto producido, las cuales son esenciales para el desarrollo de este microorganismo.

INDICE

Contenido	Página
INTRODUCCION	
I. EXTRACTO DE LEVADURA, CARACTERISTICAS E IMPORTANCIA	3
1.1 Características fisicoquímicas del extracto de levadura.	4
1.2 Normas de calidad para extracto de levadura	8
II. DISPONIBILIDAD DE LEVADURA RESIDUAL EN CERVECERIA Y CONSUMO DE EXTRACTO DE LEVADURA EN EL SALVADOR	10
2.1 Producción de levadura residual en El Salvador	10
2.2 Consumo de extracto de levadura en El Salvador.	12
III. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA LEVADURA DE CERVECERIA	17
3.1 Características biológicas. Citología de levaduras del género <u>Saccharomyces</u>	18
3.1.1 Pared celular de levaduras del género <u>Saccharomyces</u>	20
3.1.2 Contenido intracelular de levaduras del género <u>Saccharomyces</u>	21
3.2 Características fisicoquímicas de levaduras del género <u>Saccharomyces</u>	22
3.3 Floculación de las levaduras de cervecería	26
3.4 Levaduras salvajes en el mosto de cerveza	27
IV. METODOS GENERALES PARA LA PRODUCCION DE EXTRACTO DE LEVADURA	29
4.1 Plasmólisis	29
4.2 Tratamiento con enzimas	29

Contenido	Página
4.3 Método mecánico de ruptura de pared celular	31
4.3.1 Funcionamiento del agitador de partículas abrasivas, "Bead Beater" para ruptura de pared celular	34
V. PRUEBAS DE LABORATORIO PARA EVALUAR LOS PARAMETROS QUE INFLUYEN EN LA RUPTURA DE PARED CELULAR DE <u>Saccharomyces uvarum</u> RESIDUAL DE CERVECERIA	40
5.1 Preparación de las muestras para el proceso de ruptura de la pared celular	41
5.2 Determinación del tipo y tiempo de tratamiento previo a la ruptura mecánica	43
5.2.1 Determinación del tipo de tratamiento previo a la ruptura mecánica	47
5.2.2 Determinación del tiempo de tratamiento enzimático previo a la ruptura mecánica	49
5.3 Optimización del tiempo de agitación y concentración de levadura	52
5.3.1 Resultados de las pruebas de optimización	54
5.3.2 Determinación de las ecuaciones de regresión para la predicción del porcentaje de ruptura de pared celular de <u>Saccharomyces uvarum</u> en función de la concentración de levadura y el tiempo de agitación	61
VI. PRODUCCION DE EXTRACTO DE LEVADURA CON LAS MEJORES CONDICIONES DE RUPTURA	67
6.1 Rendimiento de producción con las mejores condiciones de ruptura	71
6.2 Evaluación de la calidad del producto	73

Contenido	Página
6.2.1 Prueba de aplicación del extracto del extracto de levadura producido	76
OBSERVACIONES	77
CONCLUSIONES	79
RECOMENDACIONES	81
REFERENCIAS	83
ANEXOS	87
ANEXO A. Raciones dietéticas diarias recomendadas para el ser humano y requerimientos de calidad para el extracto de levadura comercial	88
ANEXO B. Implicaciones legales en el uso de enzimas.	92
ANEXO C. Conteo de células en Cámara Neubauer.	95
ANEXO D. Resultados de análisis estadístico de los datos experimentales aplicando STATGRAPHICS V.2.6	102
ANEXO E. Determinación de las ecuaciones de regresión para la evaluación del grado de ruptura de la pared celular de <u>Saccharomyces uvarum</u> residual de cervecería en función de la concentración de levadura y el tiempo de agitación a velocidad constante aplicando el programa STATGRAPHICS V.2.6	113
ANEXO F. Porcentaje de ruptura en función de la concentración de levadura a 5 min de agitación utilizando el programa de computador TBLCURVE	122
ANEXO G. Determinación del rendimiento de producción de extracto de levadura.	128
ANEXO H. Análisis sugeridos para la evaluación de la calidad del producto.	130

Contenido	Página
ANEXO I. Reportes de los laboratorios de servicio para evaluar la calidad del producto.	134
ANEXO J. Análisis químicos de la levadura residual de destilería y del extracto obtenido experimentalmente por Gamero et al., 1992.	139
ANEXO K Composición de medio de cultivo de aislamiento para bacterias acéticas.	141

INDICE DE CUADROS

	Página
CUADRO 1.1 Composición proximal promedio de extracto de levadura de cervecería y levadura crecida en melaza (% p/p).	5
CUADRO 1.2 Composición promedio de vitaminas del complejo B de extracto de levadura de cervecería y levadura crecida en melaza.	5
CUADRO 1.3 Composición promedio de aminoácidos esenciales de extracto de levadura de cervecería, de levadura crecida en melaza y de proteína modelo provisional de la FAO (% p/p de proteína total (N x 6.25) después de la hidrólisis).	6
CUADRO 1.4 Composición promedio de aminoácidos no esenciales de extracto de levadura de cervecería y de levadura crecida en melaza (% p/p de proteína total (N x 6.25) después de hidrólisis).	6
CUADRO 2.1 Producción de levadura de cervecería en El Salvador.	11
CUADRO 2.2 Importación, gasto anual y precio unitario de extracto de levadura durante el período 1987 - 1992.	12
CUADRO 2.3 Proyección del consumo anual, gasto anual y precio unitario de extracto de levadura para el período 1993 - 1997, a partir de datos del período 1987 - 1992.	13

CUADRO 2.4	Proyección del consumo anual, gasto anual y precio unitario de extracto de levadura para el período 1993 - 1997, a partir de datos del período 1989 - 1992.	14
CUADRO 3.1	Comparación de características de <u>Saccharomyces cerevisiae</u> y de <u>Saccharomyces uvarum</u> .	18
CUADRO 3.2	Composiciones promedio de análisis proximal y de vitaminas de levaduras alimenticias comerciales.	23
CUADRO 3.3	Composición de aminoácidos esenciales de levaduras alimenticias comerciales.	24
CUADRO 3.4	Contenido de vitaminas de levaduras alimenticias comerciales.	25
CUADRO 4.1	Parámetros de operación para la producción del extracto de levadura usando el agitador de partículas abrasivas, "Bead Beater", modelo 11079-00, para la ruptura de células de <u>S. uvarum</u> de cervecería.	39
CUADRO 5.1	Tipos de tratamiento aplicados a la crema de levadura residual de cervecería previo a la ruptura con partículas abrasivas.	48
CUADRO 5.2	Porcentaje de ruptura de pared celular de levadura de cervecería <u>S. uvarum</u> aplicando tres tipos de pretratamiento a una concentración de levadura de 32.84% p/v y 5 min de agitación.	49

CUADRO 5.3	Porcentaje de ruptura de pared celular de levadura de cervecería <u>S. uvarum</u> a diferentes tiempos de pretatamiento enzimático, a una concentración de levadura de 32.84% p/v y 5 min de agitación, con 0.04 % papaína.	50
CUADRO 5.4	Resultados experimentales de porcentaje de ruptura de pared celular de levadura de cervecería <u>S. uvarum</u> en la optimización de la concentración de levadura y el tiempo de agitación, por ruptura mecánica con agitación de partículas abrasivas.	55
CUADRO 5.5	Porcentajes de ruptura de pared celular de levadura de cervecería <u>S. uvarum</u> para la optimización de la concentración de levadura, con 5 min de agitación.	59
CUADRO 5.6	Comparación de porcentajes de ruptura de la pared celular experimentales vrs. calculados por la regresión.	65
CUADRO 6.1	Determinación del rendimiento de producción de extracto de levadura a nivel de laboratorio.	72
CUADRO 6.2	Análisis proximal, mineralógicos, vitamínicos y microbiológicos realizados a la crema de levadura de cervecería, extracto de levadura producido a nivel de laboratorio y extractos de levadura comerciales.	75

INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 2.1 Proyección del consumo anual de extracto de levadura en El Salvador para el período 1993 - 1997.	14
FIGURA 2.2 Proyección del gasto anual por importación de extracto de levadura en El Salvador para el período 1993 - 1997.	15
FIGURA 2.3 Proyección del precio unitario de extracto de levadura en El Salvador para el período 1993 - 1997.	16
FIGURA 3.1 Microfotografía electrónica de sección delgada a través de una célula vegetativa de <u>Saccharomyces cerevisiae</u> (x31,250).	19
FIGURA 4.1 Cámara de ruptura y rotor de teflón del equipo de ruptura de pared celular "Bead Beater" de Biospec Products (1992).	35
FIGURA 4.2 Chaqueta de enfriamiento y conjunto cámara-rotor del equipo de ruptura de pared celular "Bead Beater" de Biospec Products (1992).	36
FIGURA 4.3 Vista completa del agitador de partículas abrasivas "Bead Beater" de Biospec Products (1992), utilizado para la ruptura de células de <u>S. uvarum</u> de cervecería.	37
FIGURA 4.4 Esquema y configuración del rotor de teflón del equipo de ruptura de pared celular "Bead Beater" de Biospec Products (1992).	38

- FIGURA 5.1 Vista al microscopio de la crema de levadura S. uvarum lavada, antes del proceso de ruptura en un campo de cámara de conteo Neubauer. Lente utilizado 100x, coloración azul de metileno. 44
- FIGURA 5.2 Vista al microscopio de fragmentos de pared celular de levadura S. uvarum después de la ruptura con equipo "Bead Beater" en un campo de cámara de conteo Neubauer. Lente utilizado 100x, coloración azul de metileno. 45
- FIGURA 5.3 Porcentaje de ruptura de pared celular de levadura de cervecería S. uvarum a diferentes tiempos de pretratamiento enzimático a una concentración de levadura de 32.84 % p/v y 5 min de agitación a 3,450 rpm, con 0.04 % de papaina. 51
- FIGURA 5.4 Representación espacial de la relación del porcentaje de ruptura de pared celular obtenido experimentalmente para concentraciones de levadura de 30 a 70 % p/v y tiempo de agitación de 3 a 5 min, evaluado para S. uvarum residual de cervecería (Datos de cuadro 5.4). 56
- FIGURA 5.5 Representación bidimensional de porcentajes de ruptura de pared celular de levadura de cervecería S. uvarum en la optimización de la concentración de levadura y el tiempo de agitación por ruptura mecánica con agitación de partículas abrasivas (Datos de cuadro 5.4). 57

- FIGURA 5.6 Porcentajes de ruptura de pared celular de levadura de cervecería S. uvarum para la optimización de la concentración de levadura, con 5 min de agitación (Datos de cuadro 5.5). 60
- FIGURA 5.7 Representación espacial del modelo matemático para la ecuación de regresión (EC. 5.3) 63
- FIGURA 5.8 Porcentajes de ruptura de pared celular de S. uvarum experimentales y calculados por regresión bidimensional para un tiempo de agitación de 5 min con concentraciones de levadura de 30 a 70 % p/v. 66

INTRODUCCION

Actualmente la demanda de alimentos ricos en proteínas no está siendo satisfecha adecuadamente a nivel mundial por el acelerado crecimiento poblacional y la disminución de recursos alimenticios, por lo que es necesaria la investigación de fuentes no tradicionales de proteínas y vitaminas; una de estas fuentes son las proteínas de origen microbiano, las cuales pueden ayudar a mejorar esta situación; además, puede usarse para la elaboración de productos farmacéuticos y como enriquecedor de medios de cultivo, entre otros.

Las levaduras enteras son una excelente fuente proteínica, pero presentan el inconveniente que la composición de su pared celular disminuye su digestibilidad. Para aprovechar mejor el contenido intracelular, puede producirse extracto de levadura, el cual se obtiene por ruptura de la pared celular.

El extracto de levadura es un concentrado del material soluble obtenido del contenido intracelular de levaduras. En contraste con otros productos de levadura, los extractos de levadura son solubles en agua y sus soluciones son claras. Muchos tipos de sistemas de saborizantes de alimentos contienen extractos de levadura, por ejemplo, salsas, sopas, quesos y productos cárnicos entre otros (La Bell, 1992).

Es importante mencionar que el extracto de levadura aún no es fabricado en el área centroamericana (Gamero et al., 1992) por lo que con este proyecto se pretende producir extracto de levadura a nivel de laboratorio partiendo de levadura residual de cervecería, Saccharomyces uvarum, con el fin de determinar las condiciones de operación bajo las que estos desechos podrían ser aprovechados para su posterior comercialización, ya que hasta la fecha sólo han sido parcialmente utilizados como alimento animal o para inoculación de los siguientes lotes de fermentación; el resto es desechado por

tuberías hacia el sistema de alcantarillado o directamente hacia los ríos, como aguas de lavado de filtros y de tanques de fermentación, produciendo desechos con demanda bioquímica de oxígeno de alrededor de 3,000 mg/dm³ y 16,000 mg/dm³ respectivamente (Fundación Natura, 1991); lo anterior contribuye a incrementar la contaminación en el ecosistema.

La levadura residual (Saccharomyces uvarum) utilizada en este proyecto fue proporcionada por la empresa La Constancia S.A., siendo ésta la levadura que queda después de la producción de cerveza.

CAPITULO I

EXTRACTO DE LEVADURA, CARACTERISTICAS E IMPORTANCIA

Se define como extracto de levadura el concentrado del material soluble obtenido por la eliminación de la pared celular de las levaduras. Dicha pared puede eliminarse por métodos mecánicos o químicos, para degradar la estructura macromolecular de la levadura y liberar la máxima cantidad de material soluble a un costo comercialmente aceptable (Kelly, 1983). En el capítulo IV se describen algunos de estos métodos.

La importancia del extracto de levadura radica en que la eliminación de la pared celular permite un mejor aprovechamiento del contenido intracelular, pues la composición de la pared dificulta su digestibilidad. Por su valor nutricional, el extracto de levadura tiene gran aplicación en la industria alimenticia, de manera que en El Salvador podría utilizarse como ingrediente enriquecedor en la elaboración de tortitas de carne, salchichas, carne molida, "chili con carne", pizza, galletas dulces y saladas, caramelos, bebidas instantáneas, pastas y cereales; por otro lado, también podría utilizarse en la industria farmacéutica en forma seca, en polvo o en tabletas (Gamero et al, 1992). Así mismo, tiene gran demanda de uso como aditivo en medios de cultivo microbiológicos, a escala de laboratorio y a escala industrial.

El extracto de levadura puede producirse a partir de Saccharomyces cerevisiae crecida en melaza y/o de otras especies de levaduras tales como Kluyveromyces fragilis crecida en trigo o de Candida utilis crecida en desechos de carbohidratos, así como de Saccharomyces uvarum residual de la etapa de fermentación en cervecería.

Los factores claves para un fabricante en la elección de un material de inicio son principalmente el precio y la disponibilidad de la levadura misma. La levadura de cerveza como producto secundario cuesta menos que el material crecido en melaza. En segundo lugar, la elección puede estar influenciada por el tipo y costo del proceso necesario para dar rendimientos aceptables y calidad de extracto. Por ejemplo, la levadura de cerveza mezclada con lúpulo requerirá de tratamiento adicional y costoso de desamargado. La calidad del producto final es de gran importancia y la levadura de cerveza tiende a producir mayores rendimientos y extracto más oscuro de un sabor diferente al obtenido del tipo de levaduras de panadería (Kelly, 1983).

No se cuenta con datos actualizados, pero se conoce que entre los mayores productores de extracto de levadura están: Reino Unido (4,000 ton/año), Francia (3,000 ton/año), Australia (1,000 ton/año) y Perú (2,000 ton/año) (Kelly, 1983).

1.1 CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DEL EXTRACTO DE LEVADURA.

La composición de un típico extracto de levadura de cervecería se da en los cuadros 1.1 a 1.4, donde se observa que los extractos obtenidos a partir de dos tipos distintos de levaduras exhiben sólo diferencias menores en composición proximal, presentando en ambos casos un alto contenido de proteínas (Cuadro 1.1).

Los altos niveles de sal son una consecuencia del proceso de manufactura, pero modificaciones al proceso pueden producir extracto de bajo contenido de sal con valores mayores correspondientes para proteína, carbohidratos y otros componentes en el material final (Kelly, 1983).

Ambos tipos de extractos tienen altos niveles de las vitaminas del grupo B, como lo muestra el cuadro 1.2, así como todos

los aminoácidos esenciales, aunque sólo bajos niveles de metionina y treonina, como se observa en el cuadro 1.3, respecto a la proteína modelo provisional de la FAO. En el cuadro 1.4 se presentan los aminoácidos no esenciales, los cuales se encuentran en mayores cantidades en el extracto de levadura de cervecería (Kelly, 1983).

CUADRO 1.1 COMPOSICION PROXIMAL PROMEDIO DE EXTRACTO DE LEVADURA DE CERVECERIA Y DE LEVADURA CRECIDA EN MELAZA (% p/p).

Componente	Levadura de cervecería	Levadura de melaza
Humedad	27	28
Proteína (N x 6.25)	44	37
Cloruro de sodio	10	11
Cenizas (NaCl excluido)	13	7
Grasas	Trazas	Trazas
Carbohidratos (por diferencia)	6	17

(Kelly, 1983).

CUADRO 1.2 COMPOSICION PROMEDIO DE VITAMINAS DEL COMPLEJO B DE EXTRACTO DE LEVADURA DE CERVECERIA Y DE LEVADURA CRECIDA EN MELAZA.

Vitamina	Levadura de cervecería (mg/g ext)	Levadura de melaza (mg/g ext)	Ración recomendada* (mg/día)
Tiamina	20 - 70	10 - 20	1.3 - 1.6
Riboflavina	55 - 100	50 - 100	1.6
Piridoxina	12 - 16	10 - 16	-
Niacina	250 - 700	300 - 500	13 - 16

(Kelly, 1983).

* Ración dietética recomendada por el Food and Nutrition Board y el National Research Council de Gran Bretaña, para hombres entre 25 y 65 años de edad (Pyke, 1970).

CUADRO 1.3 COMPOSICION PROMEDIO DE AMINOACIDOS ESENCIALES DE EXTRACTO DE LEVADURA DE CERVECERIA, DE LEVADURA CRECIDA EN MELAZA Y DE LA PROTEINA MODELO PROVISIONAL DE LA FAO (% p/p de proteína total (N x 6.25) después de hidrólisis).

Aminoácido esencial	Levadura de cerveza	Levadura de melaza	Proteína modelo de FAO ⁺
Isoleucina	4.7	4.9	4.2
Leucina	7.0	6.2	4.8
Metionina	1.5	1.4	2.2
Fenilalanina	3.8	4.5	2.8
Treonina	0.5	7.1	2.8
Triptofano	1.7	0.6	1.4
Valina	6.0	5.6	4.2

(Kelly, 1983).

+ Patrón de aminoácidos esenciales en la proteína modelo provisional de la FAO (Burton, 1969).

CUADRO 1.4 COMPOSICION PROMEDIO DE AMINOACIDOS NO ESENCIALES DE EXTRACTO DE LEVADURA DE CERVECERIA Y DE LEVADURA CRECIDA EN MELAZA (% p/p de proteína total (N x 6.25) después de hidrólisis).

Aminoácido no esencial	Levadura de cerveza	Levadura de melaza
Alanina	7.2	6.5
Arginina	1.7	3.8
Aspártico	10.2	14.0
Cistina	Trazas	Trazas
Glutámico	11.5	19.6
Glicina	5.5	4.4
Histidina	2.3	1.8
Prolina	5.0	3.5
Serina	4.5	4.6
Tirosina	3.0	2.5

(Kelly, 1983).

El sabor del extracto de levadura está influenciado por varios factores, que incluyen el tipo de levadura, la presencia de impurezas, las condiciones del proceso, niveles de sal, la extensión de la hidrólisis de enzimas y el efecto de cualquier bacteria contaminante (Kelly, 1933).

Por su sabor y relativo bajo costo, el extracto de levadura encuentra mayor aplicación en la industria de alimentos, siendo particularmente valioso por su contribución de un sabor cárnico en amplia variedad de productos, incluyendo boquitas, sopas, pasteles de carne, salchichas, productos pesqueros y derivados de proteína vegetal hidrolizada; además, después de modificación por adición de especias y proteínas vegetales, el extracto de levadura es la base de cubiertas saborizantes (Kelly, 1983).

Al ser utilizado como aditivo en los alimentos, el extracto de levadura mejora el valor nutricional de los mismos, debido a que es rico en proteínas, vitaminas y aminoácidos. En el cuadro A.1, del ANEXO A, se presentan las raciones dietéticas diarias recomendadas para mantener un buen estado de salud en el ser humano. Comparando estos valores con la información presentada en los cuadros 1.1 a 1.4, se observa que los niveles de proteínas y vitaminas contenidos en el extracto de levadura cumplen satisfactoriamente dichos requerimientos.

Es necesario tomar en consideración que el contenido de ácidos nucleicos en el extracto de levadura limita su uso en la dieta de un individuo a no más de 20 g/día (Kelly, 1983), pues el páncreas y el intestino delgado del ser humano secretan bajos niveles de las enzimas ribonucleasas y desoxirribonucleasas, encargadas de degradar a los ácidos nucleicos, por lo que no tolera más del 1% de ácidos nucleicos en su dieta (Whitaker, 1972).

1.2 NORMAS DE CALIDAD PARA EXTRACTO DE LEVADURA.

El Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI) no ha publicado normas de calidad para extracto de levadura (Vargas, 1993). Sin embargo, a continuación se resumen los aspectos regulatorios desarrollados por el Grupo Consultivo de Proteína, PAG (Protein Advisory Group) del sistema de las Naciones Unidas, para la evaluación de proteína unicelular y otras nuevas fuentes de proteínas para alimentación humana (entre las que puede incluirse al extracto de levadura), mediante la realización de pruebas biológicas en animales.

Tales regulaciones indican que para el caso del extracto de levadura, debe asegurarse la ausencia de organismos contaminantes en la levadura que se utilizará como materia prima. También debe asegurarse que durante el proceso de producción no se introduzcan especies patógenas en forma accidental y sin ser detectadas. Se hace hincapié en que el sustrato usado para la reproducción de la levadura (mosto de cerveza) debe estar libre de patógenos y, de existir contaminación con metales pesados (mercurio, cobre, cadmio, plomo, aluminio y arsénico), residuos de pesticidas, residuos de drogas, metabolitos tóxicos y cuerpos extraños, las cantidades existentes no deben sobrepasar niveles máximos aceptables (Moo-Young y Gregory, 1986).

Para consumo humano del producto, debe garantizarse que reúna ciertas características, como no ser alergénico, mutagénico, carcinogénico o teratogénico; además debe poseer valor nutricional satisfactorio, características organolépticas y funcionales favorables y aceptabilidad cultural (Moo-Young y Gregory, 1986).

Para el caso de extracto de levadura como ingrediente en medios de cultivo, Gamero et al., 1992, presentan los requerimientos de calidad para el extracto de levadura comercial

producido por la empresa Bio-Serv Inc. (ANEXO A, cuadro A.2), donde se incluyen análisis de cantidad y tipo de nitrógeno, contenidos de aminoácidos esenciales, vitaminas principalmente las del complejo B y nutrientes menores como sodio, cloro, potasio, calcio, magnesio, cobre, hierro y cinc.

Para el extracto producido en este proyecto, en la sección 6.2 se incluyen resultados de análisis proximal, análisis microbiológicos, análisis de las vitaminas B₁ y B₆; además de los resultados de una prueba de crecimiento de Acetobacter sp. en un medio de cultivo enriquecido con extracto de levadura comercial y en otro enriquecido con el extracto de levadura producido experimentalmente en esta investigación, con el fin de verificar su potencial aplicación en bacteriología.

CAPITULO II

DISPONIBILIDAD DE LEVADURA RESIDUAL DE CERVECERIA Y CONSUMO DE EXTRACTO DE LEVADURA EN EL SALVADOR

La levadura S. cerevisiae es utilizada en gran escala en las industrias de panadería y fermentaciones alcohólicas. En estas dos aplicaciones, después de convertir la glucosa a dióxido de carbono y etanol, la levadura residual muere por el proceso de horneado o el de destilación; sin embargo, en la producción de cerveza, la levadura viva (S. uvarum) que se ha multiplicado hasta seis veces durante la fermentación, es separada de la cerveza. Aunque se requiere una porción para adicionar al siguiente lote de fermentación del mosto de cerveza, tres cuartos o más se desecha como levadura residual y es descartada directamente a los ríos, pero en varios países ésto es ilegal y en cualquier caso, la mayoría de cerveceros buscan salidas gananciosas para este producto secundario (Kelly, 1983).

Internacionalmente una parte de estos residuos se utiliza para alimentación animal, mientras otra, debido a su alto contenido de vitaminas del complejo B, es convertida en forma de tableta para usos farmacéuticos, pero en general, una gran proporción de levadura residual se usa para producir extracto de levadura (Kelly, 1983); sin embargo, éste aún no es producido en el área centroamericana (Gameró et al., 1992).

2.1 PRODUCCION DE LEVADURA RESIDUAL EN EL SALVADOR.

En El Salvador se produce este residuo en la industria cervecera, que trabaja con cultivos puros de S. uvarum de los que se recupera el 90 %, del cual una porción es reciclada para el proceso de fermentación y la otra es tratada con vapor para su posterior uso como alimento animal. El 10 % restante queda retenido en las paredes de los tanques de fermentación y reposo después que han sido vaciados, por lo que se desecha

al sistema de alcantarillado como parte de las aguas de lavado, no siendo rentable su recuperación (Reyes de Serpas, 1994).

Como puede inferirse del cuadro 2.1, por cada 46.7 litros de cerveza se produce casi 1 litro de crema de levadura, lo cual, tomando en cuenta la capacidad real de la fábrica de 192,000 L/día, representa una producción de 4,110 litros de crema de levadura por día, que si no son utilizados para consumo animal, estarían disponibles para la producción de extracto de levadura el cual podría ser un producto de mayor valor agregado que de la forma en que actualmente se comercializa.

En la sección 6.1 se presenta el rendimiento de producción de extracto de levadura por el método aplicado en esta investigación, evaluando también el potencial de producción a partir de la levadura residual disponible.

CUADRO 2.1 PRODUCCION DE LEVADURA DE CERVECERIA EN EL SALVADOR.

Empresa	La Constancia
Tipo de Levadura	<u>Saccharomyces uvarum</u>
Capacidad Real	192,000 L de cerveza/día
Capacidad Instalada	274,000 L de cerveza/día
Crema de Levadura Producida	4,110 L/día
Crema de Levadura Recuperada	90 %
Proceso de Recuperación	Sedimentación

Reyes de Serpas, 1994.

2.2 CONSUMO DE EXTRACTO DE LEVADURA EN EL SALVADOR.

El extracto de levadura consumido en El Salvador es importado en su totalidad desde los Estados Unidos de Norteamérica. Según datos de la Dirección General de Estadística y Censos, la cantidad de extracto importada durante el período comprendido entre 1987 y 1992 asciende a 13,941 Kg, según se muestra en el cuadro 2.2. Como se mencionó en el capítulo I, existe una amplia gama de aplicaciones para el extracto de levadura, por lo que al producirlo en El Salvador, además de satisfacer la demanda nacional, podría aumentarse ésta, al proponer usos alternativos potenciales como fuente no tradicional de proteínas.

CUADRO 2.2 IMPORTACION, GASTO ANUAL Y PRECIO UNITARIO DE EXTRACTO DE LEVADURA DURANTE EL PERIODO 1987-1992.

AÑO	IMPORTACION (Kg)	VALOR CIF (¢)	COSTO UNITARIO (¢/Kg)
1987	5,824	56,615	10.24
1988	1,811	27,155	14.99
1989	285	4,195	14.72
1990	2,146	48,530	22.61
1991	1,762	52,459	29.77
1992	2,113	61,809	29.25
Total	13,941	-	-

Dirección General de Estadística y Censos.
(Código NAUCA 21070900).

Como puede observarse en el cuadro 2.2, el gasto anual (Valor CIF) en la importación de extracto de levadura presenta un notable incremento a partir de 1990. Un mejor análisis de estos datos se hace a través de las proyecciones de consumo anual (Kg), gasto anual (¢) y precio unitario (¢/Kg) de extracto de levadura en El Salvador, como las presentadas en los

cuadros 2.3 y 2.4 y en las figuras 2.1, 2.2 y 2.3 respectivamente para el período 1993 - 1997. Se observa que la disminución en el consumo entre los años 1987 y 1989 coincide con la crisis económica causada por el conflicto armado que se agudizó en ese período, pero a partir de 1990 la tendencia es claramente creciente por lo que se presentan dos proyecciones diferentes, una tomando como base los datos del período 1987-1992 y otra, según el período 1989-1992; de cumplirse la segunda proyección, habrá un incremento de la demanda de este producto, con la consecuente fuga de divisas; esto podría contrarrestarse si la demanda se cubriera con producto nacional utilizando un producto secundario de otra industria ya establecida en el país, como es el caso en estudio, en que se presenta que el extracto de levadura puede producirse a partir de levadura residual de cervecería.

El rendimiento de producción que se presenta en la sección 6.1 indica que en El Salvador podrían producirse 54,437.4 Kg de extracto de levadura al año, con lo que se cubriría holgadamente la demanda nacional; además, existen posibilidades de evaluar mercados de exportación para Centroamérica, pues este producto aun no es fabricado en el área.

CUADRO 2.3 PROYECCION DE CONSUMO ANUAL, GASTO ANUAL Y PRECIO UNITARIO DE EXTRACTO DE LEVADURA PARA EL PERIODO 1993 - 1997, A PARTIR DE DATOS DEL PERIODO 1987 - 1992.

AÑO	IMPORTACION (Kg)	VALOR CIF (¢)	COSTO UNITARIO (¢/Kg)
1993	642.25	56,418.38	30.46
1994	161.08	60,596.01	34.74
1995	- 320.09	64,773.64	39.02
1996	- 801.26	68,951.27	43.30
1997	- 1,282.43	73,128.90	47.58

CUADRO 2.4 PROYECCION DE CONSUMO ANUAL, GASTO ANUAL Y PRECIO UNITARIO DE EXTRACTO DE LEVADURA PARA EL PERIODO 1993 - 1997, A PARTIR DE DATOS DEL PERIODO 1989 - 1992.

AÑO	IMPORTACION (Kg)	VALOR CIF (¢)	COSTO UNITARIO (¢/Kg)
1993	2,851.50	85,941.00	45.61
1994	3,361.50	103,618.10	50.69
1995	3,871.50	121,295.20	55.77
1996	4,381.50	138,972.30	60.85
1997	4,891.50	156,649.40	65.93

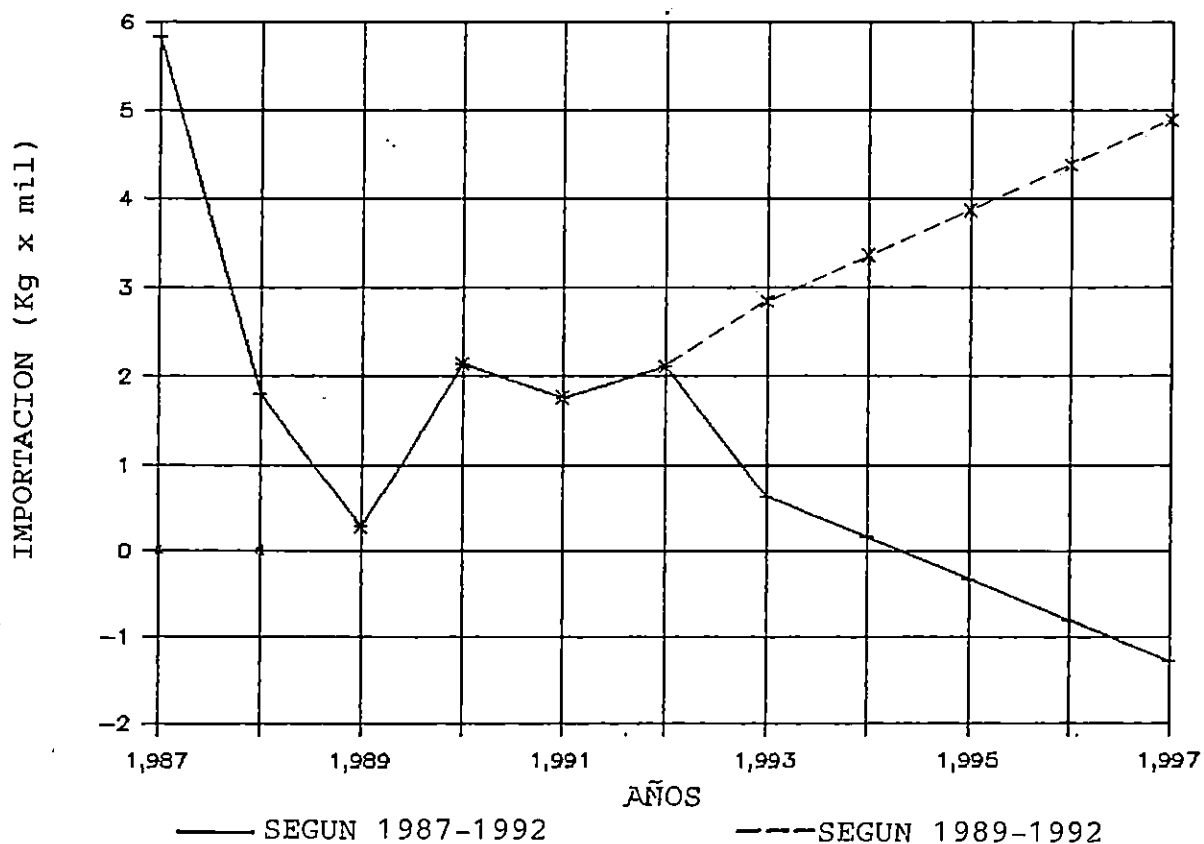


FIGURA 2.1 PROYECCION DEL CONSUMO ANUAL DE EXTRACTO DE LEVADURA EN EL SALVADOR PARA EL PERIODO 1993 - 1997.

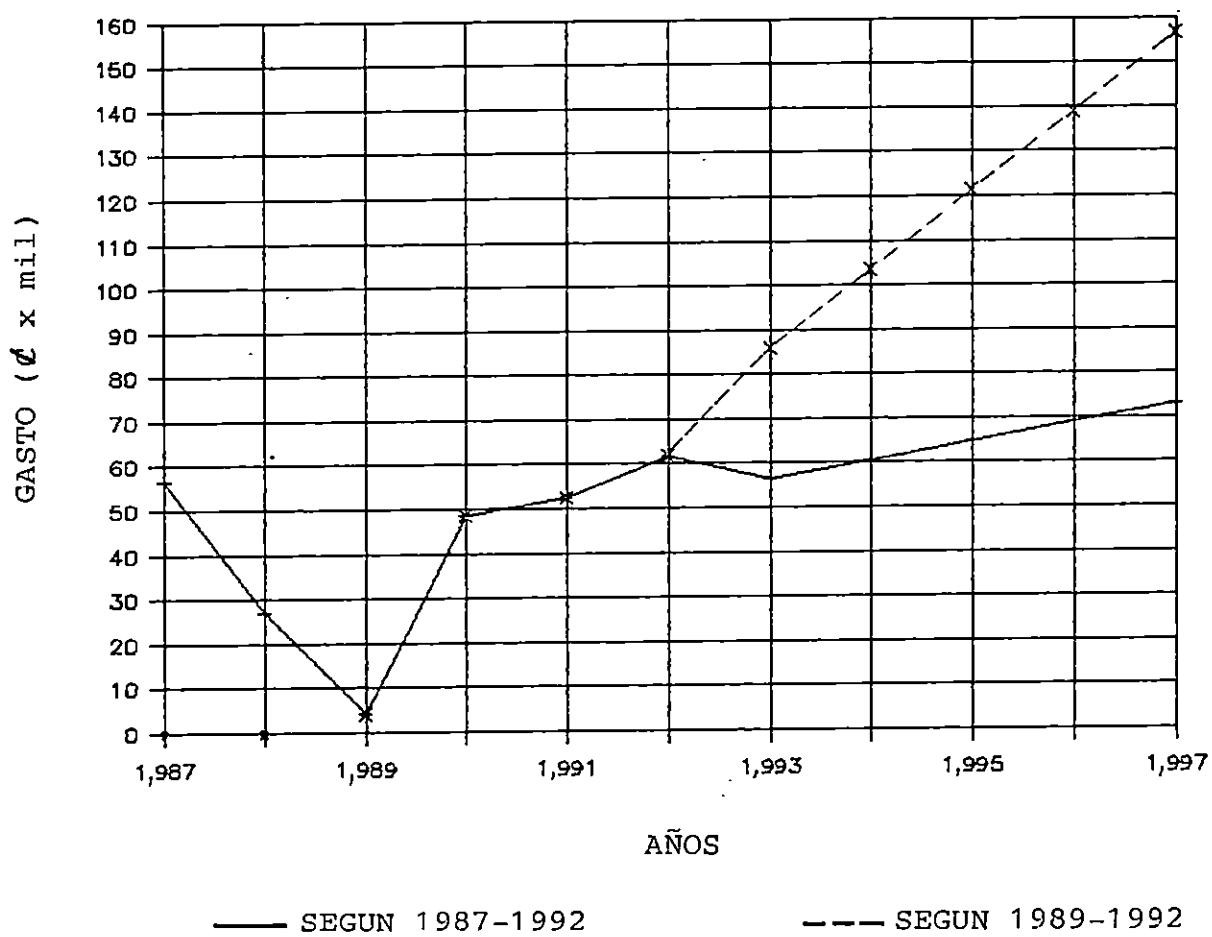


FIGURA 2.2 PROYECCION DEL GASTO ANUAL POR IMPORTACION DE EXTRACTO DE LEVADURA EN EL SALVADOR PARA EL PERIODO 1993 - 1997.

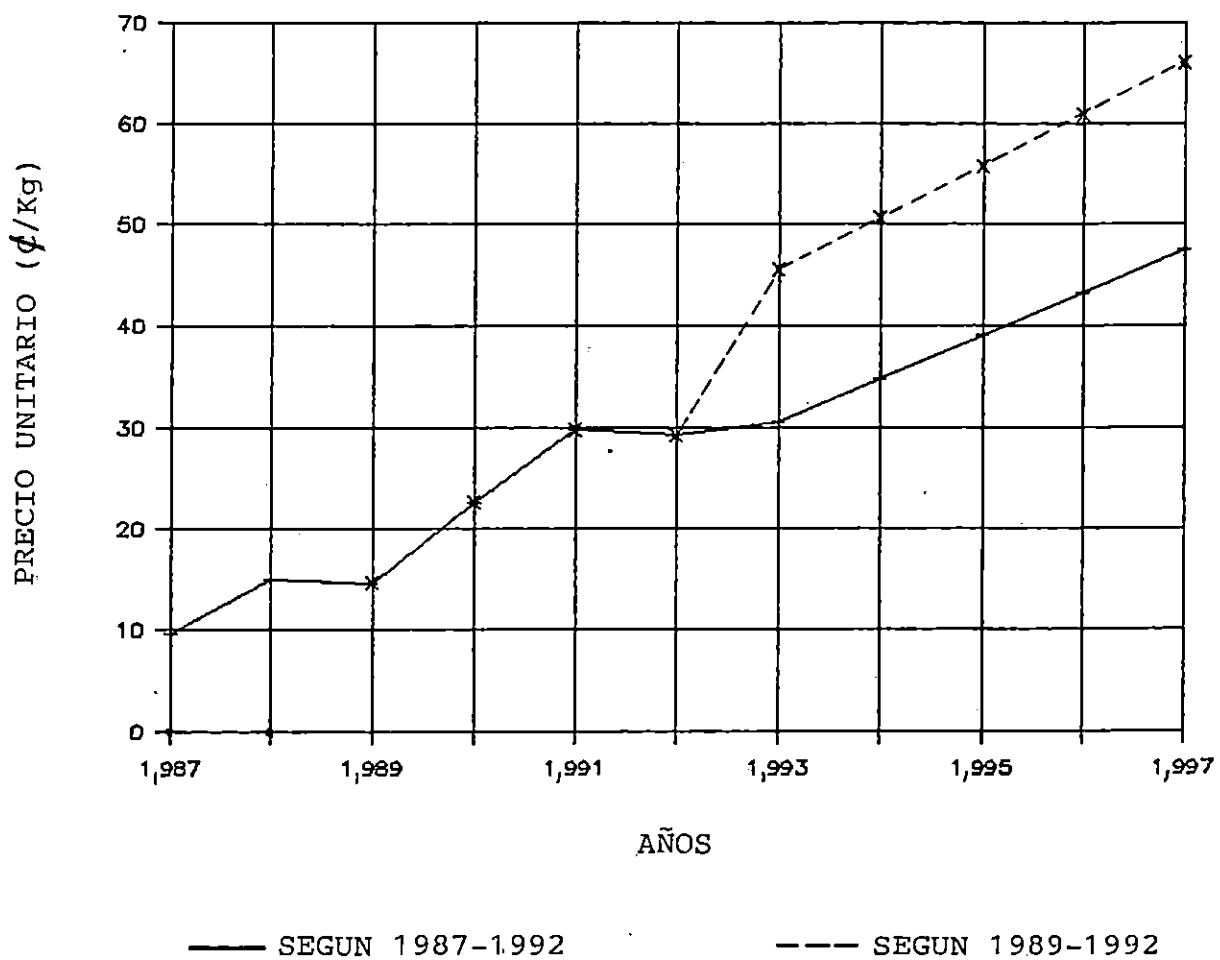


FIGURA 2.3 PROYECCION DEL PRECIO UNITARIO DE EXTRACTO DE LEVADURA EN EL SALVADOR PARA EL PERIODO 1993 - 1997.

CAPITULO III

CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS LEVADURAS DE CERVECERIA

La palabra "cerveza" se usa para designar a las bebidas alcohólicas hechas de granos de cereal; más específicamente, cerveza es la bebida carbonatada preparada por fermentación de masas conteniendo predominantemente malta (Reed y Peppler, 1973).

En la industria cervecera se usan cultivos puros de levadura para la inoculación del mosto. Las levaduras de fermentación superior pertenecen a la especie S. cerevisiae y las levaduras de fermentación inferior, a S. carlsbergensis (en adelante, S. uvarum) (Reed y Peppler, 1973).

Es difícil distinguir células individuales de las dos especies bajo un microscopio; S. uvarum generalmente aparece en células solas o en pares de células, mientras que S. cerevisiae forma cadenas con cruces ocasionales de cadenas. La forma de las células para las dos especies es de redonda a ovalada u ovoidea, con una longitud de 4 a 14 micrones y un ancho de 3 a 10 micrones. Las levaduras usadas en la industria cervecera son probablemente poliploides, lo cual puede ser la razón de la dificultad de cruzar especies. Las levaduras de fermentación superior tienen un sistema respiratorio más fuerte que las levaduras de fermentación inferior. La habilidad de fermentar completamente la rafinosa es característica de las levaduras de fermentación inferior. Las levaduras de fermentación superior carecen de actividad melobiasa (Reed y Peppler, 1973).

Las cepas de Saccharomyces que fermentan glucosa, maltosa, sacarosa y rafinosa por completo y que en cultivos de malta agar forman células redondas ovaladas a una relación entre longitud y ancho variando entre 1 y 2 son reunidas en una especie: S. uvarum (Reed y Peppler, 1973).

Se han considerado varios criterios para distinguir especies y cepas de levaduras comerciales. Las características morfológicas como el tamaño de las células, la forma de brotes o la formación de esporas son a menudo satisfactorias para diferenciar subfamilias y géneros (Reed y Peppler, 1973). En el cuadro 3.1 se presenta un resumen comparativo de algunas de las características de S. cerevisiae y de S. uvarum.

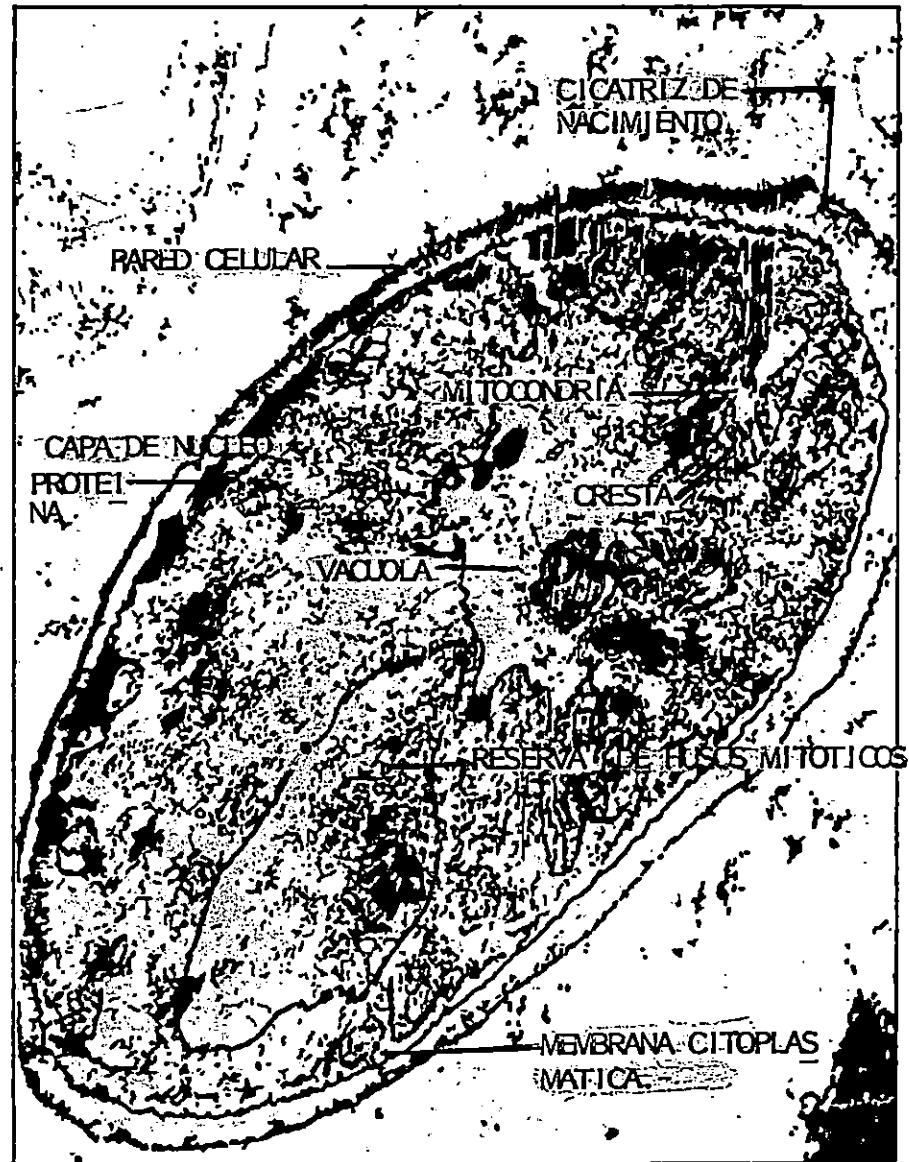
CUADRO 3.1 COMPARACION DE CARACTERISTICAS DE Saccharomyces cerevisiae Y DE Saccharomyces uvarum.

CARACTERISTICA	<u>S. cerevisiae</u>	<u>S. uvarum</u>
Fermentación	Superior	Inferior
Apariencia	Cadenas con cruces ocasionales	Individuales o en parejas
Forma	Redondas a ovaladas	Redondas a ovaladas
Dimensiones (largo x ancho)	4 - 14 x 3 - 10 μ	4 - 14 x 3 - 10 μ

Para la producción de extracto de levadura a partir de levadura residual de cervecería, resulta de gran importancia conocer las características biológicas y fisicoquímicas de estas levaduras ya que de ellas dependerá en gran parte la calidad del producto obtenido.

3.1 CARACTERISTICAS BIOLOGICAS. CITOLOGIA DE LEVADURAS DEL GENERO SACCHAROMYCES.

Se han caracterizado más de una docena de distintos componentes celulares de las levaduras, desde organelos hasta entidades macromoleculares. Las principales microestructuras son la pared celular y el contenido intracelular constituido por el plasmalema, el núcleo, una o más vacuolas, mitocondrias, gránulos de polifosfatos (volutina), glóbulos, lípidos, ribosomas y plasma de masa o matriz (Figura 3.1) (Reed y Peppler, 1973).



Courtesy of C. C. Lindgren

FIGURA 3.1 MICROFOTOGRAFIA ELECTRONICA DE SECCION DELGADA A TRAVES DE UNA CELULA VEGETATIVA DE Saccharomyces cerevisiae (x 31,250) (Reed y Pepler, 1973).

3.1.1 PARED CELULAR DE LEVADURAS DEL GENERO SACCHAROMYCES.

El contenido de pared de las cepas cerveceras varía desde 6 hasta 27% del peso de célula seca. Aumenta mientras las células pasan de la fase logarítmica de crecimiento a la fase estacionaria. Con la edad las levaduras cerveceras floculantes casi duplican su peso de pared (Reed y Pepler, 1973).

En esta sección se presenta también información general sobre la composición de la pared celular de la levadura de panadería considerando que a nivel de esta investigación, es aplicable a la levadura de cerveza pues se carece de información específica para esta última.

El contenido químico bruto de la pared celular de la levadura de panadería es 83% carbohidratos, 10% proteína, 3% lípidos, 0.45% esterol, 0.3% ácido ribonucleico y 0.04% ácido desoxirribonucleico. Los componentes caracterizados hasta ahora incluyen glucán, manán, proteína, quitina (1%), glucosamina, ácidos grasos, glicéridos, fosfolípidos (0.7%) y fosfatos (1%) (Reed y Pepler, 1973).

El glucán (celulosa de levadura) es un polímero insoluble de enlaces glicosídicos ramificados de Beta-(1,3) y Beta-(1,6) y representa cerca del 30 - 35 % de los sólidos de la pared. Al igual que la capa interna de la pared celular, imparte rigidez pero retiene alguna elasticidad pues la célula se encoge cuando se somete a un medio hipertónico (Reed y Pepler, 1973).

El manán (goma de levadura), es un polímero soluble ramificado de manosa, existe en la superficie de la pared celular (alrededor del 30% del peso de la pared seca. Es una capa activa, adsorptiva enlazada con proteínas, enzimas y fosfato). El manán y en menor extensión el glucán, son fuentes de carbohidratos durante la latencia celular (Reed y Pepler, 1973).

La quitina es un polímero lineal de N-acetil-D-glucosamina, que se localiza en las cicatrices de los brotes y áreas adyacentes en la pared celular. Las cicatrices de brote aisladas de la pared celular de S. cerevisiae como residuos aislados por digestión de glucanasa contienen 85% manosa, 4% glucosa y 2.7% glucosamina (Reed y Pepler, 1973).

3.1.2 CONTENIDO INTRACELULAR DE LEVADURAS DEL GENERO SACCHAROMYCES.

Contiguo a la superficie interior de la pared celular descansa una membrana de plasma delgada llamada plasmalema, de naturaleza lipoproteica que regula el intercambio de nutrientes y metabolitos por su permeabilidad selectiva. En su área superficial exterior se acumulan numerosos vesículos compuestos de manán y proteína en la región de formación del brote, sugiriendo que tienen el papel de acarrear materiales al sitio de síntesis de nueva pared celular (Reed y Pepler, 1973).

Distribuidos cerca del plasmalema se encuentran organelos conocidos como mitocondrias, ricos en lípidos, fosfolípidos y un bajo porcentaje de ácido deoxirribonucleico. Se encargan principalmente de la conversión aeróbica de energía (actividad respiratoria), y de la síntesis de proteína (Reed y Pepler, 1973).

Otro elemento importante del contenido intracelular es el núcleo, el cual está compuesto de dos partes: el nucléolo, región inferior ópticamente densa y con forma de capa, y el nucleoplasma, sección superior menos densa y con forma de domo. Contenida en el núcleo se encuentra la cromatina, que es un complejo citoplasmático de proteína y ácido nucleico. Durante la división celular por brote, el núcleo usualmente está colocado entre el brote y la vacuola, la cual es un saco

de fluidos metabólicos y de nutrientes almacenados, encerrados por una sola membrana.

Excepto por los organelos y las estructuras discernibles en microfotografías electrónicas, el fluido citoplasmático restante se denomina sustancia granulada. Comprende carbohidratos, ribosomas y enzimas (Reed y Pepler, 1973).

El carbohidrato principal distribuido a través del citoplasma y el nucleoplasma es el glicógeno de levadura; es un polímero de alto peso molecular ramificado de residuos de D-glucopiranos; a menudo se acumula como terrones esféricos de hasta 40 milimicrones de diámetro en células de levadura maduras (fase estacionaria). La trehalosa, un disacárido no reductor (alfa-D-glucopiranosil-alfa-D-gucopiranosida), aparece como azúcar libre (cerca del 15% peso seco). Parece estar localizada en un compartimiento de membrana enlazada como reserva de carbohidrato (Reed y Pepler, 1973).

Distribuidas en el citoplasma existen numerosas partículas diminutas de unidades ribosomales ricas en ácido ribonucleico y proteínas; están involucradas en la síntesis de proteína celular y su actividad es inhibida por la ciclohexamida (Reed y Pepler, 1973).

En la fracción soluble de la sustancia granulada se encuentran las enzimas involucradas en la fermentación y también trehalasa, glucosa-6-fosfato dehidrogenasa y alcohol dehidrogenasa (Reed y Pepler, 1973).

3.2 CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LEVADURAS DEL GENERO SACCHAROMYCES.

La composición de las levaduras es afectada por las variaciones en las materias primas y por las condiciones de crecimiento y de tratamiento de lo cosechado. Los lotes de producción

de levadura a los que nominalmente se les da el mismo régimen usualmente muestran pequeñas diferencias en su constitución química, aun con el mejor control de las condiciones comerciales de operación. La naturaleza del medio de crecimiento y el grado de aireación son factores importantes que influyen en el contenido de carbohidratos, proteínas, grasas y vitaminas (Peppler, 1970).

En el cuadro 3.2 se muestra la composición aproximada de levaduras alimenticias comerciales. Puede observarse que las composiciones varían ampliamente debido en parte a los tipos de medios y de levaduras, y en parte a los enriquecimientos de vitaminas de las levaduras cosechadas (Peppler, 1970).

CUADRO 3.2 COMPOSICIONES PROMEDIO DE ANALISIS PROXIMAL Y DE VITAMINAS DE LEVADURAS ALIMENTICIAS COMERCIALES.

ANALISIS	CONTENIDO EN LEVADURA SECA		
	A	B	C
Humedad (%)	5	6	6
Proteína (Nx6.25) (%)	50	45	45
Grasa (%)	6	6	1.5
Cenizas (%)	7	8	8
Tiamina (g/g)	150	150	125
Riboflavina (g/g)	70	45	35
Niacina (g/g)	500	400	500
Piridoxina (g/g)	30	40	50

A = S. cerevisiae crecida en melaza.

B = Levadura de cervecería desamargada secado en rodillos.

C = Levadura de cervecería liofilizada.

(Peppler, 1970)

Casi la mitad del peso seco de las levaduras es proteína cruda (Nx6.25) expresada en términos del nitrógeno total aunque en realidad solo un 80% corresponde a aminoácidos, el resto

se distribuye en un 12% de ácidos nucleicos, 8% de amonio y alrededor del 7% del nitrógeno total se presenta como aminoácidos libres. La presencia de grandes cantidades de bases de purina y pirimidina disminuye la proteína verdadera de la levadura a 40% del peso seco. Otros constituyentes de la levadura cuyo nitrógeno es sólo una pequeña parte del total incluyen glutatona, lecitina, ácido adenílico, vitaminas, enzimas y coenzimas (Peppler, 1970).

El valor nutritivo de la levadura seca depende de la calidad de su contenido de proteínas y vitaminas. La levadura ha probado ser un suplemento proteico de cereales superior por su relativamente alta digestibilidad y valor biológico, ambos de 87%, comparada con las del huevo entero de gallina de 96% y 97% respectivamente (Peppler, 1970).

CUADRO 3.3 COMPOSICION DE AMINOACIDOS ESENCIALES DE LEVADURAS ALIMENTICIAS COMERCIALES.

AMINOACIDO	CONTENIDO EN LEVADURA (g/16g N)		
	A	B	C
Lisina	8.2	7.3	9.7
Valina	5.5	5.2	5.9
Leucina	7.9	6.3	7.7
Isoleucina	5.5	5.7	7.3
Treonina	4.8	4.8	7.0
Metionina	2.5	1.2	3.5
Fenilalanina	4.5	4.4	5.6
Triptofano	1.2	1.1	1.7
Cistina	1.6	0.9	1.2
Histidina	4.0	1.5	3.6
Tirosina	5.0	-	4.5
Arginina	5.0	4.7	4.3

A = S. cerevisiae de melaza.

B = Levadura de cervecería desamargada.

C = Levadura de pan.

(Peppler, 1970).

El cuadro 3.3 compara el contenido de aminoácidos esenciales nutricionales de levaduras alimenticias comerciales donde se observa que la levadura entera de cervecería posee niveles de aminoácidos esenciales que sobrepasan a los de la proteína modelo provisional de la FAO (cuadro 1.3), excepto para metionina y triptofano cuyos valores son ligeramente menores. El método de fabricación del extracto de levadura debe asegurar la recuperación de la mayor cantidad posible de estos aminoácidos.

La abundancia de lisina y triptofano en la proteína de levadura produce mejoría en las dietas de cereales. Cuando la proteína de la levadura es suplementada con metionina, la eficiencia del uso de su proteína casi iguala a la de la caseína.

CUADRO 3.4 CONTENIDO DE VITAMINAS DE LEVADURAS ALIMENTICIAS COMERCIALES.

VITAMINA	CONTENIDO EN PRODUCTO SECO (g/g)		
	A	B	C
Tiamina (HCl)	165	150	125
Riboflavina	100	45	35
Niacina	585	400	500
Piridoxina (HCl)	20	40	50
Folacina	13	5	49
Calcio			
d-pantotenato	100	100	120
Biotina	0.6	1	1
Acido			
p-aminobenzoico	160	5	-
Cloruro de colina	2,710	3,800	4,850
Inositol	3,000	3,900	5,000

A = S. cerevisiae crecida en melaza.

B = Levadura de cervecería desamargada, secada en rodillos.

C = Levadura de cervecería desamargada, liofilizada.

(Peppler, 1970)

En cuanto a vitaminas, aunque las levaduras contienen más de diez vitaminas solubles en agua designadas como el complejo de vitaminas B, sólo se especifican tres compuestos en levaduras alimenticias comerciales (tiamina, riboflavina y niacina); sin embargo, con ellas se consideran la piridoxina y el ácido fólico o folacina. En el cuadro 3.4 se presenta el contenido de vitaminas de levaduras alimenticias comerciales (Pepler, 1970).

3.3 FLOCULACION DE LAS LEVADURAS DE CERVECERIA.

Hacia el final de la fermentación del mosto de cerveza, las células de levadura se agrupan en conglomerados. Esta floculación se ha definido como la agregación reversible de las células de levadura, las cuales caen al fondo del recipiente si la levadura es de fermentación inferior, o pueden elevarse y colectarse como una levadura de cabeza en la superficie del mosto usado si es una cepa de fermentación superior.

Las levaduras floculantes tienden a sedimentar (o a elevarse) temprano en el proceso de fermentación, produciendo una cerveza clara pero pobremente atenuada, mientras que las no floculantes (o polvorientas) permanecen en suspensión, produciendo una cerveza brumosa de buena atenuación. Los cerveceros prefieren trabajar con levaduras que tienen floculación intermedia.

Se han investigado los procesos fisicoquímicos involucrados en la floculación y la incidencia de los factores que la afectan; entre ellos se encuentran el factor genético, el reciclaje de las cepas y la zona de los tanques donde estas cepas son colectadas.

Genéticamente se ha encontrado que levaduras floculantes producirán descendencia floculante, es decir, que la tendencia a este proceso es hereditaria. En relación al reciclaje, las

levaduras de cervecería algunas veces pierden sus características floculantes mientras son cosechadas de un mosto de cerveza fermentado y pasadas a un mosto fresco, pues parece que ocurre una selección natural de levaduras menos floculantes durante este reciclaje a través de mostos sucesivos. En el caso de levaduras de fermentación inferior, la capa más baja que contiene las levaduras que sedimentan más rápido, usualmente se descarta, ya que también contiene la mayor cantidad de lodos, por tanto, las levaduras menos floculantes tienden a enriquecer las porciones usadas para pasar al siguiente mosto. En una manera similar, las primeras capas de levaduras de fermentación superior que se elevan hacia la superficie son usualmente descartadas. Finalmente, existe la posibilidad de que levaduras no floculantes sean colectadas sobre las paredes de los tanques de cultivo de levadura usados para crecer nueva levadura. A menos que tales tanques sean limpiados y esterilizados después de cada uso, el número de levaduras no floculantes tenderá a incrementarse en los sucesivos lotes que crezcan en ellos (Reed y Pepler, 1973).

3.4 LEVADURAS SALVAJES EN EL MOSTO DE CERVEZA.

El término "levadura salvaje" se aplica usualmente a cualquier levadura presente en fermentación de cervecería y que no se derive de la levadura crecida en cultivo puro por el cervecero, quien desea usar sólo una cepa particular que puede ser crecida en cultivos puros o usada para inocular mostos de cerveza. Por tanto, la determinación de la presencia de levaduras salvajes es de importancia práctica, ya que a menudo son responsables de pérdidas de sabor y de otros efectos indeseables (Reed y Pepler, 1973).

Las levaduras salvajes pueden entrar a la cervecería en el aire, el agua, u otras materias primas, o pueden ser acarreadas por insectos o en botellas vacías. En general, el nivel de

contaminación es más o menos pequeño en contraste con el gran número de cultivos puros de levadura en una fermentación. En las etapas activas de la fermentación, las levaduras de cultivos puros que están bien adaptadas al mosto como nutriente, generalmente crecerán en mayor cantidad que los organismos contaminantes. Sin embargo, una ventaja selectiva para las levaduras salvajes puede ocurrir después de completarse la fermentación primaria cuando la existencia de azúcares fácilmente fermentables casi se ha extinguido. Algunas manipulaciones cerveceras pueden resultar en una ventaja selectiva para las levaduras salvajes; por ejemplo, la floculación diferencial puede incrementar el porcentaje de levaduras salvajes en la porción de levadura usada para inoculación. La filtración a menudo favorece a las células de levaduras contaminantes si son más pequeñas en tamaño celular. Alternativamente, la pasteurización puede favorecer levaduras salvajes de mejor resistencia térmica (Reed y Peppler, 1973).

Desafortunadamente ninguno de los métodos disponibles actualmente para determinar levaduras salvajes es enteramente satisfactorio. El examen microscópico directo puede usarse para encontrar una célula de levadura salvaje en alrededor de 1,000 células de cultivo puro de levadura. Pero esto sólo es aplicable si el nivel de contaminación ya está muy alto y no detectará levaduras salvajes si la apariencia y dimensiones de sus células es similar a las de levaduras de cultivo puro (Reed y Peppler, 1973).

CAPITULO IV

METODOS GENERALES PARA LA PRODUCCION DE EXTRACTO DE LEVADURA

La tecnología de los procesos para la producción de extracto de levadura aun se encuentra en desarrollo y no toma ventaja completa de los avances en tecnología de enzimas, particularmente las de fuentes microbianas, así que los cambios efectivos de rendimiento y costo podrán ser previstos a medida que el conocimiento sea absorbido en la industria (Kelly, 1983).

Algunos procesos aplicados industrialmente se explican de la sección 4.1 a la 4.3

4.1 PLASMOLISIS.

Es un método para iniciar la ruptura celular, que involucra la adición de químicos plasmolizantes como sal o solventes orgánicos como acetato de etilo o isopropanol, a temperatura elevada (suficiente para matar a la levadura pero no para inactivar sus enzimas) (Kelly, 1983).

4.2 TRATAMIENTO CON ENZIMAS.

Comercialmente, la hidrólisis catalizada por enzimas se logra usando las propias enzimas degradativas de la levadura, de las cuales las más estudiadas y probablemente las más importantes en la producción de extracto de levadura son las proteasas. De ser necesario puede agregarse otra proteasa para incrementar la velocidad de solubilización y el rendimiento final, por ejemplo, papaína en una concentración de aproximadamente 0.04% p/p de crema de levadura (Kelly, 1983).

Dada la presencia de quitina en las cicatrices de brote en la pared celular, es recomendable el uso de la enzima quitinasa como ayuda para la hidrólisis de los polisacáridos que la

constituyen (Gamero et al., 1992); sin embargo, la información concerniente a los mecanismos de degradación y utilización de quitina por los microorganismos está lejos de ser completada (Watanabe et al., 1990), por lo que también los estudios disponibles sobre el uso de quitinasa como ayuda en el tratamiento enzimático para la ruptura de la pared celular de la levadura no son suficientes como para utilizarla en ensayos de optimización de la producción de extracto de levadura, por lo que sigue prefiriéndose el uso de papaína debido a los conocimientos que se tienen sobre su efecto proteolítico, y especialmente porque es aceptada para consumo humano.

Se han obtenido mezclas de enzimas a partir de varios microorganismos que atacan a las levaduras intactas y podrían ser usadas para iniciar la hidrólisis. Ya que las paredes celulares pueden ser totalmente solubilizadas por tales mezclas de enzimas, sería posible obtener un porcentaje aun más alto de componentes solubles, aunque el producto final diferiría en sabor comparado con los extractos de levadura comerciales (Kelly, 1983).

La mejor estrategia para abrir las defensas de las paredes celulares puede ser usar, ya sea secuencial o simultáneamente, una variedad de enzimas oxidativas y/o hidrolíticas. Los microorganismos que lisan a la levadura generalmente tienen varias actividades enzimáticas que pueden incluir proteasas, mananasa, glucanasa y quitinasa. La aplicación exitosa de un tratamiento multienzimático requiere atención de las mismas variables químicas y físicas que la autólisis, que puede verse como un caso especial de lisis enzimática donde las enzimas líticas son endógenas. Tales variables son el tipo de solvente y su concentración, temperatura, fuerza iónica y pH, concentración de oxígeno disuelto y tiempo de incubación (Biospec, 1992).

Existen varios problemas potenciales al usar lisis enzimática; por ejemplo, el producto de la célula a recuperar puede ser

destruido o modificado durante la lisis, las enzimas líticas agregadas en el lisado celular pueden complicar las etapas de purificación del producto aguas abajo, y las enzimas líticas pueden ser muy caras para permitir el escalado hacia un proceso industrial, especialmente, si son usadas sólo una vez (Biospec, 1992).

Una forma de sobrellevar el alto costo de las enzimas líticas es usar menos enzima, en lugar de intentar romper la pared celular con enzima, sólo se usa lo suficiente para debilitar la pared celular. La ruptura de células pretratadas es después lograda rápidamente con un método mecánico (Biospec, 1992).

Después de completar la producción de extracto de levadura, puede usarse una mezcla mananasa-glucanasa con contenido limitado de proteasa, para digerir los residuos de pared celular (Kelly, 1983).

Dado que el proceso de obtención de extracto de levadura puede incluir una etapa de pretratamiento enzimático, es necesario tomar en consideración las normas legislativas que se aplican a la operación y pureza de productos de materiales biológicos pues existen varias áreas obvias de peligro potencial: microbiológica, toxicidad química, toxicidad relativa a la actividad y alergenicidad (Gacesa y Hubbe, 1987).

Tomando en cuenta que la papaína es utilizada para la producción de extracto de levadura comercial (Kelly, 1983), puede ser clasificada como enzima del grupo A, según el ANEXO B, por lo que en esta investigación se propone el uso de papaína para iniciar la hidrólisis de la pared celular.

4.3 METODO MECANICO DE RUPTURA DE PARED CELULAR.

A nivel de laboratorio se ha desarrollado una amplia variedad de técnicas mecánicas de ruptura de pared celular; una de

ellas, aplicable también a nivel industrial, es la agitación con partículas abrasivas, que pueden ser partículas de vidrio.

La ruptura de pared celular ocurre por la acción cortante y trituradora de pequeñas perlas de vidrio cuando colisionan con las células al ser agitadas a gran velocidad.

Existen variables que deben estudiarse para obtener una eficiente ruptura de la pared celular, tales como el material y tamaño de las perlas de vidrio, carga de medio de perlas, concentración de la mezcla, velocidad y configuración del agitador, tiempo de agitación y temperatura. Si estas condiciones son apropiadamente optimizadas se pueden obtener eficiencias de ruptura celular de 90 - 95 % (Biospec Products, 1992).

El tamaño óptimo de las perlas (diámetro promedio) para ruptura de levaduras en general es de 0.5 mm. Generalmente, mientras mayor sea la razón de volumen de perlas a la suspensión de células, mayor la rapidez de ruptura celular, aunque para mejores resultados esta suspensión es agregada a un volumen igual de perlas pues mientras mejor su agitación, mayor el porcentaje de ruptura (Biospec Products, 1992).

Un factor importante en la técnica de ruptura celular es la posible desnaturalización del producto durante la operación de ruptura. Un ejemplo de esto es la pérdida de actividad enzimática bajo condiciones comúnmente usadas para lograr la ruptura completa de la célula; sin embargo, estudios recientes sugieren que la desnaturalización de la proteína o la inactivación de enzimas es resultado de un cambio químico, tal como la oxidación, que ocurre a menudo en interfases aire/líquido (Bjurstrom, 1985), por lo que aunque la eficiencia de ruptura es mayor en recipientes parcialmente llenos (Biospec Productos, 1992), este problema puede evitarse eliminando espuma y minimizando el área interfacial aire/líquido (Bjurstrom, 1985).

Después del tratamiento las perlas sedimentan por gravedad en unos cuantos segundos y pueden ser separadas de la mezcla a través de un filtro adecuado. Posteriormente pueden lavarse en un buen detergente de laboratorio para ser utilizadas de nuevo (Biospec Products, 1992).

La densidad o concentración de la suspensión de células juega un papel importante en la eficiencia con la que se rompen las células. En general, mientras más alta la densidad, mejor la ruptura lograda con perlas de vidrio. La experiencia en varios laboratorios indica que la densidad óptima de células es aproximadamente 5×10^9 / ml para células haploides (cerca de la mitad de esto para las diploides). Esta densidad celular es equivalente a una suspensión de células 1:1 peso por volumen de un amortiguador apropiado. En la técnica de ruptura mecánica aplicando molienda con perlas, la eficiencia de la ruptura celular depende de la concentración de células en la suspensión; esto es debido al mecanismo de ruptura, el cual involucra interacciones entre las perlas de vidrio y las células. El efecto es más pronunciado a menores velocidades de agitación; a velocidades altas, la ruptura es menos sensible a la concentración de células. La concentración óptima debe ser encontrada experimentalmente para cada caso, pero usualmente cae en el rango de 30 - 60 % sólidos húmedos en suspensión celular (Bjurstrom, 1985).

El tiempo de residencia de la suspensión de células en la cámara mezcladora puede variarse para proveer el nivel de ruptura deseado para un sistema dado. El tiempo de residencia máximo está limitado debido a inactivación del producto como resultado de la degradación térmica (Bjurstrom, 1985).

La velocidad de agitación es la principal fuente de la energía que provocará la ruptura (Bjurstrom, 1985) por lo que el diseño de los sistemas mecánicos de ruptura toma especial atención al especificar este factor.

La temperatura también influye en la eficiencia de la ruptura porque la liberación de proteína desde la célula es dependiente de la temperatura. Desafortunadamente la temperatura necesita ser controlada para evitar la degradación del producto; no se pueden usar mayores temperaturas para incrementar la eficiencia de la ruptura (Bjurstrom, 1985).

En su estudio, Gamero et al., concluyeron que la agitación con partículas abrasivas combinada con lisis enzimática resulta ser más eficiente que ambos métodos por separado para la ruptura de pared celular de S. cerevisiae residual de la etapa de fermentación en destilería para la producción de extracto de levadura (Gamero et al., 1992).

4.3.1 FUNCIONAMIENTO DEL AGITADOR DE PARTICULAS ABRASIVAS, "BEAD BEATER" PARA RUPTURA DE PARED CELULAR.

El aparato utilizado en esta experimentación es denominado BEAD BEATER CELL DISRUPTER, modelo 11079-00 el cual es fabricado por Biospec Products de Bartlesville, Oklahoma, USA. Este aparato es básicamente un molino que utiliza partículas abrasivas como medio de molienda, el cual a través del texto será referido como "Bead Beater".

Para uso a nivel de laboratorio el Bead Beater esta diseñado para que suspensiones de células sean agitadas y que por efecto de esfuerzos cortantes generados por los constantes choques de las partículas abrasivas permitan una rápida ruptura de la pared celular. Consiste de una cámara de 375 ml, de policarbonato o de acero inoxidable. La última es muy útil para promover el rápido intercambio de calor desde la suspensión porque la acción vigorosa provista por el motor de la base del Bead Beater, de 0.43 hp, genera considerable calor, durante la ruptura de células debido al rotor de Teflón (figura 4.1), por lo que está provisto de una chaqueta de enfriamiento (figura 4.2) (Biospec Products, 1992).

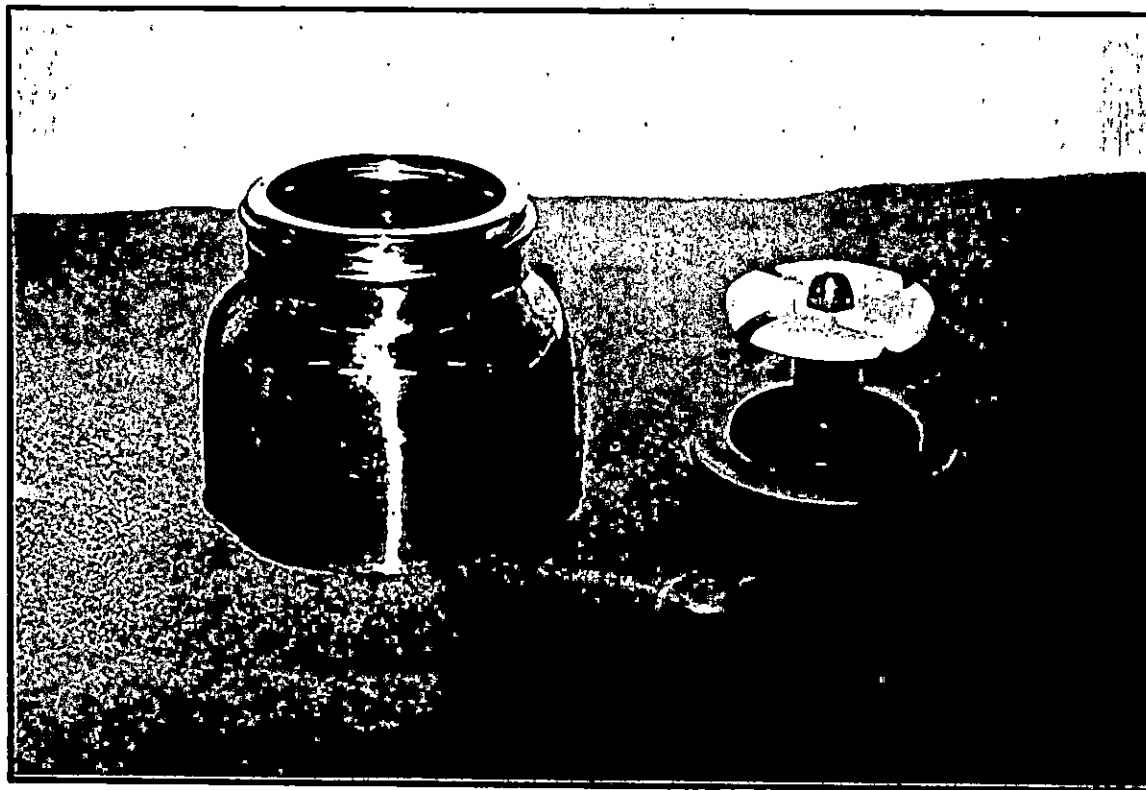


FIGURA 4.1 CAMARA DE RUPTURA Y ROTOR DE TEFLON DEL EQUIPO DE RUPTURA DE PARED CELULAR "BEAD BEATER" DE BIOSPEC PRODUCTS (1992).

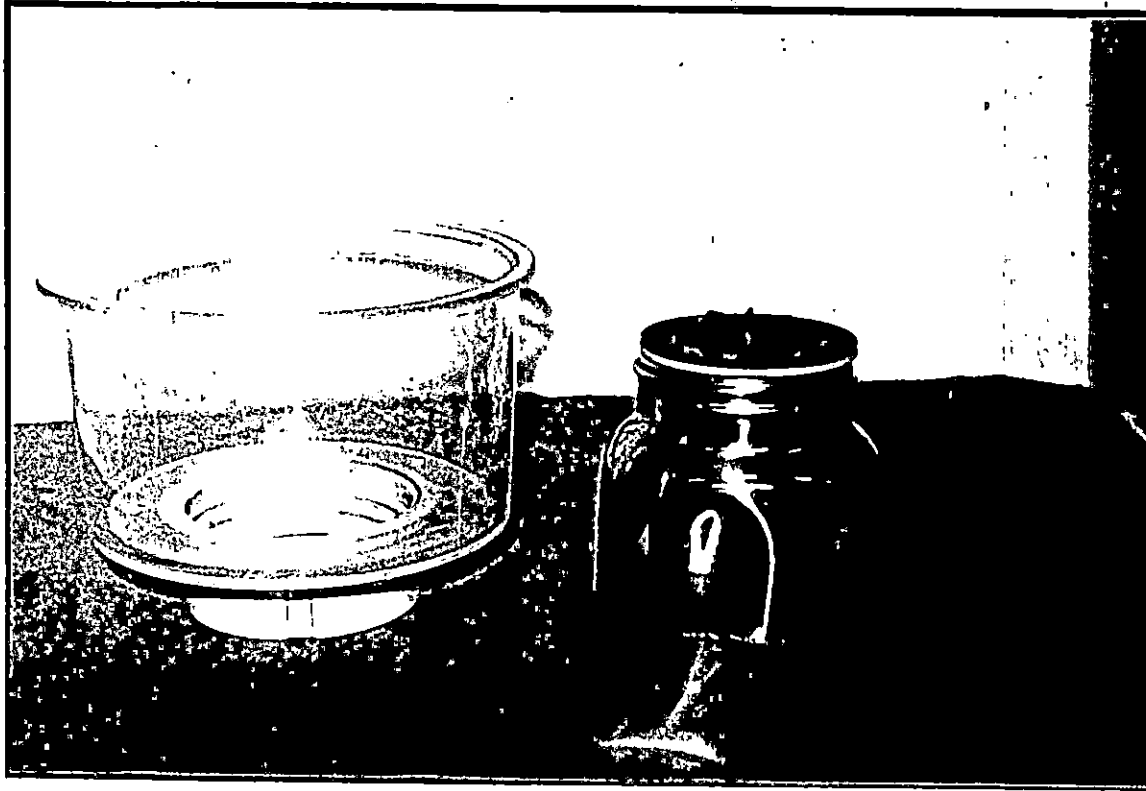


FIGURA 4.2 CHAQUETA DE ENFRIAMIENTO Y CONJUNTO CAMARA-ROTOR DEL EQUIPO DE RUPTURA DE PARED CELULAR "BEAD BEATER" DE BIOSPEC PRODUCTS (1992).

En general, las técnicas de ruptura mecánica generan cantidades significativas de calor, el cual puede causar degradación térmica o desnaturalización de proteínas. El diseño de sistemas basados en ruptura mecánica debe incorporar medios de enfriamiento para evitar este problema (Bjurstrom, 1985).

En la figura 4.3 se muestra una fotografía del equipo Bead Beater descrito, con una configuración comúnmente utilizada para la ruptura de células.



FIGURA 4.3 VISTA COMPLETA DEL AGITADOR DE PARTICULAS ABRASIVAS "BEAD BEATER" DE BIOSPEC PRODUCTS (1992), UTILIZADO PARA LA RUP-TURA DE CELULAS DE S. uvarum DE CERVECERIA.

La figura 4.4 muestra un esquema detallado de las partes que conforman el rotor de teflón y los accesorios que permiten ensamblarlo a la cámara de ruptura. Puede observarse el diseño del rotor de teflón el cuál permite crear gran turbulencia en la suspensión de partículas y choques con las células que finalmente llevan a la ruptura de las mismas.

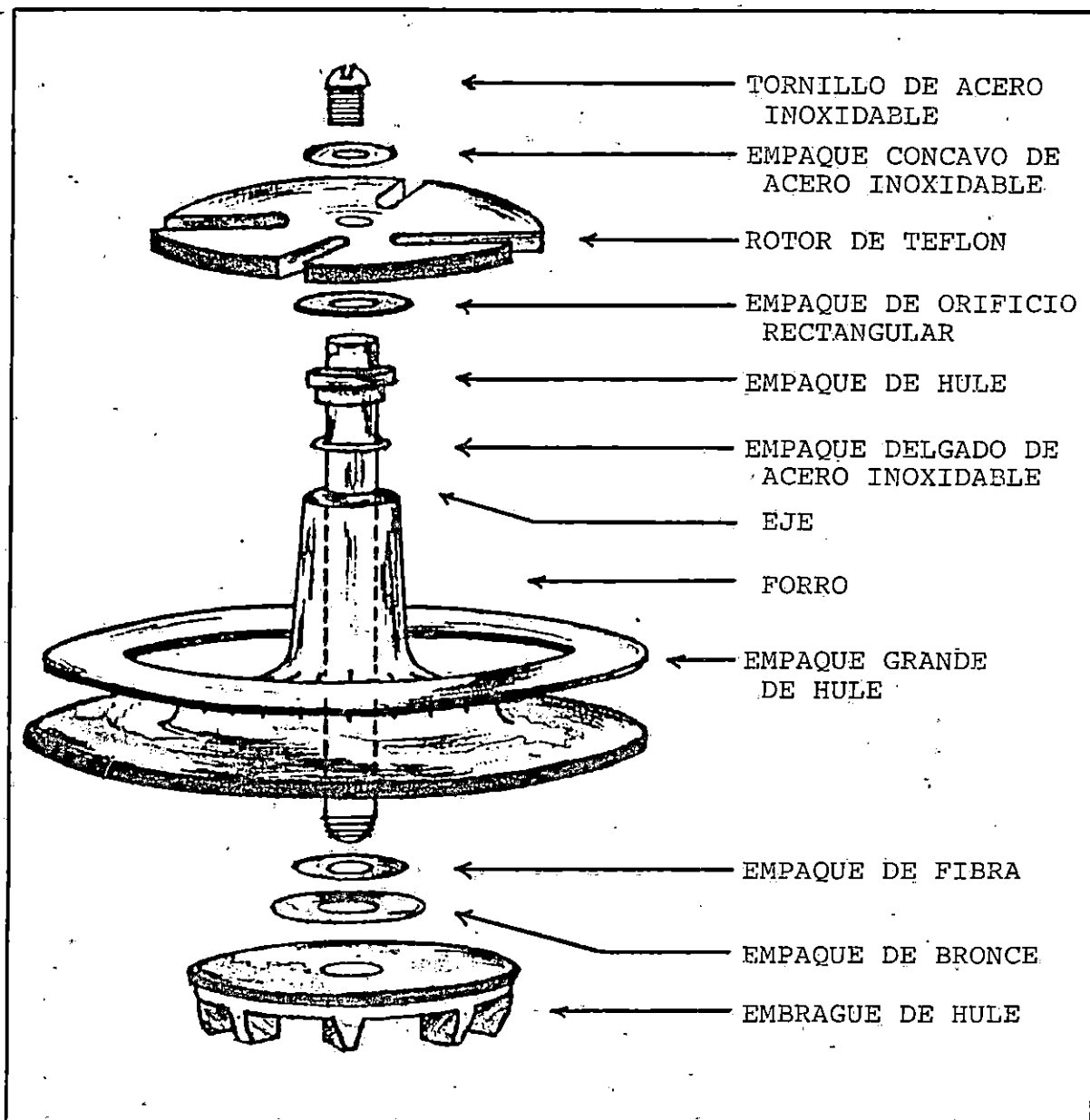


FIGURA 4.4 ESQUEMA Y CONFIGURACION DEL ROTOR DE TEFLON DEL EQUIPO DE RUPTURA DE PARED CELULAR "BEAD BEATER" DE BIOSPEC PRODUCTS (1992).

Biospec Products, 1992 recomienda que el equipo Bead Beater no debe usarse en encendidos de más de 1 min, de lo contrario, el motor puede ser dañado y, en cualquier caso, la suspensión de células puede sobrecalentarse. Se recomiendan ciclos de 1 min de mezclado y 1 min de enfriado, con un tiempo máximo de trabajo de 5 minutos por lote. También debe tomarse en cuenta que al llenar la cámara (que tiene un volumen total de 375 ml) del Bead Beater con mucho más de la mitad del volumen con las perlas de vidrio, se genera mayor cantidad de calor durante el proceso de ruptura.

En el cuadro 4.1 se presentan los parámetros de operación recomendados por Biospec Products y adaptados a la presente investigación, para la producción de extracto de levadura a nivel de laboratorio, utilizando el equipo Bead Beater, el cual trabaja a una velocidad de agitación constante de 3,450 rpm, y su tiempo de agitación, como ya se mencionó, no debe exceder los 5 min para evitar posibles daños en el equipo por sobrecalentamiento.

CUADRO 4.1 PARAMETROS DE OPERACION PARA LA PRODUCCION DEL EXTRACTO DE LEVADURA USANDO EL AGITADOR DE PARTICULAS ABRASIVAS, "BEAD BEATER", MODELO 11079-00, PARA LA RUPTURA DE CELULAS DE S. uvarum DE CERVECERIA.

PARAMETRO	RANGO	REF.
Velocidad de agitación	3,450 rpm	+
Tiempo de agitación	3 - 5 minutos	+
Concentración de levadura	30 - 60% p/v	++
Temperatura de ruptura	0 - 4 °C	+++
pH	*	+++
Temperatura de secado del extracto	55 °C	+++
Concentración de enzima: papaína	0.04 % p/p	+++

- * Dependerá de la ayuda química y/o enzimática que se use; por ejemplo, si es papaína, será pH 6.2 a 25 °C
- + Biospec Products, 1992.
- ++ Bjurstrom, 1985.
- +++ Gamero, et al., 1992.

CAPITULO V

PRUEBAS DE LABORATORIO PARA EVALUAR LOS PARAMETROS QUE INFLUYEN EN LA RUPTURA DE PARED CELULAR DE Saccharomyces uvarum RESIDUAL DE CERVECERIA

La ruptura de pared celular está influenciada por varios factores entre los que se pueden mencionar el tipo de tratamiento previo a la ruptura de pared celular (sección 5.2.1), el tiempo de aplicación de este tratamiento (sección 5.2.2), la concentración de levadura y el tiempo de agitación (sección 5.3).

El tipo de pretratamiento, que para el caso consiste en una combinación de la enzima papaína con amortiguador de fosfatos,⁺ es de gran importancia pues contribuirá a iniciar el proceso de ruptura de pared celular, ya que debilita los enlaces entre las moléculas complejas de los componentes de dicha pared, mencionados en la sección 3.1.1.

Como consecuencia de los anterior es necesario tomar en cuenta el tiempo durante el cual será aplicado dicho pretratamiento, pues un tiempo excesivamente largo podría ocasionar pérdidas de calidad en el producto de interés, por ataque enzimático de la papaína a las proteínas intracelulares.

En cuanto a la concentración de levadura y al tiempo de agitación, son los dos parámetros que se variarán para optimizar sus efectos, o sea, obtener la combinación de éstos que permita un mayor grado de ruptura de la pared celular.

Para medir y comparar la influencia de todos estos factores, debe definirse primero la variable respuesta, es decir, aquélla que se cuantificará como efecto del tipo y tiempo de pretratamiento, así como también de la optimización. Para esta investigación la variable respuesta es el porcentaje (%) de ruptura de la pared celular, definido por la ecuación 5.1.

+ Cuadro 5.1

$$\% \text{ de ruptura} = \frac{\text{Células iniciales} - \text{Células finales}}{\text{Células iniciales}} \times 100 \text{ (EC. 5.1)}$$

El número de células iniciales y finales se determina por medio de conteos en cámara Neubauer, Anexo C.

5.1 PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA EL PROCESO DE RUPTURA DE LA PARED CELULAR.

La materia prima para producir el extracto de levadura se recolecta de los tanques de fermentación y de reposo en la cervecería en forma de crema de levadura sedimentada; esta crema puede ser almacenada a temperaturas de -15°C cuando no se utilizará inmediatamente.

Posteriormente esta crema es sometida a un tratamiento térmico con el propósito de inactivar las enzimas intracelulares causantes de la degradación y pérdida de la proteína celular. Además, este tratamiento causa la muerte de las células de levadura provocando la fragilización de la pared celular debido al cambio brusco de temperatura permitiendo que la acción de las enzimas que puedan ser adicionadas en etapas posteriores sea más efectiva (Gamero et al., 1992).

Este tratamiento consiste en descongelar la crema a temperatura ambiente, verter la crema en un recipiente resistente al calor y colocar este arreglo en un baño de agua a 70°C . La crema se agita continuamente para distribuir el calor uniformemente y una vez que alcanza los 60°C se mantiene la agitación por 10 minutos más e inmediatamente se retira del baño de agua y almacena nuevamente a -15°C (Gamero et al., 1992).

El proceso de concentración de la crema de levadura consiste en reducir el volumen de mosto o cerveza remanente mezclado con la levadura residual de cervecería. Este proceso puede

realizarse después del tratamiento térmico y consiste en descongelar la crema a temperatura ambiente y someterla a centrifugación a 2,000 rpm durante 10 min idealmente a temperatura baja (4 °C); alternativamente puede realizarse por filtración al vacío o por evaporación al vacío (Gamero et al., 1992).

Después de la concentración se lleva a cabo el lavado de las células de levadura, que tiene por objeto remover sustancias extracelulares como cerveza residual (lo cual puede contribuir al desamargado de la levadura), sales solubles y microorganismos indeseables. El proceso consiste en mezclar un peso conocido de crema descongelada y concentrada con 5 volúmenes de agua destilada fría, homogenizar esta suspensión en agitador magnético durante 5 min a aproximadamente 690 rpm y separar nuevamente las células centrifugando a 2,000 rpm por 5 a 10 minutos. El proceso de lavado puede repetirse las veces que se considere necesario según las condiciones iniciales de la crema de levadura como materia prima para la producción de extracto de levadura, por lo que es aconsejable hacer observaciones microscópicas del agua de lavado antes y después del proceso de lavado (Gamero et al., 1992).

La ruptura mecánica se realiza utilizando el equipo Bead Beater y perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro, con una velocidad de agitación de 3,450 rpm durante 5 minutos.

Mediante pruebas se determinó que un volumen de 335 ml de suspensión de crema de levadura más 190 ml de perlas de vidrio, llenan completamente la cámara de modo que al ensamblarla se desplaza totalmente el aire en su interior.

Las pruebas iniciales se realizaron con suspensión de crema de levadura a una concentración de 32.84 % p/v (peso de crema de levadura por volumen de solución final), mezclando 100 gramos de pasta tratada y lavada, con 200 ml de medio de suspensión.

Antes de introducir la suspensión de levadura a la cámara se toma una muestra de 1 ml a la que denomina M1 y se determina el número de células iniciales, es decir, antes del proceso de ruptura, luego se procede a llenar la cámara, y ensamblarla a la chaqueta refrigerante; se llena la chaqueta con agua y hielo, se ajusta al motor del equipo y se procede a la ruptura. Finalizada la ruptura, se toma otra muestra de 1 ml denominada M2 y se procede a determinar el número de células sin daño en la pared celular. Los números de células en las muestras M1 y M2 se determinan mediante conteo en Cámara Neubauer (ANEXO C), para calcular el % de ruptura por la ecuación 5.1.

En la figura 5.1 se muestra una vista al microscopio de la crema de levadura lavada antes del proceso de ruptura de pared celular y en la figura 5.2 se observan los restos de pared celular y algunas levaduras enteras después de dicho proceso.

5.2 DETERMINACION DEL TIPO Y TIEMPO DE TRATAMIENTO PREVIO A LA RUPTURA MECANICA.

Como tratamiento preliminar al método mecánico, Gamero et al. (1992), recomiendan la aplicación de un método de ruptura de pared celular de Saccharomyces cerevisiae residual de destilería que combina la acción enzimática de la papaína durante 24 horas a una concentración de 0.04% p/p de crema de levadura en amortiguador de fosfatos, con la agitación mecánica en un molino de arenas. Por otro lado, Deutscher (1986), recomienda la utilización de un agitador de perlas de vidrio sólo con amortiguador de fosfatos. Una tercera alternativa surge al considerar el factor económico, por lo que se propone la realización del proceso de ruptura mecánica utilizando agua como medio para la suspensión de células.

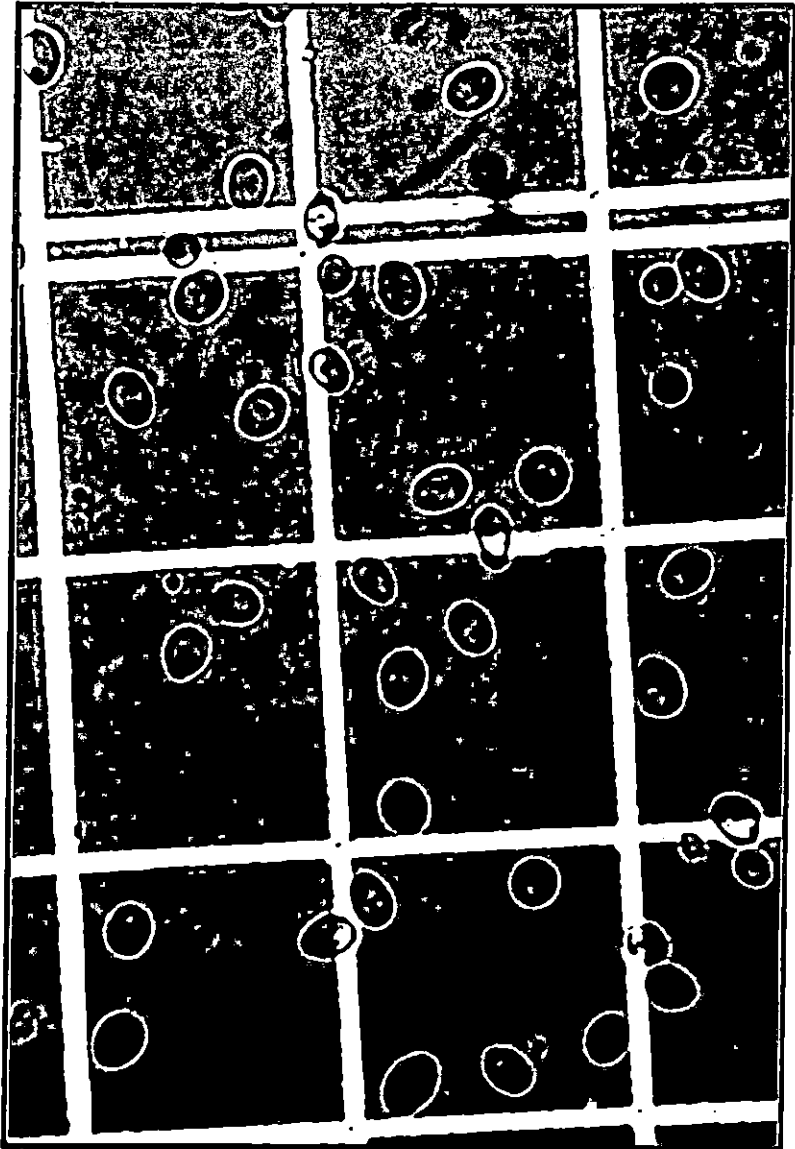


FIGURA 5.1 VISTA AL MICROSCOPIO DE LA CREMA DE LEVADURA S. uvarum LA-
VADA, ANTES DEL PROCESO DE RUPTURA EN UN CAMPO DE CAMARA
DE CONTEO NEUBAUER. LENTE UTILIZADO 100x, COLORACION AZUL
DE METILENO.

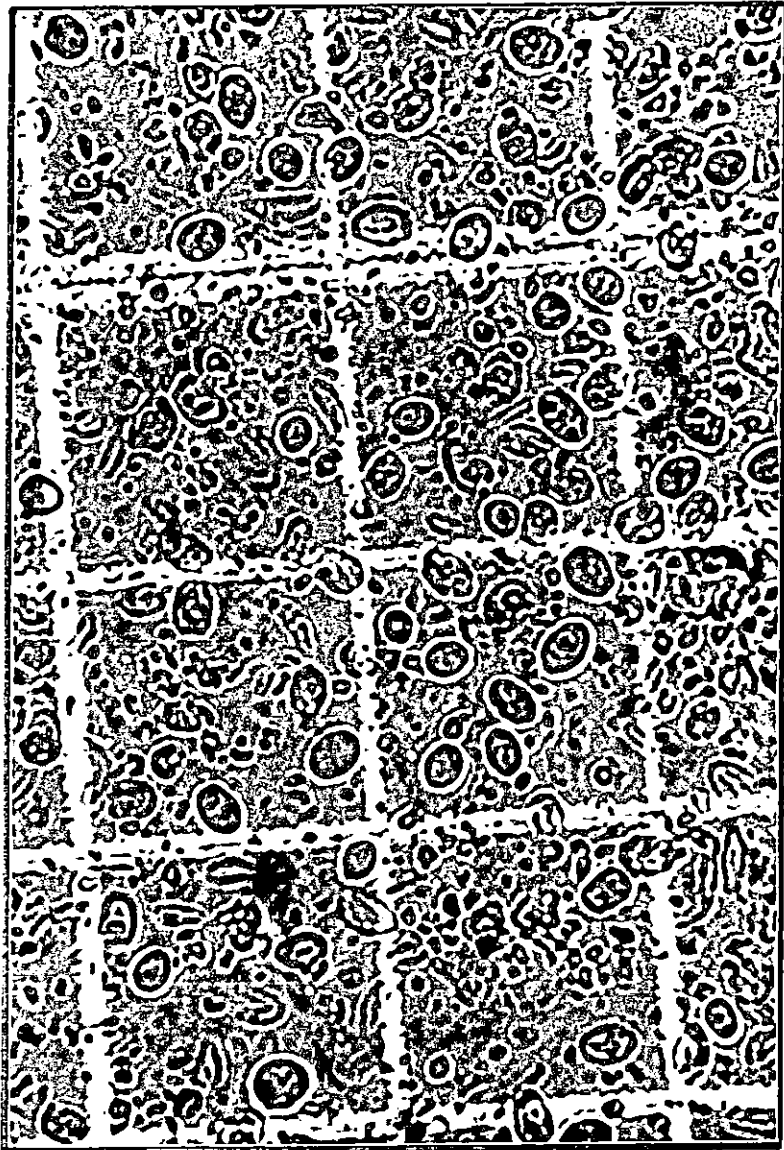


FIGURA 5.2 VISTA AL MICROSCOPIO DE FRAGMENTOS DE PARED CELULAR DE LEVADURA S. uvarum DESPUES DE LA RUPTURA CON EQUIPO "BEAD BEATER" EN UN CAMPO DE CAMARA NEUBAUER. LENTE UTILIZADO 100x, COLORACION AZUL DE METILENO.

Con las tres opciones se procedió a determinar cuál de estas resulta en la obtención de mayores grados de ruptura, por lo que antes de optimizar las variables tiempo de agitación y concentración de levadura se realizaron pruebas de ruptura con los tres tipos de suspensiones mencionados usando el equipo Bead Beater, aplicando un tiempo de agitación de 5 minutos y una concentración de células de 32.84 % p/v; los resultados obtenidos se sometieron a análisis estadístico por el método de comparación de medias (Método de Tukey), resultados que se muestran en la sección 5.2.1.

Se sabe que al aplicar ayudas enzimáticas, un tiempo de acción de la enzima demasiado grande (24 horas), puede provocar la ruptura total de las paredes celulares y actuar sobre las proteínas internas de la levadura afectando la calidad del producto. En el proceso se observó que para algunas muestras, después de 24 horas de acción enzimática, a temperatura ambiente las muestras de levadura presentaban el olor característico de materia orgánica en descomposición, por lo que se realizaron pruebas para determinar el tiempo de acción enzimática que facilitara la obtención de altos grados de ruptura sin riesgo de descomposición ni de daño en las proteínas intracelulares.

Se trabajó aplicando tratamientos enzimáticos de 2, 4, 8, 12, 16 y 24 horas; los datos obtenidos se analizaron también estadísticamente y los resultados se muestran en la sección 5.2.2

Una vez determinados el tipo y tiempo de tratamiento que se daría a las muestras antes de someterlas a la ruptura mecánica, se procedió a la elaboración del diseño experimental para la optimización de las variables tiempo de agitación y concentración de levadura, lo cual se presenta en la sección 5.3.

5.2.1 DETERMINACION DEL TIPO DE TRATAMIENTO PREVIO A LA RUPTURA MECANICA.

Los tipos de pretratamiento que se estudiaron fueron (1) crema de levadura en agua, (2) crema de levadura en amortiguador de fosfatos a pH 8.0 (Deutscher, 1986) y (3) crema de levadura en amortiguador de fosfatos a pH 6.2 con papaína al 0.04 % peso de papaína por peso de crema de levadura, 3.5 g NaCl por litro de solución y 0.05 % volumen de isopropanol por volumen de solución dejando actuar por 24 horas a 25 °C (Gamero et al., 1992). Se hicieron tres repeticiones (A, B y C) de 32.84 % p/v (peso de crema de levadura por volumen de solución final) por cada tipo de tratamiento preparando las muestras de la misma forma descrita en la sección 5.1. En el cuadro 5.1, se presenta un resumen de los tratamientos aplicados.

Los resultados de aplicar estos tratamientos se muestran en el cuadro 5.2; los mayores porcentajes de ruptura se obtienen con el tratamiento de carácter enzimático. Para verificarlo, los resultados de los tres tipos de tratamiento se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) ejecutado con el programa de computador "STATGRAPHICS", Versión 2.1, Statistical Graphics System, de Statistical Graphics Corporation (1987), el cual se presenta en el ANEXO D, cuadro D.1, donde se observa que para los datos del Cuadro 5.1 a un 95% de significancia, F_c (6.287) es menor que F_t (6.94) (tomado del ANEXO D, cuadro D.5); indicando que no existe diferencia estadística significativa en el grado de ruptura de la pared celular para los tres tratamientos aplicados.

Al aplicar el método de comparación de medias (Método de Tukey) para un 95 % de significancia resultando que las medias aritméticas de los % de ruptura de pared celular con los tres tratamientos aplicados son estadísticamente iguales, indicando también que el mayor promedio aritmético corresponde al tratamiento enzimático (ANEXO D, cuadro D.1); por lo que se

decidió aplicar este tratamiento preliminar para el proceso de producción del extracto de levadura en estudio.

CUADRO 5.1 TIPOS DE TRATAMIENTO APLICADOS A LA CREMA DE LEVADURA RESIDUAL DE CERVECERIA PREVIO A LA RUPTURA CON PARTICULAS ABRASIVAS.

PARAMETRO	TRATAMIENTOS		
	1	2	3
Concentración de levadura (% p/v)	32.84	32.84	32.84
pH	7.5	8.0	6.2
Concentración papaína (%p/p)	-	-	0.04*
Concentración isopropanol (%v/v)	-	-	0.5*
Concentración NaCl (g/L)	-	-	3.5*
Tiempo de incubación (h)	-	-	24*
Vol. suspensión (ml)	335	335	335
Vol. perlas de vidrio (ml)	190	190	190
Velocidad de agitación (rpm)	3,450	3,450	3,450
Tiempo de ruptura (min)	5	5	5

* Gamero et al., 1992.

CUADRO 5.2 PORCENTAJE DE RUPTURA DE PARED CELULAR DE LEVADURA DE CERVECERIA S. uvarum APLICANDO TRES TIPOS DE PRETRATAMIENTO A UNA CONCENTRACION DE LEVADURA DE 32.84 % p/v Y 5 min DE AGITACION.

Repetición	Tipo de tratamiento			
	1	2	3	Promedio
A	80.48	80.30	85.85	82.21
B	79.57	76.67	84.38	80.21
C	85.83	75.73	85.14	82.23
Promedio	81.96	77.57	85.12	81.55

5.2.2 DETERMINACION DEL TIEMPO DE TRATAMIENTO ENZIMATICO PREVIO A LA RUPTURA MECANICA.

Como se mencionó en la sección 5.2, Gamero et al., 1992, utilizaron tiempo de tratamiento enzimático de 24 horas para levadura residual de destilería; sin embargo, al utilizar levadura de otra naturaleza y crecida en distinto sustrato, como es el caso de la levadura de cervecería, la cual se descompone con mayor facilidad, se hace necesario determinar un tiempo que permita un alto grado de ruptura, sin riesgo de descomposición de la materia prima pues, este tratamiento se realizó a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), lo que puede acelerar su descomposición. Esta evaluación es importante también porque al reducir el tiempo de tratamiento enzimático se disminuye el costo de operación ya que el proceso necesita agitación para homogenizar el efecto de la enzima, y dicha agitación necesita del uso de un sistema accionado eléctrica-

mente; también se reduce la posibilidad que la papaína ataque proteínas intracelulares de interés por ser una proteasa.

Se prepararon 3 muestras con una concentración de levadura de 32.84 % p/v (sección 5.1). Se sometieron a tratamiento enzimático a temperatura ambiente y agitación constante. Se observó que el tiempo aproximado en que la suspensión de levadura comienza a presentar cambios en su olor es de 16 horas; éste se tomó como límite superior del intervalo de tiempo de tratamiento enzimático en que se harían las pruebas para determinar el tiempo más conveniente.

En el cuadro 5.3 y en la figura 5.3 se muestran los resultados por triplicado del grado de ruptura de pared celular aplicando el pretratamiento enzimático a tiempos de 2, 4, 8, 12, 16 y 24 horas.

CUADRO 5.3 PORCENTAJE DE RUPTURA DE PARED CELULAR DE LEVADURA DE CERVECERIA S. uvarum A DIFERENTES TIEMPOS DE PRETRATAMIENTO ENZIMÁTICO, A UNA CONCENTRACION DE LEVADURA DE 32.84% p/v Y 5 min DE AGITACION, CON 0.04 % PAPAÍNA.

Repetición	Tiempo de tratamiento enzimático (h)						
	2	4	8	12	16	24	Promedio
1	77.41	80.53	79.24	78.99	81.89	85.85	80.67
2	76.93	81.04	80.78	82.08	80.18	84.38	80.90
3	78.02	81.08	80.58	83.03	79.64	85.14	81.25
Promedio	77.45	80.88	80.23	81.37	80.57	85.12	80.94

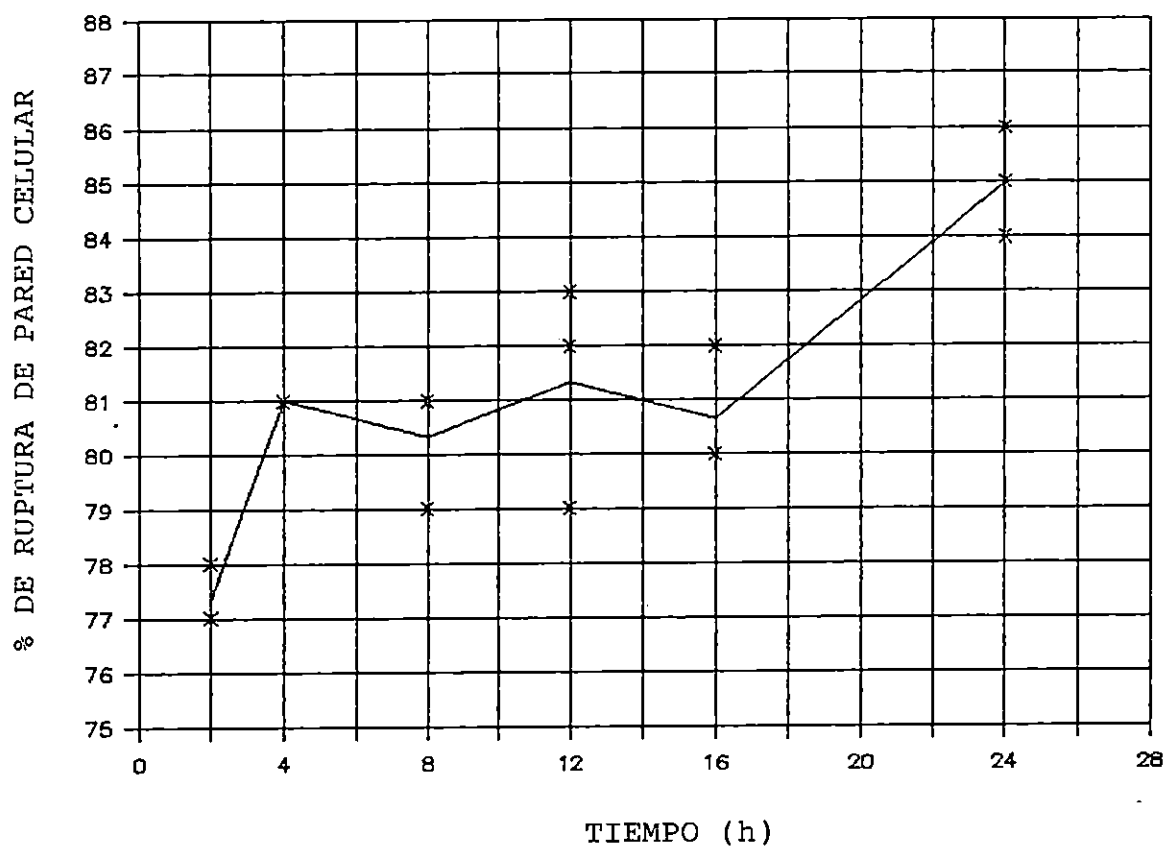


FIGURA 5.3 PORCENTAJE DE RUPTURA DE PARED CELULAR DE LEVADURA DE CERVECERIA *S. uvarum* A DIFERENTES TIEMPOS DE PRETRATAMIENTO ENZIMATICO A UNA CONCENTRACION DE LEVADURA DE 32.84% p/v Y 5 min DE AGITACION, A 3,450 rpm, CON 0.04% DE PAPAÑA.

Al analizar estadísticamente los resultados del cuadro 5.3 mediante el análisis de varianza ejecutado con el programa de computador que se presenta en el ANEXO D, cuadro D.2, se tiene con un 95% de significancia para la variable tiempo, F_c (13.307) es mayor que F_t (3.33), por lo que existe diferencia estadística en el porcentaje de ruptura de pared celular para los diferentes tiempos ensayados.

El análisis estadístico por el método de comparación de medias, método de Tukey, para un nivel de significancia del 95% (ANEXO D.2) indica que existe diferencia estadística entre los porcentajes de ruptura a los diferentes tiempos de pretratamiento ensayados, obteniéndose el más alto para un tiempo de 24 horas; sin embargo, tomando en cuenta las consideraciones mencionadas al inicio de esta sección, este tiempo de pretratamiento debe descartarse.

El análisis indica además que los porcentajes de ruptura de la pared celular para los tiempos de pretratamiento de 4, 8, 12 y 16 horas son estadísticamente iguales, encontrándose que entre estos el mayor corresponde a 12 horas, seguido por el de 4 horas como se observa en la figura 5.3. Por tanto, considerando los factores ya mencionados, se decidió que el tiempo de pretratamiento a utilizar sería de 4 horas.

5.3 OPTIMIZACION DEL TIEMPO DE AGITACION Y CONCENTRACION DE LEVADURA.

Conociendo el tipo y tiempo de pretratamiento para las muestras que serían sometidas a la ruptura de pared celular se procedió a desarrollar la etapa de optimización de la concentración de levadura y el tiempo de agitación aplicando un diseño estadístico experimental para llegar a determinar si existe interdependencia entre las variables concentración de levadura y tiempo de agitación para la ruptura de la pared celular con el método a utilizar, se plantearon las siguientes

hipótesis:

- (a) Existe interdependencia entre la concentración de levadura y el tiempo de agitación.
- (b) No existe interdependencia entre la concentración de levadura y el tiempo de agitación.

En este diseño, la concentración de levadura variará de 30 a 70% p/v (Bjurstrom), y el tiempo de agitación variará de 3 a 5 min por las especificaciones del equipo Bead Beater (sección 4.3.1). La unidad experimental, es decir, el objeto sobre el que se evaluará el efecto de las variables, es un volumen de 330 ml de suspensión de levadura, que es aproximadamente lo que se necesita para llenar por completo la cámara del equipo utilizado.

En este experimento se utilizará el diseño de bloques completamente al azar, que permite incluir cualquier número de tratamientos y repeticiones. Este tipo de diseño permite que el material en estudio se divida en grupos con la finalidad de mantener el error experimental tan pequeño como sea posible en cada grupo.

La crema de levadura fue preparada para el tratamiento enzimático de la misma forma que para las pruebas anteriores (0.04 % peso de papaína por peso de crema de levadura), tomando en cuenta que la cantidad de enzima variaría con la concentración de crema de levadura y que el volumen final de la muestra sería de 330 ml con las proporciones descritas en la sección 5.2.1; se evaluaron muestras por triplicado. En el ANEXO D, cuadro D.6, se presenta un resumen de las cantidades de reactivos utilizados para preparar las muestras para el tratamiento.

5.3.1 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE OPTIMIZACION.

Los resultados obtenidos en el proceso de optimización de las variables concentración y tiempo de agitación se muestran en el cuadro 5.4 y en las figuras 5.4 y 5.5.

Como puede observarse, para todas las concentraciones de levadura el porcentaje de ruptura de la pared celular aumenta al aumentar el tiempo de agitación, obteniéndose los mayores valores a un tiempo de 5 min (máximo tiempo evaluado en este estudio).

Por otro lado, al aumentar la concentración de levadura de 30 a 40 %, también aumenta el porcentaje de ruptura de la pared celular, y a tiempos de 4 y 5 min el máximo se da a una concentración del 40% p/v; luego, a medida que aumenta la concentración, el porcentaje de ruptura de la pared celular disminuye hasta valores mínimos para un 70 % p/v.

Para un tiempo de agitación de 3 min, el mayor grado de ruptura se observa con 50 % de concentración, disminuyendo a concentraciones mayores y menores del 50 %.

El análisis de varianza de doble entrada con interacción aplicado a los datos del cuadro 5.4 considera efectos de las variables concentración de levadura y tiempo de agitación, y su interacción para un 95% de significancia (Anexo D, cuadro D.3).

Para la variable concentración de levadura se tiene que F_c (296.561) es mucho mayor que F_t (2.69); en el caso de la variable tiempo de agitación F_c (745.917) también es mucho mayor que F_t (3.32) al igual que para la interacción de ambas variables donde F_c (13.876) es mayor que F_t (2.27), por lo que se concluye que el efecto de las variables y su interacción generan una diferencia estadística significativa sobre los

distintos porcentajes de ruptura de pared celular; de aquí que resulta verdadera la hipótesis (a) planteada en la sección 5.3.

CUADRO 5.4 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE PORCENTAJES DE RUPTURA DE PARED CELULAR DE LEVADURA DE CERVECERIA S. uvarum EN LA OPTIMIZACION DE LA CONCENTRACION DE LEVADURA Y EL TIEMPO DE AGITACION, POR RUPTURA MECANICA CON AGITACION DE PARTICULAS ABRASIVAS.

Tiempo de agitación (min)	Concentración de levadura (% p/v)					
	30	40	50	60	70	\bar{X} total
3	65.77	66.61	69.11	65.40	49.32	
	66.67	68.08	69.58	62.61	51.22	
	65.83	68.00	69.73	62.85	50.21	
Promedio	66.09	67.56	69.47	63.62	50.25	63.40
4	75.38	80.73	73.37	67.21	59.98	
	75.62	80.78	69.38	66.10	61.27	
	76.34	82.37	70.33	66.04	61.40	
Promedio	75.78	81.29	71.03	66.45	60.88	71.09
5	85.08	91.50	84.59	79.32	70.60	
	83.65	92.55	84.52	73.67	70.93	
	87.46	93.15	85.84	79.24	69.71	
Promedio	85.40	92.40	84.98	77.41	70.41	82.12
\bar{X} total	75.76	80.42	75.16	69.16	60.51	72.20

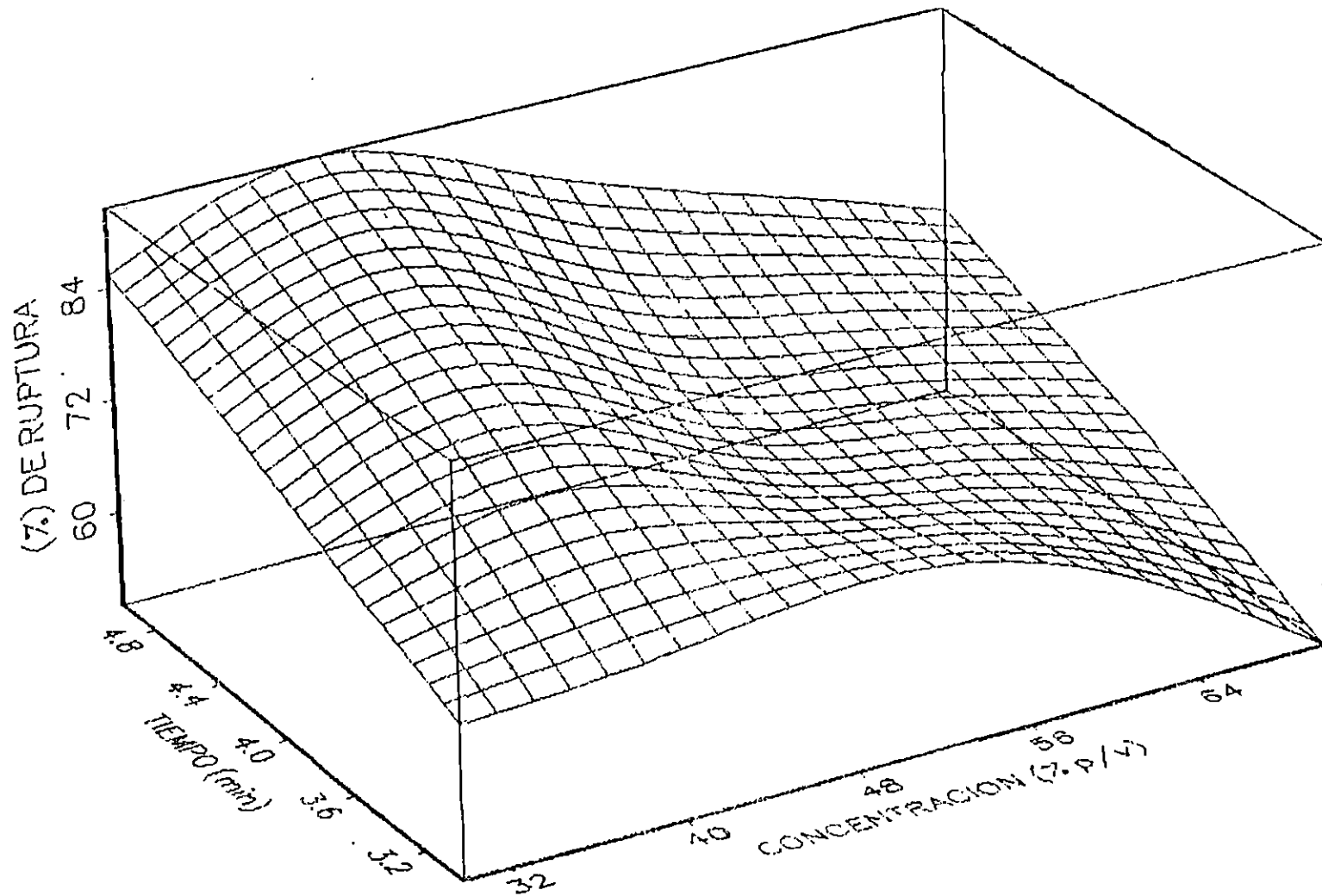


FIGURA 5.4 REPRESENTACION ESPACIAL DE LA RELACION DEL PORCENTAJE DE RUPTURA DE PARED CELULAR OBTENIDO EXPERIMENTALMENTE PARA CONCENTRACIONES DE LEVADURA DE 30 a 70 % p/v Y TIEMPO DE AGITACION DE 3 A 5 min, EVALUADO PARA S. uvarum RESIDUAL DE CERVECERIA (DATOS DE CUADRO 5.4).

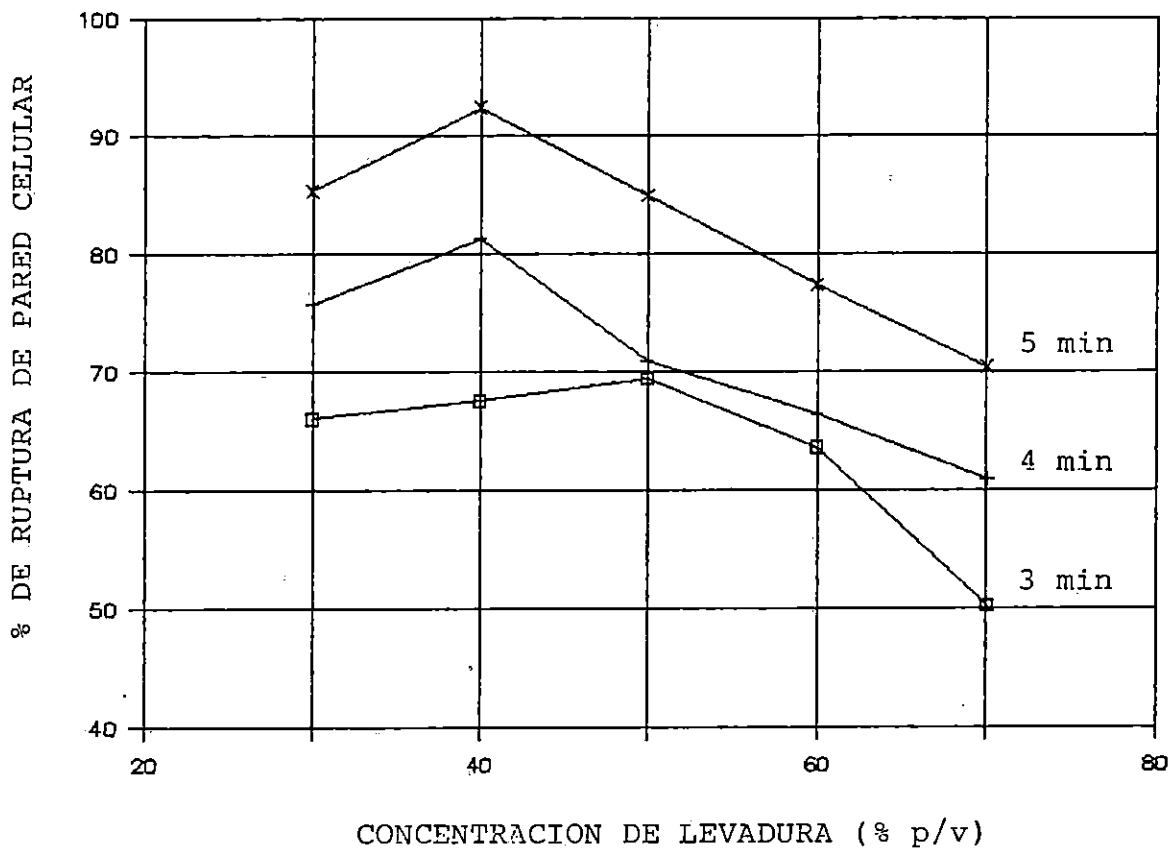


FIGURA 5.5 REPRESENTACION BIDIMENSIONAL DE PORCENTAJES DE RUPTURA DE PARED CELULAR DE LEVADURA DE CERVE-
CERIA *S. uvarum* EN LA OPTIMIZACION DE LA CONCEN-
TRACION DE LEVADURA Y EL TIEMPO DE AGITACION POR
RUPTURA MECANICA CON AGITACION DE PARTICULAS
ABRASIVAS (DATOS DE CUADRO 5.4).

Analizando por el método de Tukey (Anexo D, cuadro D.3) se tiene que las medias aritméticas del porcentaje de ruptura de la pared celular son estadísticamente diferentes para los tres tiempos de agitación ensayados y el porcentaje de ruptura promedio más alto (82.12%) se obtiene con 5 minutos de agitación.

En lo que respecta a la aplicación del método de Tukey para la concentración de levadura se tiene que el mayor promedio de ruptura de pared celular (92.11%) se obtiene a un 40 % p/v de crema de levadura; mientras que las medias aritméticas para concentraciones de levadura de 30 y 50 % p/v son estadísticamente similares, pero con un porcentaje de ruptura inferior a 92.11 %, por lo que se realizaron nuevas pruebas con concentraciones entre 30 y 50 % p/v; para el caso, se seleccionaron 35 y 45 % p/v con 5 min de agitación definido en entrevista personal con Segura Lemus (1994).

El cuadro 5.5 muestra los resultados de estas nuevas pruebas, donde se observa que el máximo grado de ruptura de pared celular sigue obteniéndose a la concentración de 40 % p/v (92.11%), conservándose el comportamiento de la gráfica presentada en la figura 5.5 a las demás concentraciones evaluadas (figura 5.6).

El análisis de varianza para los datos del cuadro 5.5 a un 95% de significancia refleja que existe diferencia estadística significativa entre los porcentajes de ruptura obtenidos para todas las concentraciones ensayadas, pues F_c (53.778) es mayor que F_t (2.85), (Anexo D, cuadro D.4).

Por otro lado al aplicar el método de Tukey a estos datos se obtiene que, para una concentración de levadura de 40% p/v, la media aritmética de los porcentajes de ruptura de pared celular logrados con 5 minutos de agitación no es igual estadísticamente a ninguno de los promedios obtenidos con

otras concentraciones, siendo la que presenta el mayor promedio de porcentaje de ruptura de pared celular (92.11%). Por lo que los resultados experimentales indican que la concentración de levadura que rinde el mayor porcentaje de ruptura de pared celular es 40% p/v, combinada con un tiempo de agitación de 5 minutos.

CUADRO 5.5 PORCENTAJES DE RUPTURA DE PARED CELULAR DE LEVADURA DE CERVECERIA *S. uvarum* PARA LA OPTIMIZACION DE LA CONCENTRACION DE LEVADURA, CON 5 min DE AGITACION.

Repetición	Concentración de levadura (% p/v)							Promedio
	30	35	40	45	50	60	70	
1	85.08	85.14	91.50	83.63	84.59	79.32	70.60	82.84
2	83.65	87.37	92.55	86.95	84.52	73.67	70.93	82.81
3	87.47	87.34	93.15	85.45	85.84	79.24	69.71	84.03
4	-	89.20	91.22	84.24	-	-		88.22
Promedio	85.40	87.26	92.11	85.07	84.98	77.41	70.41	83.84

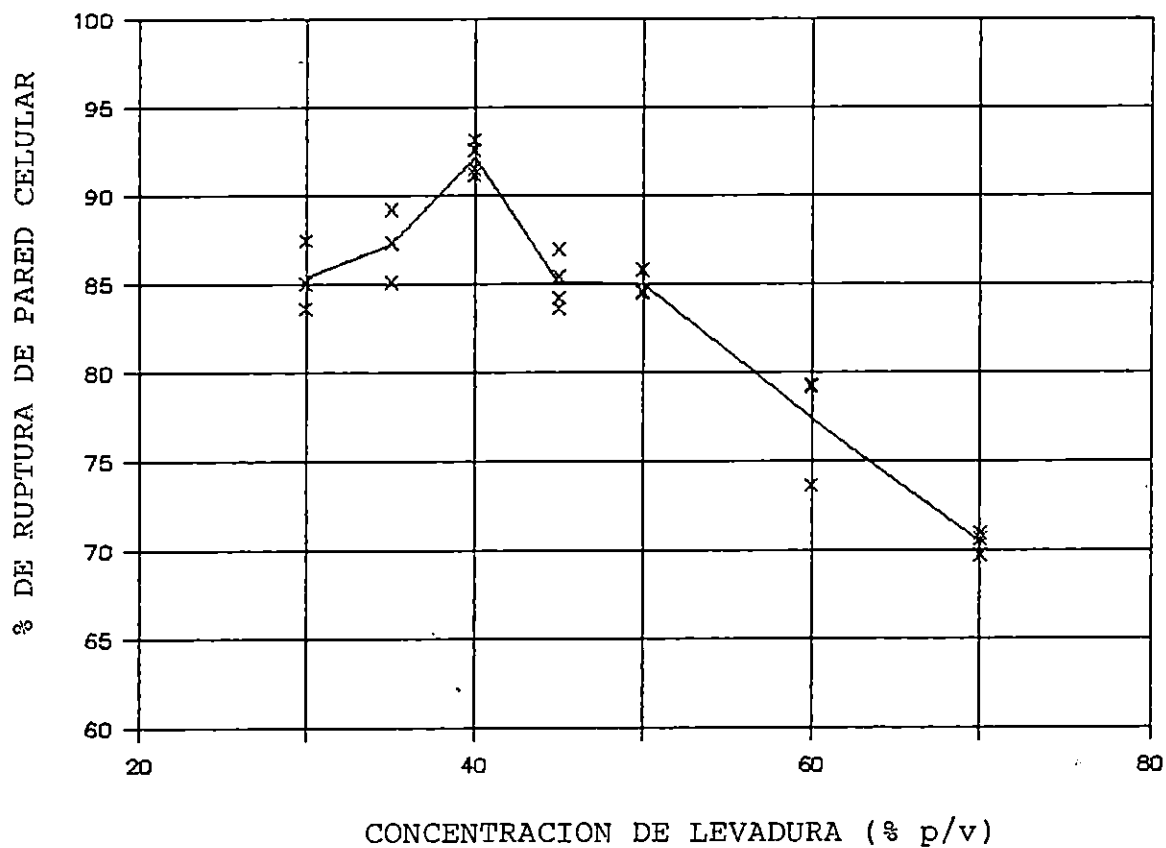


FIGURA 5.6 PORCENTAJES DE RUPTURA DE PARED CELULAR DE LEVADURA DE CERVECERIA S. uvarum PARA LA ÓPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACION DE LEVADURA, CON 5 min DE AGITACION (DATOS DE CUADRO 5.5).

5.3.2 DETERMINACION DE LAS ECUACIONES DE REGRESION PARA LA PREDICCIÓN DEL PORCENTAJE DE RUPTURA DE PARED CELULAR DE *Saccharomyces uvarum* EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACION DE LEVADURA Y EL TIEMPO DE AGITACION.

Experimentalmente se ha comprobado que la concentración de levadura y el tiempo de agitación que permiten obtener un mayor grado de ruptura de pared celular son 40% p/v y 5 min, respectivamente, (Sección 5.3.1).

Para predecir los porcentajes de ruptura de pared celular analíticamente en función de las variables concentración de levadura y tiempo de agitación, se determinó una expresión matemática que correlacione satisfactoriamente los datos experimentales mediante un análisis de regresión.

Utilizando el programa de computador "STATGRAPHICS", Versión 2.1, se ensayaron diferentes modelos matemáticos, tomando los datos presentados en el cuadro 5.5; los criterios utilizados para elegir el mejor de estos fueron el cuadrado del factor de correlación (r^2), la confiabilidad de los coeficientes, la gráfica de residuos, así como el porcentaje de desviación entre los valores predichos y los valores experimentales, estableciendo para este caso un porcentaje máximo de desviación del 5% (Bermúdez, 1994; Schafer, 1989 y Segura, 1994).

En el ANEXO E (cuadros E.1 al E.6) se presentan alternadamente los modelos de ajuste y los análisis de regresión para los tres mejores de los modelos ensayados, y en las figuras E.1 a E.3, las correspondientes gráficas de residuos; según los criterios mencionados, se estableció que el mejor modelo es:

$$\% R = A C^2 + B C + D T \quad (\text{EC. 5.2})$$

Donde:

- % R = porcentaje de ruptura de pared celular.
- C = concentración de levadura (% p/v).
- T = tiempo de agitación (min).
- A, B, D = constantes de la ecuación de regresión

En el cuadro E.5 (ANEXO E) se observa que para este modelo el r^2 tiene un valor de 0.9985, y los valores de significancia de los coeficientes son todos iguales a cero, lo que corresponde a un 100% de confiabilidad. La correspondiente gráfica de residuos (Figura E.3 del ANEXO E) indica que las diferencias entre los valores predecidos y los experimentales no exceden de $|-5.80755|$.

El cuadro E.6 (ANEXO E) presenta los porcentajes de desviación entre los valores experimentales y los predecidos, donde las muestras correspondientes a 8 y 9 sobrepasan al 5%, por lo que se procedió a rechazarlos y realizar nuevamente el análisis de regresión para este modelo. Los nuevos resultados se presentan en los cuadros E.7 y E.8, y en la figura E.4 del ANEXO E, en donde se observa que todos los criterios mejoraron.

De esto se concluye que entre los modelos ensayados el que mejor correlaciona los datos experimentalmente obtenidos es el siguiente (ecuación 5.3):

$$\% R = A' C^2 + B' C + D' T \quad (\text{EC. 5.3})$$

Donde:

$$\begin{aligned} A' &= - 0.024131 \\ B' &= 2.012696 \\ D' &= 9.374708 \end{aligned}$$

En la figura 5.7 se presentan gráficamente los datos generados por esta ecuación, que comparada con la figura 5.4 de la sección 5.3.1 se tiene que estos datos se ajustan de manera aceptable a los datos obtenidos experimentalmente en los rangos de tiempo de agitación y concentración de levadura estudiados.

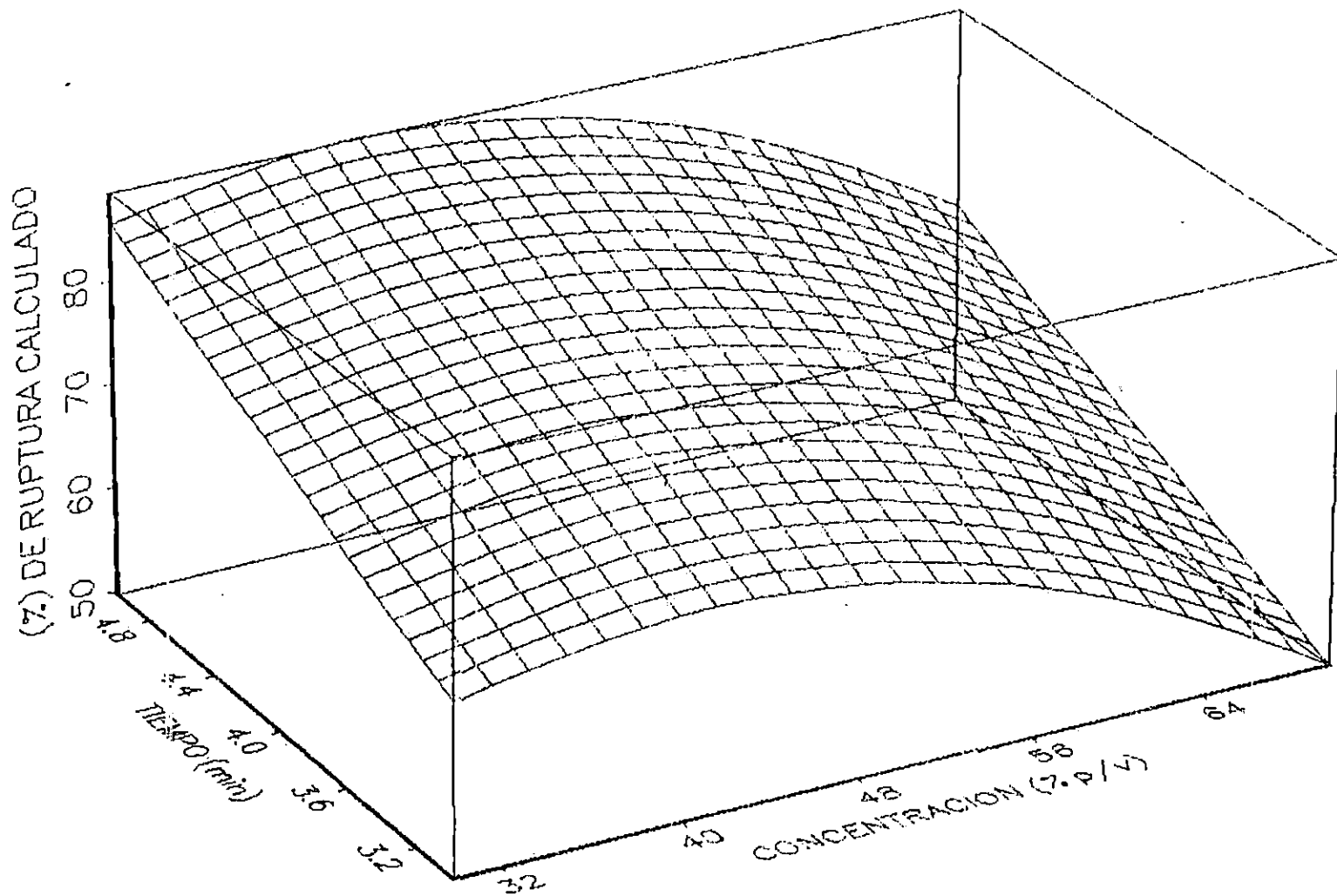


FIGURA 5.7 REPRESENTACION ESPACIAL DEL MODELO MATEMATICO PARA LA ECUACION DE REGRESION (EC. 5.3).

Analíticamente se encontró que para un porcentaje de ruptura ideal del 100% el valor de la concentración de levadura debe ser 43.526724 % p/v combinada con un tiempo de agitación de 6.2311707 minutos; sin embargo, por las limitantes de diseño del equipo Bead Beater (sección 4.3.1), no es posible experimentar con un tiempo mayor de 5 minutos.

Por la misma razón resulta conveniente realizar un análisis de regresión para encontrar la expresión matemática que mejor correlacione el porcentaje de ruptura con la variable concentración de levadura con un tiempo de agitación de 5 min.

Lo anterior se realizó utilizando el programa "TBLCURVE", de Jandel Scientific (1992), el cual basándose en los datos obtenidos experimentalmente para 5 min de agitación, cuadro 5.5, genera expresiones matemáticas del porcentaje de ruptura en función de la concentración de levadura; al finalizar la rutina el programa proporciona una serie de ecuaciones que se ajustan a los puntos mencionados anteriormente con sus respectivos análisis estadísticos; en este caso se seleccionó la ecuación que presenta un mayor coeficiente de correlación ($r = 0.9925$), siendo la siguiente (ecuación 5.4):

$$\% R = A'' + B'' C \sqrt{C} + D'' C^2 + E'' C^2 \sqrt{C} \quad (\text{EC. 5.4})$$

Donde:

$$\begin{aligned} \% R &= \text{Porcentaje de ruptura de pared celular} \\ C &= \text{Concentración de levadura (\% p/v)} \\ A'' &= - 0.000112710 \\ B'' &= 2.601399024 \\ D'' &= - 0.538824870 \\ E &= 0.028960777 \end{aligned}$$

La figura 5.8 muestra los puntos obtenidos experimentalmente y los puntos generados por la regresión matemática obtenida por el programa de computadora.

El detalle de cómo calcular el coeficiente de correlación para esta ecuación se presenta en el cuadro F.1, ANEXO F.

Los resultados del análisis estadístico para la regresión matemática se presentan en el cuadro F.2 del anexo F, siendo el valor máximo de ruptura predicho por esta regresión, 89.12% a una concentración de levadura de 38.70% p/v, desviándose del valor real obtenido (92.11%) en un 3.25%.

En los cuadros F.3 al F.5 se presentan los datos predichos con esta regresión; como puede observarse, ninguno de los porcentajes de desviación excede del 5%.

Con el fin de verificar si el modelo matemático se ajusta a los porcentajes de ruptura obtenidos experimentalmente, se realizaron pruebas a 37.5% y 42.5% p/v, cuyos resultados se presentan en el cuadro 5.6, donde los porcentajes de desviación también resultan abajo del 5%, por lo que se demuestra que la expresión matemática se ajusta a los datos obtenidos experimentalmente, en el intervalo de concentración de levadura trabajado (30 a 70% p/v).

CUADRO 5.6 COMPARACION DE PORCENTAJES DE RUPTURA DE LA PARED CELULAR EXPERIMENTALES VRS. CALCULADOS POR LA REGRESION.

% p/v	% ruptura experimental	% ruptura predicho	% de desviación
37.5	90.35	89.05	1.43
42.5	89.13	88.53	0.67

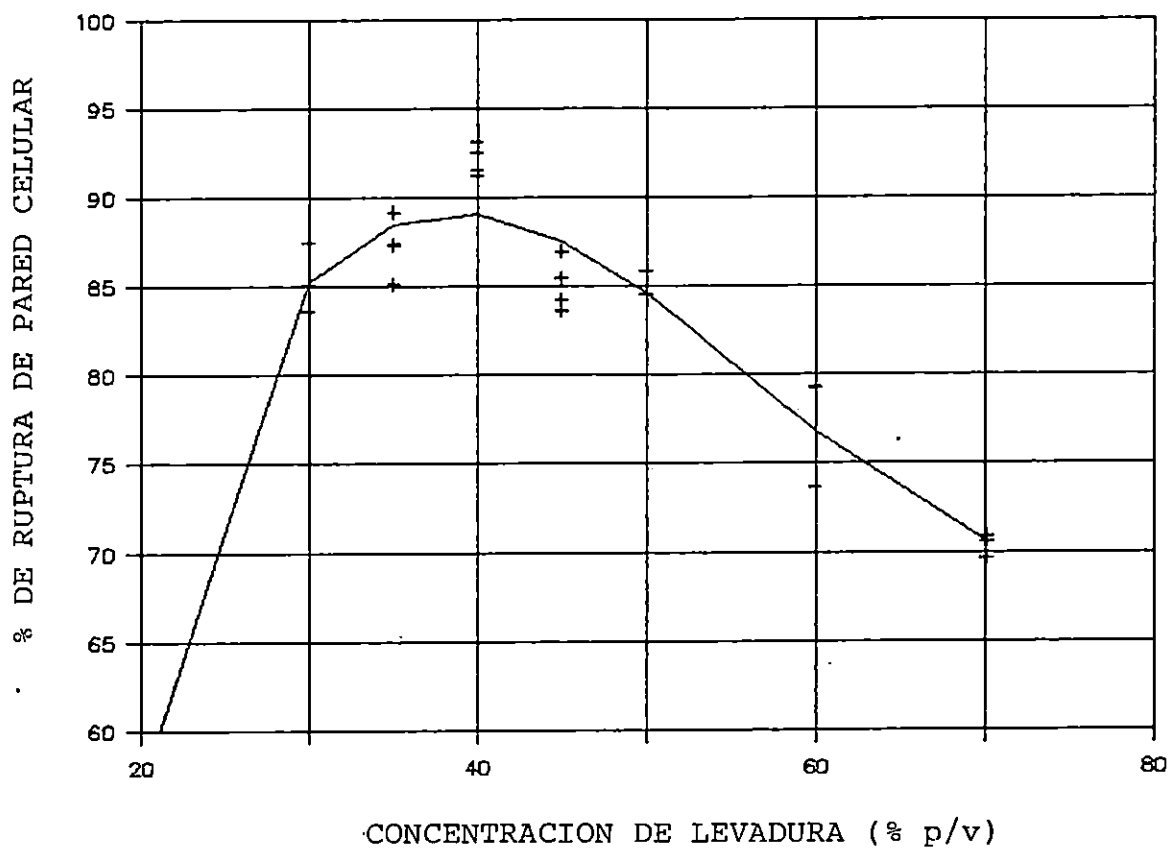


FIGURA 5.8 PORCENTAJES DE RUPTURA DE PARED CELULAR DE S. uvarum EXPERIMENTALES Y CALCULADOS POR REGRESION BIDIMENSIONAL PARA UN TIEMPO DE AGITACION DE 5 min CON CONCENTRACIONES DE LEVADURA DE 30 A 70 % p/v.

CAPITULO VI

PRODUCCION DE EXTRACTO DE LEVADURA CON LAS MEJORES
CONDICIONES DE RUPTURA

Se procedió a la producción de extracto de levadura basándose en las condiciones experimentales que produjeron un mayor grado de ruptura de la pared celular en la levadura (concentración de levadura de 40% p/v y 5 min de tiempo de agitación).

Para asegurar una mejor calidad del producto final se procedió a trabajar bajo condiciones asépticas, esterilizando todo el material de vidrio y metálico, el agua destilada y el amortiguador de fosfatos. El material y equipo que no era posible esterilizar en el autoclave, fue desinfectado utilizando una solución al 10% de lugol en alcohol etílico de 70% (como diluyente). El proceso de preparación de la muestra fue realizado en área de mechero para minimizar la contaminación microbiológica. El proceso utilizado para la obtención de extracto de levadura se detalla a continuación.

- a) Recolección de materia prima. La levadura residual fue recolectada directamente de los tanques de fermentación en la Cervecería La Constancia S.A. de C.V., en recipientes plásticos desinfectados,
- b) Tratamiento térmico. La levadura recolectada fue sometida a tratamiento térmico utilizando un baño maría a 70 °C y agitación constante; cuando la levadura alcanzó 60 °C se dejó en el baño maría por 10 minutos más, siempre con agitación, luego se almacenó a - 15 °C.
- c) Concentración de la materia prima. Con el fin de eliminar cerveza residual y obtener una pasta de levadura más homogénea, se concentró utilizando una centrífuga. Para lo anterior se colocó levadura en botes de vidrio roscados,

previamente esterilizados con su respectiva tapadera; se homogenizó con agitación magnética durante 5 minutos y se colocó esta suspensión en los vasos de la centrífuga, los cuales fueron previamente desinfectados, se taparon con papel de aluminio y se centrifugaron a 2,000 rpm por 10 minutos; la levadura fue recuperada utilizando una espátula esterilizada y depositada en recipientes plásticos desinfectados; luego se almacenó a una temperatura de 10 °C. Tanto el proceso de llenado de los vasos como el de recuperación de levadura se realizó en área de mechero.

- d) Lavado de levadura. La levadura debe lavarse con el fin de eliminar sólidos en suspensión. El proceso de lavado se realizó esencialmente bajo las mismas condiciones que para la concentración de levadura, excepto que para este caso se agregaron 5 pesos de agua destilada estéril por cada peso de crema de levadura concentrada, se homogenizó por 5 minutos con agitación magnética y luego se procedió a centrifugarla y recuperar el sedimento bajo las mismas condiciones que en el proceso de concentración.
- e) Tratamiento enzimático. Conociendo que la concentración de levadura a utilizar para la producción de extracto de levadura sería de 40 % p/v y que la cámara de ruptura del equipo Bead Beater se llena con 190 ml de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro y un poco menos de 330 ml de suspensión de crema de levadura, se determinó el volumen necesario de amortiguador para aforar 132 g de crema de levadura concentrada y lavada hasta 330 ml ($132 \text{ g} \times 100 / 330 \text{ ml} = 40 \text{ \% p/v}$), el cual resultó ser de 215 ml. Se esterilizaron frascos de vidrio con sus tapaderas y conteniendo 215 ml de amortiguador más 1.155 g de NaCl; uno de los frascos se esterilizó vacío para pesar en él los primeros 132 g de crema de levadura, agregar los 215 ml de amortiguador y sal estéril, y así sucesivamente utili-

zando el frasco que quedaba vacío. Aparte se esterilizaron beakers de 50 ml para en ellos pesar con cuchillo o espátula estéril, 0.0528 g de papaína en balanza analítica adecuadamente limpia en el momento de preparar la muestra; en este momento también se agregó 1.65 ml de isopropanol (en área de mechero), se colocó el magneto previamente desinfectado, se tapó el frasco con su respectiva tapadera estéril y se inició el tratamiento enzimático por 4 horas con agitación constante a temperatura ambiente.

- f) Ruptura de la pared celular. La suspensión de levadura que resultó del tratamiento enzimático fue sometida a un proceso de ruptura de la pared celular, con el fin de poder extraer los componentes intracelulares solubles de la levadura.

Inicialmente se desinfectó la cámara de ruptura y todos los utensilios que entrarían en contacto con la suspensión de levadura, luego se colocaron en la cámara 190 ml de perlas de vidrio y se aforó con suspensión de levadura, de forma que al colocar el rotor de teflón la cámara quedara completamente libre de aire; se colocó la chaqueta refrigerante y se añadió hielo el cual enfría la cámara durante el proceso de ruptura. El tiempo efectivo de ruptura fue de 5 minutos, pero por motivos de seguridad del equipo Bead Beater debe operarse en intervalos de tiempo de 1 minuto de encendido, alternado con uno o dos minutos de apagado, hasta que el tiempo efectivo de ruptura sea completado.

Posterior a la ruptura, la separación de las perlas se realizó mediante un cedazo el cual permite el paso de la suspensión y retiene las perlas; para evitar que estas retengan suspensión de levadura rota es necesario realizar un enjuague con poca agua.

- g) Recuperación del extracto de levadura. La suspensión de levadura obtenida mediante el proceso de ruptura se sometió a centrifugación con la finalidad de separar el contenido intracelular soluble, de los restos de pared celular, levadura sin romper y otros sólidos; se centrífugó a 2,000 rpm por 30 minutos, después se separó la fracción soluble por decantación y se almacenó en un recipiente plástico. No se realizó lavado de la fracción sólida por lo que no se recuperó la máxima cantidad de proteína.
- h) Secado del extracto. La fracción soluble se sometió a un proceso de secado a temperaturas que no excedieran los 55 °C. Para ello se colocó la solución de extracto de levadura en recipientes de vidrio ó metálicos revestidos con teflón previamente desinfectados y se colocó en una estufa a 55 °C previamente desinfectada, el tiempo de secado fue de aproximadamente 18 horas.
- i) Recuperación del extracto de levadura y pulverización. El extracto fue separado de los recipientes de vidrio y/o de los recipientes metálicos utilizando espátulas metálicas. Las hojuelas recuperadas fueron pulverizadas utilizando un mortero y pistilo desinfectados, todo este proceso se realizó en área de mechero; el extracto de levadura seco y pulverizado se almacenó en un recipiente plástico desinfectado y este a su vez fue almacenado en un desecador.
- j) Determinación del rendimiento. En la sección 6.1 se explica la forma en que se obtuvieron los rendimientos por cada lote de producción de extracto de levadura, siendo el rendimiento promedio 8.64% de extracto seco por crema de levadura sin amortiguador.

6.1 RENDIMIENTO DE PRODUCCION CON LAS MEJORES CONDICIONES DE RUPTURA.

El rendimiento de producción de extracto de levadura se basó en la cantidad de crema de levadura presente en la suspensión que se introducía en la cámara de ruptura del equipo Bead Beater. Para hacer este cálculo se tomó en cuenta que la suspensión de 40 %p/v se preparó pesando 132 g de crema de levadura lavada aforándola hasta un volumen final de 330 ml, y que tenía una densidad promedio de 1.02 g/ml. Cabe mencionar que la crema de levadura lavada tiene una densidad de 1.2 g/ml.

En el cuadro 6.1 se presentan los datos del rendimiento de producción obtenido para diez lotes de crema de levadura. A partir de estos datos se calcula un rendimiento de producción promedio de 8.64 g de extracto seco por cada 100 g de crema de levadura sin amortiguador de fosfatos. En el ANEXO G se presenta un ejemplo de cálculo de rendimiento de uno de los lotes de crema de levadura procesados.

Para calcular la cantidad de extracto de levadura seco que puede producirse a partir de la levadura residual de la etapa de fermentación en la cervecería La Constancia S.A., se toman como base los 4,110 L/día de crema de levadura residual producida por esta empresa (Cuadro 2.1, sección 2.1), tomando en cuenta además que según la metodología propuesta en esta investigación, durante la etapa de concentración se recupera aproximadamente un 35 % del volumen inicial de la levadura residual, se tendrían 1,438.5 L/día de crema de levadura residual disponibles para la producción de extracto, que con una densidad de 1.2 Kg/L, equivalen a 1,726.2 Kg, los cuales con el rendimiento promedio de 8.64 % de extracto seco por crema de levadura sin amortiguador, presentado en el cuadro 6.1, producirían 149.1 Kg de extracto seco al día, es decir, 54,437.4 Kg al año. En el ANEXO G se presentan estos cálculos en detalle.

CUADRO 6.1 DETERMINACION DEL RENDIMIENTO DE PRODUCCION DE EXTRACTO DE LEVADURA A PARTIR DE S. uvarum RESIDUAL DE CERVECERIA.

Número correlativo	Suspensión de levadura 40.0 % p/v (g)	Suspensión de levadura 40.0 % p/v (ml)	Crema de levadura sin amortiguador (g)	Extracto seco recuperado (g)	Rendimiento % extracto seco por crema sin amortiguador
1	289.4	283.7	113.5	9.8399	8.67
2	290.9	285.2	114.1	9.8321	8.62
3	299.3	293.4	117.4	10.1316	8.63
4	292.7	287.0	114.8	9.8450	8.58
5	288.4	282.7	113.1	9.7139	8.59
6	290.4	284.7	113.9	9.9085	8.70
7	296.7	290.9	116.4	10.1695	8.74
8	288.4	282.7	113.1	9.6993	8.58
9	292.7	287.0	114.8	9.8875	8.61
10	295.5	289.7	115.9	10.0883	8.70
Total			1,147.0	99.1156	8.64

Tiempo de agitación = 5 min

Densidad de la suspensión de levadura al 40 % p/v = 1.02 g / ml

Con esta capacidad de producción de extracto de levadura se estaría satisfaciendo por un amplio margen la demanda nacional proyectada según los datos del cuadro 2.4 de la sección 2.2, por lo que sería recomendable considerar nuevas aplicaciones para este producto como fuente no convencional de proteínas.

6.2 EVALUACION DE LA CALIDAD DEL PRODUCTO.

La calidad del extracto de levadura producido experimentalmente a nivel de laboratorio, se evaluó únicamente en base a calidad microbiológica, composición proximal, vitamínica y de minerales, según los análisis sugeridos presentados en el ANEXO H y de acuerdo a la disponibilidad de laboratorios de análisis en El Salvador. En el caso de la calidad vitamínica sólo fue posible analizar las vitaminas B₁ y B₆.

El cuadro 6.2 presenta los resultados de los análisis realizados a la crema de levadura después de someterla a tratamiento térmico, concentración y lavado; extracto de levadura producido experimentalmente y extractos de levaduras comerciales producidos por Sigma Inc. y Bio-Serv Inc.

El análisis proximal se realizó en los laboratorios de la Unidad de Química de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador. Los resultados fueron corroborados analizando la misma muestra en el Laboratorio de Servicio de la Universidad Centroamericana "José Simeón Cañas". Como puede observarse, los niveles de proteínas del extracto producido experimentalmente (de 11.55% a 12.60% p/p) son menores que los reportados para el extracto comercial (55.64% p/p); esto puede deberse a que el método utilizado para la recuperación del extracto de levadura después de la ruptura de la pared celular probablemente no es el más adecuado (ver observación 8, pág. 78), o debido a una posible formación de complejos fosfatados insolubles entre las proteínas por el amortiguador de fosfatos utilizado como medio de suspensión, provocando pérdidas de proteínas

en estas etapas del proceso de producción. Así mismo se tienen contenidos de cenizas ligeramente elevados con respecto a los de la muestra comercial (17.0% contra 10.0%). En lo que respecta a los minerales cabe destacar la alta presencia de fósforo, debida probablemente a fósforo residual del amortiguador de fosfatos utilizado.

En el ANEXO J se presentan las características del extracto de levadura producido a partir de levadura residual de destilería reportado por Gamero et al., 1992, el cual también presentó niveles bajos de proteínas y alto contenido de cenizas, principalmente de fósforo.

El análisis de vitaminas fue realizado por el Departamento de Análisis Químico Industrial e Instrumental de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador; presentó 29 mcg de vitamina B₁ por g de extracto de levadura, y 9.75 mcg de vitamina B₆ por g de extracto de levadura. Las restantes vitaminas del complejo B no pudieron ser cuantificadas pues no se contó con el material y equipo adecuados.

Gamero et al., 1992, presentan los requisitos de calidad microbiológica para extracto de levadura; estos establecen un máximo de 10,000 unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (ufc/g) en el recuento total de bacterias aeróbicas mesófilas y Escherichia coli y Salmonelas negativos; de manera que el extracto de levadura producido en esta investigación satisface dichos requisitos, ya que presentó 165 ufc/g, en el recuento total de bacterias aeróbicas mesófilas y negativo en las pruebas de Escherichia coli y de salmonelas. Este análisis se realizó con la colaboración del Laboratorio Especialidades Microbiológicas Industriales S.A de C.V. (San Salvador). La baja presencia de bacterias se debió al cuidadoso proceso de producción realizado en las mejores condiciones higiénicas posibles en los Laboratorios de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de El Salvador.

CUADRO 6.2 ANALISIS PROXIMAL, MINERALOGICOS, VITAMINICOS Y MICROBIOLOGICOS REALIZADOS A LA CREMA DE LEVADURA DE CERVECERIA, EXTRACTO DE LEVADURA PRODUCIDO A NIVEL DE LABORATORIO Y EXTRACTOS DE LEVADURA COMERCIALES.

ANALISIS	CREMA DE LEVADURA [¶]	EXTRACTO PRODUCIDO EXPERIMENTALMENTE		EXTRACTO COMERCIAL ^{¶¶}
PROXIMAL	% p/p BASE SECA			
		1	2	Sigma Inc.
PROTEINA (N : 6.25)	36.48	12.17	11.55	55.64
EXTRACTO ETEREÓ	0.20	ND	NA	-
FIBRA CRUDA	1.53	ND	NA	-
CARBOHIDRATOS	61.53	69.46	PD	33.99
CENIZAS	1.79	17.94	17.54	10.00
HUMEDAD	60.8	8.35	6.35	3.68
MINERALES	% p/p			
CALCIO	NA	0.0516	NA	0.5038
FOSFORO	NA	6.8300	NA	2.1300
NaCl	NA	0.7300	NA	0.0000
VITAMINAS	mcg / g de extracto de levadura			
TIAMINA (B ₁)	NA	29.44		Bio-Serv Inc. 45.00
PIRIDOXINA (B ₆)	NA	9.75		30.00
MICROBIOLOGICO	ufc / g de extracto de levadura			
RECUENTO TOTAL DE BACTERIAS AEROBICAS MESOFILAS	NA	165		-
<i>Escherichia coli</i>	NA	0		-
<i>Salmonella sp</i>	NA	0		-

1 Reportado por el Laboratorio de la Facultad de Ciencias Agronómicas de La Universidad de El Salvador.

2 Reportado por el Laboratorio de Servicio de la Universidad Centroamericana "José Simeón Cañas".

NA: No Analizado.

ND: No Detectado

PD: Por Diferencia: 100 - (% Cenizas + % Fibra cruda + % Proteínas)

¶ Crema de levadura tratada y lavada de La Constancia S.A.

¶¶ Sigma Chemical Co. y Bio-Serv Inc. (Gamero et al., 1992).

Los reportes recibidos de estos análisis se presentan en el ANEXO I.

6.2.1 PRUEBA DE APLICACION DEL EXTRACTO DE LEVADURA PRODUCIDO.

Se realizó una prueba de crecimiento de Acetobacter sp. usando un medio de cultivo que contenía extracto de levadura comercial y otro con extracto de levadura producido experimentalmente.

Para esta prueba se partió de un cultivo puro de Acetobacter sp. el cual fue inoculado por duplicado inicialmente en medio inclinado de crecimiento para este microorganismo, cuya formulación se presenta en el ANEXO K (Díaz y Díaz, 1991), conteniendo extracto de levadura comercial de Sigma Inc., y al mismo tiempo en otro conteniendo extracto de levadura producido experimentalmente; después de 48 de incubación a 31 °C, se hicieron observaciones al microscopio que corroboraron el crecimiento de Acetobacter sp. en los dos tipos de medio; a partir de ellos se inocularon en caldos de los mismos medios; después de otras 48 horas de incubación se procedió a sembrar en placas Petri a partir de ambos caldos, en diluciones de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} respectivamente.

Aunque no pudo cuantificarse el número de ufc/ml crecidas en ambos medios para establecer una eficiencia de crecimiento en el medio con extracto de levadura producido experimentalmente, sí pudo confirmarse mediante observaciones microscópicas la presencia de Acetobacter sp., quedando comprobado con esto que el extracto de levadura producido en esta investigación no contiene elementos inhibidores para el crecimiento de este microorganismo, y sí contiene vitaminas del complejo B, las cuales son esenciales para su desarrollo, por lo que podría recomendarse para uso en medios de cultivo microbiológicos.

OBSERVACIONES



- 1- La levadura residual de cervecera presenta un alto contenido de CO_2 , el cual debe ser eliminado como parte de la preparación de la levadura antes de someterla a la ruptura para prevenir inconvenientes técnicos y disminución en la eficiencia del proceso, esto se logra mediante el tratamiento térmico que se aplica a la levadura antes de concentrarla y lavarla.
- 2- Aunque estaba prevista la realización de ensayos de ruptura de pared celular utilizando la enzima quitinasa, éstos no se llevaron a cabo debido a que es una enzima de costo muy elevado, pero principalmente, porque su aplicación no está aprobada para usos alimenticios, a diferencia de la papaína.
- 3- El equipo Bead Beater de Biospec Products Inc. está diseñado para trabajar a una velocidad de agitación constante de 3,450 rpm, por lo que todas las pruebas de esta investigación se realizaron a esta velocidad.
- 4- Se trabajó con un tiempo de agitación máximo de 5 minutos debido a que la literatura que acompaña al equipo Bead Beater de Biospec Products Inc. limita este parámetro a un rango de 2 a 5 minutos por razones de seguridad del equipo.
- 5- El alto contenido de cenizas en el extracto de levadura revelado por el análisis proximal puede provenir de diversos factores, entre los que está la posible contaminación por desgaste de las perlas de vidrio o por la adición de reactivos a la muestra, tales como el amortiguador de fosfatos, cloruro de sodio o residuos de las sustancias y nutrientes utilizados para la fabricación de cerveza.

- 6- El análisis microbiológico del extracto de levadura reveló un contenido de 165 ufc/g de bacterias aeróbicas mesófilas, el cual se encuentra muy por debajo del límite máximo recomendado por las normas de calidad de Bio-Serv. Inc. (menos de 10,000 ufc/g), lo cual indica que se trabajó en condiciones higiénicas adecuadas.

- 7- Para la selección del tiempo de 4 horas de pretratamiento enzimático que se aplicó a la levadura se consideraron aspectos técnicos como el riesgo de descomposición de la materia prima y la pérdida de la proteína de interés, y aspectos económicos como el consumo energético; además del grado de ruptura de la pared celular.

- 8- La crema de levadura presenta 36.48% p/p de proteína en base seca, y el extracto producido presentó un 11.55 % p/p en base seca; las pérdidas de proteína pueden deberse a diversos factores, por ejemplo: la falta de condiciones adecuadas de refrigeración puede causar la degradación de proteínas intracelulares por acción de enzimas proteolíticas propias de la levadura; en el proceso de producción propuesto no se incluye una etapa de inactivación de la enzima papaína posterior a su efecto deseado, por lo que esta misma podría actuar en etapas posteriores provocando la hidrólisis de las proteínas intracelulares recuperadas; en la separación del extracto de levadura disuelto en la fase líquida de los restos de levadura después de la ruptura puede haber pérdida de proteína soluble que quede atrapada en la fracción sólida; otra causa probable de esta pérdida es la posible formación de complejos fosfatados insolubles entre las proteínas y el amortiguador de fosfatos utilizado como medio de suspensión, por lo que el pretratamiento enzimático utilizado puede influir en la calidad del producto final.

CONCLUSIONES

- 1- Habiéndose ensayado tres tipos de tratamientos previos a la ruptura mecánica de pared celular se determinó que el mas adecuado es el tratamiento enzimático utilizando papaína, pues es el que produjo mayores porcentajes de ruptura de pared celular, aunque según la estadística sus resultados no son muy diferentes de los obtenidos con los otros tratamientos.
- 2- Se determinó que la concentración de levadura que rinde mayor grado de ruptura de pared celular es de 40 % p/v en combinación con un tiempo de agitación de 5 minutos, que es además el tiempo máximo de trabajo permitido según las especificaciones del modelo de equipo Bead Beater utilizado.
- 3- Se obtuvo un rendimiento de producción de 8.64% peso de extracto de levadura seco por peso de crema de levadura, producido a las condiciones donde se obtuvo un mayor grado de ruptura. Este rendimiento se considera aceptable en relación al 4.8 % reportado por Gamero et al., 1992 para extracto de levadura de destilería.
- 4- Las pruebas de crecimiento realizadas utilizando extracto de levadura producido a nivel de laboratorio como ingrediente enriquecedor de medios de cultivo para Acetobacter sp., demostraron que dicho extracto contiene las vitaminas del complejo B que son esenciales para el crecimiento de esta bacteria la cual es utilizada para la producción comercial de ácido acético.
- 5- El extracto de levadura que se produjo a nivel de laboratorio contiene vitaminas del complejo B; analíticamente se cuantificaron las vitaminas B₁ y B₆, siendo sus valores de 29 mcg/g y 9.75 mcg/g, respectivamente; estos resultados indican que el tratamiento térmico (10 min a 60 °C) aplicado a

las levaduras previo a la ruptura, puede no haber afectado el contenido de vitaminas en las mismas, sin embargo, por no existir un patrón con contenido de vitaminas conocido para analizar la crema de levadura utilizada como materia prima, no es posible determinar si estos niveles en el extracto son aceptables o no, pues aunque son menores que los del extracto comercial de Bio-Serv Inc., están por encima de los datos reportados por Kelly, 1983 y son mayores que la ración diaria recomendada por el Food and Nutrition Board y el National Research Council de Gran Bretaña (Cuadro 1.2).

- 6- La información obtenida respecto a la calidad microbiológica y vitamínica es insuficiente para proponer usos potenciales definitivos del extracto de levadura producido a nivel de laboratorio.
- 7- Como consecuencia de la disponibilidad de levadura residual de la etapa de fermentación en cervecería (4,110 L/día) y del rendimiento de producción de extracto de levadura con el método propuesto (8.64 gramos de extracto seco por 100 gramos de crema de levadura), sería factible producir extracto con tecnología apropiada en el país para cubrir la demanda nacional e incluso para proponer usos alternativos como fuente no tradicional de proteínas, lo cual debe determinarse mediante un posterior estudio de factibilidad técnico-económica del proceso, una vez se optimice el método en estudio con sus respectivas etapas de escalamiento.

RECOMENDACIONES

- 1- Para la producción de extracto de levadura a partir de S. uvarum residual de cervecería, es recomendable no almacenar la levadura a temperaturas mayores de 4 °C por más de una semana, sin embargo, si es necesario, puede hacerse a una temperatura de -15 °C.
- 2- Como resultado de esta investigación se determinó que es conveniente el tratamiento de la levadura residual de cervecería con la enzima papaína pues incrementa el grado de ruptura de la pared celular por método mecánico utilizando partículas abrasivas, por lo que se recomienda realizar estudios para optimizar la concentración de dicha enzima, a las condiciones óptimas de ruptura encontradas en esta investigación, aunque debe tomarse en cuenta que el uso de enzimas incrementa el costo del proceso lo cual puede ser inconveniente al llevarlo a escala industrial.
- 3- Se recomienda completar los análisis de vitaminas del complejo B sobre el extracto de levadura producido a nivel de laboratorio.
- 4- Es importante realizar un estudio más amplio sobre la utilización de este extracto de levadura como ingrediente enriquecedor de medios de cultivo, para determinar su posible aplicación en esta área.
- 5- Considerando que en El Salvador se producen grandes volúmenes de levadura residual a partir de la industria de destilerías (350,683 Kg/año, Gamero et al., 1992), se recomienda dar continuidad a esta investigación dirigiéndola a la evaluación del efecto y optimización de la concentración de levadura y tiempo de agitación en la ruptura de pared celular para la producción de extracto de levadura a partir de Saccharomyces cerevisiae residual de destilerías, así como

al escalamiento del proceso a nivel de planta piloto para Saccharomyces uvarum residual de cervecería.

- 6- Se recomienda identificar la etapa en la que se da la mayor pérdida de proteína intracelular realizando análisis de proteínas en cada una de las etapas del proceso de producción, lo cual permitirá estudiar los métodos más adecuados para su recuperación.
- 7- Es conveniente determinar si existe desgaste de las perlas de vidrio durante el proceso de agitación mediante un análisis de sílice de las cenizas del producto recuperado.
- 8- Para garantizar una mejor recuperación de la fracción soluble que contiene al extracto de levadura, una vez realizada la ruptura de células, es recomendable incrementar la velocidad en el proceso de centrifugación, por encima de 2,000 rpm con esto podría disminuirse la pérdida de proteínas solubles que queden retenidas con los restos de pared celular.
- 9- Para determinar la factibilidad de uso para consumo humano del extracto de levadura producido en esta investigación, se sugiere la realización de pruebas toxicológicas y nutricionales.
- 10- Al no resultar estadísticamente diferentes los pretratamientos aplicados a la crema de levadura en el grado de ruptura obtenido del proceso, sería conveniente realizar pruebas de ruptura de pared celular sin hacer uso de pretratamiento con enzimas con la finalidad, en primer lugar, de comparar la calidad del producto así obtenido con la del que se obtuvo en esta investigación; con lo cual se estaría determinando también si el método enzimático es el que produjo los resultados de bajo contenido de proteínas en el extracto.

REFERENCIAS

- BATEMAN, J.V. (1970). "NUTRICION ANIMAL. MANUAL DE METODOS ANALITICOS". Primera Edición en Español. Herrero Hnos., Sucesores S.A. México.
- BERMUDEZ, M.A. (1994). Entrevista Personal. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de El Salvador.
- BIOSPEC PRODUCTS. (1981). "OPERATING INSTRUCTIONS FOR THE BEAD BEATER CELL DISRUPTER". Bartlesville, Ok., USA.
- BIOSPEC PRODUCTS. (1992). "OPERATING INSTRUCTIONS FOR THE BEAD BEATER CELL DISRUPTER". Bartlesville, Ok., USA.
- BJURSTROM, E.E (1985). "BIOTECHNOLOGY. FERMENTATION AND DOWNSTREAM PROCESSING". Chemical Engineering Magazine. Vol.92. pags. 126 to 158. USA.
- BORLAND INTERNATIONAL INC. (1987). "EUREKA: THE SOLVER". California, USA.
- BURTON, B. T. (1969). "NUTRICION HUMANA: UN TRATADO COMPLETO SOBRE NUTRICION". Organización Panamericana de la Salud. Washington, USA.
- CHISTI, Y. and MOO-YOUNG, M. (1986). "DISRUPTION OF MICROBIAL CELLS FOR INTRACELLULAR PRODUCTS". Enzyme Microbiology Technology. Vol. 8. Pags. 194 to 204. USA.
- DEUTSCHER, M. P. (1986). "EXTRACT PREPARATION AND FRACTIONATION". Guide to protein Purification. Methods in Enzymology. Vol. 182. Pags. 162 and 163. USA.

DIAZ, A.C. y DIAZ, M.G. (1991). "PRODUCCION DE ACIDO ACETICO A PARTIR DE ALCOHOL ETILICO INDUSTRIAL". Trabajo de Graduación para Optar al Título de Ingeniero Químico. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Universidad de El Salvador.

Dirección General de Estadística y Censos. "ANUARIOS DE EXPORTACION. TARIFA-PAIS". 1987 a 1991.

FAO (1982). "MANUALES PARA CONTROL DE CALIDAD DE LOS ALIMENTOS: ANALISIS MICROBIOLOGICO". Editados por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia.

FLORES, D. de C.; MARTINEZ, M.L. y ORTIZ, R.G.(1992). "ELIMINACION DE HIERRO Y MANGANESO EN AGUA NATURAL POR MEDIO DE AIREACION Y RETENCION CON LAVA VOLCANICA". Trabajo de Graduación para Optar al Título de Ingeniero Químico. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Universidad de El Salvador.

FUNDACION NATURA (1991). "POTENCIAL IMPACTO AMBIENTAL DE LAS INDUSTRIAS EN EL ECUADOR, EXPLORACION PRELIMINAR Y SOLUCIONES". Quito, Ecuador.

GACESA, P. and HUBBLE, J. (1987). "ENZYME TECHNOLOGY". First Edition. Open University Press Taylor & Francis. N.Y., USA.

GAMERO, E.S.; MENDOZA, L.E. y RODAS, R.A. (1992). "PRODUCCION DE EXTRACTO DE LEVADURA A PARTIR DE *Saccharomyces cerevisiae* RESIDUAL DE LAS FERMENTACIONES ALCOHOLICAS". Trabajo de Graduación para Optar al Título de Ingeniero Químico. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Universidad de El Salvador.

- JANDEL SCIENTIFIC TABLECURVE. (1992). AISN Software para Aplicaciones Estadísticas. USA.
- KELLY, H. (1983). "THE APPLICATION OF ENZYME IN INDUSTRY". Industrial Enzymology. T. Godfrey and J. Reichelt, Editors. The Nature Press, N.Y., USA.
- LA BELL, F. (1992). "YEAST EXTRACT ENHANCES CHEESE, SAVORY FLAVORS". A Publication of Food Processing. Vol. 65. No.8 Pag. 65. USA.
- MOO-YOUNG, M. and Gregory, K.F. (1986). "MICROBIAL BIOMASS PROTEIN". First Edition. Elsevier Applied Science Publishers Ltd. London, England.
- PEPPLER, H.J. (1970). "THE YEASTS". Yeast Technology. A.H. Rose and J.S. Harrison, Editors. Academic Press. London, England.
- PYKE, M. (1970). "EL HOMBRE Y SU ALIMENTACION, INTRODUCCION A LA BROMATOLOGIA". Ediciones Guadarrama. Madrid, España.
- REED, G. and PEPPLER, H.J. (1973). "YEAST TECHNOLOGY". The AVI Publishing Co., Inc. Westport Conn., USA.
- REYES de SERPAS, S.Y.(1994). Entrevista Personal, Dpto. de Control de Calidad, Sección Microbiología, La Constancia S.A., San Salvador, El Salvador.
- SCHAFER, D. (1989). "CUADERNO DE CATEDRA DE LA ASIGNATURA 'STATISTICS METHODS FOR RESEARCH WORKERS'". Statistics Department, Oregon State University. Oregon, USA.
- SEGURA, V.M. (1991). "CURSO DE DISEÑO EXPERIMENTAL". Capítulo I. Universidad de El Salvador.

- SEGURA LEMUS, V.M. (1994). Entrevista Personal. Escuela de Ingeniería Química, Universidad de El Salvador.
- STATISTICAL GRAPHICS CORPORATION (1987). "STATGRAPHICS", V.2.6. Software para Aplicaciones Estadísticas. USA.
- STROBECKER, R. y HENNING, H.M. (1967). "ANÁLISIS DE VITAMINAS. METODOS COMPROBADOS". Editorial Paz Montalvo, Madrid, España.
- VARGAS, C. (1993). Entrevista Personal, Instituto Centroamericano de Investigaciones y Tecnología Industrial (ICAITI), San Salvador, El Salvador.
- WATANABE, T; OYANAG, W.; SUZUKI, K. and TANAKA, H. (1990). "CHITINASE SYSTEM OF Bacillus circulans WL-12 AND IMPORTANCE OF CHITINASE A1 IN CHITIN DEGRADATION". Journal of Bacteriology. American Society for Microbiology. Vol. 172, No.7 Pags. 4017 to 4022.
- WHITAKER, J.R. (1972). "PRINCIPLES OF ENZYMOLOGY FOR THE FOOD SCIENCES". Marcel Dekker, Inc. N.Y., USA.

A N E X O S

ANEXO A

RACIONES DIETETICAS DIARIAS RECOMENDADAS PARA
EL SER HUMANO Y REQUERIMIENTOS DE CALIDAD PARA
EL EXTRACTO DE LEVADURA COMERCIAL

CUADRO A.1 RACIONES DIETETICAS DIARIAS PARA MANTENER UN BUEN ESTADO DE SALUD EN EL SER HUMANO (BURTON, 1969).

Calculadas para mantener el buen estado de nutrición de prácticamente todas las personas sanas en los Estados Unidos.

Edad ^a años	Peso		Estatura		Kilocalorías	Proteínas gm	Vitaminas liposolubles			Vitaminas hidrosolubles						Minerales					
	kg	lb	cm	in			Actividad de vitamina A U.I.	Vitamina D U.I.	Actividad de vitamina E U.I.	Acido ascórbico mg	Folacina mg	Niacina equiv mg	Riboflavina mg	Tiamina mg	Vitamina B ₆ mg	Vitamina B ₁₂ µg	Calcio g	Fósforo g	Yodo µg	Hierro mg	Magnesio mg
Lactantes	0-½	4 9	55 22		kg×120	kg×2,2 ^c	1.500	400	5	35	0,05	5	0,4	0,2	0,2	1,0	0,4	0,2	25	6	40
	½-1½	7 15	63 25		kg×110	kg×2,0 ^e	1.500	400	5	35	0,05	7	0,5	0,4	0,3	1,5	0,5	0,4	40	10	60
Niños	½-1	9 20	72 28		kg×100	kg×1,8 ^e	1.500	400	5	35	0,1	8	0,6	0,5	0,4	2,0	0,6	0,5	45	15	70
	1-2	12 26	81 32		1.100	25	2.000	400	10	40	0,1	8	0,6	0,6	0,5	2,0	0,7	0,7	55	15	100
	2-3	14 31	91 36		1.250	25	2.000	400	10	40	0,2	8	0,7	0,6	0,6	2,5	0,8	0,8	60	15	150
	3-4	16 35	100 39		1.400	30	2.500	400	10	40	0,2	9	0,8	0,7	0,7	3	0,8	0,8	70	10	200
	4-6	19 42	110 43		1.600	30	2.500	400	10	40	0,2	11	0,9	0,8	0,9	4	0,8	0,8	80	10	200
	6-8	23 51	121 48		2.000	35	3.500	400	15	40	0,2	13	1,1	1,0	1,0	4	0,9	0,9	100	10	250
Hombres	8-10	28 62	131 52		2.200	40	3.500	400	15	40	0,3	15	1,2	1,1	1,2	5	1,0	1,0	110	10	250
	10-12	35 77	140 55		2.500	45	4.500	400	20	40	0,4	17	1,3	1,3	1,4	5	1,2	1,2	125	10	300
	12-14	43 95	151 59		2.700	50	5.000	400	20	45	0,4	18	1,4	1,4	1,6	5	1,4	1,4	135	18	350
	14-18	59 130	170 67		3.000	60	5.000	400	25	55	0,4	20	1,5	1,5	1,8	5	1,4	1,4	150	18	400
	18-22	67 147	175 69		2.800	60	5.000	400	30	60	0,4	18	1,6	1,4	2,0	5	0,8	0,8	140	10	400
	22-35	70 154	175 69		2.800	65	5.000	—	30	60	0,4	18	1,7	1,4	2,0	5	0,8	0,8	140	10	350
	35-55	70 154	173 68		2.600	65	5.000	—	30	60	0,4	17	1,7	1,3	2,0	5	0,8	0,8	125	10	350
Mujeres	55-75+	70 154	171 67		2.400	65	5.000	—	30	60	0,4	14	1,7	1,2	2,0	6	0,8	0,8	110	10	350
	10-12	35 77	142 56		2.250	50	4.500	400	20	40	0,4	15	1,3	1,1	1,4	5	1,2	1,2	110	18	300
	12-14	44 97	154 61		2.300	50	5.000	400	20	45	0,4	15	1,4	1,2	1,6	5	1,3	1,3	115	18	350
	14-16	52 114	157 62		2.400	55	5.000	400	25	50	0,4	16	1,4	1,2	1,8	5	1,3	1,3	120	18	350
	16-18	54 119	160 63		2.300	55	5.000	400	25	50	0,4	15	1,5	1,2	2,0	5	1,3	1,3	115	18	350
	18-22	58 128	163 64		2.000	55	5.000	400	25	55	0,4	13	1,5	1,0	2,0	5	0,8	0,8	100	18	350
	22-35	58 128	163 64		2.000	55	5.000	—	25	55	0,4	13	1,5	1,0	2,0	5	0,8	0,8	100	18	300
	35-55	58 128	160 63		1.850	55	5.000	—	25	55	0,4	13	1,5	1,0	2,0	5	0,8	0,8	90	18	300
Embarazadas	55-75+	58 128	157 62		1.700	55	5.000	—	25	55	0,4	13	1,5	1,0	2,0	5	0,8	0,8	80	10	300
En lactación					1.200	65	6.000	400	30	60	0,8	15	1,8	1,0	2,0	6	0,8	0,8	80	10	300
					1.000	75	8.000	400	30	60	0,5	20	2,0	1,0	2,5	6	1,0	1,0	125	18	450

^a Se han calculado las raciones para cubrir variaciones individuales en la mayoría de las personas normales habituales del ambiente. Las raciones recomendadas pueden obtenerse con muy diversos alimentos comunes y bien definidos los requerimientos del ser humano. Véase el texto para mayores detalles respecto a raciones y nutrientes no tabulados.

^b Las cifras de las líneas correspondientes al grupo de edades de 22 a 35 años corresponden a la edad de 22 años. Todas las demás cifras representan raciones correspondientes al punto medio de los grupos de edades especificadas.

^c Las raciones de folacina se refieren a fuentes dietéticas determinadas por experimentos con *Lactobacillus casei*. Las formas puras de folacina pueden ser eficaces en dosis de menos de un cuarto de las raciones diarias recomendadas.

^d Los equivalentes de niacina comprenden fuentes dietéticas de la vitamina preformada y de su precursor, el triptófano; 60 mg de triptófano equivalen a 1 mg de niacina.

^e Asume el equivalente proteínico de la leche humana. Para proteínas no utilizadas en un 100% los factores señalados deben aumentarse proporcionalmente.

CUADRO A.2 CONTENIDO DE VITAMINAS Y AMINOACIDOS REQUERIDOS PARA EL EXTRACTO DE LEVADURA COMERCIAL DE BIOSERV INC. (GAMERO et al., 1992).

COMPONENTES	CONTENIDO
Nitrógeno Proteico	% p/p
Proteína (Nx6.25)	60.0
Nitrógeno total	8.8
Nitrógeno amínico	4.2
Razón de nitrógeno amínico a nitrógeno total	48.0
Aminoácidos (% en la proteína)	% p/p
Alanina	7.3
Arginina	6.3
Histidina	2.5
Isoleucina	4.5
Leucina	6.8
Lisina	7.5
Metionina	1.7
Fenilalanina	4.2
Prolina	4.8
Serina	4.8
Treonina	4.5
Triptofano	1.0
Tirosina	3.5
Valina	5.5

CUADRO A.3 CONTENIDO DE VITAMINAS Y NUTRIENTES MENORES
REQUERIDOS PARA EL EXTRACTO DE LEVADURA DE
BIO-SERV INC. (GAMERO et al., 1992).

COMPONENTES	CONCENTRACION
Vitaminas	(Microgramo/gramo)
Tiamina (B ₁)	45
Riboflavina (B ₂)	60
Niacina	350
Piridoxina (B ₆)	30
Acido pantoténico	170
Acido fólico	11
Biotín	3
Colina	2,000
Inositol	1,400
Nutrientes menores	(% p/p)
Sodio	0.13000
Cloruros	0.85000
Potasio	3.24000
Calcio	0.07000
Magnesio	0.28000
Cobre	0.00016
Hierro	0.00103
Zinc	0.00430

ANEXO B

IMPLICACIONES LEGALES EN EL USO DE ENZIMAS

B.1 IMPLICACIONES LEGALES EN EL USO DE ENZIMAS.

Identificados los peligros potenciales asociados con el uso y producción de enzimas, es necesario conocer las disposiciones generales que se han tomado para controlar su uso. Se hará referencia a la posición de Gran Bretaña, aunque hay otros países que tienen leyes similares.

En 1982, la Oficina de Papeleo de Su Majestad (HMSO) en Gran Bretaña, publicó el reporte "Reseña de la Preparación de Enzimas" por el Comité de Aditivos y Contaminantes de alimentos del Ministerio de Agricultura, Pescadería y Alimentos. En este reporte las enzimas fueron clasificadas en cinco grupos dependiendo de su conveniencia para uso en la industria de alimentos tomando en cuenta los diferentes tipos de toxicidad (Gacesa y Hubbe, 1987).

Grupo A: Sustancias que la evidencia disponible sugiere que son aceptables para el uso en alimentos.

Grupo B: Sustancias que sobre la evidencia disponible pueden considerarse provisionalmente aceptables para el uso en alimentos, pero de las que debe hacerse disponible mayor información dentro de un tiempo especificado para revisión.

Grupo C: Sustancias para las cuales la evidencia disponible sugiere toxicidad y que no debe ser permitido usarlas en alimentos hasta que se presente evidencia adecuada de su seguridad para establecer su aceptabilidad.

Grupo D: Sustancias para las que la información disponible indica toxicidad definida o probable y que no debe ser permitido usarlas en alimentos.

Grupo E: Sustancias para las que existe disponible información inadecuada o no toxicológica y de las que no es posible expresar una opinión para su aceptabilidad de uso en alimentos.

ANEXO C

CONTEO DE CELULAS EN CAMARA NEUBAUER

C.1 CONTEO EN CAMARA NEUBAUER

La cámara Neubauer se utilizó para realizar los conteos antes (M1) y después (M2) del proceso de ruptura de la pared celular. Mediante ensayos logró determinarse que era necesario preparar diluciones sucesivas de cada muestra hasta llevarlas a la dilución 1:1000 ó 10^{-3} para facilitar y hacer más confiable su conteo en la cámara. Las muestras diluidas fueron coloreadas con rodamina para hacer más fácil su observación al microscopio. El llenado de las cámaras se realizó utilizando micropipetas las cuales deben llenarse siempre hasta el mismo nivel, teniendo el cuidado de utilizar una pipeta diferente para el llenado de la cámara o bien, en el caso de utilizar una misma pipeta, ésta debe lavarse adecuadamente. Lo anterior para evitar que células del llenado anterior queden adheridas a las paredes y posteriormente sean fuentes de error.

Cada cámara está constituida por dos cuadrículas; después de llenar la cámara se procedió a realizar el conteo tomando en cuenta los siguientes criterios:

Para los casos de concentraciones celulares bajas, una diferencia mayor de 10 células entre los conteos realizados en la cuadrícula 1 y en la cuadrícula 2, de la cámara Neubauer implica una repetición en el llenado y conteo de la cámara, la figura C.1, muestra la posición de las cuadrículas en la cámara antes mencionada y la figura C.2, el proceso de dilución.

Si el promedio entre los conteos de la cuadrícula 1 y la cuadrícula 2 da una cifra decimal de 0.5 o arriba de este valor se aproximará al entero superior, por ejemplo:

Conteo realizado en la cuadrícula 1 = 66 células

Conteo realizado en la cuadrícula 2 = 67 células

Promedio = $(66 + 67) / 2 = 66.5$

= 67

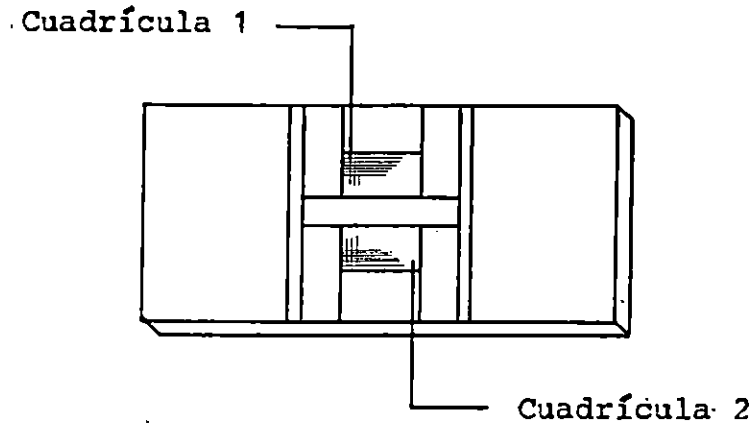


FIGURA C.1 DISPOSICION DE LAS CUADRICULAS EN LA CAMARA NEUBAUER.

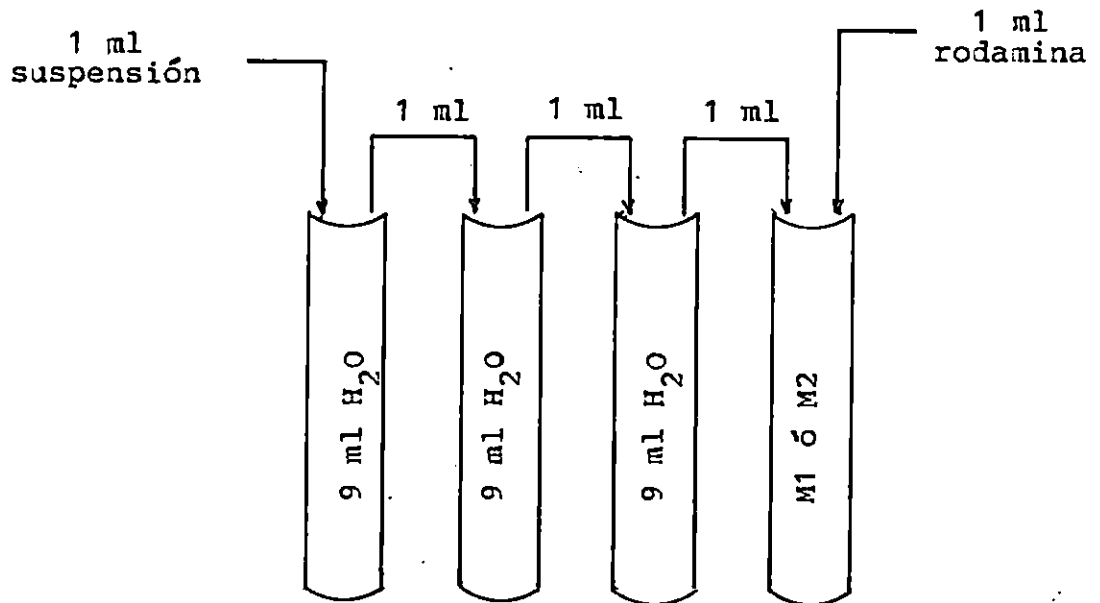


FIGURA C.2 PROCESO DE DILUCION DE LAS MUESTRAS.

Después de cada conteo deben lavarse las cámaras con agua destilada y secarse con cuidado para evitar dañarlas. El porcentaje de ruptura se obtiene utilizando la ecuación 3.1.

C.2 ELIMINACION DE DATOS.

El primer criterio utilizado para verificar que se han realizado los conteos en forma adecuada, se basa en que la diferencia entre el conteo de las cuadrículas 1 y 2 de la cámara Neubauer no debe exceder un valor de 10, esto para concentraciones de levadura inferiores a 50% p/v, para valores de concentración de levadura superiores al 50% p/v se hace más difícil el obtener una diferencia tan baja, puesto que el número de células en las cuadrícula aumenta considerablemente, por lo que se optó por seleccionar los datos que presentaran la menor diferencia entre los conteos de las cuadrículas 1 y 2, un ejemplo de eliminación de datos se presenta a continuación:

Tipo de muestra: Levadura de cervecería con amortiguador a 32.84 % p/v.

Conteo de las células antes del proceso de ruptura:

No. de conteo	Cuadrícula 1	Cuadrícula 2	Promedio
1	117	127	122.0
2	121	120	120.5
3	68	167	Eliminado
4	120	128	124.0

$$\begin{aligned}
 \text{Promedio 1} &= (122 + 121 + 124) / 3 \\
 &= 122.33 \\
 &= 122
 \end{aligned}$$

Conteo de células después del proceso de ruptura:

No. de conteo	Cuadrícula 1	Cuadrícula 2	Promedio
1	30	42	Eliminado
2	22	23	22.5
3	10	22	Eliminado
4	23	25	24.0
5	25	28	26.5

$$\begin{aligned} \text{Promedio 2} &= (23 + 24 + 27) / 3 \\ &= 24.67 \\ &= 25 \end{aligned}$$

Con EC. 5.1:

$$\% \text{ de ruptura} = \frac{122 - 25}{122} \times 100 = 79.51$$

122

Cuando se ha realizado un mínimo de tres rupturas correspondientes a un mismo lote de crema de levadura, se procede a realizar el primer rechazo de resultados utilizando el criterio del rango y/o el de la desviación típica, la máxima desviación típica permitida en este caso será de 4, si un grupo de datos excede este valor deberá eliminarse el dato que presente mayor desviación respecto al valor medio.

Resultados obtenidos:

$$\% R1 = 79.51$$

$$\% R2 = 80.10$$

$$\% R3 = 60.50$$

$$\text{Desviación típica} = 11.15$$

$$\% \text{ de ruptura promedio} = 73.37$$

Las diferencias entre el % de ruptura promedio y los valores observados son los siguientes:

$$\% R - \% R1 = 73.37 - 79.51 = |-6.14| = 6.13$$

$$\% R - \% R2 = 73.37 - 80.10 = |-6.73| = 6.73$$

$$\% R - \% R3 = 73.37 - 60.50 = 12.87$$

Al observar los valores absolutos de las diferencias, el dato que debe eliminarse es el de 60.50%, por lo que debe realizarse una nueva ruptura para sustituir el dato anterior.

$$\% R4 = 81.5$$

Con este valor la desviación típica reportada es de 1.0221, lo cual nos permite aceptar el resultado. Siempre debe procurarse que la desviación típica sea lo menor posible.

La cantidad de células de levadura por ml de suspensión puede encontrarse utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{No. de células/ml} = (X \times CT \times VC \times DI) / CC \quad (\text{EC. C.1})$$

Donde:

X = Número de células contadas

CC= Número de cuadros contados

CT= Total de cuadros en la cuadrícula

VC= Volumen de cuadrícula

DI= Dilución utilizada

El número de células de levadura por ml de suspensión para una concentración del 40% p/v puede calcularse de la siguiente manera:

Número de conteo	Promedio de células	Células / ml x 10 ⁻⁹
1	178	1.78
2	180	1.80
3	179	1.79
4	236	2.36
5	164	1.64
6	170	1.70
7	180	1.80
8	226	2.26
9	161	1.61
10	164	1.64

$\bar{X} = 1.838 \times 10^9$ células de levadura / ml de suspensión.

ANEXO D

RESULTADOS DE ANALISIS ESTADISTICO DE LOS
DATOS EXPERIMENTALES APLICANDO STATGRAPHICS V.2.6

CUADRO D.1 ANALISIS DE VARIANZA PARA LOS TIPOS DE
PRETRATAMIENTO (DATOS DEL CUADRO 5.2)

Analisis de Varianza para el % de ruptura

Fuente de variacion	Suma de Cuadrados	grados de libertad	Cuadrado Medio	Fc	Ft	Nivel de Signif.
VARIABLES	94.532533	4	23.633133	3.439		0.1294
tratamiento	86.411267	2	43.205633	6.287	6.940	0.0582
repeticion	8.121267	2	4.060633	0.591	6.940	0.5959
RESIDUAL	27.497467	4	6.871867			
TOTAL (CORR.)	122.02000	8				

0 valores ausentes han sido excluidos

Analisis de rango multiple para % de ruptura por tratamiento

Metodo: Intervalos HSD para Tukey al 95%

Nivel	No. de Observaciones	Promedio	Grupos Homogeneos
2	3	77.566667	*
1	3	81.960000	*
3	3	85.123333	*

Analisis de rango multiple para % de ruptura por repeticion

Metodo: Intervalos HSD para Tukey al 95%

Nivel	No. de Observaciones	Promedio	Grupos Homogeneos
B	3	80.206667	*
A	3	82.210000	*
C	3	82.233333	*

Tabla de medias para el % de ruptura

Nivel	Numero de Observac.	Promedio	Error Stnd. (interno)	Error Stnd. (conjunto)	95 % de Confiabilidad para la media
tratamiento					
1	3	81.960000	1.9527502	1.5134802	77.756415 86.163585
2	3	77.566667	1.3933453	1.5134802	73.363082 81.770252
3	3	85.123333	0.4244343	1.5134802	80.919748 89.326918
repeticion					
A	3	82.210000	1.8207416	1.5134802	78.006415 86.413585
B	3	80.206667	2.2483352	1.5134802	76.003082 84.410252
C	3	82.233333	3.2577617	1.5134802	78.029748 86.436918
Total	9	81.550000	0.8738082	0.8738082	79.123059 83.976941

CUADRO D.2 ANALISIS DE VARIANZA PARA LOS TIEMPOS
DE PRETRATAMIENTO (DATOS DEL CUADRO 5.3)

Analisis de Varianza para el % de ruptura

Fuente de variacion	Suma de Cuadrados	grados de libertad	Cuadrado Medio	Fc	Ft	Nivel de Signif.
VARIABLES	92.459517	7	13.208502	9.611		0.0010
tiempo	91.435917	5	18.287183	13.307	3.330	0.0004
repeticion	1.023600	2	0.511800	0.372	4.100	0.6982
RESIDUAL	13.742733	10	1.3742733			
TOTAL (CORR.)	106.20225	17				

0 valores ausentes han sido excluidos

Analisis de rango multiple para % de ruptura por tiempo

Metodo: Intervalos HSD para Tukey al 95%			
Nivel	No. de Observaciones	Promedio	Grupos Homogeneos
2	3	77.453333	*
8	3	80.233333	**
16	3	80.570000	**
4	3	80.883333	**
12	3	81.366667	*
24	3	85.123333	*

Analisis de rango multiple para % de ruptura por repeticion.

Metodo: Intervalos HSD para Tukey al 95%			
Nivel	No. de Observaciones	Promedio	Grupos Homogeneos
1	6	80.668333	*
2	6	80.898333	*
3	6	81.248333	*

Continuación

CUADRO D.2 ANALISIS DE VARIANZA PARA LOS TIEMPOS DE
PRETRATAMIENTO (DATOS DEL CUADRO 5.3)

Tabla de medias para el % de ruptura

Nivel	Numero de Observac.	Promedio	Error Stnd. (interno)	Error Stnd. (conjunto)	95 % de Confiabilidad para la media	
tiempo						
2	3	77.453333	0.3154010	0.6768243	75.944873	78.961794
4	3	80.883333	0.1770436	0.6768243	79.374873	82.391794
8	3	80.233333	0.4503826	0.6768243	78.724873	81.741794
12	3	81.366667	1.2195673	0.6768243	79.858206	82.875127
16	3	80.570000	0.6781593	0.6768243	79.061539	82.078461
24	3	85.123333	0.4244343	0.6768243	83.614873	86.631794
repeticion						
1	6	80.668333	1.2049797	0.4785870	79.601691	81.734976
2	6	80.898333	0.9969300	0.4785870	79.831691	81.964976
3	6	81.248333	1.0296162	0.4785870	80.181691	82.314976
Total	18	80.938333	0.2763124	0.2763124	80.322507	81.554160

CUADRO D.3 ANALISIS DE VARIANZA PARA LA OPTIMIZACION
DE LA CONCENTRACION DE LEVADURA Y EL TIEM-
PO DE AGITACION (DATOS DEL CUADRO 5.4)

Análisis de Varianza para el % de ruptura

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	grados de libertad	Cuadrado Medio	Fc	Ft	Nivel de Signif.
VARIABLES	4769.4853	6	794.9142	446.346		0.0000
tiempo	2656.8612	2	1328.4306	745.917	3.320	0.0000
concentracion	2112.6240	4	528.1560	296.561	2.690	0.0000
INTERACCIONES	197.69110	8	24.711388	13.876		0.0000
2 factores:						
tiempo y concentracion	197.69110	8	24.711388	13.876	2.270	0.0000
RESIDUAL	53.428067	30	1.780936			
TOTAL (CORR.)	5020.6044	44				

0 valores ausentes han sido excluidos

Análisis de rango múltiple para % de ruptura por tiempo

Metodo: Intervalos HSD para Tukey al 95%

Nivel	No. de Observaciones	Promedio	Grupos Homogeneos
3	15	63.399333	*
4	15	71.086667	*
5	15	82.121333	*

Análisis de rango múltiple para % de ruptura por concentracion

Metodo: Intervalos HSD para Tukey al 95%

Nivel	No. de Observaciones	Promedio	Grupos Homogeneos
70	9	60.515556	*
60	9	69.160000	*
50	9	75.161111	*
30	9	75.756667	*
40	9	80.418889	*

Continuación

CUADRO D.3 ANALISIS DE VARIANZA PARA LA OPTIMIZACION
DE LA CONCENTRACION DE LEVADURA Y EL TIEM-
PO DE AGITACION (DATOS DEL CUADRO 5.4)

Tabla de medias para el % de ruptura

Nivel	Numero de Observac.	Promedio	Error Std. (interno)	Error Std. (conjunto)	95 % de Confiabilidad para la media		
tiempo							
3	15	63.399333	1.8412575	0.3445708	62.695461	64.103206	
4	15	71.086667	1.9129498	0.3445708	70.382794	71.790539	
5	15	82.121333	2.0509301	0.3445708	81.417461	82.825206	
concentracion							
30	9	75.756667	2.8081528	0.4448390	74.847971	76.665362	
40	9	80.418889	3.6002170	0.4448390	79.510193	81.327584	
50	9	75.161111	2.4937758	0.4448390	74.252416	76.069807	
60	9	69.160000	2.1887617	0.4448390	68.251305	70.068695	
70	9	60.515556	2.9209136	0.4448390	59.606860	61.424251	
ti. por conc.							
3	30	3	66.090000	0.2905168	0.7704837	64.516093	67.663907
3	40	3	67.563333	0.4772258	0.7704837	65.989427	69.137240
3	50	3	69.473333	0.1867559	0.7704837	67.899427	71.047240
3	60	3	63.620000	0.8926926	0.7704837	62.046093	65.193907
3	70	3	50.250000	0.5488473	0.7704837	48.676093	51.823907
4	30	3	75.780000	0.2884441	0.7704837	74.206093	77.353907
4	40	3	81.293333	0.5385268	0.7704837	79.719427	82.867240
4	50	3	71.026667	1.2033333	0.7704837	69.452760	72.600573
4	60	3	66.450000	0.3803945	0.7704837	64.876093	68.023907
4	70	3	60.883333	0.4532230	0.7704837	59.309427	62.457240
5	30	3	85.400000	1.1142860	0.7704837	83.826093	86.973907
5	40	3	92.400000	0.4821825	0.7704837	90.826093	93.973907
5	50	3	84.983333	0.4288097	0.7704837	83.409427	86.557240
5	60	3	77.410000	1.8701426	0.7704837	75.836093	78.983907
5	70	3	70.413333	0.3643411	0.7704837	68.839427	71.987240
Total	45	72.202444	0.1989380	0.1989380	71.796064	72.608825	

CUADRO D.4 ANALISIS DE VARIANZA PARA LA OPTIMIZACION
DE LA CONCENTRACION DE LEVADURA CON 5 min
DE AGITACION (DATOS DEL CUADRO 5.5)

Analisis de Varianza para el % de ruptura

Fuente de variacion	Suma de Cuadrados	grados de libertad	Cuadrado Medio	Fc	Ft	Nivel de Signif.
VARIABLES	1008.9827	9	112.10918	38.621		0.0000
repeticion	6.8101	3	2.27004	0.782	3.340	0.5235
porciento	936.6575	6	156.10959	53.778	2.850	0.0000
RESIDUAL	40.639740	14	2.9028386			
TOTAL (CORR.)	1049.6224	23				

0 valores ausentes han sido excluidos

Analisis de rango multiple para % de ruptura por repeticion

Metodo: Intervalos HSD para Tukey al 95%			
Nivel	No. de Observaciones	Promedio	Grupos Homogeneos
2	7	82.805714	*
1	7	82.837143	*
3	7	84.027143	*
4	3	88.220000	*

Analisis de rango multiple para % de ruptura por concentracion

Metodo: Intervalos HSD para Tukey al 95%			
Nivel	No. de Observaciones	Promedio	Grupos Homogeneos
70	3	70.413333	*
60	3	77.410000	*
50	3	84.983333	*
45	4	85.067500	*
30	3	95.396667	*
35	4	87.262500	*
40	4	92.105000	*

Continuación

CUADRO D.4 ANALISIS DE VARIANZA PARA LA OPTIMIZACION
DE LA CONCENTRACION DE LEVADURA CON 5 min
DE AGITACION (DATOS DEL CUADRO 5.5)

Tabla de medias para el % de ruptura

Nivel	Numero de Observac.	Promedio	Error Std. (interno)	Error Std. (conjunto)	95 % de Confiabilidad para la media	
repeticion						
1	7	82.837143	2.4455876	0.6439652	81.455626	84.218659
2	7	82.805714	2.9321874	0.6439652	81.424198	84.187231
3	7	84.027143	2.8418402	0.6439652	82.645626	85.408659
4	3	88.220000	2.0736763	0.9836732	86.109698	90.330302
porciento						
30	3	85.396667	1.1111906	0.9836732	83.286365	87.506968
35	4	87.262500	0.8304856	0.8518859	85.434925	89.090075
40	4	92.105000	0.4508603	0.8518859	90.277425	93.932575
45	4	85.067500	0.7326479	0.8518859	83.239925	86.895075
50	3	84.983333	0.4288097	0.9836732	82.873032	87.093635
60	3	77.410000	1.8701426	0.9836732	75.299698	79.520302
70	3	70.413333	0.3643411	0.9836732	68.303032	72.523635
Total	24	83.847917	0.3477810	0.3477810	83.101812	84.594021

CUADRO D.5 VALORES F_t PARA 95 % DE NIVEL DE CONFIANZA
(SEGURA, 1991).

	GRADOS DE LIBERTAD DEL NUMERADOR								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77
6	5.92	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27
27	4.21	3.35	2.95	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21
40	4.09	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.09	2.02	1.96
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88

GRADOS DE LIBERTAD DEL DENOMINADOR

CUADRO D.6 RESUMEN DE REACTIVOS PARA TRATAMIENTO ENZIMATICO

% p/v	Crema de levadura (g)	Papaína (g) 0.04% p/p	Isopropanol (ml) 0.5 % v/v	Cloruro de sodio (g) 3.5 g/L
30.0	99.00	0.0396	1.65	1.1550
35.0	115.50	0.0462	1.65	1.1550
37.5	123.75	0.0495	1.65	1.1550
40.0	132.00	0.0528	1.65	1.1550
42.5	140.25	0.0561	1.65	1.1550
45.0	148.50	0.0594	1.65	1.1550
50.0	165.00	0.0660	1.65	1.1550
60.0	198.00	0.0792	1.65	1.1550
70.0	231.00	0.0924	1.65	1.1550

En todos los casos se agregará amortiguador de fosfatos de pH 6.2 hasta completar 330 ml de suspensión.

Por ejemplo, para una concentración de levadura de 50% p/v los reactivos a utilizar se calculan de la siguiente manera:

- Crema de levadura:

$$\frac{\text{g de crema de levadura}}{330 \text{ ml de solución final}} \times 100 = 50\% \text{ p/v}$$

$$\text{g de crema de levadura} = 165 \text{ g}$$

- Enzima papaína:

$$\frac{\text{g de papaína}}{165 \text{ g de crema de levadura}} \times 100 = 0.04\% \text{ p/p}$$

$$\text{g de papaína} = 0.0660 \text{ g}$$

- Isopropanol:

$$\frac{\text{ml de isopropanol}}{330 \text{ ml de solución final}} \times 100 = 0.5\% \text{ v/v}$$

$$\text{ml de isopropanol} = 1.65 \text{ ml}$$

- Cloruro de sodio:

$$\frac{\text{g de NaCl}}{330 \text{ ml de solución final}} \times 100 = 3.5 \text{ g/L}$$

$$\text{g de NaCl} = 1.15 \text{ g}$$

- Amortiguador de fosfatos pH 6.2: ml necesarios para completar
330 ml de solución final.

ANEXO E

DETERMINACION DE LAS ECUACIONES DE REGRESION PARA LA
EVALUACION DEL GRADO DE RUPTURA DE LA PARED CELULAR
DE Saccharomyces uvarum RESIDUAL DE CERVECERIA
EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE LEVADURA Y EL
TIEMPO DE AGITACION A VELOCIDAD CONSTANTE
APLICANDO EL PROGRAMA STATGRAPHICS V.2.6

CUADRO E.1 RESULTADOS DEL MODELO DE AJUSTE No.1*
PARA EL PORCENTAJE DE RUPTURA.

Variable independiente	coeficiente	error std.	valor-t	nivel sig.
EXP c	-7.59632E-30	2.9514E-30	-2.5738	0.0244
c	0.233685	0.172305	1.3562	0.2000
t	15.815766	1.94727	8.1220	0.0000

R-CUAD (AJ.) = 0.9859 SE= 8.957921 MAE= 6.786584 DurWat= 0.761
15 observaciones ajustadas, predic. calculadas para 0 val. ausentes de var. dep.

CUADRO E.2 RESULTADOS DE REGRESION PARA EL MODELO DE
AJUSTE No.1* PARA EL PORCENTAJE DE RUPTURA.

Numero de Observacion	Valores Observados	Valores Ajustados	Residuales	% Desviacion
1	66.0900	54.4579	11.6321	17.6004
2	67.5600	56.7947	10.7653	15.9344
3	69.4700	59.1316	10.3384	14.8818
4	63.6200	61.4675	2.15246	3.3833
5	50.2500	44.6972	5.55280	11.0503
6	75.7800	70.2736	5.50638	7.2663
7	81.2900	72.6105	8.67953	10.6772
8	71.0300	74.9473	-3.91733	-5.5150
9	66.4500	77.2833	-10.8333	-16.3029
10	60.8800	60.5130	0.36704	0.6029
11	85.4000	86.0894	-0.68939	-0.8072
12	92.4000	88.4262	3.97376	4.3006
13	84.9800	90.7631	-5.78309	-6.8052
14	77.4100	93.0991	-15.6891	-20.2675
15	70.4100	76.3287	-5.91873	-8.4061

SUM = 16.13683

* No.1: %R = A EXPC + B C + D T
 Donde: %R = porcentaje de ruptura de pared celular
 C = concentración de levadura (% p/v)
 T = tiempo de agitación (min)
 A, B, D = constantes

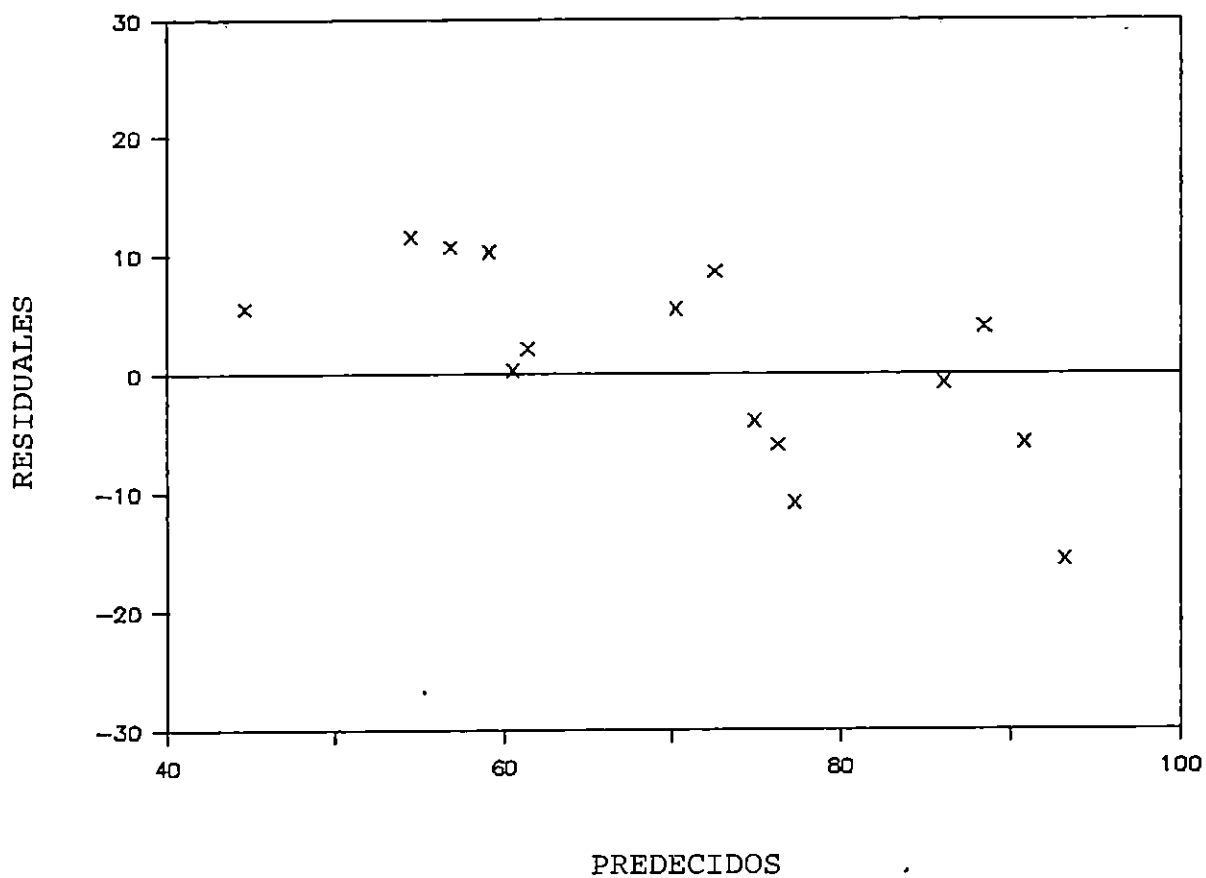


FIGURA E.1 GRAFICA DE RESIDUOS PARA EL MODELO DE AJUSTE No.1*
 PARA EL PORCENTAJE DE RUPTURA. $r^2 = 0.9859$

- * No.1: $\%R = A \text{ EXPC} + B C + D T$
 Donde: $\%R$ = porcentaje de ruptura de pared celular
 C = concentracion de levadura (% p/v)
 T = tiempo de agitaci3n (min)
 A, B, D = constantes

CUADRO E.3 RESULTADOS DEL MODELO DE AJUSTE No.2* PARA EL PORCENTAJE DE RUPTURA.

Variable independiente	coeficiente	error std.	valor-t	nivel sig.
T ²	1.225903	0.135595	9.0409	0.0000
C ²	-0.03078	0.001667	-18.4632	0.0000
C	2.694778	0.124974	21.5627	0.0000

R-CUAD (AJ.) = 0.9979 SE= 3.493820 MAE= 2.804146 DurbinWat= 1.816
15 observaciones ajustadas, predic. calculadas para 0 val. ausentes de var. dep.

CUADRO E.4 RESULTADOS DE REGRESION PARA EL MODELO DE AJUSTE No.1* PARA EL PORCENTAJE DE RUPTURA.

Numero de Observacion	Valores Observados	Valpres Ajustados	Residuales	% Desviacion
1	66.0900	64.1744	1.91557	2.8984
2	67.5600	69.5762	-2.01618	-2.9843
3	69.4700	68.8219	0.64808	0.9329
4	63.6200	61.9117	1.70834	2.6852
5	50.2500	49.8454	1.40461	2.7952
6	75.7800	72.7557	3.02425	3.9908
7	81.2900	78.1575	3.13250	3.8535
8	71.0300	77.4032	-6.37324	-8.9726
9	66.4500	70.4930	-4.04298	-6.0842
10	60.8800	57.4267	3.45329	5.6723
11	85.4000	83.7889	1.61113	1.8866
12	92.4000	89.1906	3.20938	3.4734
13	84.9800	88.4364	-3.45637	-4.0673
14	77.4100	81.5261	-4.11610	-5.3173
15	70.4100	68.4598	1.95017	2.7697

SUM = 2.05245

* No.2: $\%R = A T^2 + B C^2 + D C$
 Donde: $\%R$ = porcentaje de ruptura de pared celular
 C = concentración de levadura (% p/v)
 T = tiempo de agitación (min)
 A, B, D = constantes

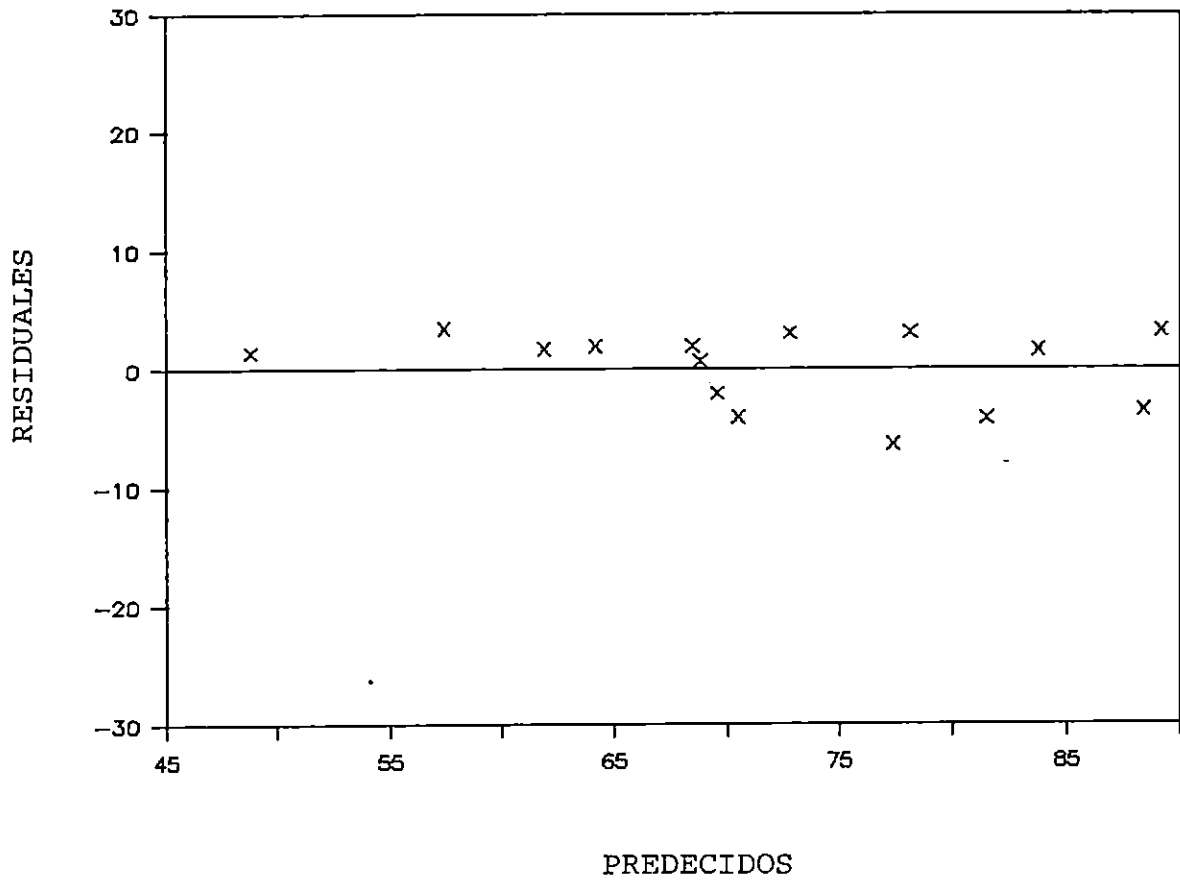


FIGURA E.2 GRAFICA DE RESIDUOS PARA EL MODELO DE AJUSTE No.2*
 PARA EL PORCENTAJE DE RUPTURA. $r^2 = 0.9979$

* No.2: $\%R = A T^2 + B C^2 + D C$
 $\%R$ = porcentaje de ruptura de pared celular
 T = tiempo de agitación (min)
 C = concentración de levadura (% p/v)
 A, B, D = constantes

CUADRO E.5 RESULTADOS DEL MODELO DE AJUSTE No.3* PARA EL PORCENTAJE DE RUPTURA.

Variable independiente	coeficiente	error std.	valor-t	nivel sig.
C ²	-0.023417	0.001847	-12.6752	0.0000
C	1.936072	0.162452	11.9178	0.0000
T	9.64416	0.879677	10.9633	0.0000

R-CUAD (AJ.) = 0.9985 SE= 2.942069 MAE= 2.089921 DurbinWat= 1.953
 15 observaciones ajustadas, predic. calculadas para 0 val. ausentes de var. dep.

CUADRO E.6 RESULTADOS DE REGRESION PARA EL MODELO DE AJUSTE No.3* PARA EL PORCENTAJE DE RUPTURA.

Numero de Observacion	Valores Observados	Valores Ajustados	Residuales	% Desviacion
1	66.0900	65.9393	0.15073	0.2281
2	67.5600	68.9080	-1.34804	-1.9953
3	69.4700	67.1934	2.27661	3.2771
4	63.6200	60.7953	2.82466	4.4399
5	50.2500	49.7139	0.53613	1.0669
6	75.7800	75.5834	0.19657	0.2594
7	81.2900	78.5522	2.73780	3.3679
8	71.0300	76.8376	-5.80755	-8.1762
9	66.4500	70.4395	-3.98950	-6.0038
10	60.8800	59.3580	1.52197	2.5000
11	85.4000	85.2276	0.17241	0.2019
12	92.4000	88.1964	4.20364	4.5494
13	84.9800	86.4817	-1.50171	-1.7671
14	77.4100	80.0837	-2.67366	-3.4539
15	70.4100	69.0022	1.40781	1.9994

SUM = 0.70787

* No.3: $\%R = A C^2 + B C + D T$
 Donde: $\%R$ = porcentaje de ruptura de pared celular
 C = concentración de levadura (% p/v)
 T = tiempo de agitación (min)
 A, B, D = constantes

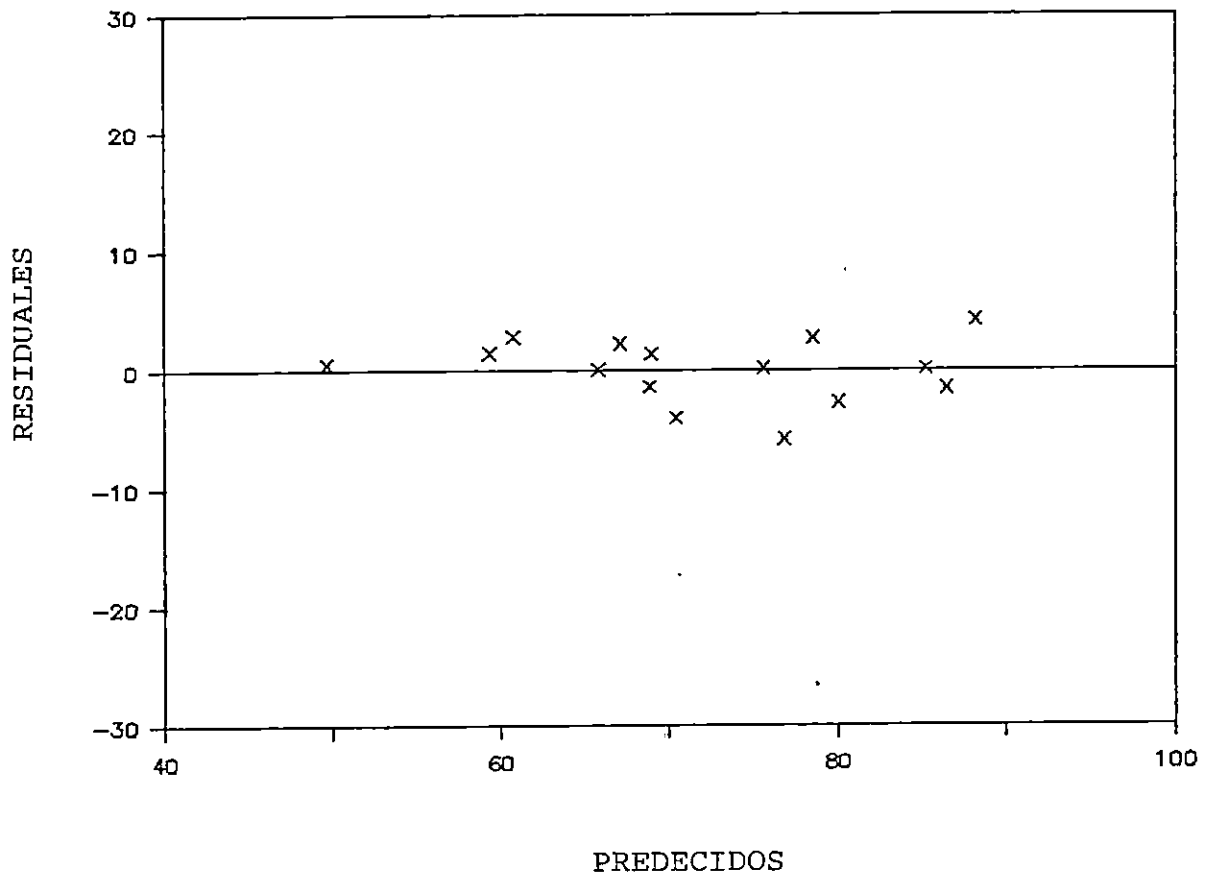


FIGURA E.3 GRAFICA DE RESIDUOS PARA EL MODELO DE AJUSTE No.3*
 PARA EL PORCENTAJE DE RUPTURA. $r^2 = 0.9985$

* No.3: $\%R = A C^2 + B C + D T$
 Donde: $\%R$ = porcentaje de ruptura de pared celular
 C = concentración de levadura (% p/v)
 T = tiempo de agitación (min)
 A, B, D = constantes

CUADRO E.7 RESULTADOS DEL MODELO DE AJUSTE No.3* PARA
EL PORCENTAJE DE RUPTURA CON DOS DATOS
RECHAZADOS

Variable independiente	coeficiente	error std.	valor-t	nivel sig.
C ²	-0.024131	0.001349	-17.8870	0.0000
C	2.012696	0.118926	16.9240	0.0000
T	9.374708	0.637282	14.7105	0.0000

R-CUAD (AJ.) = 0.9992 SE= 2.116857 MAE= 1.503268 DurWat= 2.120
13 observaciones ajustadas, predic. calculadas para 0 val. ausentes de var. dep.

CUADRO E.8 RESULTADOS DE REGRESION PARA EL MODELO DE
AJUSTE No.3* PARA EL PORCENTAJE DE RUPTURA
CON DOS DATOS RECHAZADOS.

Numero de Observacion	Valores Observados	Valores Ajustados	Residuales	% Desviacion
1	66.0900	66.7871	-0.69715	-1.0548
2	67.5600	70.0224	-2.46245	-3.6448
3	69.4700	68.4316	1.03844	1.4948
4	63.6200	62.0145	1.60552	2.5236
5	50.2500	50.7712	-0.52122	-1.0373
6	75.7800	76.1619	-0.38186	-0.5039
7	81.2900	79.3972	1.89285	2.3285
8	60.8800	60.1459	0.73407	1.2058
9	85.4000	85.5366	-0.13656	-0.1599
10	92.4000	88.7719	3.62814	3.9266
11	84.9800	87.1810	-2.20097	-2.5900
12	77.4100	80.7639	-3.35390	-4.3326
13	70.4100	69.5206	0.88936	1.2631

SUM = 0.03427

* No.3: $\%R = A C^2 + B C + D T$
 Donde: $\%R$ = porcentaje de ruptura de pared celular
 C = concentración de levadura (% p/v)
 T = tiempo de agitación (min)
 A, B, D = constantes

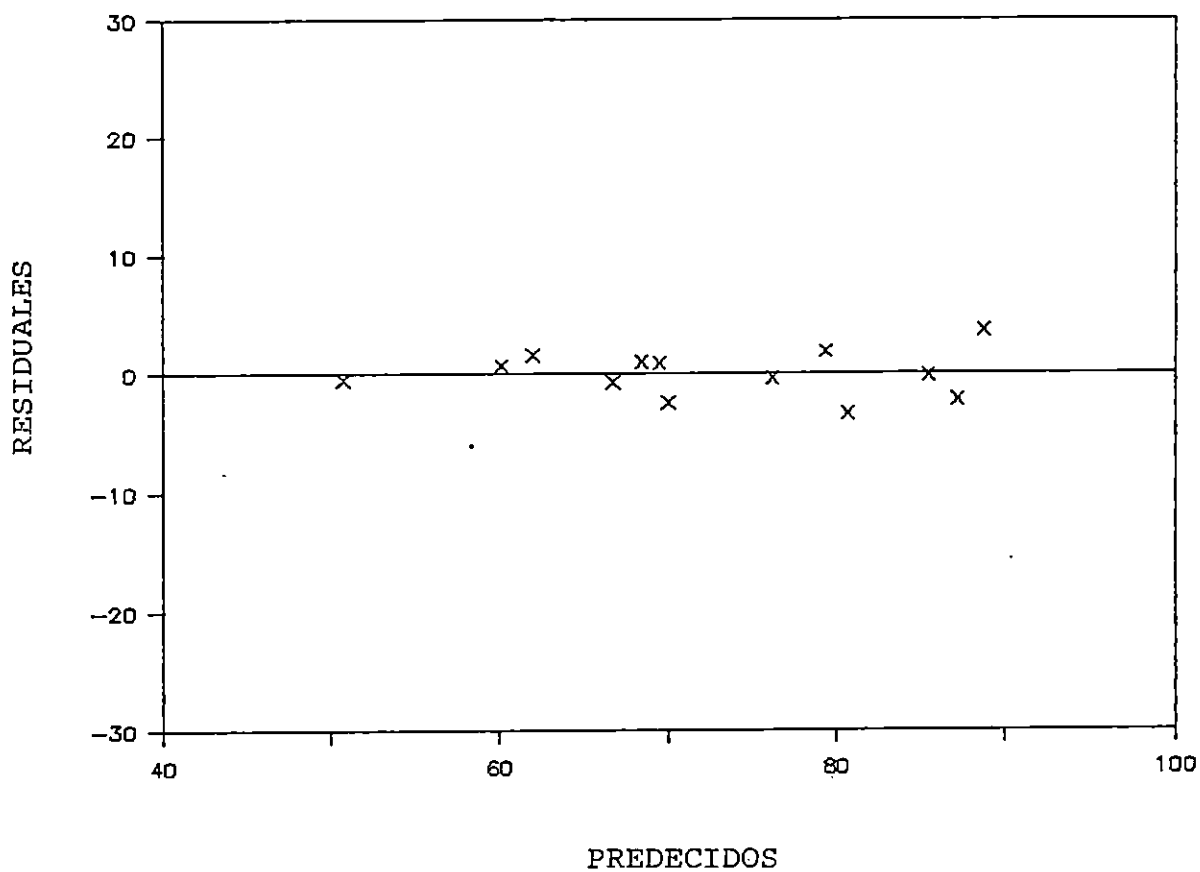


FIGURA E.4 GRAFICA DE RESIDUOS PARA EL MODELO DE AJUSTE No.3*
 PARA EL PORCENTAJE DE RUPTURA CON DOS DATOS RECHAZADOS. $r^2 = 0.9992$

* No.3: $\%R = A C^2 + B C + D T$
 Donde: $\%R$ = porcentaje de ruptura de pared celular
 C = concentración de levadura (% p/v)
 T = tiempo de agitación (min)
 A, B, D = constantes

ANEXO F
PORCENTAJE DE RUPTURA EN FUNCION DE LA CONCENTRACION
DE LEVADURA A 5 min DE AGITACION UTILIZANDO EL PROGRAMA
DE COMPUTADOR TBLCURVE

CUADRO F.1 CALCULO DEL COEFICIENTE DE CORRELACION PARA EL MEJOR MODELO DE AJUSTE BIDIMENSIONAL CON 5 min DE AGITACION.

#	%p/v		% ruptura		D	(Y-Yc)^2	(Y-Ym)^2
	X	Y	Yc				
1	0.00	0.00	-0.0011		0.00	0.00	6479.35
2	30.00	85.08	85.2670		-0.19	0.03	21.03
3	30.00	83.65	85.2670		-1.62	2.61	9.96
4	30.00	87.47	85.2670		2.20	4.85	48.66
5	35.00	85.14	88.4726		-3.33	11.11	21.58
6	35.00	87.37	88.4726		-1.10	1.22	47.27
7	35.00	87.34	88.4726		-1.13	1.28	46.86
8	35.00	89.20	88.4726		0.73	0.53	75.79
9	40.00	91.50	89.0482		2.45	6.01	121.12
10	40.00	92.55	89.0482		3.50	12.26	145.34
11	40.00	93.15	89.0482		4.10	16.82	160.16
12	40.00	91.22	89.0482		2.17	4.72	115.04
13	45.00	83.63	87.5682		-3.94	15.51	9.83
14	45.00	86.95	87.5682		-0.62	0.38	41.67
15	45.00	85.45	87.5682		-2.12	4.49	24.56
16	45.00	84.24	87.5682		-3.33	11.08	14.03
17	50.00	84.59	84.6320		-0.04	0.00	16.77
18	50.00	84.52	84.6320		-0.11	0.01	16.21
19	50.00	85.84	84.6320		1.21	1.46	28.58
20	60.00	79.32	76.8393		2.48	6.15	1.38
21	60.00	73.67	76.8393		-3.17	10.04	46.57
22	60.00	79.24	76.8393		2.40	5.76	1.57
23	70.00	70.60	70.5834		0.02	0.00	97.90
24	70.00	70.93	70.5834		0.35	0.12	91.48
25	70.00	69.71	70.5834		-0.87	0.76	116.30

sum y = 2012.36

n = 25

$Y_m = \text{sum } Y / n = 80.4944$ $r^2 = 1 - [\text{sum}(Y-Yc)^2 / \text{sum}(Y-Ym)^2]$

$\text{sum } (Y-Yc)^2 = 117.23$ $r^2 = 1 - (117.23 / 7799.02)$

$\text{sum } (Y-Ym)^2 = 7799.02$ $r^2 = 0.984969$

$r = 0.992456$

Donde: x = Concentracion (% p/v)

Y = % de ruptura (experimental)

Yc = % ruptura (prediccion)

D = diferencia (Y - Yc)

n = numero de observaciones

r = coeficiente de correlacion

CUADRO F.2 ANALISIS ESTADISTICO PARA EL MEJOR
 MODELO DE AJUSTE BIDIMENSIONAL CON
 5 min DE AGITACION.

TableCurve Numerical Summary Apr 15, 1994 5:48 PM
 Description: RUPTURA
 X-Y Table Size: 25 Active Points: 25
 X Variable: CONCENTRACION
 Y Variable: % DE RUPTURA
 File Source: SILVIA1.PRN

Rank 1 Eqn 2363 $y = a + bx\sqrt{x} + cx^2 + dx^2\sqrt{x}$

r2	Coef Det	DF	Adj r2	Fit Std Err	F-value
0.9849690799	0.9819628959	2.3626698627	458.70668729		

Parm	Value	Std Error	t-value	95% Confidence Limits	
a	0.00011271	2.353845241	4.78832e-05	-4.8972696	4.897495014
b	2.601399024	0.129229612	20.13005365	2.332525436	2.870272612
c	-0.53882487	0.033647064	-16.0140233	-0.60883055	-0.46881919
d	0.028960777	0.002238443	12.93791358	0.0243035	0.033618053

Area Xmin-Xmax
 4799.3794141

Function min	X-Value	Function max	X-Value
70.584748941	70	89.122906442	38.704751742
1st Deriv min	X-Value	1st Deriv max	X-Value
-0.808395466	56.856454984	4.1588291969	5.6764082732
2nd Deriv min	X-Value	2nd Deriv max	X-Value
-0.157020316	17.962634911	0.0641824179	70

Soln Vector Covar Matrix
 GaussElim LUDecomp

r2	Coef Det	DF	Adj r2	Fit Std Err	F
0.9849690799	0.9819628959	2.3626698627			
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	
Regr	7681.7896	3	2560.5965	458.707	
Error	117.22639	21	5.5822089		
Total	7799.016	24			

X Variable: CONCENTRACION

Xmin: 0	Xmax: 70	Xrange: 70
Xmean: 44.4	Xstd: 15.567059238	Xmedian: 45
X@Ymin: 0	X@Ymax: 40	X@Yrange: 40

Y Variable: % DE RUPTURA

Ymin: 0	Ymax: 93.15	Yrange: 93.15
Ymean: 80.4944	Ystd: 18.026619225	Ymedian: 85.08
Y@Xmin: 0	Y@Xmax: 69.71	Y@Xrange: 69.71

CUADRO F.3 RESULTADOS DE REGRESION PARA EL MODELO DE
AJUSTE BIDIMENSIONAL PARA EL PORCENTAJE DE
RUPTURA CON 5 min DE AGITACION.

RUPTURA

Page 1

#	X-Value	Y-Value	Y-Predict	Residual	Kesid%
1	0	0	0.00011271	-0.0001127	0
2	30	85.08	85.2734461	-0.1934461	-0.2273697
3	30	83.65	85.2734461	-1.6234461	-1.9407605
4	30	87.47	85.2734461	2.19655388	2.51120827
5	35	89.2	88.4770714	0.72292862	0.8104581
6	35	87.37	88.4770714	-1.1070714	-1.267107
7	35	87.34	88.4770714	-1.1370714	-1.3018907
8	35	85.14	88.4770714	-3.3370714	-3.9195107
9	40	92.55	89.050461	3.49953896	3.78124144
10	40	93.15	89.050461	4.09953896	4.401008
11	40	91.22	89.050461	2.16953896	2.37835886
12	40	91.5	89.050461	2.44953896	2.67709175
13	45	86.95	87.5684002	-0.6184002	-0.7112136
14	45	85.45	87.5684002	-2.1184002	-2.4791108
15	45	84.24	87.5684002	-3.3284002	-3.9510924
16	45	83.63	87.5684002	-3.9384002	-4.7093151
17	50	84.59	84.6304284	-0.0404284	-0.0477934
18	50	85.84	84.6304284	1.20957159	1.40910018
19	50	84.52	84.6304284	-0.1104284	-0.1306536
20	60	79.24	76.8367621	2.40323789	3.03285952
21	60	79.32	76.8367621	2.48323789	3.13065795
22	60	73.67	76.8367621	-3.1667621	-4.2985776
23	70	70.93	70.5847489	0.34525106	0.48674899
24	70	70.6	70.5847489	0.01525106	0.02160207
25	70	69.71	70.5847489	-0.8747489	-1.25484

CUADRO F.4 RESULTADOS DE REGRESION PARA EL MODELO DE
AJUSTE BIDIMENSIONAL PARA EL PORCENTAJE DE
RUPTURA CON 5 min DE AGITACION.

RUPTURA
Page 1

#	X-Value	Y-Value	Y-Predict	95% Confidence Intvl	
1	0	0	0.00011271	-4.8972696	4.89749501
2	30	85.08	85.2734461	83.2938138	87.2530785
3	30	83.65	85.2734461	83.2938138	87.2530785
4	30	87.47	85.2734461	83.2938138	87.2530785
5	35	89.2	88.4770714	87.0211506	89.9329921
6	35	87.37	88.4770714	87.0211506	89.9329921
7	35	87.34	88.4770714	87.0211506	89.9329921
8	35	85.14	88.4770714	87.0211506	89.9329921
9	40	92.55	89.050461	87.8565294	90.2443927
10	40	93.15	89.050461	87.8565294	90.2443927
11	40	91.22	89.050461	87.8565294	90.2443927
12	40	91.5	89.050461	87.8565294	90.2443927
13	45	86.95	87.5684002	86.2324454	88.904355
14	45	85.45	87.5684002	86.2324454	88.904355
15	45	84.24	87.5684002	86.2324454	88.904355
16	45	83.63	87.5684002	86.2324454	88.904355
17	50	84.59	84.6304284	83.0086266	86.2522303
18	50	85.84	84.6304284	83.0086266	86.2522303
19	50	84.52	84.6304284	83.0086266	86.2522303
20	60	79.24	76.8367621	75.0579842	78.6155401
21	60	79.32	76.8367621	75.0579842	78.6155401
22	60	73.67	76.8367621	75.0579842	78.6155401
23	70	70.93	70.5847489	67.8635832	73.3059147
24	70	70.6	70.5847489	67.8635832	73.3059147
25	70	69.71	70.5847489	67.8635832	73.3059147

CUADRO F.5 RESULTADOS DE REGRESION PARA EL MODELO DE
AJUSTE BIDIMENSIONAL PARA EL PORCENTAJE DE
RUPTURA CON 5 min DE AGITACION.

RUPTURA
Page 1

#	X-Value	Y-Value	Y-Predict	95% Prediction Intvl	
1	0	0	0.00011271	-6.9388267	6.9390521
2	30	85.08	85.2734461	79.9740621	90.5728301
3	30	83.65	85.2734461	79.9740621	90.5728301
4	30	87.47	85.2734461	79.9740621	90.5728301
5	35	89.2	88.4770714	83.3502564	93.6038863
6	35	87.37	88.4770714	83.3502564	93.6038863
7	35	87.34	88.4770714	83.3502564	93.6038863
8	35	85.14	88.4770714	83.3502564	93.6038863
9	40	92.55	89.050461	83.9918052	94.1091169
10	40	93.15	89.050461	83.9918052	94.1091169
11	40	91.22	89.050461	83.9918052	94.1091169
12	40	91.5	89.050461	83.9918052	94.1091169
13	45	86.95	87.5684002	82.4743545	92.6624459
14	45	85.45	87.5684002	82.4743545	92.6624459
15	45	84.24	87.5684002	82.4743545	92.6624459
16	45	83.63	87.5684002	82.4743545	92.6624459
17	50	84.59	84.6304284	79.4540622	89.8067947
18	50	85.84	84.6304284	79.4540622	89.8067947
19	50	84.52	84.6304284	79.4540622	89.8067947
20	60	79.24	76.8367621	71.6090879	82.0644363
21	60	79.32	76.8367621	71.6090879	82.0644363
22	60	73.67	76.8367621	71.6090879	82.0644363
23	70	70.93	70.5847489	64.9660953	76.2034026
24	70	70.6	70.5847489	64.9660953	76.2034026
25	70	69.71	70.5847489	64.9660953	76.2034026

ANEXO G

DETERMINACION DEL RENDIMIENTO DE PRODUCCION
DE EXTRACTO DE LEVADURA

G.1 DETERMINACION DEL RENDIMIENTO DE PRODUCCION.

Para la determinación del rendimiento promedio de producción de extracto de levadura en % de extracto seco por crema de levadura sin amortiguador, se calculó el rendimiento de 10 lotes de producción (Cuadro 6.1).

Por ejemplo, considérese el lote número correlativo 5 del cuadro 6.1, que resulta en un rendimiento de 8.59 % :

Suspensión de levadura 40 % p/v	= 288.4 g
Densidad de suspensión de levadura 40 % p/v	= 1.02 g/ml

Suspensión de levadura 40 % p/v :

$$288.4 \text{ g} / (1.02 \text{ g/ml}) = 282.7 \text{ ml de susp.}$$

Crema de levadura sin amortiguador :

$$282.7 \text{ ml} \times 0.4 \text{ (g crema/ml susp.)} = 113.1 \text{ g de crema}$$

Extracto de levadura seco recuperado	= 9.7139 g
--------------------------------------	------------

Rendimiento :

$$(9.7139 \text{ g ext. seco} / 113.1 \text{ g de crema}) \times 100 = 8.59 \%$$

ANEXO H

ANALISIS SUGERIDOS PARA LA EVALUACION DE LA
CALIDAD DEL PRODUCTO

CUADRO H.1 ANALISIS PROXIMAL SUGERIDO PARA EVALUAR LA CALIDAD DEL EXTRACTO OBTENIDO A PARTIR DE S. uvarum.

Análisis	PROCEDIMIENTO O METODO	FUNDAMENTO Y COMENTARIO
Humedad	Indirecto	Humedad es la cantidad de agua perdida por la evaporación debida al calor. La pérdida de peso es la medida del contenido de humedad.
Cenizas	Calcinación	La muestra se incinera para quemar el material orgánico, el material inorgánico que no se destruye a esta temperatura se le llama ceniza .
Proteína cruda	Kjendahl	El contenido de nitrógeno total está relacionado con la proteína contenida en la muestra. Se calcula por $\% \text{Prot.} = \% \text{N} \times f$, donde $f = 6.25$
Grasa cruda o Extracto etéreo	Extracción con éter de petróleo	El solvente orgánico se evapora y luego condensa sobre la muestra y extrae la grasa que contiene. Muestra seca mejora la acción del disolvente.
Extracto libre de nitrógeno.	Diferencia de todos los anteriores.	Es una categoría del sistema Weende que se encuentra por diferencia. $\text{ELN} = 100 - (\text{ceniza} + \text{extracto etéreo} + \text{proteína} + \text{fibra})$.

BATEMAN, 1970.

CUADRO H.2 ANALISIS MICROBIOLOGICO SUGERIDOS PARA
EVALUAR LA CALIDAD DEL EXTRACTO OBTENI-
NIDO A PARTIR DE S. uvarum.

ANALISIS	PROCEDIMIENTO O METODO	FUNDAMENTO Y COMENTARIO
<u>Escherichia coli</u>	Determinación del número más probable.	NMP consiste en prueba presuntiva con caldo lauril triptosa; si la prueba es gas (+), se siembra en caldo EC, si es gas (+) se hace confirmación de <u>E. coli</u> sobre medio sólido eosina y azul de metileno. La formación de colonias con brillo metálico es prueba (+) de <u>E. coli</u> .
<u>Salmonella</u>	Detección de <u>Salmonella</u>	Se basa en un preenriquecimiento en medio líquido no selectivo, a partir del cual se subcultiva en medio selectivo líquido que es inoculado en medio sólido selectivo.
Conteo estándar en cajas.	Recuento aeróbico de placa.	Se supone que las células que contienen una muestra mezclada con un medio de agar forman, c/u, colonias visibles y separadas.

FAO, 1982.

CUADRO H.3 ANALISIS DE VITAMINAS SUGERIDOS PARA
EVALUAR LA CALIDAD DEL EXTRACTO OBTENI-
DO A PARTIR DE S. uvarum.

ANALISIS	PROCEDIMIENTO O METODO	FUNDAMENTO Y COMENTARIO
Tiamina (B1)	Fluorométrico	Se basa en la oxidación de tiamina a tiocromo, que se da en solución alcalina dando al producto una intensa fluorescencia azul.
Riboflavina (B2)	Fluorométrico	La fluorescencia amarillo verdosa de la riboflavina a la luz ultravioleta depende de la concentración y pH de la solución, habitualmente pH entre 3 y 5, pues en este rango la intensidad de la fluorescencia es constante y depende sólo de la cantidad de riboflavina.
Piridoxina (B6)	Fluorométrico	Se basa en la oxidación de la piridoxina y piridoxal a ácido 4-piridóxico con $KMnO_4$. La lactona de este ácido presenta fluorescencia azulada en solución salina.
Niacina	Determinación de ácido nicotínico total.	La nicotinamida y el ácido nicotínico en productos naturales se hidrolizan con ácido sulfúrico. El anillo piridínico del ácido nicotínico liberado por hidrólisis se abre como bromuro de cianógeno. El producto de escisión se copula con ácido sulfanílico y da un colorante amarillo de polimetina que se mide a 436 nm.

ANEXO I

REPORTES DE LOS LABORATORIOS DE SERVICIO PARA
EVALUAR LA CALIDAD DEL PRODUCTO

ANALISIS BROMATOLOGICO

Bachilleres

Silvia Cuellar, Anibal Erazo y

Mariene Vaquerano.

Presente.

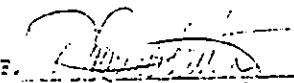
Por este medio le informo sobre los resultados obtenidos en nuestro laboratorio de las siguientes muestras.

N° de Lab.	Identificación de la muestra.	Humedad %	Cenizas %	Extracto Etéreo %	Proteínas %	Fibra Cruda %	Carbohidratos %	Fósforo %	Calcio %
11	LEVADURA SECA	8.35	16.44	0.00	11.55	0.00		6.83	0.0516
12	LEVADURA FRESCA	64.38							


OTRAS DETERMINACIONES U OBSERVACIONES DEL LABORATORIO: **Carbohidratos por diferencia= 100-(%Cenizas+%E.E.+%Fibra Cruda+%Proteínas)

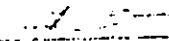
NaCl = 0.73

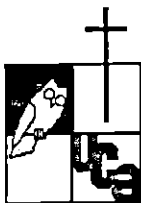
0.00 No se encontró al hacer el análisis. (Extracto Etéreo y Fibra Cruda)

F. 
 Jefe de la Unidad de Química



F. 
 Responsable de análisis.-

F. 
 Recibido.



Universidad Centroamericana José Simeón Cañas
 Apartado Postal (01) 168 - Teléfono 734400, Fax 731010. Autopista Sur - San Salvador, El Salvador, C. A.

22 de Marzo de 1994

Señores
 Estudiantes U.E.S.
 Presente.-

Att: Srita. Silvia Margarita Cuéllar

Estimados señores:

Por medio de la presente les informo sobre los resultados obtenidos en análisis realizados en una muestra de crema de levadura y una muestra de extracto de levadura, por ustedes proporcionada a este laboratorio.

RESULTADOS

Crema de levaduras:

Humedad:	60.8 %
Grasa:	0.08 %
Ceniza:	0.7 %
Proteína:	14.3 %
Carbohidratos por diferencia:	24.12 %
Fibra cruda:	0.6 %

Extracto de levadura:

Humedad:	6.5 %
Ceniza:	16.4 %
Proteína:	10.8 %

Sin otro particular, me es grato saludarle,

Atentamente,

Ing. Yolanda Ramírez de Montenegro
 Laboratorio de Servicio de Química Agrícola.-



/lvm.

LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD
ESPECIALIDADES MICROBIOLÓGICAS INDUSTRIALES
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS-CONSULTORIA

S.A DE C.V.

San Salvador, 3 de Enero de 1994

Señorita
 SILVIA CUELLAR
 Presente

Estimada Srta. Cuellar:

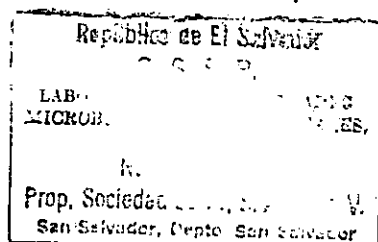
Por este medio estamos remitiendole los resultados de los análisis microbiológicos efectuados en una muestra:

Muestra	Extracto de levadura
Apariencia	Polvo amarillo con pequeñas partículas negras
Recuento total de bacterias aeróbicas mesófilas, ufc/ g	165
<u>Escherichia coli</u> ufc por gramo	0
<u>Salmonella sp</u>	Negativa
Conclusión	La muestra reúne requisitos de calidad microbiológica

ufc: unidades formadoras de colonias.

Atentamente,

ESPECIALIDADES MICROBIOLÓGICAS INDUSTRIALES, S.A. DE C.V.



Elvia Berenice Huevo de Oliva
 Dra. Elvia Berenice Huevo de Oliva

Laboratorio de Investigación en
 Microbiología



CONDOMINIO CENTRO COMERCIAL 29

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA		DEPARTAMENTO DE ANALISIS QUIMICO E INSTRUMENTAL	
INFORME DE ANALISIS			
Nombre común o comercial de la muestra : EXTRACTO DE LEVADURA		Forma Farmacéutica:	Nº lote: No tiene
Fabricante: Escuela de Ingeniería Química, UES.		Procedencia: Dr. José Anibal Draza	P. Publicación: P. Vencimiento:
Método de análisis : *		Envase : Frasco de vidrio incoloro con tapón de rosca.	
Descripción del Producto : Polvo fino de color y olor característico.			
DETERMINACIONES	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS	
a) Contenido de vitamina B ₁ (Tiamina)	45 mcg/gramo de extracto de levadura	29.14 mcg/gramo de extracto de levadura.	
b) Contenido de vitamina B ₆ (Piridoxina)	30 mcg de B ₆ /gramo de extracto de levadura	9.75 mcg./gramo de extracto de levadura	
Observaciones y Conclusiones :			
* Tesis de Lic. Inma Polanco			
Resultados obtenidos en la muestra enviada al Laboratorio de Control de Calidad. Las otras vitaminas no se cuantificaron por falta de reactivos específicos, condiciones de seguridad para su manejo y algunos equipos.			

Analista: *[Firma]* Lic. ZOLA CABRIL SORIO DE ALBA

Método de análisis : 22/02/1994



[Firma]
Dra. Gloria Ruth Calderón
JEFE DEL DEPARTAMENTO
Análisis Químico e Instrumental

ANEXO J

ANALISIS QUIMICOS DE LA LEVADURA RESIDUAL DE
DESTILERIA Y DEL EXTRACTO OBTENIDO EXPERIMENTALMENTE
POR GAMERO et al., 1992

CUADRO J.1 ANALISIS QUIMICOS DE LA LEVADURA RESIDUAL DE DESTILERIA Y DEL EXTRACTO OBTENIDO EXPERIMENTALMENTE (GAMERO et al., 1992).

ANALISIS	LEVADURA RESIDUAL	EXTRACTO PATRON	EXTRACTO PRODUCIDO	
			m1	m2
Proximal (% p/p)				
Humedad	74.87	3.68	4.69	8.15
Proteína (Nx6.25)	34.02	53.94	14.96	12.62
Extracto etéreo	-	-	0.05	-
Fibra cruda	0.79	-	0.93	-
Carbohidratos	51.46	32.74	34.29	-
Cenizas	13.73	9.64	45.08	25.42
Minerales (% p/p)				
Calcio	1.7800	0.5038	0.7095	0.6051
Fósforo	0.8730	2.1300	5.4700	0.1615
Hierro	-	-	-	0.1173
Manganeso	-	-	-	0.0140
Cobre	-	-	-	0.0123
Zinc	-	-	-	0.0300

ANEXO K

COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO DE AISLAMIENTO
PARA BACTERIAS ACETICAS

CUADRO K.1 COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO DE AISLAMIENTO
PARA BACTERIAS ACETICAS (DIAZ Y DIAZ, 1991).

Compuesto	Gramos/litro
Carbonato de calcio ^a	9.0
Glucosa ^b	36.0
Levadura ^c	7.5
Agar granulado	15.0
Alcohol etílico	2 % v/v

^a Calidad reactivo

^b Glucosa comercial a 45 ° Bé

^c Levadura comercial