

T-OEB
1506
G.192p
1992
E1.2

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



TRABAJO DE GRADUACION

**PRODUCCION DE EXTRACTO DE LEVADURA A
PARTIR DE Saccharomyces cerevisiae RESIDUAL DE
LAS FERMENTACIONES ALCOHOLICAS**

PRESENTADO POR:

**EUGENIA SALVADORA GAMERO RODRIGUEZ
LUIS ENRIQUE MENDOZA FUENTES
RICARDO ANTONIO RODAS ARTIGA**

15101004

PREVIA OPCION AL TITULO DE
INGENIERO QUIMICO



JULIO DE 1992

15101004

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

26/ Septiembre / 92
X. S. S.

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

AUTORIDADES

RECTOR

DR. FABIO CASTILLO FIGUEROA

SECRETARIO GENERAL

LIC. MIRNA ANTONIETA PERLA DE ANAYA

FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA

DECANO

ING. JUAN JESUS SANCHEZ SALAZAR

SECRETARIO

ING. JOSE RIGOBERTO MURILLO CAMPOS

ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA

DIRECTOR

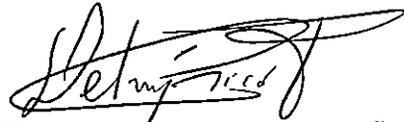



ING. ROBERTO ARISTIDES CASTELLON MURCIA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

TRABAJO DE GRADUACION

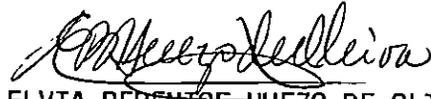
COORDINADORA :



ING. DELMY DEL CARMEN RICO PEÑA



ASESORA :



DRA. ELVIA BERENICE HUEZO DE OLIVA

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestros agradecimientos a todas las personas que de una u otra forma colaboraron desinteresadamente para la realización de este trabajo de graduación y de manera especial a las siguientes personas:

ING. DELMY DEL CARMEN RICO PEÑA
DRA. ELVIA BERENICE HUEZO DE OLIVA
ING. CARLOS ROLZ
LIC. SHERYL DE CABRERA
LIC. ELIZABETH ORELLANA DE PORRAS
LIC. MARIA DEL CARMEN ARRIOLA
ING. LUIS AGUILAR
DRA. CONCEPCION LEMUS DE BENDIX
SR. JULIO CESAR QUINTANILLA
BR. JOSE ANIBAL ERAZO CORNEJO
BR. JOSE SIMEON LOPEZ VASQUEZ

DEDICATORIA

DEDICO ESTE TRABAJO DE GRADUACION A:

- DIOS TODOPODEROSO:** Por haberme guiado por el camino correcto y permitirme culminar mi carrera.
- MIS PADRES:** Víctor Rodolfo Gamero y Lilian Rodríguez de Gamero, su amor, esfuerzo y sacrificio, hicieron posible alcanzar esta meta.
- MIS HERMANOS:** Alex, Roxana, Adriana y Sandra por su comprensión y apoyo constante.
- MIS ABUELOS:** José Víctor Gamero y Rosa Gallardo de Gamero (ambos de grata recordación) con mucho cariño, a quienes debo las bases de mi formación moral.
- MIS MEJORES AMIGOS:** Por el apoyo y cariño brindado en los momentos más difíciles.

Eugenia

DEDICATORIA

DEDICO ESTE TRABAJO DE GRADUACION:

- A DIOS TODOPODEROSO: Por ser el creador, sustentador y ayudador constante, a El pertenezca la gloria.
- A MIS PADRES: Salvador Mendoza Fuentes y Bertha Alicia Ruiz de Mendoza, por su entrega y sacrificio.
- A MIS HERMANOS: Salvador, Ceci, Luz, Lilian, Teresita y Rafael por su apoyo incondicional.
- A MI FAMILIA Y AMIGOS: Por brindarme su ánimo para la consecución de este objetivo.

Luis Enrique .

DEDICATORIA

- A DIOS TODOPODEROSO: Que en su infinita bondad me ha permitido alcanzar esta meta.
- A MI PADRE: Genaro Antonio, quien con su ejemplo y su consejo guió mis pasos y me ayudó a superar los momentos difíciles.
- A MI MADRE: Alba Marina, quien con su infinito amor me dió la fortaleza moral para seguir adelante.
- A MI ESPOSA: Ana Patricia, quien en todo momento estuvo a mi lado compartiendo el trabajo y sacrificio a lo largo de mi preparación académica.
- A MIS HIJOS: Patricia Carolina y Pedro Antonio, quienes me impulsaron a seguir adelante.
- A MIS ABUELAS: Laura y Mercedes en quienes siempre encontré un respaldo y una palabra de aliento.
- A MIS HERMANOS: Genaro, Mauricio y Fernando por su cariño y apoyo.
- A MIS MAESTROS: Que con paciencia y dedicación se esforzaron por brindarme una preparación profesional, y de quienes quedaré siempre agradecido.

Ricardo

res antes de someterlas a la ruptura mecánica; para ésto se utilizó papaína como ayuda enzimática para ablandar la pared celular de la S. cerevisiae; sin embargo, por la naturaleza de la pared celular de ésta, es recomendable efectuar ensayos con quitinasa. El grado de ruptura obtenido con el homogenizador fué del 28% y con el molino de arena el 67.5%.

Al resultar el molino de arena el equipo más adecuado para la ruptura de las células en el proceso de producción del extracto de levadura, se realizaron ensayos para evaluar el efecto de la concentración celular y el tiempo de agitación en la ruptura con el molino de arena. Se encontró que para concentraciones del 50% y un tiempo de 60 min, el grado de ruptura fue de 74.9%.

Luego el extracto obtenido se sometió a operaciones de clarificación y secado, el rendimiento obtenido del proceso global fue de 0.19 gramos de extracto seco por gramo de levadura.

Si bien se obtuvieron resultados esperados en el grado de ruptura de la pared celular, la calidad del extracto obtenido en cuanto al contenido de proteína fue solo del 15%, debido a que el equipo y medio de ruptura utilizados contaminaron la muestra aumentando el contenido de cenizas a valores entre 25 y 45%.

I N D I C E

Contenido	Página
INTRODUCCION	1
I. CARACTERISTICAS DE LA LEVADURA RESIDUAL DE DESTILERIA	2
1.1 Características contaminantes de los residuos de destilería.	2
1.2 Características químicas de la levadura residual.	4
II. USOS DE LEVADURA ENTERA Y DEL EXTRACTO DE LEVADURA	6
2.1 Usos de la levadura residual entera obtenida de la fermentación alcohólica.	6
2.2 Usos del extracto de levadura.	7
III. PRODUCCION DE EXTRACTO DE LEVADURA	12
3.1 Disponibilidad de la levadura residual de destilería en El Salvador	13
3.2 Consumo nacional del extracto de levadura	15
3.3 Métodos de producción de extracto de levadura	17
3.3.1 Recolección y pretratamiento de la levadura	18
3.3.2 Ruptura de la pared celular de levaduras	20
3.3.3 Clarificación y presentación final del extracto	30
IV. OBTENCION EXPERIMENTAL DEL EXTRACTO DE LEVADURA	39
4.1 Recolección, transporte y almacenamiento de la levadura	39
4.2 Tratamiento térmico de la levadura	41
4.3 Lavado y eliminación de contaminantes	41
4.4 Selección del método de ruptura de la pared celular	44

4.5 Tratamiento fisicoquímico	47
4.6 Tratamiento mecánico	47
4.7 Efecto de la concentración de levadura y el tiempo de agitación	54
4.8 Clarificación del extracto de levadura	57
4.9 Secado del extracto de levadura	58
4.10 Calidad del extracto de levadura	59
OBSERVACIONES	63
CONCLUSIONES	64
RECOMENDACIONES	68
REFERENCIAS	70
ANEXOS	76
ANEXO A. Producción estimada de levadura residual en destilería.	77
ANEXO B. Esquema de una centrífuga utilizada a nivel industrial para separar levaduras del mosto fermentado.	80
ANEXO C. Composición de amortiguadores para ruptura de la pared celular.	81
ANEXO D. Métodos de análisis para determinar proteínas solubles.	83
ANEXO E. Determinación de la concentración de células en la pas- ta de levadura.	86
ANEXO F. Rendimiento de la producción de extracto de levadura.	88
ANEXO G. Equipos, materiales y reactivos utilizados en la parte experimental.	89

INDICE DE CUADROS

	Página
CUADRO 1.1 Características fisicoquímicas de los efluentes de la industria del alcohol en El Salvador y normas establecidas.	3
CUADRO 1.2 Composición química proximal y contenido de vitaminas de la levadura <u>S. cerevisiae</u> proveniente de destilería.	5
CUADRO 1.3 Contenido de aminoácidos de la levadura residual de destilería y niveles recomendados por -- FAO-OMS.	5
CUADRO 2.1 Composición química proximal y contenido de vitaminas del extracto de levadura crecida en melaza.	9
CUADRO 2.2 Uso de la proteína de levadura de destilería o cervecería en alimentos.	10
CUADRO 3.1 Producción de etanol (absoluto y desnaturalizado) en El Salvador.	13
CUADRO 3.2 Capacidad instalada de las destilerías en El Salvador reportada en litros de etanol/día.	14
CUADRO 3.3 Importación del extracto de levadura durante el período 1987-1990.	15

CUADRO 3.4	Proyección del costo unitario de extracto de levadura para el período 1991-1994.	16
CUADRO 3.5	Composición del extracto de levadura comercial de Sigma Chemical Company.	35
CUADRO 3.6	Contenido de proteína y aminoácidos requeridos para el extracto de levadura comercial de Bio-Serv Inc.	36
CUADRO 3.7	Contenido de vitaminas y nutrientes menores requeridos para el extracto de levadura comercial de Bio-Serv Inc.	37
CUADRO 3.8	Análisis microbiológico requerido para el extracto de levadura comercial de Bio-Serv Inc.	38
CUADRO 3.9	Métodos analíticos empleados para evaluar la calidad del extracto de levadura.	38
CUADRO 4.1	Comparación de tratamientos aplicados para la ruptura de la pared celular de la levadura <u>Saccharomyces cerevisiae</u> .	52
CUADRO 4.2	Efecto de la concentración en la ruptura celular con molino de arena.	54
CUADRO 4.3	Efecto del tiempo de agitación en la ruptura celular con molino de arena.	56
CUADRO 4.4	Análisis químicos de la levadura residual y del extracto obtenido experimentalmente.	62

INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 3.1 Métodos de desintegración celular.	21
FIGURA 3.2 Diagrama de un agitador de partículas abrasivas Bead Beater.	25
FIGURA 3.3 Diagrama de un sistema de molino vertical y un agitador Netzsch Molinex KE5.	27
FIGURA 3.4 Diagrama de un molino horizontal Dyno.	28
FIGURA 3.5 Diagrama de un molino vibratorio Tip Sonomec.	24
FIGURA 4.1 Diagrama del proceso general de la producción del extracto de levadura a nivel de laboratorio.	40
FIGURA 4.2 Fotografía de células de levadura <u>Saccharomyces</u> <u>cerevisiae</u> en el mosto procedente de destilerías. Lente utilizado 40x, coloración azul de metileno.	43
FIGURA 4.3 Fotografía de frotis de levadura antes de la rup- tura celular. Lente utilizado 100x, coloración con azul de metileno.	44
FIGURA 4.4 Molino de arenas utilizado para la ruptura de la pared celular.	50
FIGURA 4.5 Homogenizador utilizado para la ruptura de la pared celular.	51

FIGURA 4.6 Fotografía del contenido intracelular de levadura S. cerevisiae después de la ruptura celular en molino de arena. Lente utilizado 100x, coloración azul de metileno.

53

FIGURA 4.7 Fotografía de fragmentos de pared celular de levadura S. cerevisiae después de la ruptura celular en molino de arena. Lente utilizado 40x, coloración azul de metileno.

53

RESUMEN

Los residuos sólidos de la fermentación alcohólica están constituidos por levadura Saccharomyces cerevisiae, la cual resulta ser una fuente rica en proteínas y vitaminas, por lo que al ser descargada a los ríos aumenta la contaminación ambiental.

El extracto de levadura se obtiene al romper la pared celular de la levadura, separándola y concentrando el contenido intracelular, cuyo valor se debe al contenido de altos niveles de vitaminas del complejo B (400-600 mg/g) y de proteínas (350 a 400 mg/g) de alto contenido de aminoácidos esenciales. Estas características del extracto de levadura hacen que sea aplicable en diferentes industrias tales como la fermentativa, alimenticia, farmacéutica y agrícola.

Para la ruptura de la pared celular se ensayaron tres métodos a nivel de laboratorio, éstos son: hidrólisis ácida, lisis con tratamiento fisicoquímico y ruptura por medios mecánicos. Siendo los dos últimos más apropiados al no requerir condiciones extremas de pH y temperatura.

Debido a las ventajas presentadas por ambos métodos se realizaron ensayos en los cuales se combinaron el tratamiento fisicoquímico con equipos de ruptura mecánica tales como el molino de arena y el homogenizador celular.

Los equipos utilizados fueron construidos en esta Universidad con la colaboración de la unidad productiva de la Escuela de Ingeniería Mecánica.

El tratamiento fisicoquímico se aplicó a las suspensiones celula-

INTRODUCCION

El Salvador es uno de los países de latinoamérica que posee una alta densidad poblacional, alta tasa de desnutrición y serios problemas de contaminación ambiental.

Actualmente el país enfrenta una crisis de escasez de fuentes de proteínas, por lo que es urgente buscar alternativas de solución, para lo cual se han investigado diversas fuentes de proteínas no convencionales como suplemento proteínico, entre éstas las provenientes de microorganismos, de manera especial varios géneros de levaduras. El valor nutritivo de levaduras ha sido demostrado a través de muchas investigaciones realizadas a nivel mundial.

Entre los objetivos de esta investigación está el de producir extracto de levadura a partir de Saccharomyces cerevisiae residual de fermentaciones alcohólicas de melaza, la cual está siendo descargada a los ríos en cantidades alrededor de 350, 683 kg/año, aumentando la contaminación ambiental. En cumplimiento con otro de los objetivos, se pretende plantear el aprovechamiento de un residuo industrial, actualmente no utilizado.

El presente trabajo constituye la primera investigación sobre la producción de extracto de levadura en El Salvador y se ha hecho uso de la levadura residual de Destilería Salvadoreña, S.A., ubicada en el Km 14 1/2 de la carretera Troncal del Norte, Apopa. En esta Destilería se hace uso del método de fermentación discontinua y toda la levadura utilizada por lote es descargada a los ríos.

CAPITULO I

CARACTERISTICAS DE LA LEVADURA RESIDUAL DE DESTILERIA

La levadura residual de destilerías es un desecho orgánico compuesto como su nombre lo indica por células de levadura, generalmente Saccharomyces cerevisiae, con características de floculación media. Estas células vienen mezcladas con mosto fermentado remanente, conteniendo sulfatos (SO_4^{--}), potasio expresado como K_2O y calcio como CaO , azúcares reductores, etc. (Orantes, 1987).

También con frecuencia se encuentra en este desecho contaminación con microorganismos del género Lactobacillus (Aguilar, 1991).

1.1 CARACTERISTICAS CONTAMINANTES DE LOS RESIDUOS DE DESTILERIA

En El Salvador se usa la levadura en las fermentaciones alcohólicas y después de realizarse el proceso fermentativo, las levaduras juntamente con los demás desechos de las destilerías son vertidas a los ríos contribuyendo a la contaminación de éstos. La levadura residual y las vinazas provenientes de la industria del alcohol generaron en 1986 una contaminación equivalente a 194,000 habitantes, ubicándose en el cuarto lugar después de la contaminación producida por las agroindustrias de café, caña de azúcar y henequén (Cañas, 1990). Las características fisicoquímicas de los desechos de destilería y de las normas establecidas en el anteproyecto del reglamento sobre la calidad y control de vertidos de aguas residuales industriales, se comparan en el

Cuadro 1.1, donde se observa que todos los parámetros evaluados excepto el de sólidos suspendidos se encuentran fuera de esas normas; lo cual obliga a buscar alternativas de utilización de estos desechos dado su alto contenido de materia orgánica que podría aprovecharse al aplicar un proceso de conversión adecuado de las mismas.

CUADRO 1.1 CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LOS EFLUENTES DE LA INDUSTRIA DE ALCOHOL EN EL SALVADOR Y NORMAS ESTABLECIDAS (Cañas, 1990).

CARACTERISTICAS	EFLUENTE	NORMA
Carga (población equivalente)	194,000 habitantes	
pH	4.85	6 a 9
Temperatura (°C)	59.0	No superior a 5°C de la temperatura local.
D.B.O. (mg/L)	25,000	Menos que 300.
Sólidos totales (mg/L)	87,000	Menos que 1000
Sólidos suspendidos (mg/L)	120	Menos de 500.
Oxígeno disuelto (mg/L)	0	Mayor que 5
Olor	Fétido	Ausente

1.2 CARACTERISTICAS QUIMICAS DE LA LEVADURA RESIDUAL

Se ha investigado la utilización de diversas fuentes de proteínas como suplemento proteínico, entre éstas las provenientes de microorganismos, siendo las levaduras las más populares (Cabrera et al., 1983).

El contenido de proteína de la levadura Saccharomyces cerevisiae fluctúa entre 37 y 53% de su peso total (cuadro 1.2), dependiendo del proceso de producción y purificación del microorganismo.

La proteína de origen unicelular se caracteriza por ser deficiente en aminoácidos sulfurados (metionina y cistina), pero contiene niveles elevados de lisina, por lo que es usada en alimentación humana y animal para complementar la dieta proveniente de cereales (Egaña et al., - 1979).

El contenido de aminoácidos esenciales de la levadura residual de la fermentación alcohólica se detalla en el cuadro 1.3. Al comparar estos valores de aminoácidos esenciales con los de la proteína de referencia FAO-OMS (1973), se observa que los aminoácidos limitantes son los sulfurados. El resto de aminoácidos se encuentra en cantidades relativamente adecuadas (Egaña et al., 1979). La levadura de destilería es además una buena fuente de vitaminas del complejo B (ver cuadro 1.2) (Godfrey et al., 1986).

CUADRO 1.2 COMPOSICION QUIMICA PROXIMAL Y CONTENIDO DE VITAMINAS DE LA LEVADURA S. cerevisiae PROVENIENTE DE DESTILERIA (Cabre-ra et al., 1977).

ANALISIS	CONTENIDO
Proximal	(% p/p)
Humedad	7.00
Proteína (N x 6.25)	41.25
Polisacáridos	34.00
Grasa	7.50
Fibra	1.50
Ceniza	6.10
Vitaminas	(Microgramo/gramo)
Tiamina	65.00
Riboflavina	52.00
Niacina	195.00
Piridoxina	26.00

CUADRO 1.3 CONTENIDO DE AMINOACIDOS DE LA LEVADURA RESIDUAL DE DESTILERIA Y NIVELES RECOMENDADOS POR FAO-OMS (Egaña et al., 1979)

AMINOACIDOS	g/16 g de N	Niveles FAO-OMS g/16 g de N
Arginina *	2.30	-
Histidina **	1.16	1.40
Lisina	3.77	5.44
Leucina	5.21	7.04
Isoleucina	3.83	4.00
Metionina-cistina	1.04	3.50
Fenilalanina - tirosina	4.01	6.00
Treonina	2.49	4.00
Triptofano	0.69	0.96
Valina	4.17	4.96

* Para ratas

** Infantes solamente

CAPITULO II

USOS DE LA LEVADURA ENTERA Y DEL EXTRACTO DE LEVADURA

Parte de la levadura residual de destilerías y cervecerías se utiliza tal como se obtiene después de separarla del mosto fermentado; también podría utilizarse en forma de extracto de levadura, ofreciendo este último ventajas adicionales tales como una mayor disponibilidad de sus constituyentes y un amplio campo de aplicación en la industria.

2.1 USOS DE LA LEVADURA RESIDUAL ENTERA OBTENIDA DE LA FERMENTACION ALCOHOLICA.

Una fracción de esta levadura (aproximadamente 1/4), se puede destinar a la fermentación del siguiente lote como se practica en algunas destilerías. La levadura restante se puede utilizar en la formulación de forrajes para ganado, alimento para cerdos, aves, peces y camarones (White, 1954).

En los procesos modernos se efectúan fermentaciones continuas reciclándose hasta un 80% de la levadura por cada ciclo, quedando el 20% restante en los desechos.

En El Salvador, hace algunos años la empresa Destilería Salvadoreña, S.A., trató de aprovechar la levadura separándola por medio de centrifugación antes de pasar el mosto hacia la columna de destilación, pasando luego la crema de levadura hacia unos rodillos calentadores, obteniéndose un producto preteínico en forma de harina, apta para ali-

mentación animal. Este proyecto fracasó debido a la saturación del mercado nacional con harina de pescado de costo inferior al de la levadura; como consecuencia de esta experiencia se dejó de utilizar el desecho (Aguilar, 1991). Cabe mencionar que actualmente la levadura de cerveza está siendo empleada parcialmente en forma de crema para alimentación animal.

2.2 USOS DEL EXTRACTO DE LEVADURA

Los componentes de la levadura pueden ser aprovechados, obteniendo un extracto de levadura de calidad industrial, que puede ser preparado y estabilizado para uso bacteriológico, por ser un excelente estimulador del crecimiento de bacterias; razón por la cual es usado en medios de cultivo microbiológicos como sustituto del extracto de res o como coadyuvante de éste (DIFCO, 1974).

El extracto de levadura puede ser una materia prima que juntamente con los substratos apropiados, se emplean en la fabricación de productos que utilizan procesos fermentativos (por ejemplo ácido láctico, ácido acético, etc.).

La levadura Saccharomyces cerevisiae es una fuente de enzimas especialmente de invertasa que puede ser extractada en cantidades substanciales y es utilizada principalmente en la industria alimenticia.

La invertasa es una fructo-furanosidasa cuya acción transforma la sacarosa en fructosa y glucosa, e hidroliza la rafinosa produciendo fructosa y melibiosa. La invertasa es producida por medio de autólisis de las células de levadura (Peppler et al., 1979).

También la levadura puede utilizarse para producir goma de levadura (glican), extractando este compuesto de las paredes celulares obtenidas en el proceso de producción de extracto de levadura.

La goma de levadura al ser agregada a alimentos líquidos en proporciones adecuadas, da al producto una sensación de cremosidad al paladar aunque estos productos contengan una mínima cantidad de grasa. Debido a las características funcionales que posee, el glican es usado en la formulación de alimentos tales como aderezos para ensaladas, helados, pasteles, etc. La goma de levadura tiene una composición de 5 a 20% de proteína cruda, 0.1 a 3% de lípidos, 1 a 3% de ácidos nucleicos, 0.5 a 3% de cenizas y de 60 a 95% de carbohidratos (Johnson, 1977).

El extracto de levadura es utilizado para el control de plagas. Esto se logra mediante la elaboración de panecillos en los cuales este extracto es uno de los principales componentes. El panecillo sirve para que la mosca del mediterráneo ponga sus huevecillos; los cuales, posteriormente son sometidos a radiación con el objeto de obtener moscas estériles, para luego ser liberadas.

Los extractos de levadura de destilería o cervecería, son usados frecuentemente como suplemento alimenticio. Su composición química aporta características especiales a los alimentos en donde se emplea como fuente de proteínas y vitaminas del complejo B (ver cuadro 2.1); aunque existe una limitación en su uso para alimentación humana, por su alto contenido de ácidos nucleicos.

Además se sabe que industrialmente se procesa levadura para obtener extractos usados principalmente como saborizantes (ver cuadro 2.2).

También se emplean en preparaciones farmacéuticas en forma seca, en polvo o en tabletas. Estas preparaciones son ampliamente utilizadas por su contenido de vitaminas y proteínas (White, 1954).

CUADRO 2.1 COMPOSICION QUIMICA PROXIMAL Y CONTENIDO DE VITAMINAS DEL EXTRACTO DE LEVADURA CRECIDA EN MELAZA (Godfrey et al., 1986).

ANALISIS	CONTENIDO
Proximal	(% p/p)
Humedad	28
Proteína (N x 6.25)	37
Cloruro de sodio	11
Cenizas (sin NaCl)	Trazas
Carbohidratos	17
Vitaminas del complejo B	(mg/g de extracto)
Tiamina	10-20
Riboflavina	50-100
Piridoxina	10-15
Niacina	300-5500

CUADRO 2.2 USO DE LA PROTEINA DE LEVADURA DE DESTILERIA O CERVECERIA EN ALIMENTOS (Cabrera, 1977).

PRODUCTO	NIVEL DE PROTEINA DE LEVADURA (% p/p)
Tortitas de carne	30
Salchichas	15
Carne molida	12
"Chili" con carne *	8
Pizza	50% de la carne
Galletas dulces y saladas	10
Caramelos	6
Bebida (desayuno instantáneo)	2
Pasta	No especificado
Cereal fortificado	No especificado

* Sustituye totalmente la carne.

Además del amplio campo de aplicación industrial del extracto de levadura, el desarrollo de este proyecto podría aportar otros beneficios de carácter social y científico tales como:

- a) Se aprovecharía una fuente de vitaminas y proteínas actualmente no utilizadas y con potencial de aprovechamiento en alimentación animal, ya que el extracto de levaduras podría servir para enriquecer los alimentos de aves, peces, ganado vacuno y otros, dando por resultado un crecimiento y engorde acelerado en los animales, aumentando así la disponibilidad de huevos, carne, leche y sus

derivados para beneficio de la población.

- b) Tratamiento de un residuo industrial. La contaminación de ríos es tal que la fauna acuática perece debido a la ausencia de oxígeno. Esto afecta a las comunidades cuya principal fuente de ingresos es la pesca artesanal. Además, las aguas contaminadas no pueden ser utilizadas para uso doméstico. Al aprovechar este desecho se estaría contribuyendo a eliminar un factor de contaminación de los cuerpos de agua.
- c) La ejecución de este proyecto contribuirá a impulsar el desarrollo de la biotecnología en el país, campo de acción donde la ingeniería química juega un papel importante con la aplicación de los principios y leyes de las operaciones unitarias y procesos unitarios.

CAPITULO III

PRODUCCION DE EXTRACTO DE LEVADURA

La producción del extracto de levadura ha tenido éxito en países como Alemania y Estados Unidos, donde se han realizado investigaciones orientadas a la utilización del extracto de levaduras como materia prima para la industria de alimentos y para la producción de aminoácidos, proteínas y vitaminas (Kretzsmar, 1961).

Los mayores productores de extracto de levadura en 1985 fueron; Ucrania (400 ton), Francia (300 ton), Australia (100 ton) y Perú (200 ton), (Godfrey et al., 1986).

A nivel Centroamericano se han realizado algunos estudios tendientes a utilizar levadura entera o extracto de levadura. Por ejemplo Egaña et al., (1979); en el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) en colaboración con la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, efectuaron un estudio sobre "Composición química de los residuos de destilería de alcohol y su evaluación biológica en ratas y aves".

Cabrera et al., (1987) en Guatemala a través de la División de Investigaciones Aplicadas del Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI), realizaron el estudio titulado "Empleo de concentrado de levadura (Saccharomyces cerevisiae) proveniente de una planta procesadora de alcohol y ron". En El Salvador el presente estudio constituye la primera investigación sobre la producción de extracto de levadura.

3.1 DISPONIBILIDAD DE LA LEVADURA RESIDUAL DE DESTILERIA EN EL SALVADOR

Datos estadísticos indican que en El Salvador se produjeron - 91,307,628 litros de alcohol en el año 1990 (ver cuadro 3.1). De acuerdo con ésto se obtuvo una producción estimada de levadura residual de destilería de 350.7 toneladas métricas (ver anexo A).

CUADRO 3.1 PRODUCCION DE ETANOL (ABSOLUTO Y DESNATURALIZADO) EN EL SALVADOR (ESTEVEZ, 1991).

AÑOS	Nº DE EMPRESAS	VOLUMEN DE PRODUCCION (L)
1986	2	81,996,431
1987	3	81,159,487
1988	3	71,916,051
1989	2	71,974,430
1990	2	91,307,628

Es notable en el cuadro 3.1 que durante el período comprendido entre 1986 y 1990 el volumen de producción de etanol se mantuvo entre 1.9 a 9.3 millones de litros al año, ésto refleja una baja producción si se toma en cuenta que la capacidad instalada para 1990 era de 260,000 L/día, (951,000,000 L/año), es decir que las plantas trabajaron solamente el 8.3% a 9.8% de su capacidad instalada. Esto indica que actualmente se cuenta con la infraestructura necesaria para cultivar y cosechar la levadura a escala industrial.

Debido a las condiciones mencionadas, la fabricación del extracto de levadura podría tener una repercusión significativa en la economía del país, ya que el extracto de levadura puede llegar a convertirse en un producto de exportación.

Es importante mencionar que en la actualidad solamente existen tres plantas productoras de levadura en Centro América (dos en Guatemala y una en Costa Rica) las cuales producen levadura de panificación y para piensos. El extracto de levadura aún no es fabricado en el área Centroamericana.

Se sabe que la capacidad instalada de las destilerías existentes en El Salvador asciende a 440,000 litros de etanol por día (ver cuadro 3.2), de las cuales no se encuentran trabajando las destilerías de Los Lagartos y Chanmico. Por lo que la demanda nacional está siendo abastecida por Destilería Salvadoreña, S.A. y la planta de Ahuachapán.

CUADRO 3.2 CAPACIDAD INSTALADA DE LAS DESTILERIAS EN EL SALVADOR --
REPORTADA EN LITROS DE ETANOL/DIA (Orantes, 1987).

DESTILERIA	CAPACIDAD (L/día)
Destilería Salvadoreña	90,000
Los Lagartos	120,000
Chanmico	60,000
Ahuachapán	170,000
TOTAL	440,000

3.2 CONSUMO NACIONAL DE EXTRACTO DE LEVADURA

El extracto de levadura consumido en El Salvador es importado de fuera del área Centroamericana, ya que no existen plantas en el área que se dediquen a producir este tipo de aditivo para la industria fermentativa y de alimentos. Además se utiliza en laboratorios de análisis microbiológicos y en universidades para fines didácticos o de investigación. Las importaciones de extracto de levadura proceden en su totalidad de Estados Unidos de Norteamérica (MICE, 1991).

El cuadro 3.3 muestra información recopilada en el Ministerio de Comercio Exterior por medio de la partida arancelaria N° 21070900, para importaciones de extracto de levadura durante el período 1987-1990.

CUADRO 3.3 IMPORTACION DE EXTRACTO DE LEVADURA DURANTE EL PERIODO 1987-1990 (MINISTERIO DE COMERCIO EXTERIOR).

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

La dispersión de los datos referentes al consumo en kilogramos por año no permiten hacer una estimación del mercado potencial del

extracto de levadura, por lo que únicamente se presenta en el cuadro 3.4, una proyección del costo unitario que el extracto podría tener para un período de cuatro años tomando como base el promedio de consumo (2,516 kg), del período de 1987-1990.

CUADRO 3.4 PROYECCION DEL COSTO UNITARIO DE EXTRACTO DE LEVADURA PARA EL PERIODO DE 1991-1994.

AÑO	CONSUMO PROMEDIO (kg)	VALOR CIF (¢)	COSTO UNITARIO (¢/kg)
1991	2,516	62,523	24.85
1992	2,516	71,781	28.53
1993	2,516	81,066	32.22
1994	2,516	90,324	35.90

Del cuadro 3.4, se puede observar que el costo unitario tendría incrementos de ¢ 3.68/kg al año. Esto permite concluir que en siete años el costo del extracto de levadura se duplicará con respecto al costo estimado para 1991.

De acuerdo a los datos presentados en el cuadro 3.4, actualmente se consumen en El Salvador un promedio de 2,516 kg/año de extracto de levadura con un valor estimado en ¢62,523.00 es decir ¢ 24.85 por kilogramo de extracto de levadura.

Aunque los volúmenes importados no pueden ser considerados extraordinarios, es importante considerar los siguientes aspectos para producir el extracto de levadura en El Salvador:

- a) La materia prima es de origen nacional.
- b) El costo de materia prima resulta despreciable siempre y cuando la planta de fabricación del extracto opere dentro de la misma destilería.
- c) El costo de extracto dependerá principalmente del método empleado para la ruptura celular.
- d) El extracto de levadura es materia prima para una amplia gama de industrias (industrias de alimentos, fábricas de concentrados para animales, industrias fermentativas y farmacéutica).

Todos estos aspectos permiten visualizar la importancia que tendría producir el extracto de levadura en el país; actualmente el volumen de consumo del extracto puede ser influenciado por la ventaja en términos de costo que presentan otras fuentes de proteínas (animal o vegetal). Además hay que tomar en cuenta que algunas de las industrias mencionadas, actualmente se encuentran en vías de desarrollo, pero esto no implica que a mediano plazo la demanda acelere el desarrollo de éstas, las cuales serían consumidores potenciales del extracto de levadura. Por esto podría decirse que se obtendría una ventaja económica en la producción de extracto de levadura y será más atractiva si se logra una calidad aceptable a un costo de producción bajo.

3.3 METODOS DE PRODUCCION DE EXTRACTO DE LEVADURA

En general la producción de extracto de levadura se ha dividido en tres importantes etapas y son las siguientes: Recolección y Pretra-

tamiento de la levadura, ruptura de la pared celular de levaduras, y clasificación y presentación final del extracto.

3.3.1 Recolección y Pretratamiento de la Levadura

En esta sección son descritas las operaciones que intervienen en la recolección y pretratamiento de la levadura. Como paso inicial para recuperar la levadura del mosto fermentado, es necesario someterlo a centrifugación con lo cual es posible separar la levadura en forma de crema, luego ésta debe ser transportada en condiciones refrigeradas hacia el lugar donde será necesario almacenarla a temperaturas por debajo de 0°C. El siguiente paso es lavar la levadura con agua hasta obtener el grado de limpieza requerido para el proceso.

a) Recuperación de levadura en destilerías

La operación utilizada tradicionalmente para separar y recuperar las células de levadura en destilerías es la centrifugación. El tipo de centrífuga más ampliamente utilizada es la de rotor de discos, (ver anexo B).

El proceso de separación y recuperación consiste en la remoción de células de levadura contenidas en el mosto fermentado por el efecto de la fuerza centrífuga, recuperando la levadura en forma de crema.

En 1982, Perry y colaboradores reportaron que la concentración máxima de sólidos que es factible obtener en la descarga de este tipo de centrífugas puede llegar a ser de sólo 15% debido a la naturaleza hidrofílica de la levadura.

b) Transporte y Almacenamiento

Desde el momento que la levadura es obtenida de la destilería, debe ser transportada tan rápido como sea posible, debido a lo perecedero del producto; los contenedores no deben ser expuestos a altas temperaturas o condiciones húmedas, y si es enviada a través de grandes distancias, la levadura debe ser depositada en camiones cisternas refrigeradas a temperaturas cercanas al punto de congelamiento (2 a 6°C). Para su almacenaje se requerirá de condiciones secas y refrigeración a 0°C o menos, debe evitarse las altas temperaturas porque la levadura se deteriora rápidamente causando autólisis, licuefacción y putrefacción por acción de otros microorganismos (White, 1954).

c) Lavado de levadura

La levadura procedente de las tinajas de fermentación de la destilería, forma parte de una suspensión muy heterogénea, que contiene melaza agotada y células de levadura, así como otros sólidos disueltos no aprovechados por éstas.

Es necesario lavar la levadura para obtener una crema limpia y preparada para la operación de ruptura de la pared celular.

El lavado se logra haciendo uso de la combinación de dos operaciones unitarias: centrifugación y agitación y utilizando agua como medio de suspensión, la temperatura de lavado debe ser de 4°C. El lavado de la levadura se lleva a cabo de la siguiente manera:

La levadura procedente de la destilería se centrifuga de 5 a 10 minutos a 2,700 rpm para separarla de los desechos acuosos, la crema obtenida se lleva a un recipiente con agitación, donde se le agrega

de 5 a 6 volúmenes de agua para realizar el lavado (White, 1954).

Este proceso de lavado puede repetirse si se desea hasta que la levadura esté completamente libre de materiales extracelulares, de tal forma que se obtenga una crema de levadura limpia para las etapas siguientes.

3.3.2 Ruptura de la pared celular de levadura

La ruptura de la pared celular se realiza con el objeto de extraer y separar los componentes intracelulares de las levaduras tales como proteínas, enzimas y vitaminas. Una vez que la pared celular ha sido rota, los componentes celulares pueden ser fácilmente digeridos por animales no rumiantes o también pueden ser procesados para producir extracto de levadura.

La pared celular de las levaduras posee una estructura muy fuerte y está compuesta por 6% de proteína y 68% de polisacáridos, quitina y hemicelulosa (Jorgensen, 1959).

La digestibilidad de la levadura se mejora por medio de tratamiento térmico a altas temperaturas, sin embargo, éste puede causar pérdidas de vitaminas y proteínas.

Se han estudiado métodos específicos para la desintegración de la pared celular (ver figura 3.1), siendo la desintegración mecánica uno de los métodos que ha dado mejores resultados, especialmente la agitación con partículas abrasivas, la cual tiene posibilidades de ser aplicable a gran escala (Hedenskong et al., 1973).

En esta sección se describen tres métodos utilizados en la parte

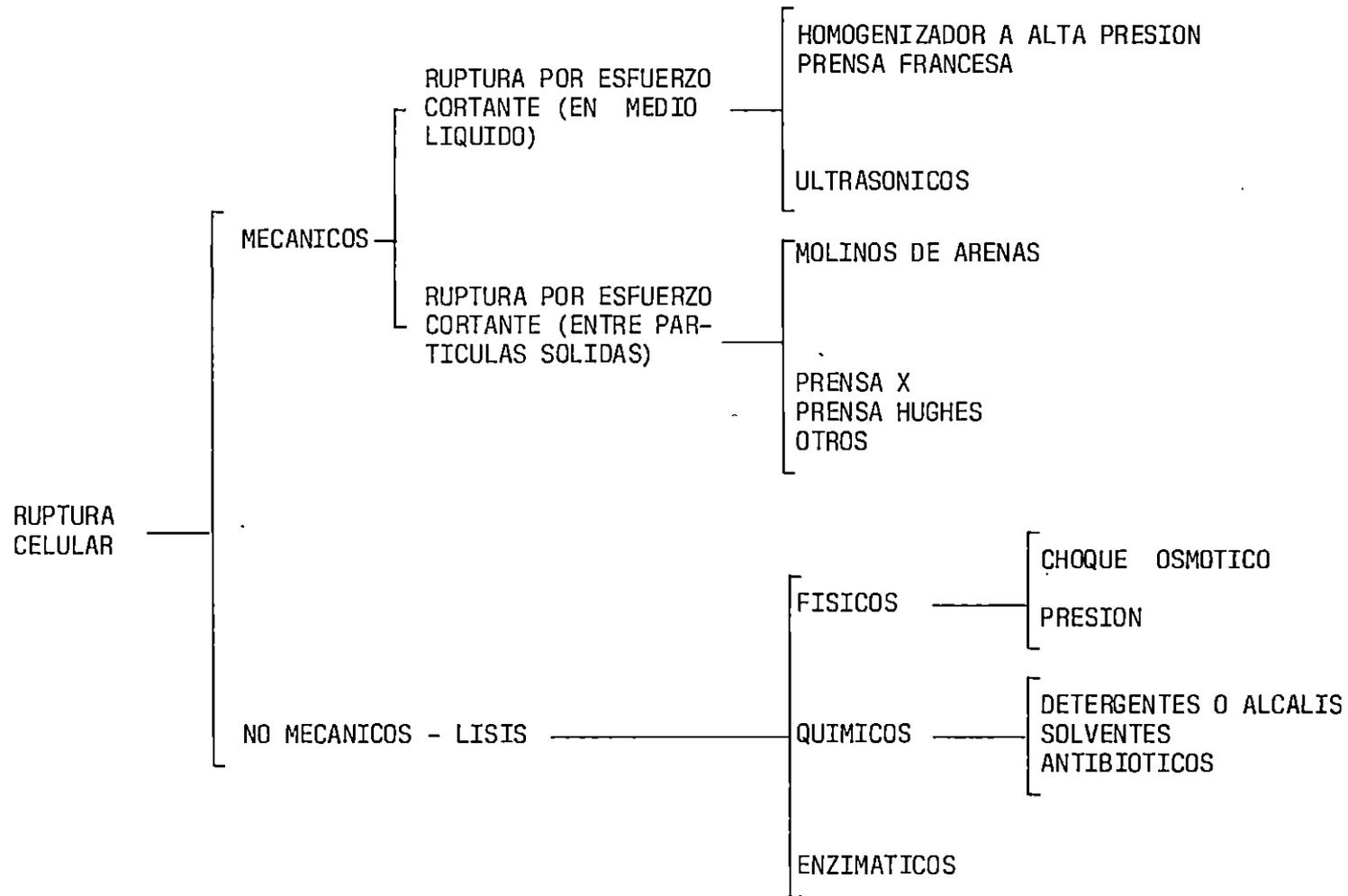


FIGURA 3.1 METODOS DE DESINTEGRACION CELULAR (Chisti et al., 1986).

experimental de este trabajo para desintegrar la pared celular de levaduras: autólisis, agitación con partículas abrasivas e hidrólisis ácida.

3.3.2.1 Autólisis

La autólisis es el proceso de autodigestión en el cual se destruyen las enzimas respiratorias y fermentativas, activándose las enzimas hidrolizantes (Jorgensen, 1959).

La autólisis ocurre entre 30 y 70°C por un período de cuatro horas o más, a un pH de 3 a 8, con agitación moderada o vigorosa y finaliza por inactivación de las enzimas a 80°C o más. Al autolisado obtenido se le ajusta el pH entre 4 a 7 con ácidos o álcalis y la mezcla resultante puede ser usada como extracto de levadura (Johnson, 1977).

Entre los productos de escisión formados durante la autólisis de la levadura se pueden mencionar sustancias nitrogenadas, vitaminas y probióticos; en esto se fundamenta el gran valor del autolisado de levadura como aditivo a los substratos nutritivos para microorganismos (Jorgensen, 1959).

A nivel industrial se emplean agentes plasmolizantes, con el fin de recortar el período de incubación, estos agentes pueden ser solventes orgánicos no polares (cloroformo, acetato de etilo, tolueno, isopropanol), o sales inorgánicas (cloruro de sodio, sulfato de amonio) (Pepler, 1970).

En 1974 Sugimoto et al., indicaron que si la levadura autolisada es utilizada en la elaboración de productos alimenticios, no es recomendable el uso de solventes. La adición de NaCl agiliza la excreción

del fluido intracelular aumentando la velocidad de autólisis; sin embargo, actúa como un inhibidor de la reacción de enzimas autolíticas y no previene de la contaminación microbiológica, debido a que se utiliza a bajas concentraciones. Sugimoto también demostró que la levadura autolisada puede emplearse en la elaboración de productos alimenticios, utilizando únicamente NaCl y etanol a bajas concentraciones entre 2-10% p/v y 1-9% v/v respectivamente.

En 1986 Godfrey et al., propusieron un procedimiento para fabricar autolisado de levadura utilizando NaCl al 3-5%, acetato de etilo o isopropanol al 0.5% v/v y enzimas proteolíticas como papaína al 0.04% p/p. Dada la composición de la pared celular de la levadura (sección 3.3.2) es recomendable el uso de la enzima quitinasa, como ayuda para la hidrólisis de los polisacáridos que la constituyen; además, la papaína por ser una proteasa podría atacar las proteínas que se encuentran en el interior de la célula que son el producto de interés (Rolz, 1992).

3.3.2.2 Agitación con partículas abrasivas

La agitación de suspensiones de microorganismos mezclados con partículas abrasivas como perlas de vidrio, arena de cuarzo y de vidrio, etc. ha sido usada en muchas ocasiones para romper paredes celulares de levadura (Wobbe, 1989; Peppler, 1979).

Existen diferentes equipos que han sido diseñados con el objeto de garantizar el mejor grado de ruptura celular, ya sea para ser utilizados a pequeña escala como el agitador de alta velocidad (VORTEXER) o gran escala como el agitador de partículas abrasivas (BEAD BEATER) u

otros molinos para manejar suspensiones coloidales (Wobbe, 1989; Peppler, 1979).

A continuación se describen algunos equipos usados a gran escala:

a) Agitador de partículas abrasivas

El desintegrador de células conocido como Bead Beater se utiliza con frecuencia a nivel industrial por la alta eficiencia de ruptura lograda en el menor tiempo posible. Con este equipo se puede obtener hasta un 95% de células rotas en tan sólo tres minutos. (ver figura 3.2).

Para la homogenización se utilizan perlas de vidrio con un diámetro comprendido entre 0.3 - 0.5 mm y de acuerdo a lo presentado en 1989 por Wobbe, la mezcla a homogenizar está formada por 1 volumen de células, por 3 volúmenes de solución tampón de ruptura y cuatro volúmenes de partículas abrasivas (Anexo C).

El tiempo óptimo de ruptura depende de varios factores entre éstos están: el tipo y tamaño de muestra a tratar, edad y resistencia de la célula, densidad celular, velocidad de homogenización, características propias del equipo, etc.

La temperatura de la mezcla incrementa 10°C por minuto, y para evitar el rápido calentamiento del equipo, la operación deberá realizarse en un cuarto frío (4°C) o en un equipo enchaquetado con circulación de agua fría (Wobbe, 1989).

Después del tratamiento las partículas abrasivas son separadas por filtración o decantación y para que puedan ser utilizadas nuevamente deberán lavarse con un buen detergente y abundante agua desti-

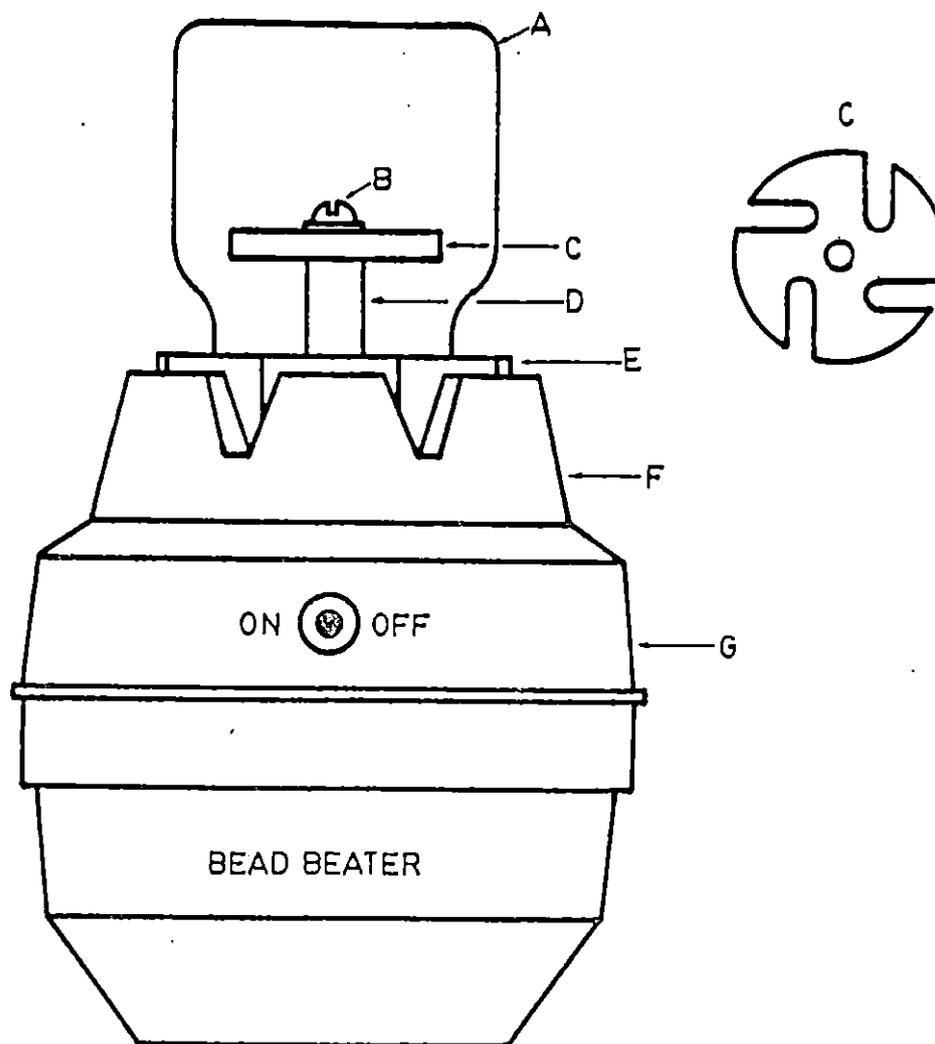


FIGURA 3.2 DIAGRAMA DE UN AGITADOR DE PARTICULAS ABRASIVAS BEAD BEATER (Biospec, 1981).

- A. Cámara de mezcla
- B. Tornillo de acero inoxidable
- C. Rotor de teflón
- D. Unidad de cojinete y eje ensamblador
- E. Base de la recámara de mezcla
- F. Anillo autoalineador
- G. Caja de motor

lada.(Biospec Products, 1981).

b) Molino de Arenas

La desintegración de células en molino de arenas es considerada como una de las técnicas mecánicas más eficientes. Diferentes diseños de molinos de arenas han sido usados para ruptura de células microbianas. Estos molinos consisten en cámaras cilíndricas que pueden ser verticales u horizontales (ver figura 3.3 y 3.4) provistas de un motor impulsador y un eje central que soporta una serie de discos centrados u otro elemento agitador. La configuración horizontal de los molinos es más eficiente que la vertical, esto se debe a que en la última el fluido fluye en forma ascendente lo cual tiende a fluidizar en algún grado la molienda con perlas (Chisti et al., 1986).

c) Molinos Vibratorios

Estos molinos son de uso general para la desintegración de células de microorganismos; pero presentan las siguientes desventajas:

1. Sólo pueden ser tratadas pequeñas cantidades de material, aproximadamente 25 ml.
2. Si se quiere obtener un porcentaje alto de ruptura se requiere de un tiempo de tratamiento largo.
3. El equipo es ineficiente para desintegrar microorganismos en soluciones concentradas de azúcar.
4. Sólo pueden ser usadas suspensiones diluidas.

Algunos autores investigaron el uso de un equipo disponible comercialmente el "SONOMEC" (ver Fig. 3.5); y encontraron que no presen-

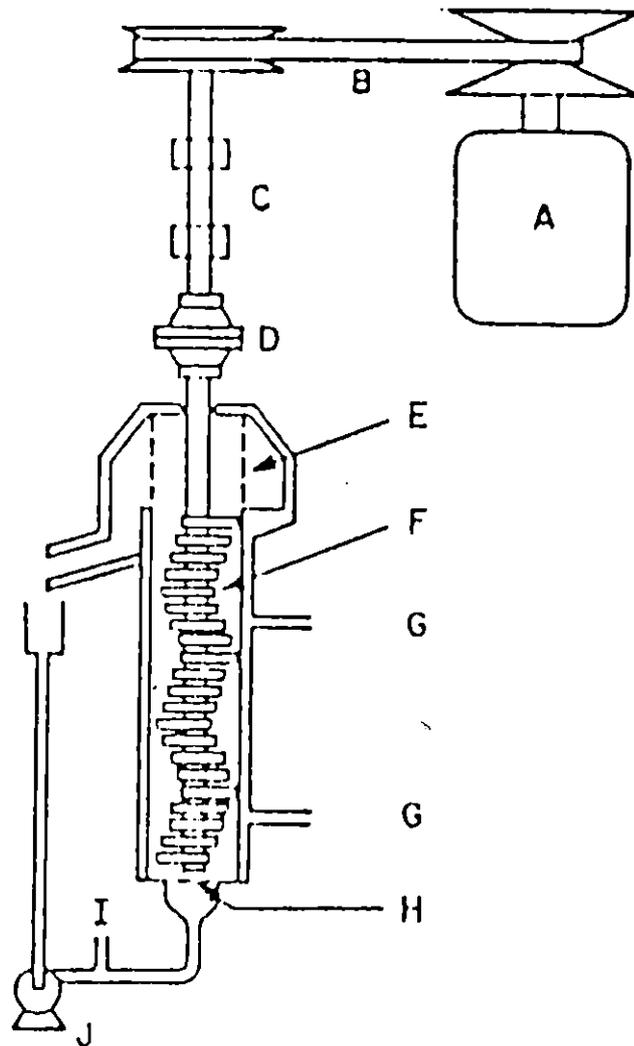


FIGURA 3.3 DIAGRAMA DE UN SISTEMA DE MOLINO VERTICAL Y AGITADOR NETZSCH MOLINEX KE5. (Chisti et al., 1986).

- | | |
|-------------------------------|--|
| A. Motor | F. Discos agitadores |
| B. Faja "V" | G. Entrada y salida a la chaqueta de enfriamiento. |
| C. Cojinetes | H. Tamiz de fondo. |
| D. Acoplamiento para agitador | I. Cavidad para medir temperatura. |
| E. Tamiz de placa cilíndrica | J. Bomba de recirculación |

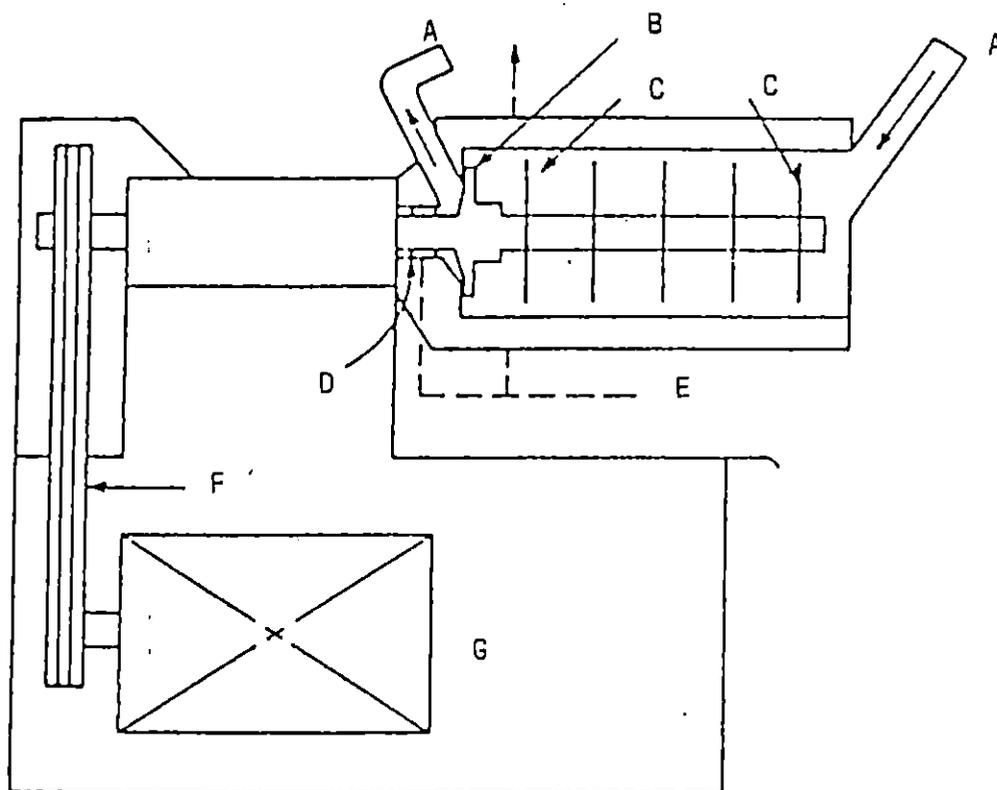


FIGURA 3.4 DIAGRAMA DE UN MOLINO HORIZONTAL DYNO.
(Chisti et al., 1986).

- A. Entrada y salida del molino
- B. Disco rotatorio
- C. Agitadores
- D. Cojinetes
- E. Enfriador
- F. Faja
- G. Motor

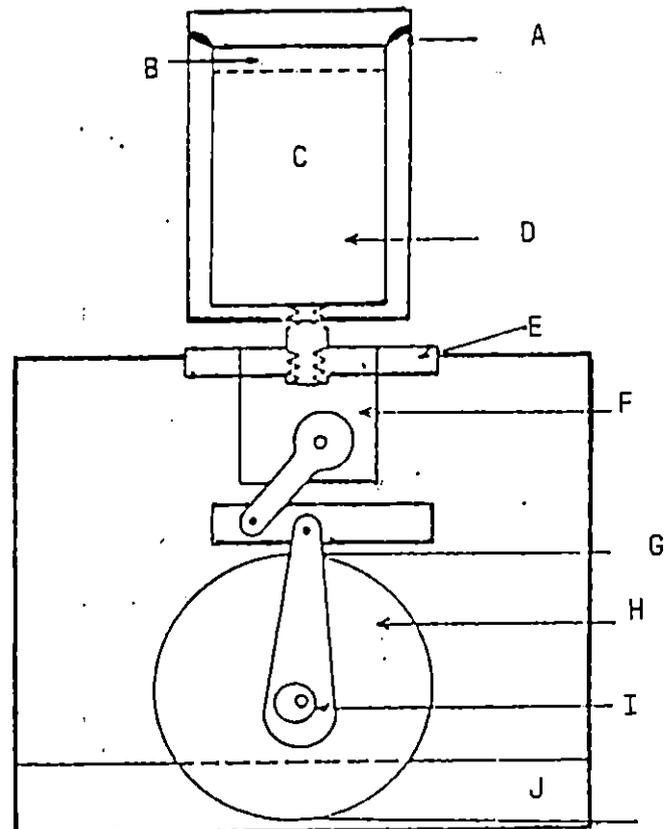


FIGURA 3.5 DIAGRAMA DE UN MOLINO VIBRATORIO TIPO SONOMEC
(Ribbons, 1971)

- | | |
|--------------------|--------------------|
| A. Empaque | F. Pistón |
| B. Espacio libre | G. Faja |
| C. Líquido | H. Volante |
| D. Recipiente | I. Leva |
| E. Cojinete poroso | J. Nivel de aceite |

taba algunas de las desventajas señaladas arriba. El Sonomec ha sido usado eficientemente para desintegrar células de levadura (Ribbons, 1971).

3.2.2.3 Hidrólisis Acida

La hidrólisis ácida es uno de los métodos más eficientes para la fabricación en grandes cantidades de extracto de levadura; sin embargo, provoca pérdidas de proteínas y vitaminas. El proceso básico involucra el calentamiento a 100⁰C de una solución de ácido clorhídrico que contenga 65-80% de levadura seca para descomponerla en aminoácidos y sus derivados, la hidrólisis se lleva a cabo manteniendo constante la relación peso-volumen entre la proteína y el ácido, para este propósito es necesario condensar el vapor de agua-ácido y devolverlo al sistema. El tiempo de calentamiento (6 a 12 horas) depende del nivel de amino nitrógeno total (ver anexo D).

Luego la suspensión se enfría y neutraliza a pH entre 5 y 6 usualmente con solución de hidróxido de sodio y el hidrolizado es centrifugado y filtrado para remover la fracción insoluble y obtener una solución clara. Finalmente, el extracto se seca al vacío hasta la concentración deseada de sólidos (Cook, 1958; Ziemba, 1967; Pepler, 1979).

3.3.3 Clarificación y presentación final del extracto

Una vez que la pared celular ha sido rota es necesario separarla de la suspensión para llevar el extracto de levadura a su presentación

final. Esto incluye las siguientes etapas:

- a) Remoción de la pared celular por medio de centrifugación y filtración.
- b) Concentración y secado por evaporación a baja temperatura.
- c) Empacado del producto final.
- d) Evaluación de la calidad del extracto de levadura.

a) Remoción de la pared celular

Una vez que la pared celular ha sido desintegrada se procede a centrifugar la suspensión durante 5 minutos a 3,800 - 7,650 rpm y a una temperatura de 4°C, para la separación de los restos de paredes celulares y células que aún se encuentran enteras (Wobbe, 1989). Este paso podrá ser repetido las veces que sean necesarias hasta remover completamente los residuos celulares. El sobrenadante contendrá el extracto crudo de levadura. El material insoluble puede ser utilizado para alimentación animal o para producir goma de levadura (glican).

Otra forma de remover la pared celular es por medio de filtración por succión utilizando papel filtro. La filtración del extracto conteniendo las paredes celulares puede hacerse en un embudo Buchner. En este procedimiento es necesario disponer de un papel filtro capaz de resistir vacío considerable y de un poro suficientemente pequeño para retener los restos celulares. El papel filtro Watman # 50, satisface este requerimiento (White, 1954).

b) Concentración y secado del extracto

Al efectuar la desintegración y separación de la pared celular,

se deja libre el contenido intracelular de las levaduras, que es el extracto líquido, luego se procede a concentrarlo. Para facilitar esta operación se puede propiciar la precipitación de las proteínas, ajustando el extracto a un pH entre 6 - 12 y la temperatura arriba de 30⁰C, separando por centrifugación la proteína precipitada (Johnson, 1977).

La concentración y secado se efectúa hasta obtener un extracto líquido concentrado, en pasta o en polvo según se requiera. Esto ha de lograrse a través de una evaporación al vacío, para reducir la temperatura de ebullición del líquido y el tiempo de calentamiento, debido a que el extracto de levadura es un producto sensible al calor.

Debe utilizarse un vacío tal que la temperatura del extracto líquido sea lo suficientemente baja entre 40 y 80⁰C, aunque algunos autores recomiendan que la temperatura no sea mayor que 55⁰C y obtener un 70-75% de sólidos (Godfrey et al, 1986), de manera que no se llegue a alcanzar niveles de deterioro de las proteínas y vitaminas en el extracto.

Otros autores recomiendan equipos y condiciones específicas para el secado del extracto de levadura, por ejemplo utilizando un secador por aspersion hasta un 4.3 - 5% de humedad o esparciendo la solución en forma de película delgada sobre una lámina de aluminio y secando con aire caliente a 40⁰C (Johnson, 1977).

Hedenskog et al., en 1973 realizaron el secado del extracto liofilizando primero la solución a una temperatura abajo de 25⁰C luego la suspensión con un 14% peso seco fue secada hasta un 94% peso seco

en secador de tambor con vapor a 150°C y por último un secado por aspersión en la que el aire entra a una temperatura de 200°C y sale a 95°C (Hedenskog et al., 1973).

c) Empaque y almacenaje del extracto de levadura

El empaque y almacenaje del extracto de levadura deben realizarse en condiciones tales que se mantenga su estabilidad y preservación después de las etapas de concentrado y secado. Varios materiales de empaque pueden ser funcionales para el extracto de levadura, el que se considera que presenta mayores ventajas para productos deshidratados como el extracto a producir, es el empackado en recipientes de estaño, ya que éste ofrece protección contra insectos, pérdida o ganancia de humedad y permite el empackado con un gas inerte (Desrosier, 1987).

Otros empaques que pueden ser muy útiles son los laminados con materiales diferentes como lo son: el laminado de aluminio y película de cloruro de polivinilideno los cuales permiten la elaboración de empaques que constituyen barreras contra la humedad, los gases y las bacterias. El empackado puede hacerse de manera automática ya que los cierres pueden sellarse al calor (Wittcoff, et al., 1987). El cloruro de polivinilideno; tiene un punto de reblandecimiento de 180°C y se descompone a 210°C , es insoluble en todos los disolventes comerciales. Por consiguiente no se usa como homopolímero sino como copolímero hasta con el 17% de cloruro de vinilo. Es químicamente inerte, tiene buena estabilidad a la luz y se autoextingue cuando arde al aire. Puede producirse en forma de fibra, extruirse en tubos

resistentes a los productos químicos y a los disolventes o moldearse, se conoce mejor como SARAN, una delgada película que es útil como material de envoltura debido a su elevada transparencia y baja transmisión de humedad (Wittcoff et al., 1987).

El extracto será almacenado en lugares fríos y secos. No se usa refrigeración porque este producto es muy higroscópico y deberá ser protegido de la humedad. Cuando no se use, deberá guardarse en recipientes herméticamente cerrados.

d) Evaluación de la calidad del extracto de levadura

Para establecer una calidad general del extracto de levadura, se realizan análisis de nitrógeno total, fibra, grasa, cenizas, humedad y carbohidratos. Para un análisis más completo pueden requerirse determinaciones posteriores de minerales, vitaminas, aminoácidos, creatina, análisis microbiológicos y evaluación de la Razón de Eficiencia Proteica (PER).

En el cuadro 3.5, se muestran los resultados de los análisis proximal y de minerales efectuados a un extracto de levadura comercial producido por la casa Sigma Chemical Company St. Louis, MO, USA., los cuales se utilizarán para comparar la calidad del extracto de levadura producido a nivel de laboratorio ya que no se dispone de normas de calidad para extracto de levadura en El Salvador y Guatemala. Además en los cuadros 3.6, 3.7 y 3.8, se presentan los requerimientos de calidad para hidrolizado de levadura procedente de la industria cervecera, el cual es utilizado en la elaboración de panecillos para la erradicación de la mosca del mediterráneo. Este

hidrolizado es producido por Bio-Serv Inc. Frenchtown, New Jersey, USA. Los resultados de los análisis químicos y microbiológico de este último podrían servir como punto de referencia para una evaluación más detallada de la calidad del extracto de levadura.

CUADRO 3.5 COMPOSICION DEL EXTRACTO DE LEVADURA COMERCIAL DE SIGMA CHEMICAL COMPANY.

ANALISIS	CONTENIDO *
Proximal	% p/p
Humedad	3.68
Proteínas	53.94
Grasa	0.00
Fibra	0.00
Ceniza	9.64
Carbohidratos	32.74
Minerales	% p/p
Calcio	0.50
Fósforo	2.06

* Análisis realizado en laboratorio de Control de Calidad La Sultana, - S.A.

CUADRO 3.6 CONTENIDO DE PROTEINA Y AMINOACIDOS REQUERIDOS PARA EL EXTRACTO DE LEVADURA COMERCIAL DE BIO-SERV INC. (Busto, 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 3.7 CONTENIDO DE VITAMINAS Y NUTRIENTES MENORES REQUERIDOS
 PARA EL EXTRACTO DE LEVADURA COMERCIAL DE BIO-SERV INC.
 (Busto, 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

CUADRO 3.8 ANALISIS MICROBIOLOGICO REQUERIDO PARA EL EXTRACTO DE LEVADURA COMERCIAL DEL BIO-SERV INC. (Busto, 1992).

ANALISIS	ESPECIFICACION
<u>Escherichia coli</u>	Negativo
<u>Salmonella</u>	Negativo
Conteo estándar en caja	Menos que 10,000/g

En el cuadro 3.9 se presentan los análisis químicos a los que será sometido el extracto de levadura a producir en la etapa experimental. En éstos se incluyen el análisis proximal y el de algunos nutrientes menores.

CUADRO 3.9 METODOS ANALITICOS EMPLEADOS PARA EVALUAR LA CALIDAD DEL EXTRACTO DE LEVADURA.

COMPONENTES	METODO
Humedad	Destilación por arrastre con tolueno
Proteínas	Kjeldahl
Cenizas	Calcinación
Grasa	Extracción directa con solvente
Fibra	Wendi (para análisis bromatológicos)
Carbohidratos	Por diferencia
Calcio	Absorción atómica
Fósforo	Absorción atómica
Hierro	Absorción atómica
Cobre	Absorción atómica
Zinc	Absorción atómica
Manganeso	Absorción atómica

CAPITULO IV

OBTENCION EXPERIMENTAL DEL EXTRACTO DE LEVADURA

La levadura residual utilizada fue proporcionada por la empresa productora de alcohol etílico, Destilería Salvadoreña, S.A., ubicada en el Km 14 1/2, carretera troncal del Norte, San Salvador. El desarrollo de la etapa experimental dió inicios con la recolección de la muestra en la destilería, seguida de tratamientos orientados a estabilizarla y favorecer la ruptura de las paredes celulares, etapas de separación y secado del extracto obtenido al cual se le realizaron análisis químicos para establecer su calidad. En la figura 4.1 se presenta el diagrama del proceso empleado a nivel de laboratorio para la obtención del extracto de levadura y los detalles de cada una de las etapas se detallan en la sección 4.1 a 4.10.

4.1 RECOLECCION, TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE LA LEVADURA

La materia prima para producir el extracto de levadura, fue recolectada en forma de crema por un obrero de la planta que se introdujo al fondo de uno de los tanques de fermentación que contenía la levadura residual, utilizando recipientes plásticos para un total de 7 galones.

Los recipientes conteniendo la crema se colocaron inmediatamente en hieleras que contenían suficiente hielo, con el objeto de preservar la crema de levadura desde la destilería hasta el lugar donde ésta fue almacenada.

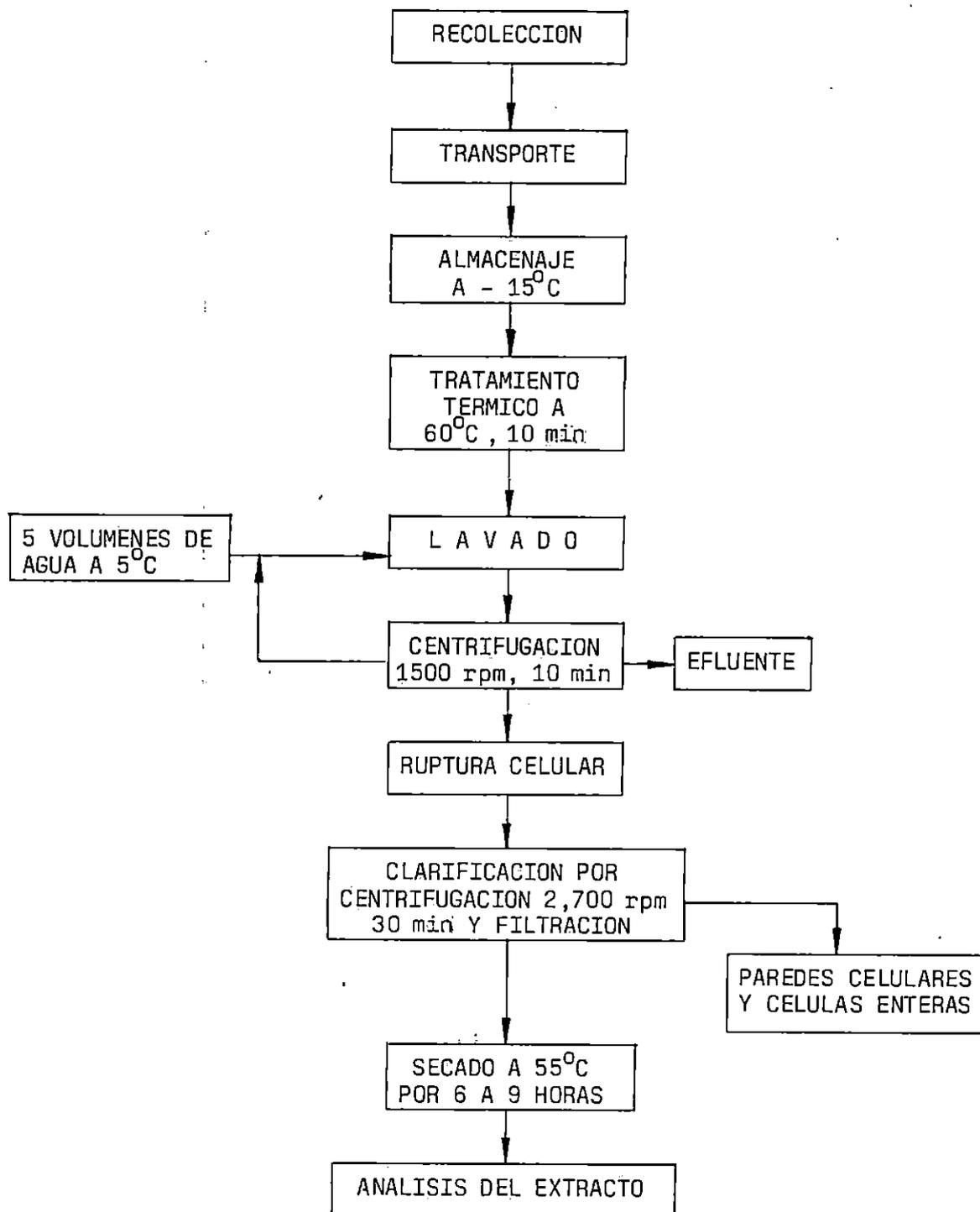


FIGURA 4.1 DIAGRAMA DEL PROCESO GENERAL DE LA PRODUCCION DEL EXTRACTO DE LEVADURA A NIVEL DE LABORATORIO.

La levadura recolectada se almacenó en congeladores de refrigeradores domésticos a una temperatura de congelación de -15°C , manteniéndose allí hasta el momento de su utilización en el laboratorio.

4.2 TRATAMIENTO TERMICO DE LA LEVADURA

El tratamiento térmico se efectuó con el propósito de inactivar las enzimas intracelulares causantes de la degradación y pérdida de 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 y permite que la acción de enzimas adicionadas en etapas posteriores sea más efectiva.

El tratamiento térmico se llevó a cabo de la siguiente manera: el mosto almacenado a -15°C se retiró del congelador y se dejó licuar a temperatura ambiente, luego fue vertido en una bandeja de aluminio. La bandeja conteniendo el mosto se colocó en un baño de agua a 70°C ; el mosto se agitó continuamente con un agitador de vidrio. Una vez el mosto alcanzó la temperatura de 60°C , se mantuvo la agitación por diez minutos más e inmediatamente se retiró del baño de agua. Luego fue vertido en un recipiente de plástico y almacenado nuevamente en el congelador a -15°C ; quedando listo para la siguiente etapa.

4.3 LAVADO Y ELIMINACION DE CONTAMINANTES

El lavado de las células de levadura tiene por objeto remover sustancias extracelulares como melaza residual, sales solubles y

microorganismos indeseables lo cual puede observarse en la figura 4.2, donde se muestra abundante presencia de bacilos distribuidos entre las células de levadura.

Inicialmente el mosto almacenado a -15°C fue descongelado y un volumen conocido de éste, se mezcló con 5 volúmenes de agua destilada a temperatura de 5°C .

Posteriormente la suspensión fue agitada en un calentador eléctrico con agitador magnético a 690 rpm por espacio de 5 minutos.

Luego las células de levadura fueron separadas centrifugando la suspensión a 1500 rpm durante 15 minutos; obteniéndose de esta manera una pasta de células de levadura más limpia y concentrada. Las operaciones de resuspensión y centrifugación fueron repetidas tres veces para remover la mayor cantidad posible de materiales contaminantes y dejar la pasta de levadura lista para la operación siguiente.

La materia seca en la pasta de levadura varía de 23.5 a 24.7% p/p esto fue determinado, desecando una muestra de pasta en una estufa a 100°C durante 6 horas hasta peso constante. La concentración de células en la pasta fue de 2.35×10^9 células/g (ver anexo "E"), la cual se determinó en una cámara de conteo de células Neubauer. El recuento se efectuó en los Laboratorios Clínicos Barrientos *.

* Urbanización La Esperanza, Av. Isidro Menéndez # 107, San Salvador.

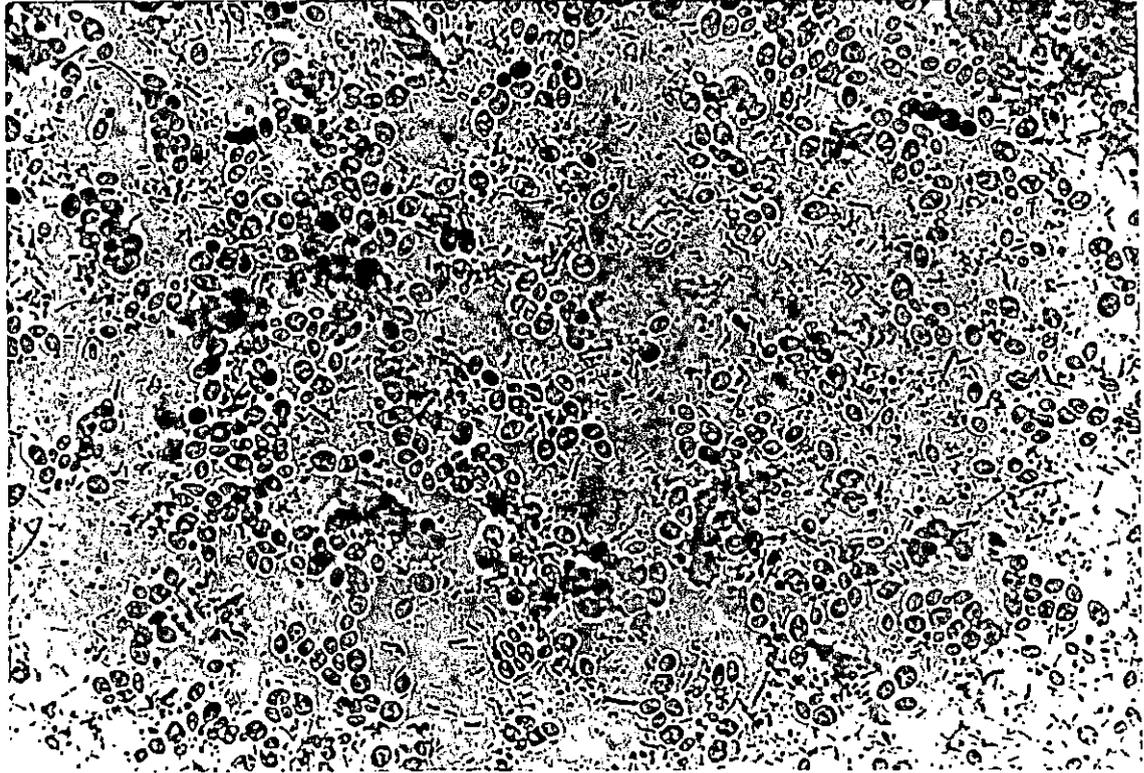


FIGURA 4.2 FOTOGRAFIA DE CELULAS DE LEVADURA Saccharomyces cerevisiae EN EL MOSTO PROCEDENTE DE DESTILERIAS. LENTE UTILIZADO 40x, COLORACION AZUL DE METILENO.

La observación microscópica realizada a frotis (utilizando lente de inmersión 100x, figura 4.3), muestra células de levadura lavadas con sus paredes celulares enteras, además se advierte la presencia de bacilos en menor proporción que la que muestra la Fig. 4.3, ésto es debido a que durante el lavado fueron parcialmente removidos de la suspensión celular.

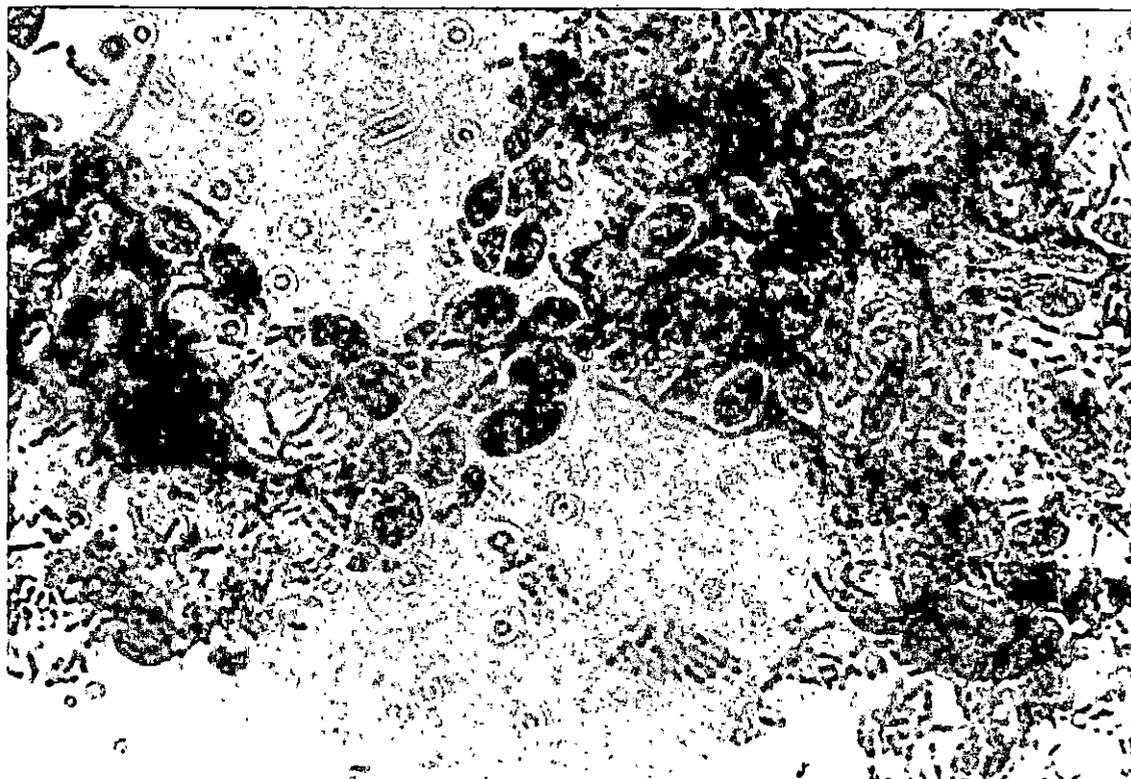


FIGURA 4.3 FOTOGRAFIA DE FROTIS DE LEVADURA ANTES DE LA RUPTURA CELULAR. LENTE UTILIZADO 100x. COLORACION CON AZUL DE METILENO.

4.4 SELECCION DEL METODO DE RUPTURA DE LA PARED CELULAR

Con el fin de lograr la producción del extracto de levadura a nivel de laboratorio se ensayaron 3 vías de ruptura de la pared celular, que fueron: ruptura por medio de hidrólisis ácida, lisado de células por un método fisicoquímico y ruptura mediante la agitación con partículas abrasivas.

a) Hidrólisis Ácida

La hidrólisis ácida se realizó tomando como guía los métodos

reportados en 1954 por White y en 1958 por Cook, 25 g de levadura lavada fueron resuspendidos en 62.5 ml de HCL 0.1N y se aforó a 100 ml con agua destilada. Luego ésta se calentó en autoclave a 121°C y 15 lb/plg² manométrica durante 30 minutos, la relación de ácido (ml) y levadura seca (g) fue de 10:1. El grado de ruptura fue de 91.3%, que se evaluó por el método de recuento directo, donde se divide el número de células rotas (células iniciales - células finales) entre el número de células antes de la operación (células iniciales), aplicando la ecuación (1).

$$\text{Grado de ruptura} = \frac{Ci - Cf}{Ci} * 100 \quad (1)$$

Donde:

Ci = Células iniciales

Cf = Células finales

b) Lisado de células

Para efectuar el lisado de la levadura se tomó como base el método descrito en 1986 por Godfrey. Se resuspendieron 60 g de levadura lavada en amortiguador de fosfatos (pH 6.2, ver anexo C) hasta completar 100 ml. Se agregaron 0.04 g de papaína, 0.35 g de NaCl y 0.5 ml de isopropanol, luego la suspensión se agitó con una varilla de vidrio para favorecer la disolución de sus componentes, a continuación la suspensión se colocó en una incubadora a 50°C durante 48 h, finalmente se elevó la temperatura hasta 67°C y se continuó la incubación por 15 h más, obteniéndose un grado de ruptura de 21.9%.

c) Ruptura mecánica

Para aplicar el método de ruptura de pared celular con agitación de partículas abrasivas se utilizó una modificación de la técnica reportada en 1989 por Wobbe. A continuación se presenta la manera en que se realizó este ensayo: 40 ml de suspensión de levadura en pasta se mezclaron con un volumen igual de partículas abrasivas de carburo de silicio de 0.3 a 0.4 mm de diámetro y posteriormente la mezcla fue agitada a 4500 rpm durante 25 minutos a temperatura ambiente. El grado de ruptura logrado fue de 41.6%.

Los detalles del equipo y su funcionamiento son presentados en la sección 4.6.

De acuerdo a los resultados obtenidos el método de hidrólisis ácida presenta un mayor grado de ruptura; sin embargo, éste causa pérdidas de proteínas y vitaminas, por lo que no es muy útil en la preparación de un extracto de levadura íntegro, que es uno de los objetivos de este estudio. El lisado muestra un bajo grado de ruptura y requiere un largo período de incubación, la agitación con partículas abrasivas muestra un grado de ruptura intermedio y un tiempo de ruptura relativamente pequeño.

Con el propósito de aumentar el grado de ruptura, sin deteriorar la integridad del contenido intracelular, se procedió a combinar el lisado de células con el método de ruptura mecánica, de tal manera que las suspensiones celulares fueron tratadas con papaína, cloruro de sodio e isopropanol antes de proceder a la ruptura mecánica. Esto debilitó y fragilizó la pared celular de las levaduras, volviéndo las más susceptibles a la desintegración por medios mecánicos.

4.5 TRATAMIENTO FISICOQUIMICO

Este tratamiento constituye un ataque por medios químicos y físicos, orientados a debilitar la fuerte estructura de la pared celular de las levaduras sin desnaturalizar el material de interés. Los agentes utilizados para este fin son:

Papaína: Por ser una enzima proteolítica hidroliza enlaces peptídicos de las proteínas que conforman la pared celular.

Cloruro de sodio: Contribuye a la plasmólisis celular ya que cuando la concentración de solutos en el medio es superior al de las células, el agua sale, las células se deshidratan y el protoplasto se colapsa.

Isopropanol: Es también un agente deshidratante y plasmolizante.

En la ejecución de esta etapa se utilizó el amortiguador de fosfato para mantener el pH constante a 6.2.

Inicialmente, 20 g de pasta de levadura fueron resuspendidos utilizando el amortiguador de fosfatos, como diluyente para completar 80 ml; luego fueron agregados a la suspensión 0.0032 g de papaína (0.04% p/p), 0.28 g de cloruro de sodio (3.5 g/L) y 0.4 ml de isopropanol (0.5% v/v), a continuación la suspensión de células fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente (26^o a 28^oC) con agitación magnética, para evitar la incorporación de polvo y otros contaminantes, el recipiente fue sellado con papel de aluminio. Una vez efectuado el tratamiento enzimático la suspensión se aforó nuevamente a 80 ml con el objeto de reponer el agua evaporada.

4.6 TRATAMIENTO MECANICO

La ruptura de la pared celular se realizó mediante la aplicación

de métodos de ruptura mecánica, para este propósito se diseñaron y construyeron un molino de arena y un homogenizador, cuyo funcionamiento básico se describe a continuación:

- a) Molino de Arenas: La acción desintegradora de este equipo sobre las células se debe a generación de impactos de baja intensidad que se producen por el choque entre partículas sólidas al ser agitadas a alta velocidad con un agitador de disco horadado en su contorno (ver figura 4.4 y anexo G).
- b) Homogenizador: Este equipo se caracteriza por crear una fuerte succión en el medio de suspensión celular, además de generar grandes fuerzas de cizalla, las cuales pueden fatigar y romper las paredes celulares (ver figura 4.5 y anexo G).

Ambos equipos se ensayaron bajo condiciones similares de operación con el objeto de establecer cual era el más efectivo para la ruptura de la pared celular.

La suspensión celular que se sometió a la ruptura mecánica es la preparada de acuerdo al tratamiento fisicoquímico especificado en la sección 4.5.

En la ruptura con el molino de arenas, se midieron 65 ml de la suspensión inicial y se mezclaron con un volumen igual de arena de carburo de silicio. El recipiente que contenía esta mezcla se colocó sobre un baño de hielo. Posteriormente la mezcla fue agitada en el molino de arenas por 75 minutos a 4,500 rpm, lográndose un porcentaje de ruptura de 67.5%.

En la ruptura con el homogenizador, se trabajó con un volumen de 300 ml de la suspensión inicial, se vertió en un recipiente de

aluminio (se optó por este material debido a su resistencia a los golpes y por facilitar la transferencia de calor durante la desintegración celular).

El recipiente conteniendo la suspensión se refrigeró por medio de un baño de hielo y se procedió con la operación de ruptura durante 75 minutos a 13,000 rpm, el grado de ruptura logrado fue 28.2%.

En el cuadro 4.1 se muestran los parámetros de operación que se controlaron y los resultados globales de comparación de ambos equipos; las lecturas de conteo de células para evaluar el porcentaje de ruptura se realizaron por duplicado.

El homogenizador ofrece la ventaja de no necesitar medios de molienda para la ruptura celular, lo que reduce la contaminación con productos provenientes del desgaste, además debido a su diseño permite procesar un volumen mayor de suspensión celular, aunque su eficiencia de ruptura es baja. En cambio el molino de arena sólo permite tratar volúmenes pequeños de suspensión celular lo cual tiene como resultado una menor producción de extracto, sin embargo es el equipo de ruptura que resultó ser más efectivo, razón por la cual se procedió a evaluar las diferentes condiciones de operación (ver sección 4.7).

Las figuras 4.6 y 4.7 son fotografías tomadas a muestras después de la ruptura de la pared celular en el molino de arenas.

En la figura 4.6, se observan aglomeraciones de productos intracelulares con células de levadura enteras señaladas por la flecha.

En la figura 4.7, se muestran fragmentos de pared celular de levaduras señaladas con flechas, también son notables los contenidos intracelulares distribuidos por todo el campo.

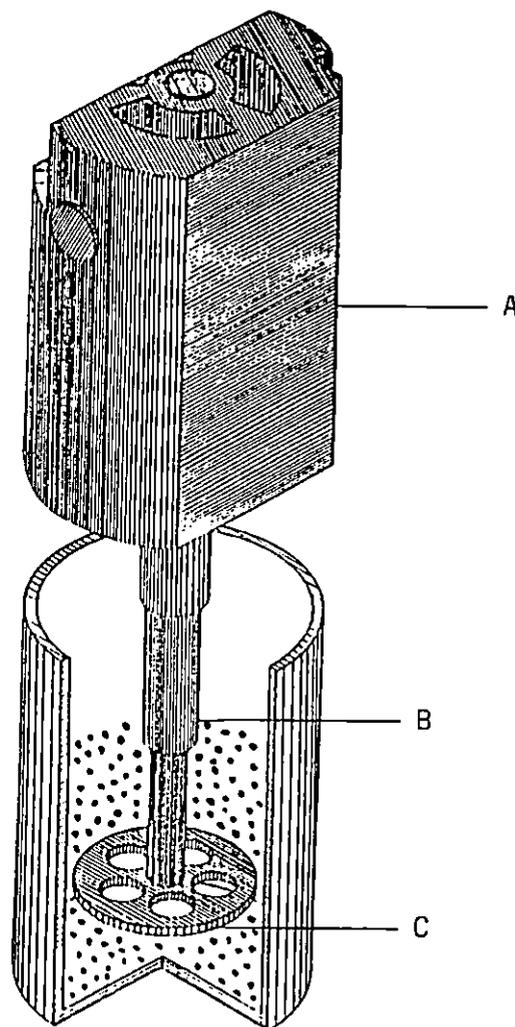


FIGURA 4.4 MOLINO DE ARENAS UTILIZADO PARA LA RUPTURA DE LA PARED CELULAR. *

A. Motor de 40 vatios, 110 voltios, 4,500 rpm.

B. Eje de acero inoxidable.

C. Disco horadado de acero inoxidable.

* Este equipo fue diseñado específicamente para realizar esta investigación y construido con la colaboración de la Unidad Productiva Metal-Mecánica de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Universidad de El Salvador, (ver diseños en anexo G).

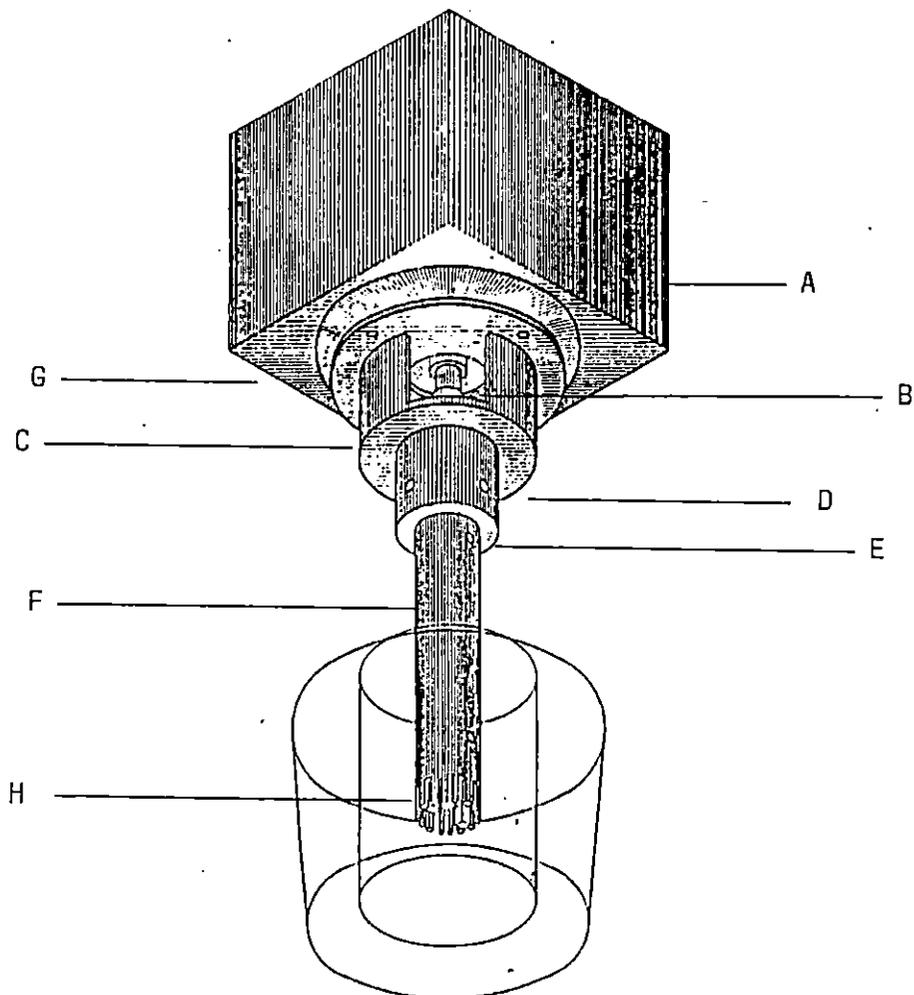


FIGURA 4.5 HOMOGENIZADOR UTILIZADO PARA LA RUPTURA DE LA PARED CELULAR. *

- | | |
|-------------------------------------|--|
| A. Motor, 390 vatios, 110 voltios | F. Generador |
| B. Ventanilla | G. Acoplador del eje del motor con el rotor del generador. |
| C. Acoplador de motor y generador. | H. Ranuras del estator del generador. |
| D. Orificio roscado para prisionero | |
| E. Orificio para lavar el generador | |

* Este equipo fue diseñado específicamente para realizar este estudio y construido con la colaboración de la Unidad Productiva Metal-Mecánica de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Universidad de El Salvador (ver diseños en anexo G).

CUADRO 4.1 COMPARACION DE TRATAMIENTOS APLICADOS PARA LA RUPTURA DE LA PARED CELULAR DE LA LEVADURA Saccharomyces cerevisiae.

PARAMETRO	MOLINO DE ARENA	HOMOGENIZADOR
Concentración de pasta de levadura % p/v	25.00	25.00
pH	6.20	6.20
Concentración de papaína (% p/p)	0.04	0.04
Tiempo de tratamiento enzimático (h)	24.00	24.00
Volumen de suspensión (ml)	65.00	300.00
Volumen de arenas (ml)	65.00	-
Velocidad (rpm)	4,500.00	13,000.00
Tiempo de agitación (min)	75.00	75.00
% de ruptura logrado	67.50	28.20

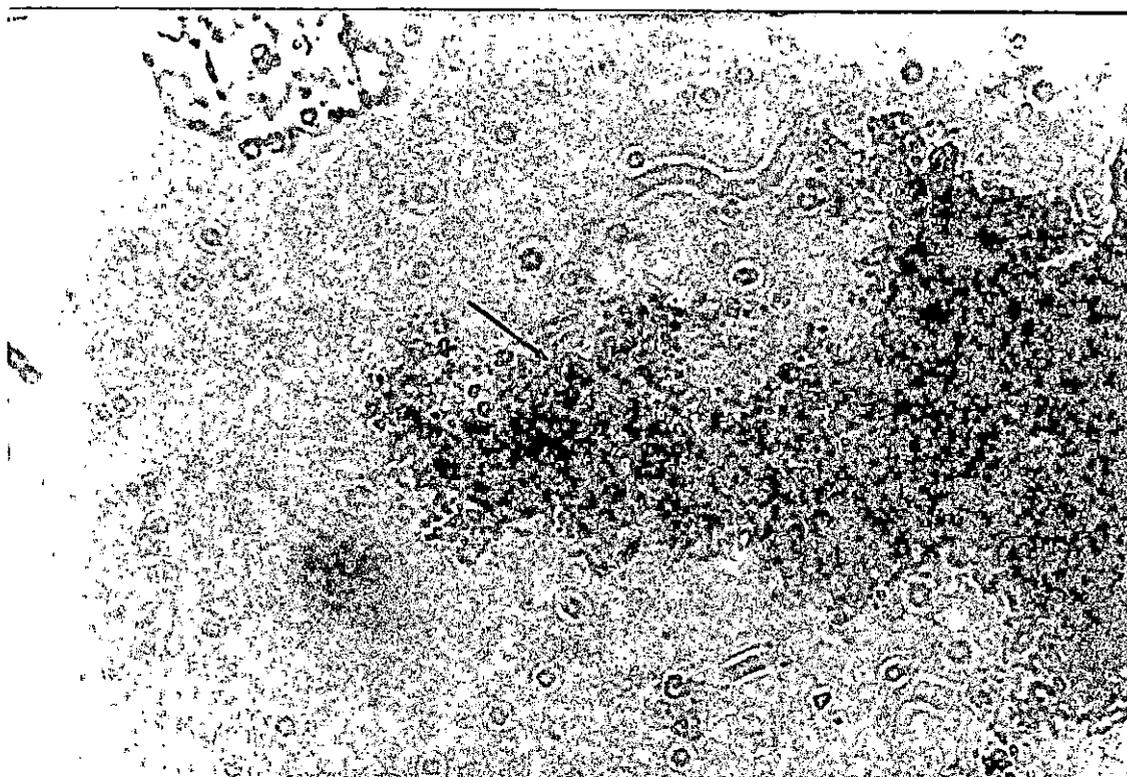


FIGURA 4.6 FOTOGRAFIA DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE LEVADURAS *S. cerevisiae* DESPUES DE LA RUPTURA CELULAR EN MOLINO DE ARENA. LENTE UTILIZADO 100x, COLORACION AZUL DE METILENO.

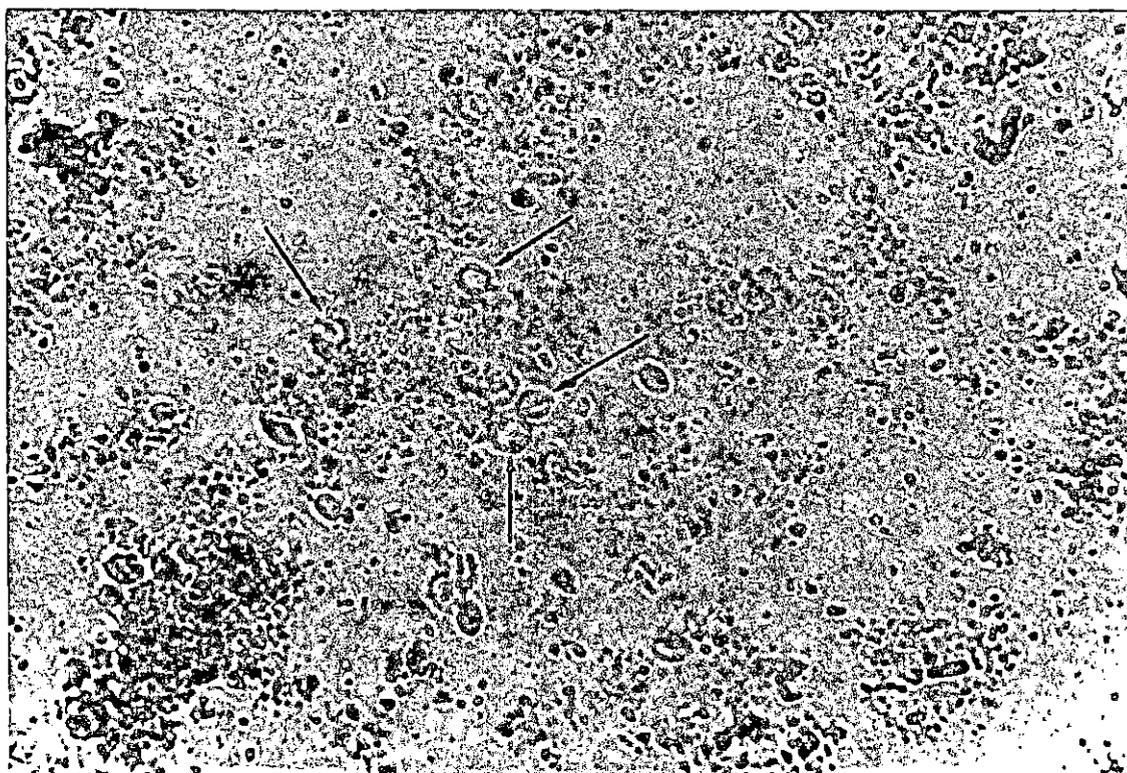


FIGURA 4.7 FOTOGRAFIA DE FRAGMENTOS DE PARED CELULAR DE LEVADURA *S. cerevisiae* DESPUES DE LA RUPTURA CELULAR EN MOLINO DE ARENA. LENTE UTILIZADO 40x, COLORACION AZUL DE METILENO.

4.7 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE LEVADURA Y EL TIEMPO DE AGITACION

Después de comparar el grado de ruptura celular obtenido por los métodos mecánicos, se seleccionó la agitación con partículas abrasivas para establecer rangos de concentración de levadura y el tiempo de agitación en los cuales el grado de ruptura fuera mayor.

El efecto de la concentración de levadura en la ruptura celular se evaluó por medio de corridas en las cuales se utilizaron suspensiones de levadura en concentraciones de 25,50 y 70% p/v. Las condiciones de operación y los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 4.2.

CUADRO 4.2 EFECTO DE LA CONCENTRACION EN LA RUPTURA CELULAR CON MOLINO DE ARENA.

PARAMETRO	MAGNITUD
pH	6.2
Volumen de suspensión celular (ml)	80.0
Medio de molienda (ml)	80.0
Tamaño de partículas abrasivas (mm)	0.3-0.4
Velocidad del agitador (rpm)	4,500.0
Diámetro del agitador (mm)	38.1
Tiempo de agitación (min)	60.0
Temperatura (°C)	5.0
Concentración de levadura (% p/v)	% de ruptura
25	63.2
50	74.9
70	49.2

Como se puede observar en el cuadro 4.2, el mayor grado de ruptura se logró al utilizar una concentración del 50% de levadura en pasta. Debido a que la levadura en pasta tenía el 74.8% p/p de humedad, el contenido total de levadura seca fue de 12.5% p/v, que se encuentra dentro del rango de operación recomendado para equipos similares (Biospec, 1981), en los cuales se utilizan concentraciones hasta del 15% p/v de materia seca.

Los resultados experimentales mostraron que la eficiencia en la ruptura celular con el molino de arenas se ve favorecida con el incremento de la concentración celular, sin embargo concentraciones muy altas reducen la eficiencia de la operación, por lo que se recomienda un rango de concentración de 12.5 a 15% p/v de levadura seca como punto de partida para la optimización del proceso en estudios futuros.

A continuación se evaluó, el efecto del tiempo de agitación en la ruptura celular con el molino de arena. Para esto se tomó como punto de partida el grado de ruptura obtenido al agitar durante 60 min una suspensión con el 50% p/v de pasta de levadura. Los tiempos de agitación ensayados fueron de 80 a 100 min. Las condiciones de operación y los resultados experimentales se muestran en el cuadro 4.3.

Los resultados experimentales muestran que el grado de ruptura aumentó a 80.2% después de 80 min de agitación y a tiempos mayores que éste, no se observó mejoría en el grado de ruptura. Esto indica que el tiempo de agitación óptimo se halla en el rango de 60 a 80 min. Cabe mencionar que la eficiencia del molino de arena que se construyó puede ser mejorada si se utilizan partículas abrasivas de forma esféri-

CUADRO 4.3 EFECTO DEL TIEMPO DE AGITACION EN LA RUPTURA CELULAR CON MOLINO DE ARENA.

PARAMETRO	MAGNITUD
pH	6.2
Volumen de suspensión celular (ml)	80.0
Concentración de levadura (% p/v)	50.0
Medio de molienda (ml)	80.0
Tamaño de partículas abrasivas (mm)	0.3-0.4
Velocidad del agitador (rpm)	4,500.0
Diámetro del agitador (mm)	38.1
Temperatura (°C)	5.0
Tiempo de Agitación (min)	% de Ruptura
50	74.8
80	80.2
100	79.8

ca, tal como lo emplean equipos similares dotados con este tipo de medios de molienda que logran hasta el 95% de ruptura celular (Biospec, 1981).

4.8 CLARIFICACION DEL EXTRACTO DE LEVADURA

Después de la ruptura celular, el contenido del molino de arena se vertió sobre un cedazo y las partículas abrasivas fueron separadas del extracto producido. Luego las partículas retenidas en el cedazo se lavaron con agua destilada para completar la recuperación del extracto en forma acuosa.

A continuación se procedió a clarificar el extracto producido con el objeto de separar los restos celulares, células enteras y otros sólidos insolubles, para tal propósito el extracto fue centrifugado a 2700 rpm (1500 x g) durante 30 min a temperatura ambiente. Sin embargo para asegurar la integridad del producto y obtener un mayor grado de clarificación es recomendable realizar la centrifugación en cuarto refrigerado a 4°C, si no se dispone de centrífuga refrigerada. Además, para acortar el tiempo de 5 a 6 min es necesario utilizar velocidades de centrifugación de 3,800 a 7,600 rpm (3,000 a 12,000 x g).

Debido a que la centrífuga utilizada en el presente estudio tenía una capacidad máxima de 2,700 rpm la centrifugación fue complementada con filtración en un embudo Buchner utilizando como medio filtrante papel Watman # 50, luego se prosiguió con la etapa siguiente de secado.

4.9 SECADO DEL EXTRACTO DE LEVADURA

Para la presentación final del extracto de levadura se eligió la forma deshidratada, porque ésta ofrece mayor estabilidad al producto, ya que existe menos riesgo de contaminación microbiológica que una presentación húmeda. El tipo de secado por aspersión es el sugerido para este caso, o el secado por evaporación al vacío a una temperatura que no exceda de los 55°C ; pero por limitaciones de equipo adecuado, se hizo lo siguiente:

Se sometió una muestra de 500 ml de extracto líquido clarificado, a un período de secado de 6 a 9 horas en una estufa a una temperatura de 55°C , obteniéndose 1.91 gramos de extracto seco color café, que representa el extracto deshidratado producido, lo cual dió un rendimiento de 0.19 gramos de extracto seco por gramo de levadura seca (ver anexo "F"). Para favorecer la evaporación del agua, el extracto acuoso se depositó en bandejas de aluminio, debido a que éstas ofrecían una mayor área de transferencia de calor y masa, ésto contribuyó a reducir el tiempo de calentamiento y por consiguiente pérdidas por desnaturalización térmica.

Después de varias corridas se observaron picaduras en el fondo de las bandejas de aluminio, lo cual evidenció el desarrollo de procesos corrosivos durante el secado. Las causas de estos procesos fueron la humedad del ambiente dentro de la estufa, el pH ácido del extracto acuoso y la temperatura de secado.

Para evitar que los productos de corrosión se incorporen al material que se está secando y modifiquen su composición química, es nece-

sario que los materiales utilizados en el equipo de secado cumplan los siguientes requerimientos: resistencia a la temperatura de secado (55°C), resistencia a ambientes ácidos y húmedos, alto coeficiente de transferencia de calor y no deben ser tóxicos.

4.10 CALIDAD DEL EXTRACTO DE LEVADURA

Para evaluar la calidad del extracto de levadura producida a nivel de laboratorio fue necesario conocer los principales componentes de interés que son: humedad, grasa, proteínas, fibra, cenizas y carbohidratos. El análisis de todos estos constituyentes se conoce como análisis proximal.

En el desarrollo de esta etapa se utilizó el análisis proximal como medio de comparación entre el extracto producido y un extracto de referencia. El extracto de levadura tomado como referencia fue calidad reactivo, de la casa Sigma Chemical Company. Los análisis fueron realizados por la Unidad de Química de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador y por el laboratorio de control de calidad La Sultana, S.A., ubicado en el Plan de La Laguna, Antiguo Cuscatlán, La Libertad. El primer análisis proximal efectuado al extracto producido, m 1 * (ver cuadro 4.4) mostró un contenido elevado de cenizas, razón por la cual se optó por repetirlo, sin embargo, se puede notar que el segundo análisis también apuntó un contenido de cenizas mayor que el de la levadura residual, esto indica que durante el proceso de producción, materia inorgánica (minerales) se incor-

* Las muestras de extracto de levadura sometida a análisis se identifican como m1, m2.

poró al extracto de levadura. Con el objeto de identificar el origen de estos minerales se analizaron algunos de los componentes de las cenizas tales como: hierro, manganeso, cobre, fósforo y calcio sin embargo éstos solamente conforman una pequeña porción del total de cenizas por lo que se requiere de un análisis más exhaustivo que incluye sílice, aluminio, zinc y otros para identificar el constituyente mineral que se encuentra en mayor cantidad. Debido a limitaciones de equipo, reactivos y tiempo, estos análisis no se llevaron a cabo por lo que solamente se señalan los principales factores causantes del incremento en las cenizas durante el proceso de producción:

- a. El desgaste del disco agitador fabricado de acero inoxidable, el cual sufrió una pérdida en peso de 0.2 g en una hora de funcionamiento por lo que será beneficioso al proceso si es sustituido por otro fabricado con teflón del grado de dureza adecuado.
- b. El desgaste de las partículas abrasivas (carburo de silicio) utilizadas como medio de molienda. Este desgaste puede minimizarse si se emplean partículas de vidrio de forma esférica.
- c. Los productos de la corrosión durante la etapa de secado, en la cual fue notable la formación de picaduras en las bandejas de aluminio utilizadas para el secado del extracto.
- d. Sales añadidas durante el proceso para el control de pH, tal como fosfato de sodio.

El cuadro 4.4 muestra que el extracto producido a nivel de laboratorio tiene un contenido de extracto etéreo y fibra cruda menor que

el 1% que son valores aceptables comparado con el extracto patrón que presentó cero contenido en ambos componentes. También en relación al nivel de carbohidratos en el extracto producido y en el extracto patrón fueron similares, con un 34.29% para el primero y un 32.74% para el segundo, es decir sólo una diferencia menor que el 2%.

Los análisis muestran también que el extracto producido a nivel de laboratorio tiene de 12 a 15% de proteína, que representa alrededor de 1/4 del contenido de proteína del extracto patrón.

La diferencia en el contenido proteico del extracto producido en comparación con la levadura residual utilizada como materia prima y el extracto patrón se debe a que por ser magnitudes porcentuales cuando un componente (ceniza) sufre un incremento el porcentaje de los demás (proteína), se ve afectado en forma inversa, o sea que experimenta un decremento en su valor porcentual.

La calidad de la proteína contenida en el extracto podrá ser evaluada mediante la Razón de Eficiencia Proteica (PER). Cabe mencionar que las operaciones involucradas en el proceso fueron seleccionadas con el propósito de obtener un extracto de levadura íntegro a pesar de las limitaciones de equipos. Además se evitaron condiciones de operación que causaran la desnaturalización y el deterioro del contenido proteico durante el proceso, tales como: valores extremos de pH y temperatura. También fue removida la mayor cantidad de humedad con el objeto de proporcionar mayor estabilidad al extracto de levadura producido.

CUADRO 4.4 ANALISIS QUÍMICOS DE LA LEVADURA RESIDUAL Y DEL EXTRACTO OBTENIDO EXPERIMENTALMENTE.

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

OBSERVACIONES

1. Para la producción de extracto de levadura se puede partir de levadura sembrada y cosechada particularmente para este propósito, o puede utilizarse levadura residual de destilería y cervecería. En el presente estudio se trabajó con la levadura residual de destilería por ser un desecho que produce una contaminación a los cuerpos de agua aproximadamente de 25,000 mg/L en demanda bioquímica de oxígeno (DBO).
2. De las muestras de crema de levadura recolectada, se hicieron observaciones microscópicas que mostraban una contaminación microbiológica con bacilos, que es una contaminación frecuentemente encontrada en este tipo de cultivo.
3. Después de cada ensayo en el molino de arena se advertía un desgaste en el agitador y una disminución del tamaño de una fracción de partículas abrasivas.
4. Después de agregar la enzima a la suspensión se hicieron observaciones microscópicas, que mostraban un hinchamiento de las células de levaduras, indicando la fragilización de la pared celular.
5. El molino de arena construido para la ruptura de la pared celular fue diseñado y construido en el país con materiales nacionales, lo cual puede facilitar el escalamiento futuro de este equipo.

CONCLUSIONES

1. En la ruptura de la pared celular de la levadura en el laboratorio pueden utilizarse métodos físicos, químicos y mecánicos o combinación de éstos, su elección depende de diversos factores tales como el componente intracelular de interés y el uso que se le dará al extracto.
2. Los métodos ensayados para producir extracto de levadura así como el tiempo de operación y el rendimiento fueron: hidrólisis ácida, 30 min, 91.3%; lisado fisicoquímico, 63 h, 21.9%; agitación con partículas abrasivas, 25 min, 41.6%; este último presentó un mayor grado de ruptura en un tiempo relativamente corto por lo que se demostró que este método mecánico ofrecía mayores ventajas para ser utilizado en la ruptura celular. Cabe mencionar que el principio de funcionamiento de este equipo es muy similar al de otros utilizados a nivel experimental como el Bead Beater y a nivel industrial como el Netzsch Molinex KE5 y el DYNQ.
- 3 El método de hidrólisis ácida puede ser aplicable en cualquier escala cuando se requieren grandes cantidades de producción de extracto, donde los componentes de interés sean las proteínas y no las vitaminas.
4. Se ensayaron combinaciones de métodos tales como: homogenización con lisis fisicoquímica y agitación con partículas abrasivas más lisis fisicoquímica. Estos ensayos mostraron que la operación de

agitación con partículas abrasivas resultó ser más eficiente que la homogenización, pues a condiciones similares de operación, para el molino de arenas se obtuvo un 67.5% y para el homogenizador un 28.2% de células rotas.

5. La temperatura más apropiada para el proceso de obtención de extracto de levadura por medios mecánicos es de 4°C. A esta temperatura se inhibe el desarrollo de microorganismos indeseables, se retardan reacciones de enzimas endógenas que pueden llegar a degradar el contenido intracelular y se evita la desnaturalización térmica causada por el calentamiento generado por la fricción y por las fuerzas de cizalla durante la operación de ruptura celular.
6. Las suspensiones de levaduras sometidas a la ruptura celular se ajustaron con un amortiguador de fosfatos a un pH de 6.2 por ser éste el óptimo para el tipo de enzima utilizado en el tratamiento fisicoquímico y porque a pH neutros o alcalinos algunas vitaminas del complejo "B" se desnaturalizan.
7. Para evaluar el efecto de la concentración de levadura en la ruptura celular con el molino de arena, se utilizaron concentraciones de 25, 50 y 70% p/v y se encontró que a una concentración del 50% el grado de ruptura fue mayor, obteniéndose el 74.9% de células rotas. A una concentración de 70% el grado de ruptura disminuyó hasta el 49.2%. Esto indicó que suspensiones que contienen excesiva cantidad de material orgánico disminuyen la eficiencia de los impactos de baja intensidad entre las partículas abrasivas

del molino de arenas.

8. La evaluación del tiempo de agitación indicó que el porcentaje de ruptura en el molino de arena aumenta con el tiempo de agitación, pero a partir de 80 min hacia tiempos mayores de agitación no hay incrementos apreciables en el porcentaje de ruptura.
9. Del proceso desarrollado para la fabricación de extracto de levadura en el que se combinaron los métodos de lisis fisicoquímica y agitación con partículas abrasivas, se obtuvo un rendimiento de 0.19 gramos de extracto seco por gramo de levadura seca.
10. El extracto obtenido a nivel de laboratorio fue de color café claro, el cual se adhería fuertemente a las paredes de las bandejas de secado, éste se secó entre un 4 y 8% de humedad, obteniéndose un producto que pudo molerse hasta polvo fino, que era muy higroscópico, con un olor característico a condimento y un leve olor a melaza propio del medio donde fue crecida la levadura usada como materia prima.
11. El extracto de levadura producido presentó entre el 25 y 45% de contenido de cenizas, mientras que en la levadura utilizada como materia prima fue de 13.73%, esto indica que en el proceso de producción del extracto fueron incorporados materiales inorgánicos, provenientes del desgaste del agitador, las partículas abrasivas, productos de la corrosión y sales adicionadas durante el proceso.
12. El bajo porcentaje en el contenido de proteínas indicado por el

análisis proximal en el extracto producido a nivel de laboratorio se debe a que por ser magnitudes porcentuales cuando un componente (cenizas) sufre un incremento el porcentaje de las demás (proteínas), se ve afectado en forma inversa, o sea experimenta un decremento en su valor porcentual.

RECOMENDACIONES

1. Debido a la naturaleza y a la composición en quitina de la pared celular de la levadura es necesario hacer ensayos con la enzima quitinasa en la etapa de tratamiento fisicoquímico, con el fin de obtener mejores resultados en el debilitamiento de la pared celular.
2. Para aumentar la eficiencia del molino de arena y mejorar la calidad del extracto se deben utilizar velocidades de agitación del orden de 4,500 a 23,000 rpm, además deben utilizarse partículas de vidrio de forma esférica con un diámetro de 0.45 a 0.55 mm; también es conveniente fabricar el agitador en teflón macizo en lugar de acero inoxidable para evitar la contaminación del extracto con este metal debido a su desgaste.
3. Debido a que las levaduras podrían sufrir cambios en su contenido proteico y de vitaminas durante el almacenaje es recomendable efectuar un control de calidad antes y durante su almacenaje en forma periódica. Esta información servirá para evaluar las condiciones de refrigeración y establecer el tiempo de vida útil de la materia prima.
4. Las pérdidas de vitaminas en el proceso de producción pueden evitarse manteniendo el pH en un rango entre 5 y 7, utilizando bajas temperaturas en el proceso especialmente en las etapas de ruptura y secado así como la utilización de sales y solventes que no causen deterioro.

5. Optimizar condiciones de operación para la ruptura celular con el molino de arenas, tales como: concentración de levadura seca (1.5 a 15% p/v), tiempo de agitación (60 a 80 min), relación de partículas abrasivas a volumen de suspensión celular y velocidad de agitación.
6. Hacer un diseño estadístico con el fin de evaluar el método más apropiado para el conteo de células iniciales y finales para una mayor confiabilidad en la evaluación del grado de ruptura.
7. Los equipos construidos para este trabajo no sólo pueden servir para producir extracto de levadura a nivel de laboratorio si no que pueden ser utilizados como medio didáctico en la enseñanza de operaciones de agitación y mezcla, aprovechamiento de componentes intracelulares, etc.
8. Si el extracto de levadura se produce con fines de uso en alimentación humana deberán hacerse pruebas de toxicidad para establecer si hay presencia de sustancias perjudiciales a la salud, además, el extracto deberá ser procesado para eliminar o reducir el contenido de ácidos nucleicos a niveles aceptados para consumo humano.
9. Una vez que se ha provocado la ruptura de la pared celular el extracto de levadura deberá ser protegido de la luz durante las etapas siguientes, porque vitaminas del complejo B tal como la riboflavina son sensibles y se deterioran rápidamente por la acción directa de la luz solar o artificial.

REFERENCIAS

- AGUILAR, L., Entrevista personal, Gerente de Producción, Destilería Salvadoreña, S.A., El Salvador, Septiembre, (1991).
- BALMACEDA, E., C.K. Rha, "RATE OF COAGULATION OF SINGLE CELL PROTEIN CONCENTRATE", Biotechnol. Bioeng., Vol. 15, 4, 819-820, USA, (1973).
- BIOSPEC Product, "BEAD BEATER", Septiembre 1, OK, USA, (1981).
- BROWN, G. et al., "OPERACIONES BASICAS DE LA INGENIERIA QUIMICA", 1ª Edición, Editorial Marín, S.A., España, (1965).
- BUSTO, E., Entrevista personal, Sub-Gerente General, COLTEC, Guatemala, (1992).
- AYRES, G.H., "ANALISIS QUIMICO CUANTITATIVO", 2ª Edición, Harla, S.A. de C.V., México, D.F., (1970).
- CABRERA, S. de, et al., "MEMORIAS DEL TERCER SIMPOSIO PANAMERICANO DE COMBUSTIBLES Y PRODUCTOS QUIMICOS VIA FERMENTACION, AVANCES EN LA PRODUCCION DE ETANOL": Seminario realizado por el Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI), Guatemala, (1983).

CABRERA, S. de; C. Rolz, "LA LEVADURA COMO FUENTE DE PROTEINA". Resumen del trabajo presentado en el Seminario sobre el Enriquecimiento de Alimentos Tradicionales con Proteína de Origen Vegetal. OEA-COLCIENCIAS, 186-213, Mayo 1-6, Bogotá, Colombia, (1977).

CAÑAS, C.G., "RECONVERSION EQUIVALE A REDUCIR LA CONTAMINACION", Diario El Mundo, Agosto 2, El Salvador, (1990).

COOK, A.H., "THE CHEMISTRY AND BIOLOGY OF YEASTS". Academic Press Inc. N.Y., USA, (1958).

CUNNINGHAM, S.D., et al., "RUPTURE AND PROTEIN EXTRACTION OF PETROLEUM GROWN YEAST", J. Food Sci, Vol. 40, 4, 732-735, (1975).

CHISTI, Y., M. Moo-Young. "DISRUPTION OF MICROBIAL CELLS FOR INTRACELLULAR PRODUCTS". Enzyme and Microbial Technology, Vol. 8, 4, 194-204, (1986).

DESROSIER, N.W., "CONSERVACION DE ALIMENTOS". Traducción 2ª Edición en Inglés, Editorial Continental, S.A. de C.V., México, D.F., (1987).

EGAN, H., et al., "ANALISIS QUIMICO DE ALIMENTOS DE PEARSON", 1ª Edición, Editorial Continental, S.A. de C.V., México, D.F., - (1987).

ESTEVEZ, M., Entrevista Personal, Jefe del Depto. de Suministro. Dirección General de Estadísticas y Censo. San Salvador, Diciembre (1991).

EGAÑA, et al., "COMPOSICION QUIMICA DE LOS RESIDUOS DE DESTILERIA DE ALCOHOL Y EVALUACION BIOLOGICA EN RATAS Y AVES", Estudio científico, Vol. 29, Nº 3, Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP), Guatemala, (1979).

FINAR, I.L., "QUIMICA ORGANICA", 2ª Edición en español, Volumen 2, Editorial Alhambra, S.A., Madrid, España, (1970).

GODFREY, T., J. Reichelt, "INDUSTRIAL ENZYMOLOGY: THE APLICACION OF ENZYMES IN INDUSTRY", The Nature Press, England, (1986).

HEDENSKOG, G., H. Mogren, "SOME METHODS FOR PROCESSING OF SINGLE CELL PROTEIN", Biotechnol. Bioeng., Vol. 15, 1, 129-142, (1973).

JOHNSON, J.C. "YEAST FOR FOOD AND OTHER PROPOSES". Food Technology Review Nº 45, 143-181 (1977).

JORGENSEN, H., "MICROBIOLOGIA DE LAS FERMENTACIONES INDUSTRIALES", 7ª edición, Editorial Acribia, Zaragoza, España, (1959).

KRETZSCHMAR, H. "LEVADURAS Y ALCOHOLES Y OTROS PRODUCTOS DE LA FERMENTACION", 1ª Edición, Editorial Reverté, México, (1961).

LYNCH, et al., "MÉTODOS DE LABORATORIO", 2ª Edición, Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V., México, D.F., (1985).

Ministerio de Comercio Exterior (MICE). Reportes de Importación. Banco Central de Reserva de El Salvador, (1987-1990).

MURRAY, R.G.E., et al., "MANUAL OF METHODS FOR GENERAL BACTERIOLOGY" American Society for Microbiology, Washington, D.C., (1981).

ORANTES, G., J.E., "PRODUCCION DE ALCOHOL ETILICO UTILIZANDO MEZCLAS MELAZA Y VINAZA COMO SUBSTRATO", Trabajo de Graduación para optar al Título de Ingeniero Químico, Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Universidad de El Salvador, (1987).

PEPPLER, H.J., D. Perlman, "MICROBIAL TECHNOLOGY", 2nd. Ed., Academic Press, Inc., N.Y. USA, (1979).

PERRY, R.H., C.H. Chilton, "MANUAL DEL INGENIERO QUIMICO". Traducción 5ª Edición en Inglés, McGraw-Hill, Bogotá, Colombia, (1982).

RIBBONS, N., "METHODS IN MICROBIOLOGY", Academic Press Inc. N.Y. USA, (1971).

ROLZ, C., Entrevista Personal, Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI), Guatemala, (1992).

SCOPES, R.K., "PROTEIN PURIFICATION", 2nd. Ed., Springer Verlag Inc., N.Y. USA, (1982).

SHARPE, P.T., "METHODS OF CELL SEPARATION", Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands, (1988).

SMITH, R.E., "THE ALCOHOLIC FERMENTATION OF MOLASSES", Thesis Submitted for the degree of Doctor of Engineering, Century University, California, Beverly Hills, (1989).

SOLOMONS, G.L., "MATERIALS AND METHODS IN FERMENTATION", Academic Press Inc. N.Y. USA, (1969).

STROBECKER, R., et al., "ANALISIS DE VITAMINAS", 1ª Edición, Editorial Paz Montalvo, Madrid, España, (1967).

SUGIMOTO, H., "SYNERGISTIC EFFECT OF ETHANOL AND SODIUM CHLORIDE ON AUTOLYSIS OF BAKER'S YEAST FOR PREPARING FOOD GRADE YEAST EXTRACTS", J. Food Sci., Vol. 39,5,939-942, USA, (1974).

WHITE, J., "YEAST TECHNOLOGY", 1ª Edición, John Wiley and Sons, N.Y. USA, (1954).

WITTCOFF, A.H., B.G. Reuben, "PRODUCTOS QUIMICOS ORGANICOS INDUSTRIALES", 1ª Edición, Vol. 2, Editorial Limusa, S.A. de C.V., México, D.F., (1987).

WOBBE, C.R., "PREPARATION OF PROTEIN EXTRACT FROM YEAST", Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, 1-9, USA, (1989).

ZIEMBA , J.V., "TAILORED HYDROLYSATES: HOW MADE, HOW USED", Food Eng. Vol. 19, 1, 82-85, USA, (1967).

A N E X O S

ANEXO "A"



PRODUCCION ESTIMADA DE LEVADURA RESIDUAL EN DESTILERIA

La producción de levadura residual se estimó tomando como base el volumen de alcohol etílico fabricado por Destilería Salvadoreña y la planta de alcohol de Ahuachapán. La metodología utilizada se detalla a continuación:

- A. Se utilizó como referencia la capacidad instalada individual y total de las dos empresas productoras de alcohol.
- B. Se asume que la producción total de alcohol etílico fue proporcional a la capacidad instalada de cada empresa, por lo que se calculó la fracción que resulta al dividir la capacidad instalada individual entre la capacidad total.
- C. Se determinó el volumen de producción de cada empresa multiplicando el volumen total (9,307,628 L de alcohol) por la fracción correspondiente.
- D. Para determinar el volumen de los fermentadores, se asume que el rendimiento de la fermentación alcohólica es del 10%, así el volumen de cada fermentador se calculó dividiendo la producción individual de alcohol etílico entre 0.10.
- E. Para inocular el mosto a fermentar es utilizado aproximadamente 1/3 del volumen total del fermentador (Aguilar, 1991). Por lo que el volumen de inóculo resulta de multiplicar el volumen de los

fermentadores por 1/3.

- F. La concentración de células de levadura en el inóculo es de 300×10^6 células/cc (300×10^9 células/L), (Aguilar, 1991,). Para determinar el número de células totales se multiplicó el volumen de inóculo por la concentración celular.
- G. La masa total de levadura se determinó a través del peso de una célula individual, el cual es 7.9×10^{-11} g (7.9×10^{-14} kg) (Jorgensen, 1959). Entonces la masa de levaduras se determinó multiplicando el peso de una célula por la cantidad total de células de levadura.
- H. La planta de Ahuachapán separa el 80% de las levaduras para reutilizarlas en otras fermentaciones por lo que solamente desecha el 20% de la masa celular en cambio la Destilería Salvadoreña no realiza reciclados y desecha el 100% de las levaduras luego de cada proceso fermentativo.
- I. La levadura residual producida durante el año 1990 fue de 350,683 kg (350.7 toneladas).

En el cuadro A.1 se muestra los datos y resultados del análisis.

CUADRO A.1 PRODUCCION DE LEVADURA RESIDUAL EN DESTILERIA.

CARACTERISTICA	D. SALVADOREÑA	AHUACHAPAN	TOTAL
A. Capacidad instalada (L/día).	90,000	170,000	260,000
B. Fracción	0.3461	0.6538	1.00
C. Producción de alcohol de 1990 (L)	3 ₁ 221,871	6 ₁ 085,757	9 ₁ 307,628
D. Volumen del fermentador (L)	32 ₁ 218,710	60 ₁ 857,570	93 ₁ 076,280
E. Volumen de inóculo (L)	10 ₁ 739,570	20 ₁ 285,857	31 ₁ 025,427
F. Células totales (10 ¹⁸ células)	3.22187	6.085757	9.307628
G. Masa celular (kg)	254,528	480,775	735,303
H. Reciclo (%)	0	80	
I. Levadura residual (kg/año).	254,528	96,155	350,683

ANEXO "B"

ESQUEMA DE UNA CENTRIFUGA UTILIZADA A NIVEL INDUSTRIAL PARA SEPARAR
LEVADURAS DEL MOSTO FERMENTADO

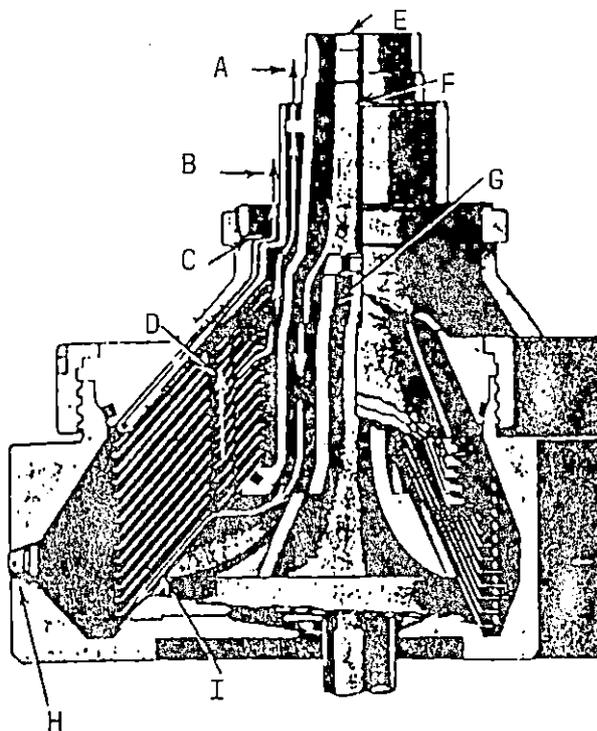


FIGURA B.1 CORTE PARCIAL DE UNA CENTRIFUGA DE ROTOR DE DISCOS UTILIZADA PARA ESCURRIR SÓLIDOS. (Brown, 1965).

- A. Descarga del líquido menos denso
- B. Descarga del líquido más denso
- C. Cierre exterior
- D. Líquidos ascendentes
- E. Entrada de la alimentación
- F. Tubo central
- G. Aletas
- H. Boquilla para descarga de sólidos
- I. Sólidos

ANEXO "C"

COMPOSICION DE AMORTIGUADORES PARA RUPTURA DE LA PARED CELULAR

C.1 Composición del amortiguador de ruptura para uso del Bead Beater

20	mM	Tris . CL , pH (7.9)
10	mM	Mg Cl ₂
1	mM	EDTA
5	%	Glicerina
1	mM	DTT
0.3	M	Sulfato de amonio
1	X	Mezcla de inhibidores de proteasas
1	mM	PMSF

La concentración de sulfato de amonio puede ser variada entre 0.1 y 1.0 M. Las concentraciones finales arriba de 0.25 M corta enlaces específicos de proteínas en el DNA y se producen histonas sin cromatina las cuales son útiles en la preparación de factores que actúan de manera recíproca con ácidos nucleicos.

El KCl y NaCl pueden ser adicionados hasta concentraciones de 0.1 y 2.0 M.

Preparación de las partículas abrasivas (0.45 - 0.55 mm). Lavar las partículas sumergiéndolas en ácido nítrico concentrado por espacio de 1 h. Enjuagar detenidamente con agua. Secar las partículas abrasivas en estufa, enfriar a temperatura ambiente y almacenarlas a 4°C hasta su utilización (Wobbe, 1989).

C.2 COMPOSICION DEL AMORTIGUADOR PARA EL MOLINO DE ARENA UTILIZADO EN EL LABORATORIO (Lynch et al., 1985).

Amortiguador de fosfato

- límites de pH, 5.7 a 8.0

Solución concentrada A. Se disuelven 27.6 g de fosfato sódico monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) en 1 litro de agua destilada (0.2 M).

Solución concentrada B. Se disuelven 28.39 g de fosfato sódico dibásico (Na_2HPO_4 ; ó 53.62 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en un litro de agua destilada (solución 0.2 M también). Se mezclan los volúmenes de soluciones concentradas que se mencionan en el cuadro y se afora a 20 ml para obtener los valores correspondientes de pH.

ml de solución A	ml de solución B	pH final
93.5	6.5	5.7
92.0	8.0	5.8
90.0	10.0	5.9
87.7	12.3	6.0
85.0	15.0	6.1
81.5	18.5	6.2
77.5	22.5	6.3
73.5	26.5	6.4
68.5	31.5	6.5
62.5	37.5	6.6
56.5	43.5	6.7
51.0	49.0	6.8
45.0	55.0	6.9
39.0	61.0	7.0
33.0	67.0	7.1
28.0	72.0	7.2
23.0	77.0	7.3
19.0	81.0	7.4
16.0	84.0	7.5
13.0	87.0	7.6
10.5	90.5	7.7
8.5	91.5	7.8
7.0	93.0	7.9
5.3	94.7	8.0

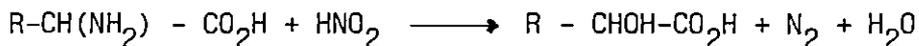
ANEXO "D"

METODOS DE ANALISIS PARA DETERMINAR PROTEINAS SOLUBLES

El amino nitrógeno puede ser determinado por el método de Sorensen, por Van Slyke, por Folin o por Biuret. Estos métodos son aplicados para el análisis de proteínas solubles.

D.1 Método de Van Slyke (1911)

El ácido nitroso libera nitrógeno, siguiendo la siguiente reacción:



El nitrógeno se desprende cuantitativamente; el método se basa en este hecho, y es útil para el análisis de mezclas de aminoácidos.

D.2 Valoración con formol de Sorensen

Por su carácter anfótero, los aminoácidos no pueden valorarse directamente con álcali. Si se añade a la glicocola una solución de formalina, se forma metilenglicocola:



Aunque es probable que se forme algo de metilenglicocola, parece que la reacción es más compleja; el producto principal de la misma parece ser dioximetilglicocola:



Estos derivados son ácidos fuertes (se enmascara el carácter básico del grupo amino) y pueden ya valorarse con álcali (Finar, 1970).

D.3 METODO DE FOLIN PARA DETERMINACION DE PROTEINAS.

Protein by Folin Reaction

The most widely used colorimetric method for estimation of proteins is that of Lowry et al. (90), using the Folin reaction. The blue color is due to the reaction of protein with copper ion in alkaline solution (the biuret reaction) and the reduction of the phosphomolybdate-phosphotungstic acid in the Folin reagent by the aromatic amino acids in the treated protein.

The following procedure is useful for proteins that are already in solution or that are soluble in dilute alkali.

Reagents.

Reagent A: Dissolve 20 g of Na_2CO_3 in 1 liter of 0.1 N NaOH.

Reagent B: Dissolve 0.5 g of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 100 ml of a 1% (wt/vol) aqueous solution of sodium tartrate.

Reagent C: Just before use, mix 50 ml of reagent A and 1 ml of reagent B. Discard after 1 day.

Reagent D: Diluted Folin reagent. Concentrated Folin-Ciocalteu reagent can be purchased commercially from several sources (e.g., Fischer Scientific Co., Pittsburgh, Pa.) and is diluted according to the manufacturer's instructions. (CAUTION: This reagent contains a strong volatile acid and should not be pipetted by mouth. Protective gloves, clothing, and goggles should be worn, particularly if a Vortex mixer is used for mixing.)

Standard protein solution: Any one of several commercially available proteins or commercial standards are suitable. Crystalline bovine serum albumin or prepared solutions of bovine serum albumin that can be purchased from biological supply houses produce suitable linear standard curves. The stock standard solution should contain 0.5 mg of protein per ml in distilled water. Different proteins give different standard curves. The protein standard used should be specified when the results are reported.

Procedure.

Add up to 1.0 ml of a sample containing 50 to 250 μg of protein to a clean 10-ml test tube. Adjust the volumes of each sample to 1.0 ml with distilled water. Add 5.0 ml of reagent C, and mix well. Allow this mixture to stand for at least 10 min at room temperature. Add 0.5 ml of

reagent D, and mix immediately. The reactivity of this reagent to freshly added protein lasts only seconds after dilution. After 30 min or longer at room temperature, measure the absorbance at 500 nm in a spectrophotometer or colorimeter. Greater sensitivity can be achieved by measuring the absorbance at 750 nm if an appropriate spectrophotometer is available.

If 1-ml cuvettes and a suitable instrument are available, all volumes can be reduced by a factor of five, and reagents and sample can be conserved. The samples and standards can be adjusted to 0.2 ml, and 1.0 ml of reagent C and 0.1 ml of reagent D are then added at the time intervals indicated above.

When protein is to be measured in bacterial cell suspensions or when proteins are insoluble in dilute alkali, it is necessary to heat the suspension at 90°C in 1 N NaOH for 10 min to obtain complete solubilization. The standard should be treated in the same way because this treatment reduces the intensity of the color. When this procedure is applied to dissolve or extract proteins, a reagent containing 20 g of Na_2CO_3 in 1 liter of water (no alkali) is substituted for reagent A. The assay procedure is otherwise identical.

Ammonium sulfate in amounts greater than 0.15% reduces color development. Investigators should be aware of this when this assay is used for proteins purified by fractionation procedures based on differential solubilities in ammonium sulfate solutions. High concentrations (1 to 5 M) of many other salts, some sugars, glycine, Tris buffer, some chelating agents, and compounds with sulfhydryl groups also interfere with the assay. Aromatic amino acids produce color with the phenol reagent, and glycine interferes with color development.

A modification of the Lowry assay that permits its use with samples containing sucrose or ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and with membrane and lipoprotein preparations without prior solubilization of the proteins has been described by Markwell et al. (91). The procedure employs a detergent (sodium dodecyl sulfate) in the alkaline carbonate reagent to improve solubilization of samples containing lipoidal material and an increase in the amount of the copper tartrate reagent to overcome interference by sucrose and EDTA. This procedure has several applications, including assays of proteins in fractions from sucrose gradients.

D.4 METODO DE BIURET PARA DETERMINACION DE PROTEINAS.

Protein by Biuret Reaction (68, 82)

Peptide bonds of proteins form blue-colored chelates with copper ions in alkaline solutions. This reaction is much less sensitive than the Lowry procedure, but has the advantage that it

is less time-consuming and can be used in the presence of ammonium salts and other materials that interfere with the Lowry procedure. There is also less variability between proteins in the amount of color formed per unit weight of protein.

The modification of the biuret procedure (83) described below involves the use of tartrate to form a copper complex that is soluble in NaOH. The protein displaces the copper ion from the complex to form a copper-protein complex with a different color and absorption intensity.

Reagents.

Dissolve 1.5 g of cupric sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) and 6 g of sodium potassium tartrate ($4\text{H}_2\text{O}$) in 500 ml of water. Add, with stirring, 300 ml of a 10% (wt/vol) solution of sodium hydroxide in water. Adjust the volume of the mixture to 1 liter with distilled water. Discard if a reddish or black precipitate is evident.

Procedure.

Add 4.0 ml of the above biuret reagent to a neutralized sample (1.0 ml) containing 1 to 10 mg of protein. Mix thoroughly, and incubate at room temperature for 30 min. Time and temperature for all samples, standards, and blanks should be the same. Measure the absorbance at 500 nm. A blank is prepared using 1.0 ml of water or aqueous solution used to dissolve proteins and 4.0 ml of biuret reagent. A standard curve can be prepared using any completely soluble protein such as crystalline bovine serum albumin. The response is not linear with protein concentration because of competition between the tartrate and protein for copper ions.

Applications.

A modification of this procedure described by Stickland (102) is suitable for the analysis of total protein in bacterial cells. In this procedure the cellular protein is dissolved in 1.0 N NaOH, and then CuSO_4 without tartrate is added. The insoluble cellular material and insoluble $\text{Cu}(\text{OH})_2$ are removed by centrifugation, leaving the colored Cu-protein complex in solution.

ANEXO "E"

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE CELULAS EN LA PASTA DE LEVADURA

La concentración de células en la pasta de levadura se determinó a partir del recuento de células efectuado a suspensiones celulares en las que el peso de pasta de levadura era conocido.

El cálculo se realizó de la siguiente manera:

DATOS:

C = Concentración de células por ml, células/ml

V = Volumen total de la suspensión, ml

M = Peso de la pasta de levadura, g

CP= Concentración de células en la pasta, células/g

Fórmula:

$$CP = \frac{V \times C}{M}$$

En el cuadro E.1, se muestran conteos de levadura realizados durante diferentes ensayos para determinar la concentración promedio de células, por gramo de pasta de levadura.

CUADRO E.1 RESUMEN DE RESULTADOS PARA DETERMINAR LA CONCENTRACION DE CELULAS EN LA PASTA DE LEVADURA.

Nº CORRELATIVO	M(g)	V(ml)	C(Célula/ml)	CP(Célula/g)
1	16.2	45.4	1210×10^6	3.39×10^9
2	19.4	80.0	800×10^6	3.30×10^9
3	75.0	300.0	650×10^6	2.60×10^9
4	100.0	400.0	630×10^6	2.52×10^9
5	100.0	400.0	540×10^6	2.16×10^9
6	75.0	300.0	520×10^6	2.08×10^9
7	75.0	300.0	500×10^6	2.00×10^9
8	124.3	250.0	820×10^6	1.60×10^9
9	75.0	300.0	370×10^6	1.48×10^9

$$CP = 2.35 \times 10^9 \text{ célula/g} \pm 4.12 \times 10^8 \text{ célula/g}$$

$$CP = 1.94 \times 10^9 \text{ a } 2.76 \times 10^9 \text{ células/g.}$$

ANEXO "F"

RENDIMIENTO DE LA PRODUCCION DE EXTRACTO DE LEVADURA

DATOS

- Masa de extracto seco:	1.91 g
- Masa de levadura en pasta:	40.00 g
- % de humedad de la levadura en pasta:	74.87% p/p
- Masa de levadura seca:	10.05 g

$$\text{RENDIMIENTO} = \frac{\text{Masa de extracto seco}}{\text{Masa de levadura seca}}$$

$$\text{RENDIMIENTO} = \frac{1.91 \text{ g}}{10.05 \text{ g}} = 0.19 \text{ g de extracto seco/g de levadura seca.}$$

De otra forma significa que 1 g de extracto seco representa 5.26 g de levadura.

ANEXO "G"

EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS UTILIZADOS EN LA PARTE EXPERIMENTAL

Se presenta a continuación un listado de los equipos y materiales utilizados en el trabajo de laboratorio

G.1 EQUIPOS

Centrífuga IEC Modelo HN-S art. 2512-D10 Cabeza Tipo 2512 F20

4 tubos metálicos de centrífuga de 100 ml

4 tubos de vidrio graduados de centrífuga de 15 ml

Calentador eléctrico con agitador magnético

Termómetro

Balanza granataria, sensibilidad 0.1 g

Balanza analítica

Autoclave

Microscopio Leitz con cámara fotográfica

Refrigeradora

Estufa Napco Modelo 630

pH meter digital Orion Modelo 601

Molino de arena

Homogenizador

G.2 MATERIALES

Levadura residual de Destilería Salvadoreña

Agua destilada.

G.3 REACTIVOS

CUADRO G.1 REACTIVOS UTILIZADOS EN LA PARTE EXPERIMENTAL

NOMBRE	FORMULA QUIMICA	CALIDAD	FABRICANTE
Cloruro de sodio	NaCl	AR ACS*	Mallindkrodt
Fosfato sódico monobásico	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	AR ACS	Mallindkrodt
Fosfato sódico dibásico	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	AR ACS	Mallindkrodt
Isopropanol	$\text{C}_3\text{H}_7 \text{ OH}$	AR ACS	Mallindkrodt
Papaína		(2.8 unidades/mg) de latex -- crudo de pa- paya. Tipo II	

* AR = Reactivo analítico

ACS = Lote con especificaciones para análisis.

G.4 DISEÑOS DE LOS EQUIPOS UTILIZADOS PARA LA RUPTURA DE LA PARED CELULAR.

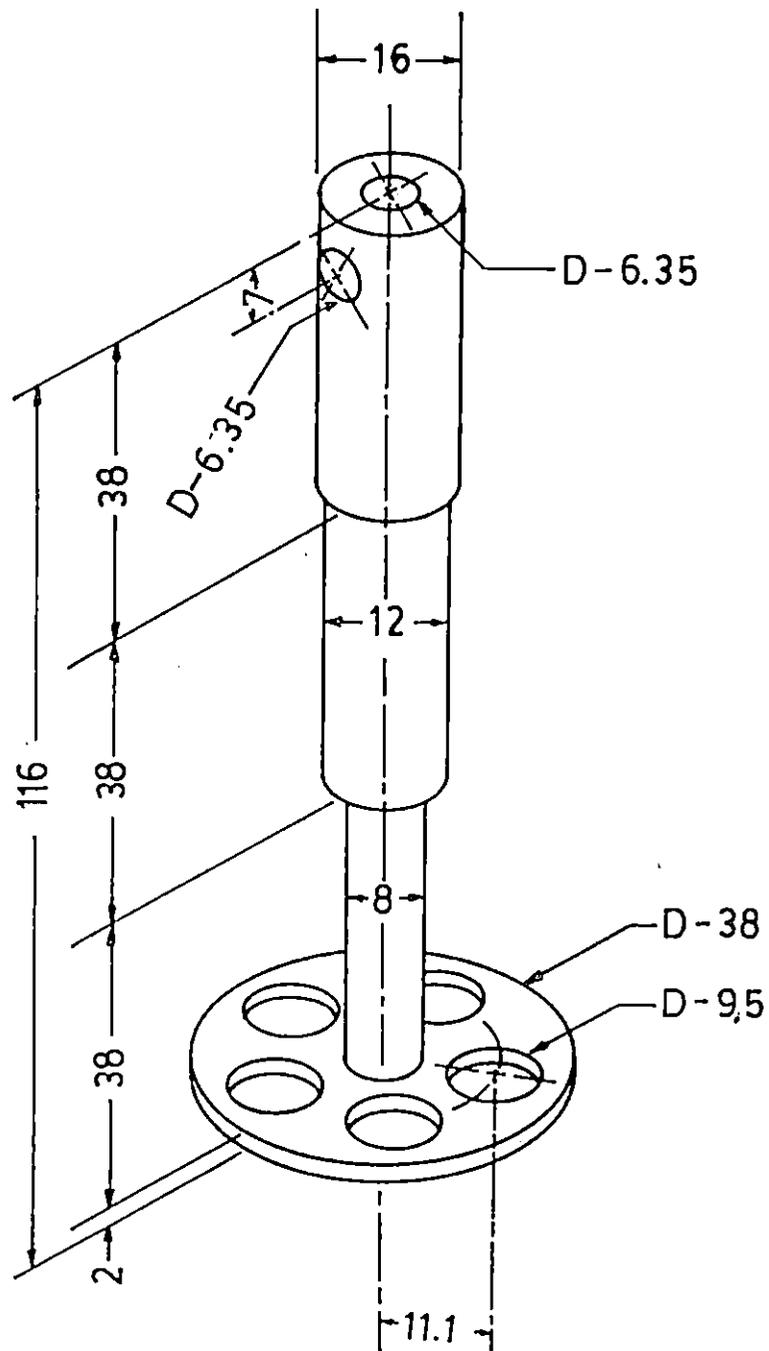


FIGURA G.1 AGITADOR DEL MOLINO DE ARENA. DISEÑADO POR LOS AUTORES Y FABRICADO EN LA FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR CON LA COLABORACION DE LA UNIDAD PRODUCTIVA METAL-MECANICA. DIMENSIONES EN mm.

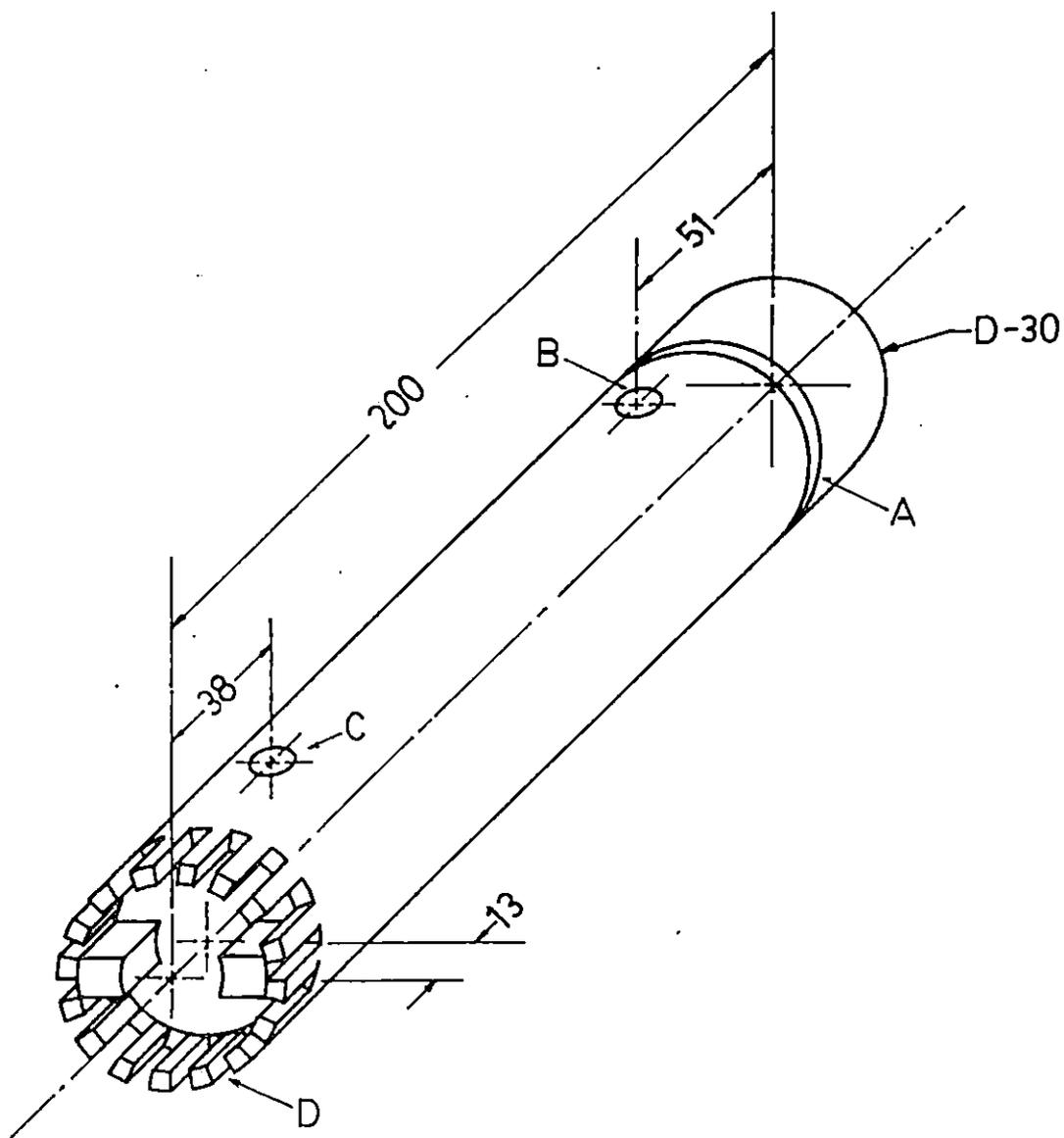


FIGURA G.2 VISTA EXTERNA DEL GENERADOR DEL HOMOGENIZADOR.
DIMENSIONES EN mm.

- A. Guía para acomodar prisioneros que sujetan al generador
- B Y C. Orificios para lavar el generador
- D. Ranuras equidistantes (16) en estator del generador.

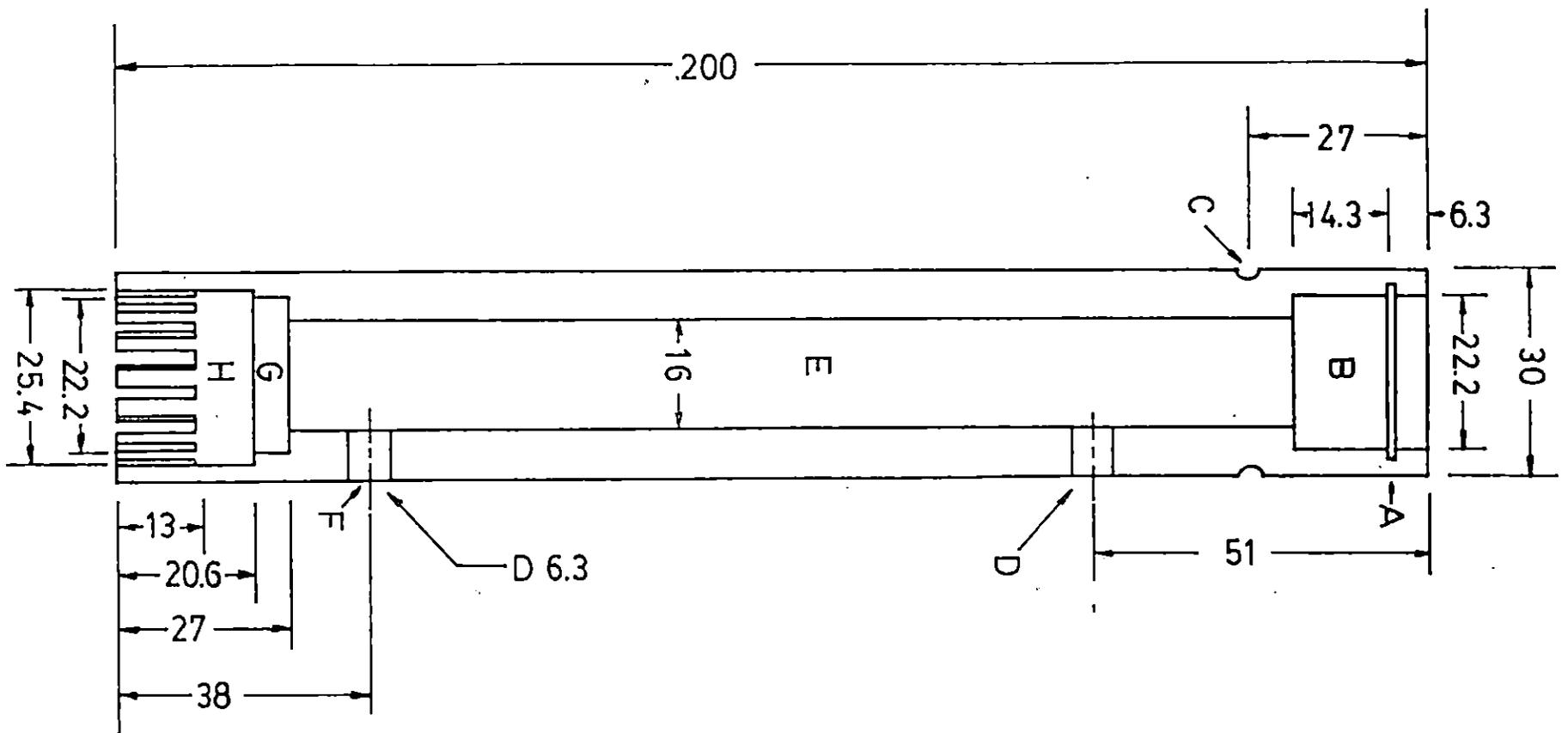


FIGURA G.3 CORTE TRANSVERSAL DEL ESTATOR DEL HOMOGENIZADOR. DIMENSIONES EN mm.

- | | |
|---|---|
| A. Ranura para seguro interior | E. Recámara para eje del rotor |
| B. Recámara para cojinetes de teflón y balero | F. Orificio de salida para agua de lavado |
| C. Guía para prisioneros | G. Recámara para cojinete de teflon |
| D. Orificio de entrada del agua de lavado | H. Recámara para el impulsor del rotor |

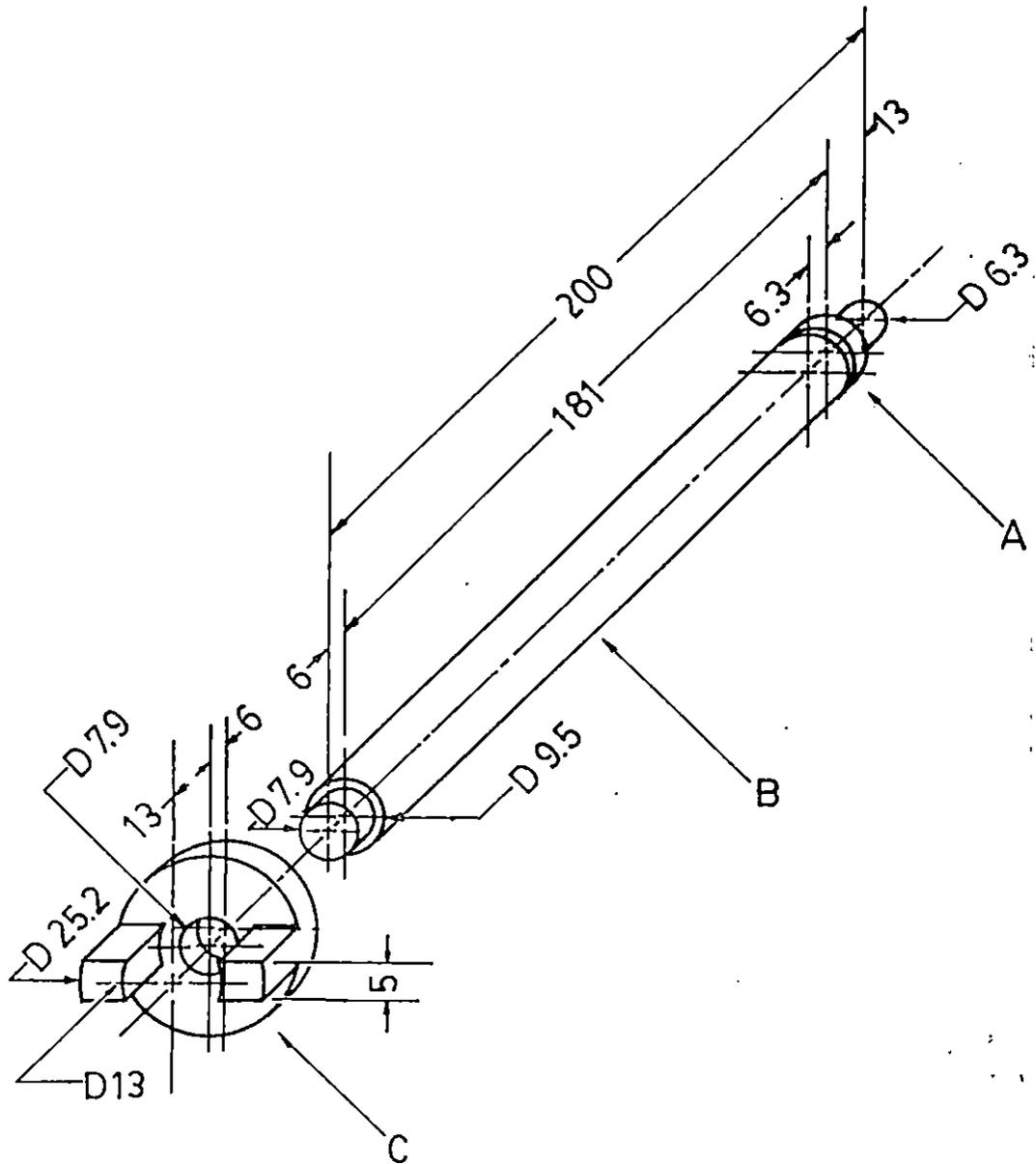


FIGURA G.4 ROTOR DEL HOMOGENIZADOR. DIMENSIONES EN mm.

A. Ranura para seguro externo

B. Eje del rotor

C. Impulsor

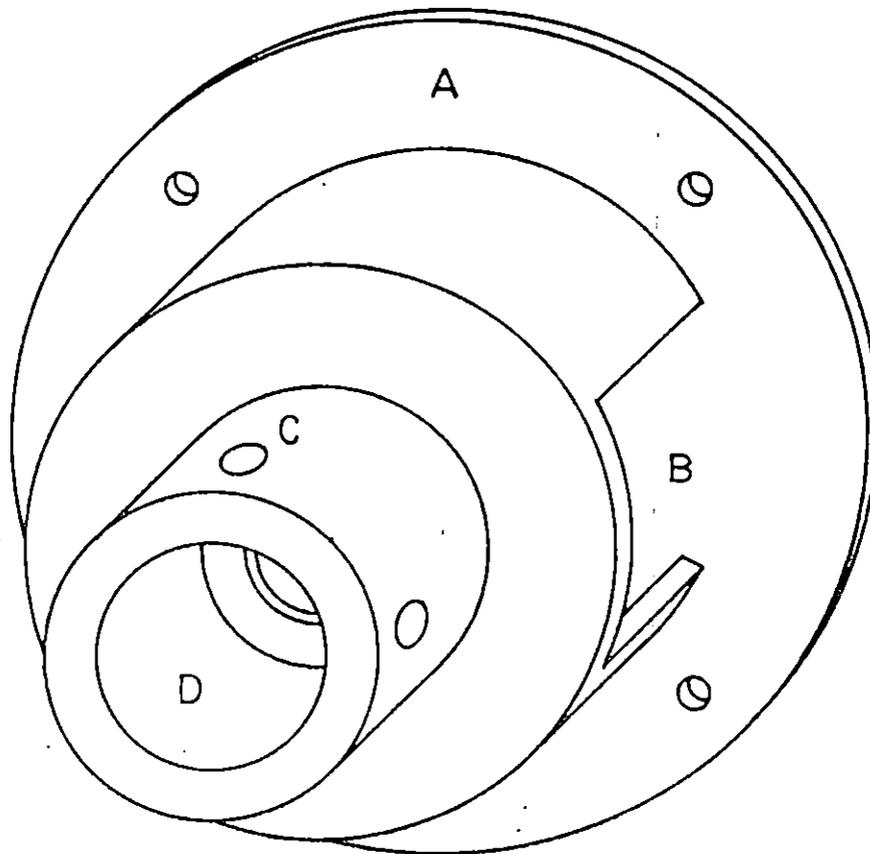


FIGURA G.5 ACOPLADOR DEL MOTOR Y GENERADOR DEL HOMOGENIZADOR FABRICADO EN HIERRO. DIMENSIONES EN mm.

- A. Disco acoplable al motor
- B. Ventanilla
- C. Orificios roscados para prisioneros
- D. Recámara para ensamblar el generador

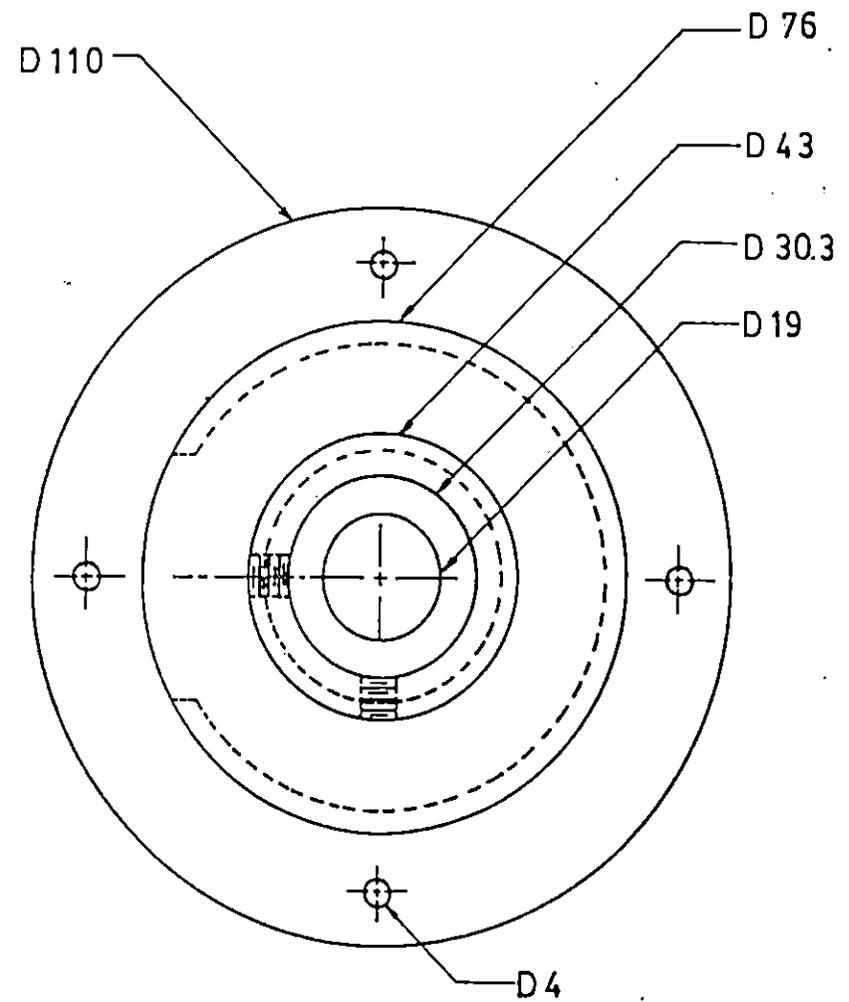
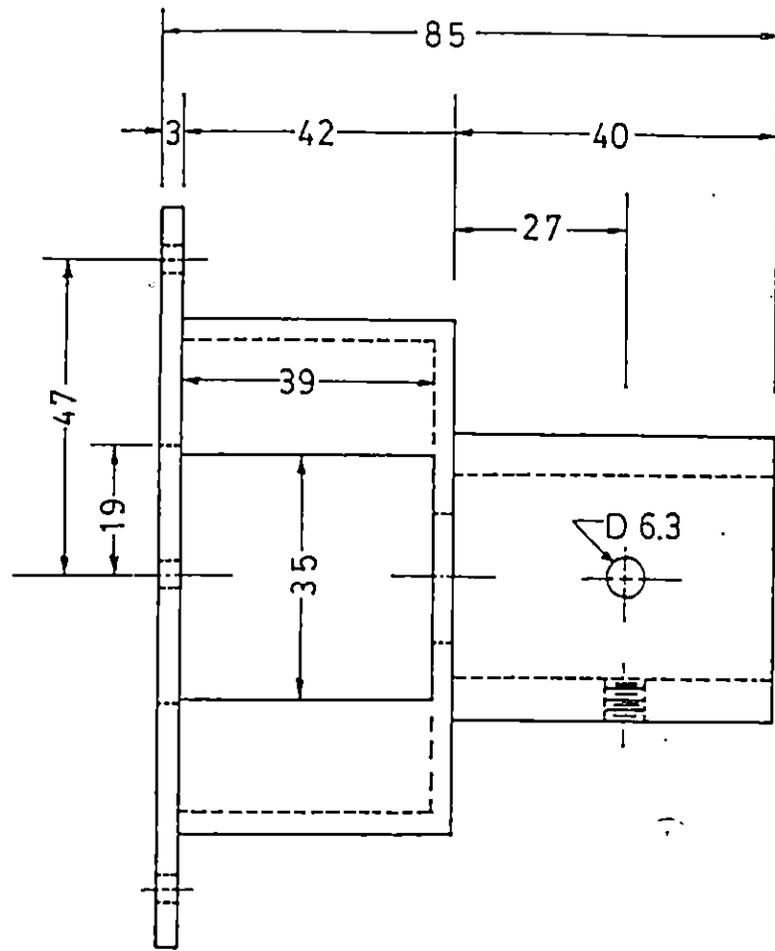


FIGURA G.6 VISTA LATERAL Y FRONTAL DEL ACOPLADOR DEL MOTOR Y GENERADOR. DIMENSIONES EN mm.