

La biotecnología ofrece instrumentos poderosos para el desarrollo sostenible de la agricultura, la pesca, la actividad forestal y las industrias alimentarias. Cuando se integra debidamente con otras tecnologías para la producción de alimentos, productos agrícolas y servicios, la biotecnología es una herramienta de gran importancia para satisfacer las necesidades de una población en crecimiento.

La producción biotecnológica de aditivos alimentarios es una actividad industrial que permite incrementar el valor agregado de las materias primas utilizadas en el proceso. Existen diferentes recursos agropecuarios en México y en el mundo que no se aprovechan industrialmente, principalmente porque no se han resuelto algunos problemas técnicos que permitan su rentabilidad. Para la resolución de estas problemáticas, es necesario integrar esfuerzos de los grupos que trabajan en este campo de la ciencia. Así mismo, es necesario dar a conocer los alcances de los estudios realizados en un formato que sea accesible a los diferentes interesados en el tema, más allá de las publicaciones científicas internacionales que sobre la temática han realizado los grupos. En este contexto, la maestría en Ciencias y Tecnología de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Tamaulipas tiene liderazgo nacional en la temática mencionada, con diversas publicaciones científicas internacionales en el campo. El encuentro académico *Avances en el aprovechamiento biotecnológico de productos agropecuarios*, permitirá consolidar al grupo participante y difundir el conocimiento que se ha generado.

Ma. Guadalupe Bustos Vázquez
Simón J. Téllez Luis

Ciencia/tecnología



Simón Josías Téllez Luis
Ma. Guadalupe Bustos Vázquez
Gonzalo Velázquez de la Cruz

APROVECHAMIENTO BIOTECNOLÓGICO
DE PRODUCTOS AGROPECUARIOS (I)

P Y V

APROVECHAMIENTO BIOTECNOLÓGICO DE PRODUCTOS AGROPECUARIOS I



Simón Josías Téllez Luis, Ma. Guadalupe Bustos Vázquez
y Gonzalo Velázquez de la Cruz



APROVECHAMIENTO BIOTECNOLÓGICO
DE PRODUCTOS AGROPECUARIOS I

Aprovechamiento biotecnológico de productos agropecuarios I

Simón Josías Téllez Luis
Ma. Guadalupe Bustos Vázquez
Gonzalo Velázquez de la Cruz

Universidad Autónoma de Tamaulipas
Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán
Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos



Primera edición: 2007

© Simón Josías Téllez Luis, Ma. Guadalupe Bustos Vázquez
y Gonzalo Velázquez de la Cruz
© Universidad Autónoma de Tamaulipas
© Plaza y Valdés S.A. de C.V.

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

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

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

ISBN: 978-970-722-609-8

Impreso en México / *Printed in Mexico*

Índice

Prólogo	11
<i>Bustos Vázquez, M.G. y Téllez Luis S. J.</i>	
Aprovechamiento de la cascarilla de cebada para la producción de aditivos alimentarios	13
Production of Food Additives from Barley Husks <i>Cruz Freire, J. M.</i>	
Metabolitos presentes en <i>Stenocereus gummosus</i> (Engelm Gibson y Horak), y actividad biológica de extractos metanólicos de tallo	41
Metabolites in <i>Stenocereus gummosus</i> (Engelm Gibson & Horak) and Biological Activity of Methanolic Extracts of Steam <i>Morales Rubio, M. E.; Verde Star, J.; Oranday Cárdenas, A.; Rivas Morales C.; Cruz Vega, D. E.; Treviño Neávez, J. F.</i>	
Detección de organismos transgénicos en granos y productos procesados	47
Molecular Detection of Genetically Modified Food Products <i>Mendoza, A.; Cruz, M. A.; Fernández, S.; Salazar, E. L.</i>	
Caracterización física, bioquímica y funcional de los gránulos de almidón de amaranto	55
Physical, Biochemical and Functional Characterization of Amaranth Starch Granules <i>Bello-Pérez, L. A.; Chávez-Guerrero, L.; Balanzar-Cortez, A. F.; Muñoz-Sandoval, E.; Terrones, M.; Barba de la Rosa, A. P.</i>	

Producción de sustratos para la alimentación de rumiantes por fermentación en medio sólido de residuos agroindustriales	71
Production of Substrates for the Feeding of Rumiantes by in the Middle Solid Fermentation of Agro-industrial Remainders	
<i>Ortiz-Tovar, G.; López-Miranda, J.; Cerrillo-Soto, A.; Favela-Torres, E; Soto-Cruz, O.</i>	
Hidrólisis ácida de la inulina del <i>Agave americana</i> para la obtención de mostos fermentables ricos en fructosa	81
Acid Hydrolysis of Inulin from <i>Agave americana</i> to Obtain Fermentable Solutions Rich in Fructose	
<i>Gómez Ayala, R. C.; Ramírez de León, J.A.; Jacques-Hernández, C.; Vázquez Vázquez, M.</i>	
Producción de astaxantina por microorganismos crecidos en residuos agropecuarios lignocelulósicos	93
Astaxanthin Production by Microorganism Grown on Lignocellulosic Farming Wastes	
<i>Vázquez Vázquez, M.</i>	
Producción de transglutaminasa por <i>Streptovercillium ladakanum</i> NRRL-1391 desarrollado en medios hechos de hidrolizados de paja de sorgo	117
Transglutaminase Production by <i>Streptovercillium ladakanum</i> NRRL-3191 Growing on Media Made from Hydrolysates of Sorghum Straw	
<i>Téllez Luis, S. J.; Ramírez de León, J.A.; Vázquez Vázquez, M.</i>	
Producción biotecnológica de transglutaminasa	127
Biotechnological Production of Transglutaminase	
<i>Portilla Rivera, O. M.; Téllez Luis, S. J.; Ramírez de León, J.A.; Vázquez Vázquez, M.</i>	
Baculovirus recombinantes: Desarrollo de nuevos bioinsecticidas para el control de plagas de insectos lepidópteros	135
Recombinant Baculoviruses: New Bioinsecticides to Control Lepidopteran Insect Pests	
<i>Rodríguez-Pérez, M. A.; Beckage, N. E.; Dumpit, R.; Lizarazo, O.; Barrera, H.; Bonning, B.</i>	
El nopal <i>Opuntia ssp</i>: Aprovechamiento integral de sus alimentos derivados y sus componentes funcionales	151
The Nopal <i>Opuntia ssp</i> : Integral Advantage of its Derived Foods and their Functional Components	
<i>Pérez-Quilantan, L. M.; Hurtado González, M.</i>	

Aprovechamiento de residuos vitivinícolas contaminantes para la obtención de nutrientes fermentativos económicos y aditivos alimentarios	159
Utilization of Viticulture Pollutant Wastes for Obtaining Economic Fermentative Nutrients and Food Additives <i>Domínguez González, J. M.; De la Torre Sayáns, N.</i>	
Producción de ácido láctico a partir de azúcares hemicelulósicos de las podas de sarmiento y lías de vinificación como medio nutritivo utilizando <i>Lactobacillus pentosus</i>	183
Lactic Acid Production for Hemicellulosic Sugars from Vine-trimming Wastes and Vinification Lees as a Nutritional Medium by <i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Bustos Vázquez, G.; De la Torre, N.; Martínez, M.; Moldes, A. B.; Cruz, J. M.; Domínguez, J. M.</i>	
Transformación biotecnológica de los residuos de camarón de cultivo	205
Biotechnological Transformation from Cultivated Shrimp Waste <i>Sánchez-Machado, D. I.; López-Cervantes, J.; Ríos Vázquez, N. J.</i>	
Evaluación biológica del efecto de extractos polifenólicos de <i>Quercus resinosa</i> sobre células transformadas	219
Biological Evaluation of the Effect of Poliphenolic Extracts of <i>Quercus Resinosa</i> on Transformed Cells <i>Rocha Guzmán, N. E.; González Laredo, R. F.; Gallegos Infante, J. A.; Lares Assef, I.; Coria, M.; Ochoa Martínez, A.; Seade Bechelani, M. G.</i>	
Producción de xilitol en hidrolizados de paja de sorgo de toxicados utilizando <i>Candida parapsilosis</i>	239
Xylitol Production in Detoxified Hydrolysates of Sorghum Straw by <i>Candida parapsilosis</i> <i>Sepúlveda-Huerta, E.; Herrera Guajardo, A.; Ramírez de León, J. A.; Vázquez Vázquez, M.</i>	
Estudio de la eliminación de inhibidores microbianos en hidrolizados de bagazo de caña y de la producción de xilitol por <i>Candida parapsilosis</i> en medios de xilosa comercial en presencia de elevadas concentraciones de sales	247
Study of the Microbial Inhibitor Removal in Hydrolysates of Cane Bagasse and the Production of Xylitol by <i>Candida Parapsilosis</i> in Commercial Xylose Media in Presence of High Concentration of Salts <i>Rodríguez Durán, N. A.; Ramírez de León, J. A.; Vázquez Vázquez, M.</i>	

Producción de xilitol a partir de una cepa autóctona obtenida de bagazo de caña de azúcar en presencia de inhibidores	259
Xylitol Production from a Wild Strain of Sugar Cane Bagasse in Presence of Inhibitors <i>Rangel L., E.; Livas L., D.; Escudero A., B.; Gómez R., J.; Aguilar U., M. G.</i>	
Estudio de la hidrólisis de la paja de sorgo con ácido fosfórico	275
Study of Sorghum Straw Hydrolysis Using Phosphoric Acid <i>Oliva Álvarez, M. A.; Téllez Luis, S. J.; Ramírez de León, J. A.; Vázquez Vázquez, M.</i>	
Uso de transgenes en el mejoramiento de la producción de alimentos	285
Use of Transgenes to Improve Food Production <i>Bocanegra García, V.; Cruz Pulido, W. L.; Leal Ayala, H. F.; Flores Gutiérrez, G. H.; Rivera Sánchez, G.</i>	
Producción de biosurfactantes a partir de residuos agrícolas	305
Biosurfactants Production from Agricultural Residues <i>Moldes, A. B.</i>	
Uso y aprovechamiento de subproductos vegetales y animales en la prevención de insectos, hongos y algunas enfermedades	321
Use and Advantage of Vegetal by-products and Animals in the Prevention of Insects, Fungi and Some Diseases <i>Plascencia-Jatomea, M.; Cortez-Rocha, M. O.; Aldana-Madrid, M. L.; Shirai, K.; Robles, R. M.; Canett, R.; Parra-Vergara, N. V.</i>	
Aprovechamiento integral de residuos agrícolas mediante compostaje	329
Whole Recycling of Agriculture Residues Through Composting <i>Moldes A. B.; Vázquez Vázquez, M.; Barral, M. T.; Díaz-Fierros, F.</i>	
Aprovechamiento del lirio acuático para la producción de azúcares fermentables	347
Acid Hydrolysis of Water Hyacinth for Fermentable Sugars Production <i>Saucedo Luna J.; Serna González M.; Castro Montoya A. J.</i>	
Importancia de la caracterización genético-molecular de levaduras en bebidas alcohólicas: el caso del mezcal	357
Genetic and Molecular Characterization of Yeast on Alcoholic Beverages: Mezcal <i>Oliva Hernández, A. A.; Sifuentes Rincón, A. M.; Bocanegra García, V.; C. Jacques-Hernández, C.</i>	

Prólogo

La biotecnología ofrece instrumentos poderosos para el desarrollo sostenible de la agricultura, la pesca, la actividad forestal y las industrias alimentarias. Cuando se integra debidamente con otras tecnologías para la producción de alimentos, productos agrícolas y servicios, la biotecnología es una herramienta de gran importancia para satisfacer las necesidades de una población en crecimiento.

La situación mundial actual se caracteriza por un incremento de la población y por el agotamiento de muchas materias primas. Dada esta situación resulta de gran interés el estudio de procesos no convencionales para el aprovechamiento de los recursos naturales.

Los microorganismos se han utilizado desde la antigüedad para la producción de alimentos. Actualmente se siguen empleando para la producción de alimentos tan conocidos como el vino, el vinagre, el pan o el yogurt. La biotecnología alimentaria también estudia el uso de otros microorganismos para la producción de aditivos alimentarios de gran interés para la industria.

La producción biotecnológica de aditivos alimentarios es una actividad industrial que permite incrementar el valor agregado de las materias primas utilizadas en el proceso. Existen diferentes recursos agropecuarios en México y el mundo que no se aprovechan industrialmente, principalmente porque no se han resuelto algunos problemas técnicos que impiden su rentabilidad. Para la resolución de estas problemáticas es necesario integrar los esfuerzos de los grupos que trabajan en este campo de la ciencia. Asimismo, es necesario dar a conocer los alcances de los estudios realizados en un formato que sea accesible a los interesados en el tema, más allá de las publicaciones científicas internacionales que abordan esta temática. La Maestría en Ciencias y Tecnología de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, ostenta el liderazgo a nivel nacional en este campo gracias a

SIMÓN JOSÍAS TÉLLEZ, MA. GUADALUPE BUSTOS Y GONZALO VELÁZQUEZ

diversas publicaciones científicas internacionales. El encuentro académico: Avances en el aprovechamiento biotecnológico de productos agropecuarios, permitirá consolidar el trabajo del grupo de especialistas participantes y difundir el conocimiento que se ha generado.

Ma. Guadalupe Bustos Vázquez
Simón J. Téllez Luis

Aprovechamiento de la cascarilla de cebada para la producción de aditivos alimentarios *Production of Food Additives from Barley Husks*

*Cruz Freire, J. M.**

Resumen

Los materiales lignocelulósicos (MLC), procedentes de los sectores agrícola, forestal o industrial, son una fuente de recursos renovables muy abundante y con un gran potencial como materia prima dentro de la industria alimentaria. En los últimos años se han desarrollado procedimientos químicos para el aprovechamiento integral de los materiales lignocelulósicos distintos de la tradicional producción de pasta de celulosa. Algunos de los esquemas de procesamiento estudiados pretenden la separación selectiva de los componentes poliméricos de los materiales lignocelulósicos (celulosa, hemicelulosas y lignina), en tratamientos denominados de *fraccionamiento*. Este tipo de procesos permite una utilización separada de las *fracciones* obtenidas y su transformación en productos de interés comercial, y en particular, en productos de interés alimentario de alto valor añadido, por medio de procesos químicos y/o biotecnológicos.

Dentro de estos MLC destaca el salvado de cebada procedente de la industria de malteado para la fabricación de cerveza, por su relativamente elevado porcentaje de hemicelulosas y bajo porcentaje de lignina, además de tratarse de un desperdicio industrial sin mayor aprovechamiento que su empleo como combustible. Un aprovechamiento integral de las distintas fracciones permite obtener un valor añadido al residuo.

Así, la fracción hemicelulósica puede emplearse para la producción de xilitol, un edulcorante de elevado valor añadido y con múltiples aplicaciones en la industria alimentaria,

* Área de Nutrición y Bromatología. Departamento de Química Analítica Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela (15782 Santiago de Compostela, La Coruña, España). E-mail: jmcruz@usc.es

mientras que la fracción celulósica se puede utilizar para producir ácido láctico, que es un conservante y acidulante empleado también en dicha industria sobre todo debido a que su sabor ácido que no se sobrepone a otros sabores más sutiles. Finalmente, de los licores hemicelulósicos y de los licores procedentes de la etapa de deslignificación se pueden obtener extractos de naturaleza polifenólica que pueden ser utilizados como antioxidantes y conservantes en la industria alimentaria.

Abstract

Lignocellulosic materials (LCM) obtained from agricultural, forestry or industrial residues are a renewable, cheap and widespread resource, with a high potential as raw material in the food industry. In the last years several chemical processes has been developed to get an overall profit of LCM different from production of paper pulp. Some processing schemes pretend a selective separation of the different polymeric compounds (cellulose, hemicellulose and lignin). This kind of process allows a separately utilization of the different fractions and their transformation into commercial valuable products. So, by chemical o biotechnological procedures high added value products interesting for the food industry can be obtained.

Barley husk is LCM obtained from a brewery industry, with high hemicellulose content and low lignin content. This LCM is a residue without any useful purpose except as fuel utilization. A chemical-biotechnological utilization of the different fractions, allows getting an added value products from a residue.

So, the hemicellulosic fraction can be employed to obtain xylitol, a sweetener with high added value and several applications in the food industry, whereas the cellulosic fraction can be used to obtain lactic acid, which is employed in food industry like acidulant, flavour and preservative because lactic acid has a mild taste that do not hide the weaker aromatic flavours of some foods. Finally, polyphenolic compounds extracts can be obtained from hemicellulosic liquors and deslignification step liquors. This extracts can be utilized in the food industry due to its antioxidant and antimicrobial properties.

Introducción

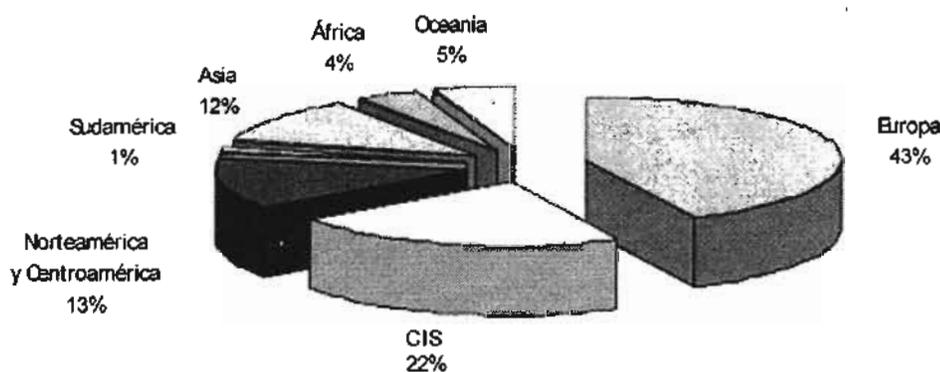
Cebada: importancia y producción mundial

Cebada es el nombre común de las especies de cereal del género *Hordeum*, que pertenece a la familia de las gramíneas (*gramineae*) y que es originario de Asia y Etiopía, siendo una de las plantas cultivadas más antiguas. En la actualidad ocupa el cuarto lugar en volumen de producción mundial de cereales, después del trigo, el arroz y el maíz, y se utiliza principalmente en la fabricación de cerveza o para la elaboración de piensos. Las cifras de producción mundial de cebada en el año 2004 se han estimado en casi 150 millones de toneladas (veáanse tabla 1 y figura 1).

Tabla 1. Producción mundial de cebada (en millones de toneladas)

Región	2001	2002	2003	2004
Europa	59.50	58.80	56.80	64.10
CIS (Estados Independientes de la <i>Commonwealth</i>)	36.30	34.80	30.00	33.00
Norteamérica y Centroamérica	16.80	12.90	18.80	19.00
Sudamérica	1.70	1.60	1.60	1.60
Asia	16.00	17.30	17.40	17.50
África	3.40	3.80	6.50	6.20
Oceania	8.80	4.20	9.00	7.70
Total mundial	142.50	133.40	140.10	149.10

Figura 1. Productores mundiales de cebada



Europa aporta 43% de la producción mundial de cebada, ya que el bloque económico UE-25 concentra 60.50 de los 149.2 millones de toneladas que se estima producir en la el periodo 2004-2005 a nivel internacional.

Si desglosamos el nivel de producción por países, el más importante es Rusia, cuya estimación para la campaña 2004-2005 es de 18 millones de toneladas. Ésta es seguido por: Alemania (perteneciente a la UE-25, con 12.9 millones de toneladas estimadas de producción), Canadá (12.6 millones), Francia (UE-25, 11 millones), España (UE-25, 10 millones), Ucrania (9.7 millones), Australia (7.3 millones), Estados Unidos (5.9 millones) y Reino Unido (5.8 millones), entre los más importantes.

La producción sudamericana contribuye a la producción mundial con sólo 1%; Argentina es su principal referente con 700 toneladas anuales estimadas, cifra notablemente inferior en comparación con los principales productores de cebada.

Cascarilla de cebada: composición y fraccionamiento

Durante el proceso de fabricación de la cerveza, en una de las etapas iniciales de malteado, se produce el descascarillado del grano de cebada obteniendo una corriente residual compuesta de una mezcla de paja y polvo, de naturaleza lignocelulósica, que en un principio constituye un desperdicio industrial sin mayor aprovechamiento que su empleo como combustible.

La utilización directa de la cascarilla de cebada como fuente de carbohidratos (por ejemplo, como suplemento de alimentos o para la fabricación de glucosa o etanol) no es conveniente por su baja digestibilidad. Por ello es preciso llevar a cabo un fraccionamiento de sus principales constituyentes (celulosa, hemicelulosas y lignina) para aprovecharlos por separado.

La tabla 2 muestra la composición química de la cascarilla de cebada original, con mezcla de tamaños de partícula entre 0.071 y 2 mm, siendo el tamaño medio de partícula de 0.69 mm.

El contenido en cenizas es muy alto (15.49%), muy superior al de las maderas y al de la mayoría de los materiales agrícolas. Anglès *et al.* (1997) realizaron un estudio sobre materiales con un elevado contenido en cenizas; encontraron que la cascarilla de arroz era el MLC de su estudio con mayor contenido en cenizas, con 10.7%, valor inferior al encontrado en la cascarilla de cebada. Este elevado contenido en cenizas desaconseja la combustión de la cascarilla de cebada.

El contenido en lignina de Klason (CLK) es del orden encontrado en otros materiales agrícolas. El contenido en glucano (CGN) es bajo, incluso para un material agrícola. Las hemicelulosas, con un total de 36.57 g/100 g, representan la fracción más abundante en la cascarilla, mientras que en la paja de cebada hay entre 22 y 25 g/100 g. La distribución de monómeros en las hemicelulosas (que suelen estar formadas por arabinoglucoroxilanos) es típica de un material agrícola. Bajo el término de *otros* se agrupa el resto de los compuestos (tales como extractos y lignina soluble en ácido).

Los materiales lignocelulósicos (MLC) procedentes de los sectores agrícola, forestal o industrial, son una fuente muy abundante de recursos renovables y con un gran potencial como materia prima dentro de la industria alimentaria. En los últimos años se han desarrollado procedimientos químicos para el aprovechamiento integral de los materiales lignocelulósicos, distintos de la tradicional producción de pasta de celulosa.

Tabla 2. Composición química de la cascarilla de cebada, mezcla (valores medios de cuatro replicados)

<i>Componente</i>	<i>Contenido (g/100 g MLC b.s.)</i>
Cenizas	15.49
Proteínas	5.90
Lignina de Klason	19.22
Celulosa	21.43
Hemicelulosas	
Xilanos	26.75
Arabanos	5.74
Ácidos urónicos	2.39
Grupos acetilo	1.69
Otros	1.39

Algunos de los esquemas de procesamiento estudiados pretenden la separación selectiva de los componentes poliméricos de los materiales lignocelulósicos (celulosa, hemicelulosas y lignina), en tratamientos denominados de *fraccionamiento*. Este tipo de procesos permite una utilización separada de las *fracciones* obtenidas y su transformación en productos de interés comercial; particularmente, en productos de interés alimentario de alto valor añadido, por medio de procesos químicos y/o biotecnológicos.

Los beneficios medioambientales estriban no sólo en la reutilización de los residuos sólidos, sino también en el nulo perjuicio medioambiental de los procesos ensayados (minimización de los efluentes, reducción/reutilización de los productos químicos y utilización de todas las fracciones).

Los materiales lignocelulósicos tienen una naturaleza heterogénea y las filosofías de aprovechamiento se basan en aprovechar los materiales como un todo (la pirólisis o combustión), o bien en separar las distintas fracciones que componen el sustrato para dotar a éstas de aplicaciones diferentes, según su naturaleza química.

El fraccionamiento de los materiales lignocelulósicos está condicionado por el hecho de que la celulosa, las hemicelulosas y la lignina son de naturaleza polimérica y se hallan interpenetradas, existiendo entre ellas uniones físicas y químicas; es por eso que los procedimientos clásicos de fraccionamiento (cristalización, precipitación, extracción) no son satisfactorios para su separación individual, ya que el aislamiento de uno de los polímeros exige la degradación de la estructura de los otros (Nimz y

Casten, 1986). Entre los procedimientos químicos utilizados para el aislamiento de la fracción celulósica e hidrólisis de la fracción hemicelulósica, destacan los procesos mixtos, en los cuales el material lignocelulósico es tratado secuencialmente con varios agentes químicos, de modo que cada uno de éstos separa alguna de las fracciones de interés. Aunque en este tipo de procesos aumentan los costos de funcionamiento, permiten obtener una mayor selectividad y un fraccionamiento más eficiente de la materia prima. Un ejemplo de procesos de este tipo es el acoplamiento de una prehidrólisis selectiva con ácido diluido (para obtener azúcares hemicelulósicos) y un tratamiento con agentes oxidantes (para eliminar la lignina), de modo que se obtiene la celulosa en fase sólida (Koukios y Valkanas, 1982; David *et al.*, 1988).

En la figura 2 se representa un esquema de aprovechamiento integral de la cascarrilla de cebada, que permite la utilización de las diferentes fracciones para la producción de diferentes aditivos alimentarios: xilitol, ácido láctico y extractos de naturaleza polifenólica, susceptibles de ser utilizados como agente antioxidante y conservante.

Aprovechamiento de la fracción hemicelulósica

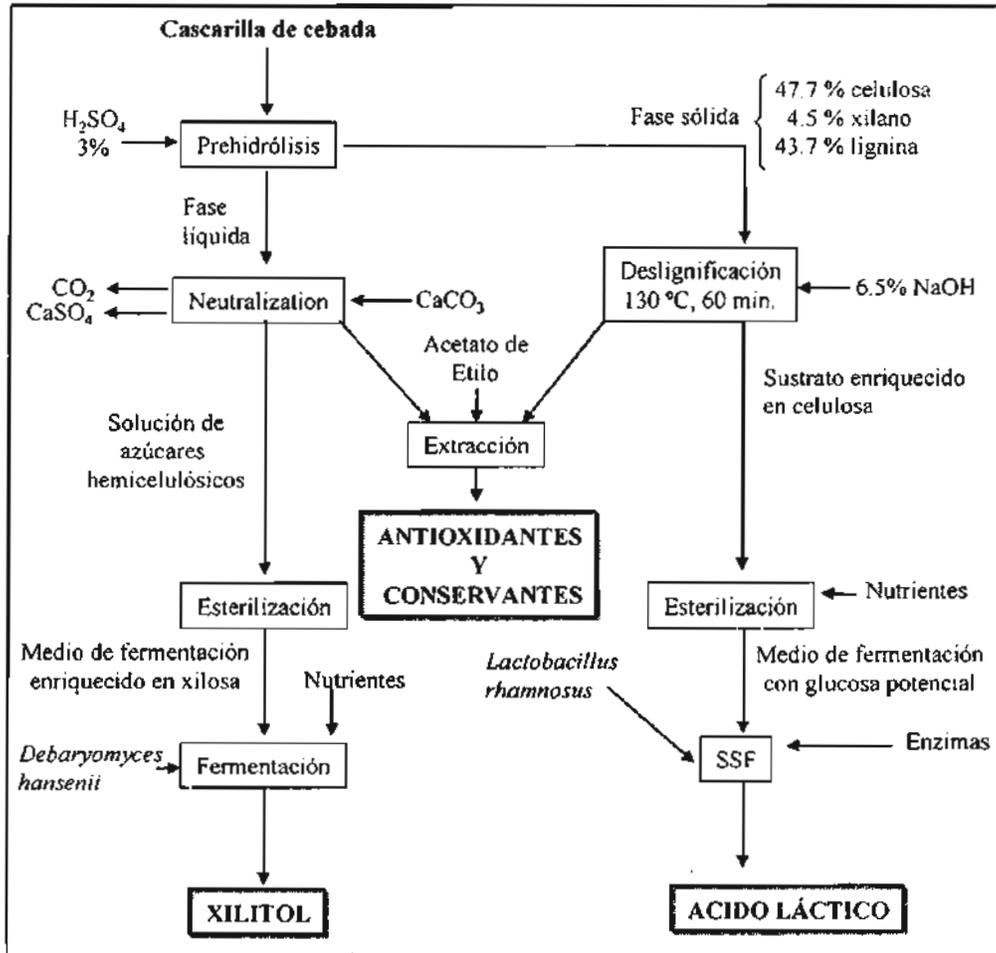
La hidrólisis de la fracción hemicelulósica conduce a disoluciones de azúcares, constituidas fundamentalmente por xilosa, que pueden utilizarse para formular medios fermentativos destinados a la obtención biotecnológica de xilitol. Éste es poliol de alto valor añadido con propiedades como elevado poder edulcorante, tolerancia por diabéticos y carácter anticariogénico, que lo hacen muy interesante para su aplicación en la industria alimentaria.

Optimización de las condiciones de hidrólisis

Conjuntamente con los azúcares hemicelulósicos, en el medio de hidrólisis aparecen diferentes compuestos de degradación que pueden inhibir los procesos fermentativos o limitar en gran medida los rendimientos y productividades que se podrían obtener en ausencia de estos inhibidores (furfural, hidroximetilfurfural, etc.). Por este motivo, para cada material lignocelulósico es necesario optimizar las condiciones de hidrólisis, de forma que se obtenga la mayor concentración de azúcares posible pero, al mismo tiempo, minimizando la concentración de los productos que pueden resultar inhibidores para el proceso fermentativo.

Cruz *et al.* (2000a) determinaron la concentración de xilosa (el principal producto de reacción) y la de otros compuestos resultantes del proceso de hidrólisis (otros

Figura 2. Esquema de aprovechamiento de la cascarilla de cebada para la producción de aditivos alimentarios

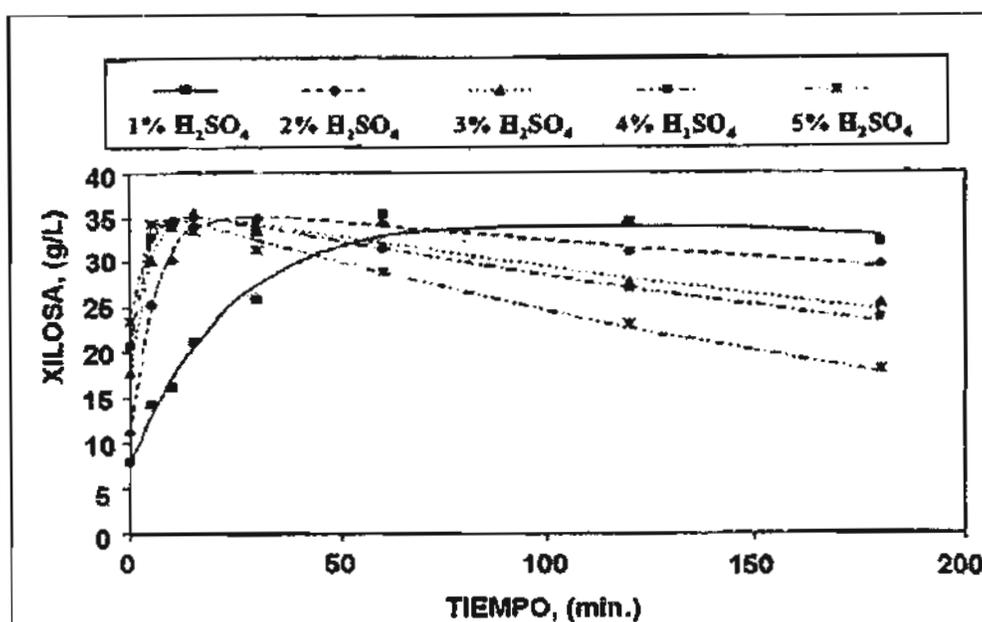


azúcares, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural) durante la etapa de prehidrólisis de la cascarilla de cebada a una temperatura de 130°C y bajo diferentes condiciones de operación (tiempo de reacción y concentración de ácido sulfúrico).

En la figura 3 se muestran las concentraciones de xilosa para las diferentes condiciones de hidrólisis ensayadas. Los resultados permiten observar que se alcanza una concentración máxima de xilosa en tiempos de reacción intermedios (entre 15 minutos y una hora) dependiendo de la concentración de ácido empleada. En tiempos de reacción prolongados, la concentración de xilosa disminuye, ya que ésta se involucra en diferentes reacciones de degradación, cuya cinética se ve

incrementada a concentraciones de ácido sulfúrico crecientes. Inicialmente, el xilano es transformado en xilosa, y posteriormente, si se deja continuar la reacción, ésta es transformada en furfural y otros productos de degradación. Asimismo, la concentración inicial de xilosa nos indica que parte del xilano ya ha reaccionado durante el periodo de calentamiento.

Figura 3. Concentraciones de xilosa para diferentes condiciones de prehidrólisis (Cruz *et al.*, 2000a)



La concentración máxima de xilosa, en torno a 35 g/L (correspondiente a 96% de conversión del xilano susceptible de reaccionar) se obtiene a diferentes tiempos, dependiendo de la concentración de ácido sulfúrico empleada. Las condiciones óptimas de hidrólisis pueden considerarse aproximadamente a 15 minutos de hidrólisis con 3% de ácido sulfúrico, ya que condiciones de hidrólisis más severas conducen a la disminución en la concentración de xilosa y al aumento de la concentración de inhibidores del proceso fermentativo.

En la tabla 3 se muestran las concentraciones de otros azúcares generados durante el proceso de hidrólisis (glucosa y arabinosa) y de productos inhibidores de la fermentación (ácido acético y furfural). Los azúcares, tanto la glucosa como la

Tabla 3. Concentraciones de azúcares e inhibidores de la fermentación generados durante el proceso de prehidrólisis

$\%H_2SO_4$ Tiempo (h)	Glucosa (g/L)					Arabinosa (g/L)					Ácido acético (g/L)					Furfural (g/L)					
	1%	2%	3%	4%	5%	1%	2%	3%	4%	5%	1%	2%	3%	4%	5%	1%	2%	3%	4%	5%	
0	2.3	2.4	2.5	2.7	3.0	5.1	5.0	5.3	5.4	5.3	0.7	0.9	1.5	1.5	1.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
5	2.4	4.0	4.9	4.9	5.9	5.1	5.4	6.4	5.9	6.8	1.1	1.8	2.2	2.3	2.5	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	
10	2.4	4.5	5.9	5.9	5.9	5.1	5.8	7.0	7.0	7.1	1.5	1.8	2.3	2.3	2.4	0.0	0.2	0.2	0.3	0.4	
15	2.4	5.1	5.9	6.0	5.9	5.3	7.0	7.1	7.0	6.8	2.0	2.3	2.4	2.5	2.4	0.0	0.2	0.3	0.8	1.0	
30	3.4	6.0	6.5	6.1	6.0	5.7	6.9	7.3	7.5	6.9	2.0	2.4	2.4	2.5	2.5	0.1	0.5	1.1	1.4	2.1	
60	5.4	6.6	6.7	6.8	6.8	7.3	8.5	7.4	8.1	7.9	2.3	2.6	2.6	2.4	2.4	1.7	2.1	2.4	2.9	2.5	
120	6.1	6.6	6.8	7.4	7.4	6.8	6.3	6.5	6.7	5.9	2.6	2.6	2.7	2.7	2.8	1.7	2.2	3.3	3.7	4.4	
180	6.3	6.7	6.9	7.6	7.6	6.6	6.8	6.1	6.3	5.2	2.4	2.4	2.6	2.8	2.6	2.1	2.5	3.9	5.8		

arabinosa, siguen una cinética similar a la de la xilosa, si bien la glucosa no experimenta las reacciones de degradación que sufre la xilosa en condiciones de hidrólisis severas.

El ácido acético liberado de los grupos acetilo aumenta gradualmente a medida que lo hace la concentración de ácido. Para las condiciones que permiten obtener la máxima concentración de xilosa (130°C, 15 min) se obtienen 2.4 g de ácido acético/L. Estos valores están cerca del límite de concentración que causa efectos inhibitorios en algunas levaduras, y demuestra que la concentración de ácido acético condiciona la susceptibilidad de los hidrolizados a la fermentación.

El ácido acético, que puede aparecer en concentraciones de hasta varios gramos por litro en los hidrolizados, es el inhibidor más estudiado. Su efecto inhibitor depende de la concentración de su forma no disociada, que depende de la concentración y del pH del medio. En pH ácido, el ácido acético puede difundirse dentro del citoplasma celular, donde se disocia y baja el pH intracelular, provocando un desequilibrio metabólico que da lugar a un aumento en el consumo de energía. La sensibilidad de las levaduras al ácido acético depende del microorganismo considerado. Maiorella *et al.* (1983), empleando *Saccharomyces cerevisiae*, encontraron 86% de inhibición en el crecimiento celular, en medios que contenían 8.5 g de ácido acético/L. Watson *et al.* (1984), trabajando con *Pachysolen tannophilus*, observaron que concentraciones de ácido acético superiores a 1.45 g/L inhibían fuertemente la producción de biomasa, y encontraron que el efecto inhibitor se acentuaba a medida que disminuía el valor del pH, debido al aumento en el número de moléculas no disociadas. Se ha citado que concentraciones similares de ácido acético (1.2 g/L) son capaces de inhibir el crecimiento de *Candida utilis* (Hunková y Fencel, 1977). Phowchinda *et al.* (1995), empleando *Saccharomyces cerevisiae*, observaron una inhibición similar del crecimiento celular asociada a la presencia de acético. En hidrolizados de madera de eucalipto que contenían 10.4 g de ácido acético/L, Ferrari *et al.* (1992) sólo obtuvieron 1.4 g de xilitol/L a partir de 36.1 g de xilosa/L en 141 horas, mientras que, tras reducir la concentración de acético hasta 7.5 g/L por un pretratamiento con resinas de intercambio aniónico, alcanzaron 2.4 g de xilitol/L a partir de 35.1 g de xilosa/L.

La concentración de furfural generado durante el proceso de hidrólisis por reacciones de deshidratación de las pentosas también se incrementa cuando lo hace la severidad de las condiciones de hidrólisis. En las condiciones de hidrólisis óptimas para la cascarilla de cebada, se obtienen concentraciones de 0.32 g de furfural/L. El efecto inhibitorio del furfural varía en función del microorganismo considerado. *Pichia stipitis* es una de las levaduras más afectada por la adición de furfural. Por ejemplo, en medios que contenían 0.5 g de furfural/L se redujo 25% el crecimiento celular,

mientras que la presencia de 1 o 2 g de furfural/L lo redujeron 47 y 99% respectivamente (Delgenes *et al.* 1996). En el mismo sentido, Beck (1986) encontró que al aumentar la concentración de furfural en hidrolizados ácidos de una madera dura desde 0.3 a 1.1 g/L, la levadura *Pachysolen tannophilus* pasaba de consumir 97% del sustrato a no consumir nada del mismo; efectos similares encontraron Palmqvist *et al.* (1999) en medios sintéticos sobre *S. cerevisiae*, en concentraciones de 5 g furfural/L. Las concentraciones de 0.32 g de furfural/L encontradas en los hidrolizados de cascarilla de cebada no provocan ningún efecto inhibitorio para la fermentación a xilitol por medio de la levadura *Debaryomyces hansenii*.

La concentración de hidroximetilfural fue en todas las condiciones de hidrólisis ensayadas para la cascarilla de cebada, inferior a 0.1 g/L, concentración que no causa ningún efecto inhibitorio sobre la fermentación.

Producción biotecnológica de xilitol

El xilitol, de fórmula $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_3\text{CH}_2\text{OH}$ y peso molecular 152.15, es el pentitol resultante de la reducción de la xilosa. Se encuentra de forma natural y en pequeñas cantidades en muchas frutas y vegetales; también actúa como intermedio en el metabolismo de los carbohidratos de mamíferos.

El xilitol presenta un poder edulcorante similar al de otros azúcares, como la sacarosa y la glucosa, pero a diferencia de éstos, presenta una ventaja: no reacciona con los aminoácidos, lo que provoca un oscurecimiento (reacción de Maillard), así como una disminución del valor biológico de las proteínas. Debido a sus propiedades presenta múltiples aplicaciones en el campo alimentario, por ejemplo se utiliza en la fabricación de yogures, fiambres, productos de pastelería y panadería, y bebidas de bajo poder energético (Emodi, 1978; Pepper y Olinger, 1988).

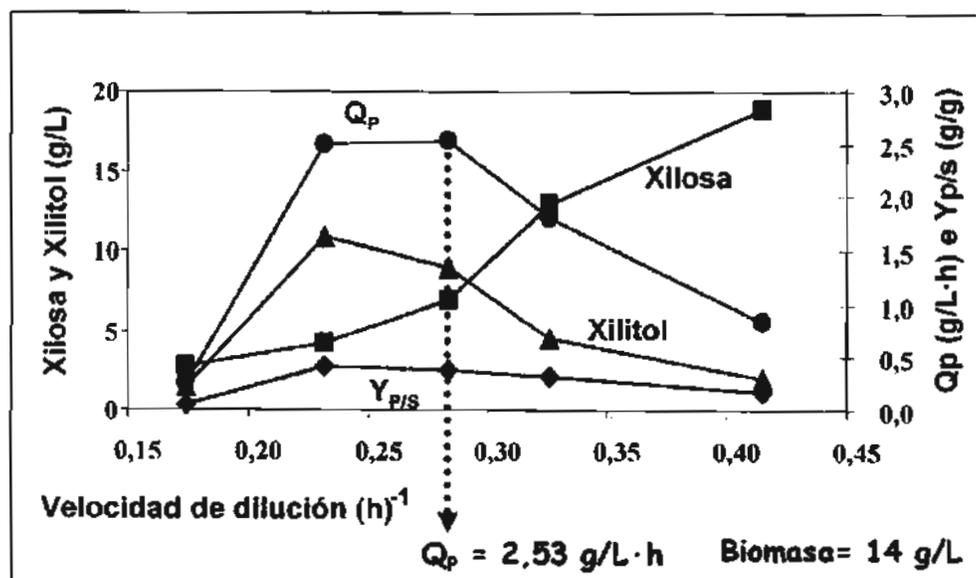
El xilitol es un intermediario metabólico de la fermentación de la D-xilosa por las levaduras, las cuales pueden convertir la D-xilosa en xilitol por medio de la enzima xilosa reductasa, la cual es NAD(P)-dependiente (Höfer *et al.*, 1971). Se han ensayado diferentes levaduras para este propósito, pero una de las más utilizadas es la levadura *Debaryomyces hansenii* (Girio *et al.*, 1990, 1994; Heikkilä *et al.*, 1991; Parajó *et al.*, 1995, 1996; Domínguez *et al.*, 1997a, b; Cruz *et al.*, 2000b).

Cruz y sus colaboradores (2000b), con el objeto de obtener unos elevados rendimientos y productividades en la conversión de xilosa a xilitol, realizaron una fermentación en continuo, con recirculación de la levadura *Debaryomyces hansenii*, empleando como alimentación hidrolizados de cascarilla de cebada obtenidos ope-

rando a 130°C, durante 15 minutos y con una concentración de ácido sulfúrico de 3%. El hecho de aplicar un sistema de retención de levaduras en la fermentación en continuo, permite disponer de altas concentraciones celulares en el medio de fermentación, con lo cual se incrementan considerablemente las productividades.

En fermentaciones en continuo sin emplear el sistema de recirculación de levaduras, se optimizó la velocidad de dilución y se obtuvo una productividad volumétrica máxima de 0.60 g de xilitol/L·h para velocidad de dilución de 0.048 h⁻¹. A esta velocidad de dilución se obtienen concentraciones de biomasa de tan sólo 3-4 g/L debido al efecto de lavado que comienza a aparecer en dicha velocidad. Para evitar tal efecto, Cruz y sus colaboradores (2000b) aplicaron un sistema de separación de células por membranas de ultrafiltración, que permite la recirculación de levaduras al interior del fermentador; de esta forma obtuvieron concentraciones de biomasa alrededor de 14 g/L a todas las velocidades de dilución ensayadas. El empleo de estos sistemas de recirculación permite aumentar la productividad volumétrica de xilitol a 2.53 g/L·h, a valores de dilución intermedios, entre 0.23 y 0.28 h⁻¹. En la figura 4 se muestra la concentración de xilosa, xilitol, así como las productividades volumétricas para los estados estacionarios de las diferentes velocidades de dilución estudiadas.

Figura 4. Fermentación en continuo de hidrolizados de cascarilla de cebada con recirculación de levaduras (Cruz *et al.*, 2000b)



Aprovechamiento de la fracción celulósica

Según el esquema propuesto en la figura 2 para el aprovechamiento integral de la cascarilla de cebada, una vez terminada la etapa de prehidrólisis con 3% de ácido sulfúrico a 130°C durante 15 minutos, y se separan los licores hemicelulósicos, cuya utilización ha sido discutida en el apartado anterior, se obtiene un residuo sólido compuesto mayoritariamente por celulosa (47.7%) y lignina (43.7 %).

Para convertir este residuo sólido en un sustrato adecuado para una etapa de hidrólisis enzimática que nos permita obtener disoluciones de glucosa susceptibles de ser empleadas en procesos fermentativos, es necesario realizar previamente una etapa de deslignificación, que puede ser hecha por ejemplo, con NaOH. Este proceso es necesario, debido a que la lignina forma una barrera física que impide el acceso de las enzimas a la celulosa; de esta manera, la etapa de deslignificación permite incrementar la accesibilidad de las enzimas y, por tanto, aumentar los rendimientos en glucosa y las velocidades de reacción. El empleo de tratamientos de deslignificación alcalinos tiene beneficios colaterales, por ejemplo, provocar alteraciones en las características físico-químicas de la celulosa, tales como cristalinidad y área superficial, lo que incrementa la susceptibilidad de la celulosa hacia la hidrólisis enzimática (Gharpuray *et al.*, 1983).

Optimización de la etapa de deslignificación

Moldes y colaboradores (2002) optimizaron las condiciones de operación de la etapa de deslignificación, con NaOH, del residuo sólido obtenido tras la prehidrólisis de la cascarilla de cebada, comprobando sus efectos sobre la composición y susceptibilidad a la hidrólisis enzimática de los residuos celulósicos obtenidos. Estos autores inicialmente llevaron a cabo una hidrólisis enzimática del residuo sólido, sin etapa de deslignificación, lo que comprobó que este sustrato mostraba una pobre susceptibilidad a la hidrólisis enzimática, por lo que se hizo imprescindible la realización de una etapa de deslignificación. Posteriormente optimizaron la temperatura, concentración de NaOH y tiempo de dicho proceso.

El contenido en celulosa se incrementa, a medida que lo hacen la temperatura y la concentración de NaOH, mientras que la duración de los tratamientos apenas presenta influencia alguna. En la figura 5 se muestra la dependencia del contenido en celulosa de las muestras sobre la temperatura y la concentración de NaOH para un tratamiento de 35 minutos. Se puede comprobar que la deslignificación es más drástica

a medida que aumenta la temperatura de tratamiento, observándose que en las condiciones ensayadas más severas (130°C, 10% de NaOH) se obtiene un residuo sólido con un contenido de hasta 86% de celulosa, lo que confirma la idoneidad de dicho proceso alcalino de deslignificación.

Los residuos sólidos obtenidos tras las etapa deslignificación muestran una elevada susceptibilidad a la hidrólisis enzimática con celulasas, resultando en porcentajes de conversión de celulosa en glucosa entre 77.6 y 100% para todas las condiciones de deslignificación evaluadas. Cuando se combinan bajas temperaturas de deslignificación con tiempos de reacción prolongados o con altas concentraciones de NaOH, el porcentaje de conversión se incrementa significativamente, hasta valores de 86.8%.

En la figura 6 se muestra la dependencia de la conversión de celulosa en glucosa, con la temperatura y concentración de NaOH para un tratamiento de 35 minutos, observándose un aumento importante de conversión cuando se incrementa la temperatura desde 50°C a 100°C, con lo que se obtienen conversiones de 94-100% a 100°C. En función de estos resultados, se pueden considerar como condiciones adecuadas para conseguir la deslignificación del residuo sólido obtenido tras la hidrólisis

Figura 5. Contenido en celulosa después de diferentes condiciones de deslignificación con NaOH (Moldes *et al.*, 2002)

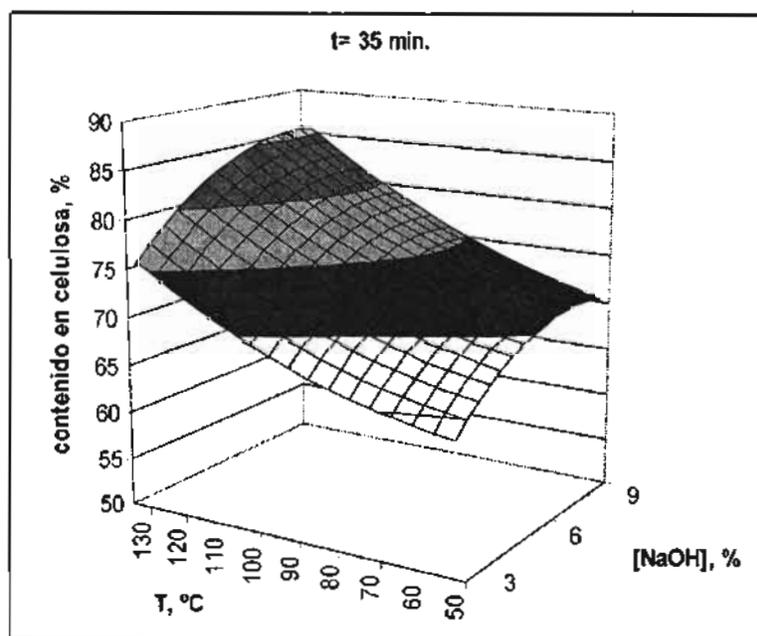
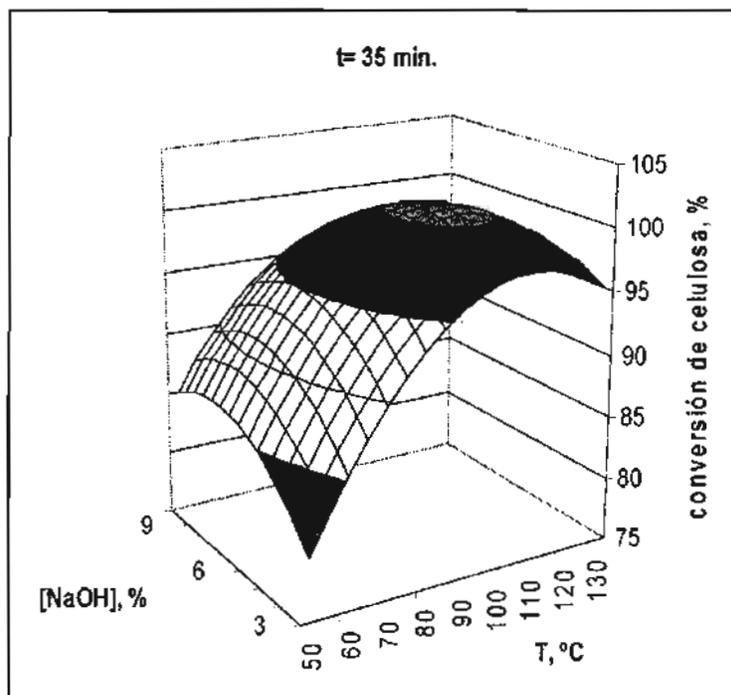


Figura 6. Porcentaje de conversión de celulosa en glucosa para diferentes condiciones de deslignificación con NaOH (Moldes *et al.*, 2002)



de la cascarilla de cebada, una concentración de hidróxido sódico de 10% a 100°C durante 160 minutos.

Sacarificación y fermentación simultánea para la obtención de ácido láctico

El ácido láctico (o ácido 2-hidroxipropiónico), cuya fórmula simplificada es $C_3O_3H_6$, presenta un amplio rango de aplicaciones; cabe destacar que más de 50% del ácido láctico producido en el mundo se emplea en la industria alimentaria como acidulante y conservante de alimentos. 20% se usa en la producción de estearil-2-lactilato, utilizado como agente emulsionante y estabilizante; el porcentaje restante se emplea en la industria química para la fabricación de tintas, pinturas y disolventes de la industria textil, y en la industria farmacéutica, para la fabricación de plásticos biodegrada-

bles, destinados sobre todo a la fabricación de prótesis, suturas y dispositivos de dosificación interna para usos médicos (Vick Roy, 1985).

Dentro del campo de la alimentación, el ácido láctico se emplea en casi cada etapa de las industrias del sector (Chahal, 1989). En general, el uso del ácido láctico se ve potenciado por su carácter *natural* (el consumidor no lo percibe como un aditivo *artificial*, extraño o poco saludable) y por su sabor ácido, que no se sobrepone a otros más sutiles. Esta última característica propicia una amplia utilización como acidulante. También se emplea frecuentemente como conservante de alimentos, al prevenir el crecimiento de *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* en productos fermentados perecederos como los de pastelería y bollería (Salminen y Von Wright, 1993).

La aplicación cuantitativamente más importante de la fermentación láctica en el campo alimentario es la producción y el procesamiento de derivados lácteos, principalmente en la elaboración de yogur (Salovaara, 1993), actividad industrial con más de medio siglo de experiencia (Salminen y Von Wright, 1993). Así, bacterias como *Streptococcus thermophilus* o *Lactobacillus bulgaricus* provocan la desestabilización de las micelas de caseína y su posterior coagulación mediante fermentación láctica y sus procesos asociados (Özen y Özilgen, 1992). En la fabricación de quesos, a veces se prefiere la acidificación con ácido láctico a la acidificación natural, para evitar el riesgo de proliferación de microorganismos no deseados que ésta última conlleva.

Adicionalmente, el ácido láctico se emplea como aditivo en productos alimentarios tan diversos como vegetales, carne, pescado, legumbres, cereales, pastelería y bebidas fermentadas, ámbitos en los que contribuyen al aroma, seguridad e imagen del producto (Salovaara, 1993).

Para la utilización del residuo celulósico obtenido tras la etapa deslignificación, en procesos fermentativos destinados a la obtención de ácido láctico, es necesaria una etapa de hidrólisis enzimática con celulasas, a fin de convertir la celulosa en glucosa, la cual ya es asimilable por las bacterias lácticas.

Estas etapas de hidrólisis enzimática y fermentación pueden hacerse de modo secuencial, o bien, puede realizarse en una única etapa la hidrólisis de los polisacáridos y la fermentación de los azúcares obtenidos a ácido láctico. Este último procedimiento, conocido en terminología anglosajona como *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF), resulta factible cuando las condiciones de operación (fundamentalmente pH y temperatura) son compatibles para los dos procesos implicados (sacarificación y fermentación), y cuando la inhibición del enzima por el producto de la fermentación es moderada y deseablemente menor que la ejercida por los azúcares generados en la hidrólisis enzimática.

Diversos autores han propuesto procesos de ssf para la producción de ácido láctico a partir de distintos materiales celulósicos. La tabla 4 recoge referencias sobre este tema, así como datos de parámetros cinéticos de rendimiento, donde se observa que, en general, la productividad total alcanzada promedia los 0.45 g/L·h.

Tabla 4. Datos de referencias bibliográficas sobre la producción de ácido láctico a partir de distintos materiales celulósicos

Sustrato	Bacteria	RES ¹	Qp ¹	Yp/s ¹	T ¹	pH	C _{max} ¹	Referencia
Zuros de maíz	<i>L. delbrium</i>	5	0.47	79	50	5	34.0	Luo <i>et al.</i> , 1997
Celulosa pura	<i>L. bulgaricus</i>	ND ²	0.45	80	45	5	62.0	Vankatesh, 1997
Celulosa pura	<i>L. delbrueckii</i>	ND ²	0.43	52.5	45	5	52.5	Abe y Takagi, 1991
Papel de periódico	<i>L. delbrueckii</i>	ND ²	0.48	81	45	4.7	24.0	Abe y Takagi, 1991
Residuos de papel	<i>L. delbrueckii</i>	25	0.25	84	45	5	25.5	Schmidt y Padukone, 1997
Hierba	<i>L. delbrueckii</i>	25	0.46	100	46	5	15.0	Chen y Lee, 1997

¹ RES: Actividad celulásica (UPF/g), unidades de papel de filtro/g sustrato; Qp: productividad, g/L·h; Yp/s: rendimiento en producto, %; T: temperatura, °C; C_{max}: concentración máxima de ácido láctico, g/L

² Valores no especificados en los respectivos trabajos.

Las ventajas de la ssf con respecto a la sacarificación y fermentación secuenciales radican en la posibilidad de operarla en volúmenes más pequeños de reactor con mayores velocidades de reacción global, ya que se evita la inhibición ejercida por los productos de sacarificación sobre los enzimas. En este sentido, Abe y Takagi (1991), trabajando con celulosa pura y papel de periódico, encontraron que el tiempo de operación durante la ssf se reducía por un factor de 1.6 respecto al que correspondería a un esquema de operación donde la hidrólisis y la fermentación se llevasen a cabo secuencialmente.

Además de los materiales celulósicos existen otras materias primas entre las que destacan materiales amiláceos que pueden utilizarse en procesos de sacarificación y fermentación simultáneos (Tsai y Moon, 1998, Hofvendahl *et al.*, 1999). Así, Linko y Javanainen (1996) realizaron una ssf con *Lactobacillus casei* y α -amilasa, utilizando como materia prima cebada, previamente sometida a un proceso de licuefacción. Mediante este procedimiento, las concentraciones de ácido láctico obtenidas después

de 48 horas fueron de 140-162 g/L, con rendimientos en producto de 87-98%, en función de la concentración inicial de sustrato.

Cabe destacar que al igual que ocurriré con sistemas de cultivos puros, durante la SSF se pueden acoplar etapas de recuperación de producto mediante la transferencia de ácido láctico a otra fase.

Para conseguir la conversión de la fracción celulósica en ácido láctico por medio de la bacteria *Lactobacillus rhamnosus* es necesaria una hidrólisis enzimática de la celulosa y una conversión posterior de la glucosa liberada en ácido láctico. Si se quiere llevar a cabo ambas etapas de forma simultánea mediante una SSF, es necesario buscar condiciones de operación que sean compatibles con ambos procesos (sacarificación y fermentación). La temperatura óptima de las celulasas empleadas para la etapa de hidrólisis enzimática es 48.5°C, pero para hacer compatible las condiciones con hidrólisis junto con la temperatura óptima de fermentación de la bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (41.5°C), la temperatura más adecuada para la SSF es 45°C (Parajó *et al.*, 1997).

Empleando residuo de papel como materia prima para la bioconversión a ácido láctico por SSF, se obtuvieron productividades de 0.54 g/L·h (Schmidt y Padukone, 1997). Si se emplea *Eucalyptus globulus* como materia prima se pueden alcanzar productividades de 0.47 g/L·h (Moldes *et al.*, 2000); en cambio si se emplea cascarilla de cebada sometida a una etapa de prehidrólisis ácida y posterior deslignificación con NaOH, se pueden alcanzar productividades de 1.25 g/L·h.

Obtención de extractos antioxidantes a partir de productos de degradación lignina

Durante las etapas de prehidrólisis y deslignificación se forman compuestos de naturaleza polifenólica derivados de la degradación de la lignina, los cuales pueden ser recuperados mediante procesos de extracción. Estos compuestos son susceptibles de ser utilizados como antioxidantes y conservantes en alimentos.

El deterioro oxidativo de grasas y aceites en los alimentos es el principal responsable de los sabores y olores rancios, así como de la reducción del valor nutritivo y seguridad debido a la formación de productos secundarios y potencialmente tóxicos. La adición de antioxidantes permite preservar las propiedades organolépticas y evitar la degradación o destrucción de vitaminas. El butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), gallato de propilo (GP) y terc-butil hidroquinona (TBHQ) son los antioxidantes sintéticos más frecuentemente empleados para la conservación de alimentos. Los

tocoferoles también se emplean como antioxidantes alimentarios, pues su efectividad es creciente para los alfa>beta>gamma>delta. Los estudios publicados sobre la posible toxicidad del BHA y BHT, el elevado costo de fabricación y baja eficacia de los tocoferoles, junto con la creciente concienciación de los consumidores respecto a cuestiones de seguridad y toxicidad alimentaria, ha favorecido el interés y la identificación de antioxidantes alternativos y seguros de origen natural (Sherwin, 1990; Wanasundara y Shahidi, 1998).

Diversos aspectos tecnológicos favorecen la sustitución de los antioxidantes sintéticos por otros naturales, ya que éstos ofrecen ventajas en cuanto a la solubilidad en aceite y agua, una propiedad de especial interés para las emulsiones, particularmente entre las más frecuentes en sistemas alimentarios; sin embargo, el origen natural de los antioxidantes no garantiza su seguridad, por lo que es necesaria la evaluación de su posible toxicidad.

La mayoría de los compuestos antioxidantes naturales son de origen vegetal, y la mayoría de los que se han estudiado para su aplicación en la industria alimentaria son compuestos polifenólicos. El reino vegetal ofrece una gran variedad de compuestos de alto y bajo peso molecular con propiedades antioxidantes (Hagerman *et al.*, 1998).

La protección que frutas y vegetales proporcionan frente a ciertas enfermedades ha sido atribuida a la presencia de antioxidantes, tales como vitamina C, vitamina E, α -tocoferol, β -caroteno y compuestos polifenólicos (Aruoma, 1998; Abushita *et al.*, 1997). Se ha demostrado que los compuestos polifenólicos reducen la oxidación *in vitro* de las lipoproteínas de baja densidad o *low density lipoproteins* (LDL) (Meyer *et al.*, 1998a); y especialmente, aquellos compuestos con múltiples grupos hidroxilo (Moon y Terao, 1998). Otras actividades fisiológicas de los antioxidantes naturales incluyen actividad antibacteriana, antiviral, antimutagénica (Ikken *et al.*, 1999), anti-alérgica (Noguchi *et al.*, 1999), anticarcinogénica (Carrol *et al.*, 1999; Kawaii *et al.*, 1999), inhibidora del incremento de la presión arterial (Ito *et al.*, 1998), antiúlceras (Saito *et al.*, 1998, Vilegas *et al.*, 1999) y anticariogénica (Tanabe *et al.*, 1995). Otros estudios han demostrado las propiedades antimicrobianas y antifúngicas de los extractos polifenólicos de *Sempervivum L* (Abram y Donko, 1999), de la piel de patata (Rodríguez de Sotillo *et al.*, 1998), de la vainillina (Cerrutti *et al.*, 1997) y del humo líquido (Estrada-Muñoz *et al.*, 1998).

Los residuos agrícolas e industriales son una fuente atractiva de antioxidantes naturales. Se han estudiado los residuos de piel de patata (Rodríguez de Sotillo *et al.*, 1994), orujo de oliva (Sheabar y Neeman, 1988), alpechines (Visioli *et al.*, 1999), pepitas de uva (Gabrielska *et al.*, 1997; Wulff, 1997; Saura-Calixto, 1998; Pietta *et al.*, 1998; Saint-Criq de Gaulejac *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 1999), así como el

bagazo de vino y pieles de uva (Larrauri *et al.*, 1997, 1998; Meyer *et al.*, 1998b). Se han identificado distintos compuestos polifenólicos en sustratos, tales como bagazo de manzana (Lu y Foo, 1997), semillas y pieles de cítricos (Bocco *et al.*, 1998), residuos de pulpa de zanahoria (Chen y Tang, 1998), hojas viejas de té (Zandi y Gordon, 1999), subproductos del coco (Azizah *et al.*, 1999) y melazas de soya (Hosny y Rosazza, 1999).

Para la extracción de compuestos fenólicos presentes en la fase acuosa, tanto en la obtenida tras la prehidrólisis con ácido sulfúrico como en la obtenida tras la etapa de deslignificación con NaOH, debe utilizarse un disolvente que extraiga la máxima cantidad posible de compuestos de naturaleza fenólica y éstos deben presentar, a su vez, una elevada capacidad antioxidante. Los disolventes apolares son los más usados para la extracción de compuestos fenólicos de medios acuosos. El acetato de etilo es un disolvente muy adecuado por su polaridad, su baja solubilidad en agua y porque puede ser utilizado en procesos alimentarios. Estudios previos han mostrado una mayor efectividad (80%) en la recuperación de la fracción de lignina solubilizada que la alcanzada por el dietil-éter (60%) (Cruz *et al.*, 1999; 2001). Según estudios llevados a cabo por Cruz y colaboradores (1999) la relación líquido/líquido (expresada como volumen de fase acuosa/volumen de disolvente) recomendada para la extracción es de 1/3 y la mezcla debe mantenerse con agitación constante durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Cruz *et al.* (2001) evaluaron la capacidad antioxidante y conservante de los extractos obtenidos a partir de los licores hemicelulósicos generados por prehidrólisis ácida de diferentes materiales lignocelulósicos. Haciendo la extracción con acetato de etilo en las condiciones de operación anteriormente indicadas, comprobaron que el mayor rendimiento de extracción de los diferentes materiales lignocelulósicos ensayados corresponde a la cascarilla de cebada (0.042 g de extractos/g de cascarilla de cebada), en comparación con los 0.030 g de extractos/g de madera de eucalipto, 0.021 g de extractos/g de zuros de maíz, y 0.022 g de extractos/g de hojas de maíz.

Los extractos obtenidos a partir de los licores hemicelulósicos de la cascarilla de cebada presentan una capacidad antioxidante, determinada como la capacidad de captación del radical DFPH ligeramente superior a la que presenta el BHT. Si la actividad antioxidante se determina como la capacidad de decoloración de β -caroteno en emulsión con ácido linoleico, se comprueba que la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de la cebada es aproximadamente la mitad de la que presentan el BHT o el BHA (Cruz *et al.*, 2001). Estos mismos extractos, además de presentar una elevada capacidad antioxidante, tienen una marcada actividad antimicrobiana, por lo que presentan una concentración mínima inhibitoria de $5 \cdot 10^3 - 10^4 \mu\text{g/mL}$ y una con-

centración mínima bactericida de $5 \cdot 10^3 - 5 \cdot 10^4$ $\mu\text{g/mL}$ frente a un amplio espectro de bacterias y levaduras.

En el esquema de aprovechamiento propuesto en este capítulo para la cascarilla de cebada, no sólo se puede obtener extractos de naturaleza polifenólica a partir de licores hemicelulósicos, sino que también se pueden extraer los compuestos polifenólicos presentes en los licores obtenidos tras la etapa de deslignificación con NaOH. En este caso, es recomendable acidificar el medio hasta pH 3 previamente a la extracción con acetato de etilo; de esta forma se obtiene un rendimiento de extracción de 0.1g/g de cascarilla de cebada y los extractos obtenidos presentan una actividad antioxidante seis veces inferior a la que presenta el BHA pero el doble de la que presenta el BHT, determinada como la capacidad de captación del radical DFPH.

Conclusiones

Mediante el esquema de aprovechamiento propuesto en este capítulo, a partir de una materia prima de carácter residual, como es la cascarilla de cebada, se pueden obtener diferentes aditivos alimentarios tales como: xilitol, a partir de la fracción hemicelulósica, con rendimientos de 2.53 g/L·h mediante un proceso de fermentación en continuo con recirculación de levaduras; ácido láctico, a partir de la fracción celulósica, con rendimientos de 1.25 g/L·h mediante un proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF); y extractos de naturaleza fenólica, a partir de los productos de degradación de la lignina, que presentan una elevada capacidad antioxidante y antimicrobiana, y que por tanto, tienen una aplicación potencial como agentes antioxidantes y conservantes en alimentos.

Bibliografía

- Abe, S.; Takagi, M. (1991), "Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid", *Biotechnol. Bioeng.*, 37: 93-96.
- Abram, V.; Donko, M. (1999), "Tentative identification of polyphenols in *Sempervivum tectorum* and assessment of the antimicrobial activity of *Sempervivum L*", *J. Agric. Food Chem.*, 44: 3426-3431.
- Abushita, A.A.; Hebshi, E.A.; Daood, H.G.; Biacs, P.A. (1997), "Determination of antioxidant vitamins in tomatoes", *Food Chem.*, 60: 207-212.

- Anglès, M.N.; Reguant, J.; Martínez, J.M.; Farriol, X.; Montané, D.; Salvadó, J. (1997), "Influence of the ash fraction on the mass balance during the summative analysis of high-ash content lignocellulosics", *Biores. Technol.*, 59: 185-193.
- Aruoma, O.I. (1998), "Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75: 199-212.
- Azizah, A.H.; Nik Ruslawati, N.M.; Swee Tee, T. (1999), "Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products", *Food Chem.*, 64: 199-202.
- Beck, M.J. (1986), "Factors affecting efficiency of biomass fermentation to ethanol", *Biotechnol. Bioeng. Sym.*, 17: 617-627.
- Bocco, A.; Cuvelier, M.E.; Richard, H.; Berset, C. (1998), "Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts", *J. Agric. Food Chem.* 46: 2123-2129.
- Carrol, K.K.; Kurowska, E.M.; Guthrie, N. (1999), *Use of citrus limonoids and flavonoids as well as tocotrienols for the treatment of cancer*, patente internacional WO9915167.
- Cerrutti, P.; Alzamora, S.M.; Vidales, S.L. (1997), "Vanillin as an antimicrobial for producing shelf-stable strawberry puree", *J. Food Sci.*, 62: 608-610.
- Chahal, S.P. (1989), "Lactic acid", *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, VCH Verlag, Berlín.
- Chen, B.H.; Tang, Y.C. (1998), "Processing and stability of carotenoid powder from carrot pulp waste", *J. Agric. Food Chem.*, 46: 2312-2318.
- Chen, R.; Lee, Y.Y. (1997), "Membrane-mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass", *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63 (65): 435-448.
- Cruz, J.M.; Domínguez, J.M.; Domínguez, H.; Parajó, J.C. (1999), "Solvent extraction of hemicellulosic wood hydrolysates: a procedure useful for obtaining both detoxified fermentation media and polyphenols with antioxidant activity", *Food Chem.*, 67: 147-153.
- _____; Domínguez, J.M.; Domínguez, H.; Parajó, J.C. (2000a), "Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion into xylitol", *Food Biotechnol.*, 14: 79-97.
- _____; Domínguez, J.M.; Domínguez, H.; Parajó, J.C. (2000b), "Xylitol production from barley bran hydrolysates by continuous fermentation with *Debaryomyces hansenii*", *Biotechnol. Lett.*, 22: 1895-1898
- _____; Domínguez, J.M.; Domínguez, H.; Parajó, J.C. (2001), "Antioxidant and Antimicrobial Effects of Extracts from Hydrolysates of Lignocellulosic Materials", *J. Agric. Food Chem.*, 49: 2459-2464.

- David, C.; Fornasier, R.; Lejong, W.; Vanlautem, N. (1988), "Pretreatment of Eucalyptus wood with sodium hypochlorite and enzymatic hydrolysis by cellulases of *Trichoderma viride*", *J. Appl. Polym. Sci.*, 36: 29-41.
- Delgenes, J.; Moletta, R.; Navarro, J.M. (1996), "Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Cymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*", *Enzyme Microb. Technol.*, 19: 220-225.
- Domínguez, J.M.; Cao, N.J.; Gong, C.S.; Tsao, G.T. (1997b), "Dilute acid hemicellulose hydrolysates from corncob for xylitol production by yeasts", *Biores. Technol.*, 61: 85-90.
- ; Gong, C.S.; Tsao, G.T. (1997a), "Production of xylitol from D-xylose by *Debaryomyces hansenii*", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 63-65: 117-127.
- Emodi, A. (1978), "Xylitol. Its properties and food applications", *Food Technol.*, 32: 28-32.
- Estrada-Muñoz, R.; Boyle, E.A.E.; Mardsen, J.L. (1998), "Liquid smoke effects on *Escherichia coli* O157,H7, and its antioxidant properties in beef products", *J. Food Sci.*, 63: 150-153.
- Ferrari, M.D.; Neirotti, E.; Albornoz, C.; Saucedo, E. (1992), "Ethanol production from *Eucalyptus* wood hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*", *Biotechnol. Bioeng.*, 40: 753-759.
- Gabrielska, J.; Oszmianski, J.; Lamer-Zarawska, E. (1997), "Protective effect of plant flavonoids on the oxidation of lecithin liposomes", *Pharmazie*, 52: 2-3.
- Gharpuray, M.M.; Fan, L.T.; Lee, Y.H. (1983), "Structural modification of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis", *Biotechnol. Bioeng.*, 25: 157-172.
- Girio, F.M.; Peito, M.A.; Amaral-Collaço, M.T. (1990), en "Biomass for Energy and Industry", Vol. 2. Eds. Grassi, G.; Gosse, G. y Dos Santos, G. Elsevier, *Appl. Science*.
- Girio, F.M.; Roseiro, J.C.; Sá-Machado, P.; Duarte-Reis, A.R.; Amaral-Collaço, M.T. (1994), "Effect of oxygen transfer rate on levels of key enzymes of xylose metabolism in *Debaryomyces hansenii*", *Enzyme Microb. Technol.*, 16: 1074-1078.
- Hagerman, A.E.; Riedl, K.M.; Jones, G.A.; Sovik, K.N.; Ritchard, N.T.; Hartzfeld, P.W.; Riechel, T.L. (1998), "High molecular weight plant polyphenolics (tannins), as biological antioxidants", *J. Agric. Food Chem.*, 46: 1887-1892.
- Heikkilä, H.; Hyöky, G.; Rahkila, L.; Sarkki, M.L.; Viljava, T. (1991), *A process for the simultaneous production of xylitol and ethanol*, patente internacional: WO 91/10740.

- Höfer, M.; Betz, A.; Kotyk, A. (1971), "Metabolism of the obligatory aerobic yeast *Rhodotorula gracilis*: induction of an enzyme necessary for D-xylose catabolism", *Biochem. Biophys. Acta* 252: 1-12.
- Hofvendahl, K.; Akerberg, C.; Zacchi, G. (1999), "Simultaneous enzymatic wheat starch saccharification and fermentation to lactic acid by *Lactococcus lactis*", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 52: 163-169.
- Hosny, M.; Rosazza, J.P.N. (1999), "Novel isoflavone, cinnamic acid, and triterpenoid glycosides in soybean molasses", *J. Nat. Prod.*, 62: 853-858.
- Hunková, Z.; Fencel, Z. (1977), *Biotechnol. Bioeng.*, 19: 1623-1641
- Ikken, Y.; Morales, P.; Martínez, A.; Marín, M.L.; Haza, A.I.; Cambero, M.I. (1999), "Antimutagenic effect of fruit and vegetable ethanolic extracts against N-nitrosamines evaluated by the Ames test", *J. Agric. Food Chem.*, 47: 3257-3264.
- Ito, A.; Shamon, L.A.; Yu, B.; Mata-Greenwood, E.; Lee, S.K.; van Breemen, R.B.; Mehta, R.G.; Farnsworth, N.R.; Fong, H.H.S.; Pezzuto, J.M.; Kinghorn, A.D. (1998), "Antimutagenic constituents of *Casimiroa edulis* with potential cancer chemopreventive activity", *J. Agric. Food Chem.*, 46: 3509-3516.
- Kawaii, S.; Tomono, Y.; Katase, E.; Ogawa, K.; Yano, M. (1999), "HL-60 Differentiating activity and flavonoid content of the readily extractable fraction prepared from *Citrus* juices", *J. Agric. Food Chem.*, 47: 128-135.
- Koukios, E.G.; Valkanas, G.N. (1982), "Process for the chemical separation of the three main components of lignocellulosic biomass", *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, 21: 309-314.
- Larrauri, J.A.; Rupérez, P.; Saura-Calixto, F. (1997), "Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels", *J. Agric. Food Chem.*, 44: 1390-1393.
- ; Sánchez-Moreno, C.; Saura-Calixto, F. (1998), "Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels", *J. Agric. Food Chem.*, 46: 2694-2697.
- Linko, Y.Y.; Javanainen (1996), "Simultaneous liquefaction, saccharification, and lactic acid fermentation on barley starch", *Enz. Microb. Technol.*, 19: 118-123.
- Lu, Y.; Foo, L.Y. (1997), "Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace", *Food Chem.*, 59: 187-194.
- Luo, J.; Xia, L.; Lin, J.; Cen, P. (1997), "Kinetics of simultaneous saccharification and lactic acid fermentation processes", *Biotechnol. Prog.*, 13: 762-767.
- Maiorella, B.; Blanch, H.W.; Wilke, C.R. (1983), "By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*", *Biotechnol. Bioeng.*, 125: 103-121.

- Meyer, A.S.; Heinonen, M.; Frankel, E.N. (1998a), "Antioxidant interactions of catechin, cyaniding, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation", *Food Chem.*, 61: 71-75.
- _____; Jepsen, S.M.; Sørensen, N.S. (1998b), "Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace", *J. Agric. Food Chem.*, 46: 2439-2446.
- Moldes, A.B.; Cruz, J.M.; Domínguez, J.M.; Parajó, J.C. (2002), "Production of a cellulosic substrate susceptible to enzymatic hydrolysis from prehidrolyzed barley husks", *Agricultural and Food Science in Finland*, 11: 51-58.
- _____; Alonso, J.L.; Parajó, J.C. (2000), "Multi-step feeding systems for lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of processed wood", *Bioprocess Engineering*, 22: 175-180.
- Moon, J.H.; Terao, J. (1998), "Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human Low-Density Lypoprotein", *J. Agric. Food Chem.*, 46: 5062-5065.
- Nimz, H.H.; Casten, R. (1986), "Chemical processing of lignocellulosics", *Holz Roh und Werk.*, 44: 207-212.
- Noguchi, Y.; Fukuda, K.; Matsushima, A.; Haishi, D.; Hiroto, M.; Kodera, Y.; Nishimura, H.; Inada, Y. (1999), "Inhibition of Df-protease associated with allergic diseases by polyphenol", *J. Agric. Food Chem.*, 47: 2969-2972.
- Özen, S.; Özilgen, M. (1992), "Effects of substrate concentration on growth and lactic acid production by mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 54: 57-61.
- Palmqvist, E.; Almeida, J.S.; Hahn-Hägerdal, B. (1999), "Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture", *Biotech. Bioeng.*, 62: 447-454.
- Parajó, J.C.; Domínguez, H.; Domínguez, J.M. (1995), "Production of xylitol from wood hydrolyzates by *Debaryomyces hansenii*", *Bioproc. Eng.*, 13: 125-131.
- _____; Domínguez, H.; Domínguez, J.M. (1996), "Production of xylitol from concentrated wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii*: Effect of the initial cell concentration", *Biotechnol. Lett.*, 18: 593-598.
- _____; Alonso, J.L.; Moldes, A.B. (1997), "Production of lactic acid from lignocellulose in a single stage of hydrolysis and fermentation", *Food Biotechnology*, 11(1): 45-58.
- Pepper, T.; Olinger, P.M. (1988), "Xylitol in sugar-free confections", *Food Technol.*, 42: 98-106.
- Phowchinda, O.; Delia-Dupuy, M.L.; Strehaiano, P. (1995), "Effects of acetic acid on growth and fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae*", *Biotechnol. Lett.*, 17: 237-242.

- Pietta, P.; Simonetti, P.; Mauri, P. (1998), "Antioxidant activity of selected medicinal plants", *J. Agric. Food Chem.*, 46: 4487-4490.
- Rodríguez de Sotillo, D.; Hadley, M.; Holm, E.T. (1994), "Phenolics in aqueous potato peel extract, extraction, identification and degradation", *J. Food Sci.*, 59: 649-651.
- _____; Hadley, M.; Wolf-Hall, C. (1998), "Potato peel extract a nonmutagenic antioxidant with potential antimicrobial activity", *J. Food Sci.*, 63: 907-910.
- Saint-Cricq de Gaulejac, N.; Provost, C.; Vivas, N. (1999), "Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods", *J. Agric. Food Chem.*, 47: 425-431.
- Saito, M.; Hosoyama, H.; Ariga, T.; Kataoka, S.; Yamaji, N. (1998), "Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins", *J. Agric. Food Chem.*, 46: 1460-1464
- Salminen, S.; Von Wright, A. (1993), *Lactic acid bacteria*, Marcel Dekker Inc., Nueva York.
- Salovaara, S. (1993), "Lactic acid bacteria in cereal-based products", en *Lactic acid bacteria*, Marcel Dekker Inc., Nueva York, pp. 1-63.
- Saura-Calixto, F. (1998), "Antioxidant dietary fiber product, a new concept and a potential food ingredient", *J. Agric. Food Chem.*, 46: 4303-4306.
- Schmidt, S.; Padukone, N. (1997), "Production of lactic acid from wastepaper as a cellulosic feedstock", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 18: 10-14.
- Sheabar, F. Z.; Neeman, I. (1988), "Separation and concentration of natural antioxidants from the rape of olives", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65: 990-993.
- Sherwin, E.R. (1990), "Antioxidants", en Branen, A.L.; Davidson, P.M.; Salminen, S. (eds.), *Food Antioxidants*, Marcel Dekker Inc., Nueva York.
- Tanabe, M.; Kanda, T.; Yanagida, A. (1995), *Fruit polyphenol; process for production thereof; and antioxidant, hypotensive agent, antimutagenic agent, anti-allergenic agent and anticariogenic agent, each comprising said polyphenol*, patente europea EP0657169.
- Tsai, S.P.; Moon, S.H. (1998), "An integrated bioconversion process for production of L-lactic acid from starchy potato feedstocks", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 70 (72): 417-428.
- Vankatesh, K.V. (1997), "Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid", *Biores. Technol.*, 62: 91-98.
- Vick Roy, T.B. (1985), en M. Moo Young (ed.), *Comprehensive Biotechnology*, Pergamon Press., Oxford.
- Vilegas, W.; Sanomimiya, M.; Rastrelli, L.; Pizza, C. (1999), "Isolation and structure elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of Maytenus

- aquifolium leaves. Evaluation of the antiulcer activity of the infusion”, *J. Agric. Food Chem.*, 47: 403-406.
- Visioli, F.; Romani, A.; Mulinacci, N.; Zarini, S.; Conte, D.; Vincieri, F.F.; Galli, C. (1999), “Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters”, *J. Agric. Food Chem.*, 47: 3397-3401.
- Wanasundara, U.N.; Shahidi, F. (1998), “Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils”, *Food Chem.*, 63: 335-342.
- Watson, N.E.; Prior, B.A.; Lategan, P.M. (1984), “Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from D-xylose by *Pachysolen tannophilus*”, *Enzyme Microb. Technol.*, 6: 451-456.
- Wulff, H. (1997), *Natural antioxidant composition*, patente int. WO9739632.
- Yamaguchi, F, Yoshimura, Y.; Nakazawa, H.; Ariga, T. (1999), “Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an H₂O₂/NaOH/DMSO system”, *J. Agric. Food Chem.*, 47: 2544-2548.
- Zandi, P.; Gordon, M.H. (1999), “Antioxidant activity of extracts from old tea leaves”, *Food Chem.*, 64: 285-288.

**Metabolitos presentes en *Stenocereus gummosus*
(Engelm Gibson y Horak), y actividad biológica
de extractos metanólicos de tallo**

*Metabolites in Stenocereus gummosus (Engelm Gibson
y Horak) and Biological Activity of Methanolic Extracts
of Steam*

Morales Rubio, M. E.¹; Verde Star, J.¹; Oranday Cárdenas, A.¹;
Rivas Morales C.¹; Cruz Vega, D. E.²; Treviño Neávez, J. F.¹

Resumen

Las cactáceas constituyen una de las familias vegetales más utilizadas por el pueblo mexicano; sus usos son sumamente diversos: sirven como bardas, como material de construcción para viviendas, como forraje para animales o como alimento para el hombre. Pero también son uno de los recursos menos estudiados en lo que corresponde a su composición química, ya que además tienen una función farmacéutica de manera empírica. La pitaya agria (*S. gummosus*) es una cactácea que se encuentra en Baja California y en la costa de Sonora. Esta especie presenta diversos usos en la medicina tradicional para combatir algunas enfermedades como úlceras y diversos tipos de cáncer. El objetivo del presente trabajo es identificar los metabolitos secundarios presentes en tallos, y determinar la actividad biológica de los extractos metanólicos éstos. Para el estudio fitoquímico, los tallos fueron molidos y se colocaron en solventes de diferente polaridad para obtener los extractos. Posteriormente se realizaron las prue-

¹Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Ave. Pedro de Alba y Manuel Barragán s/n, Cd. Universitaria, C.P. 66451, Ap. Postal 67-F San Nicolás de los Garza, N.L. Tel: (81) 83-294110.

²Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS. E-mail: mmorales113@hotmail.com

bas coloridas y cromatográficas, a fin de identificar los posibles metabolitos presentes en los tallos y frutos; para la actividad biológica se realizó la prueba de letalidad con *Artemia salina*, con extractos metanólicos de la planta. Los resultados del estudio fitoquímico de los tallos indicaron la presencia de diversos compuestos como: esteroides, carbohidratos, sesquiterpenlactonas, flavonas y alcaloides. La actividad biológica con *A. salina* nos muestra una DL_{50} de 117.6 $\mu\text{g/ml}$. Se concluye que estos compuestos pueden ser una alternativa para ser utilizados en la industria alimentaria, cosmetológica y farmacéutica.

Abstract

Cactaceae is a plant family with a wide use by Mexican population, their uses are quite varied, as fences, building material, man's food, and further more is one of the resources with a low knowledge in its chemical composition. Almost all their species have pharmaceutical uses in empirical way. *S. gummosus* (sour pitaya) it is a cacti distributed mostly in Baja California and Sonora coast. This specie has many diverse uses in traditional medicine against some diseases as sores and some kinds of cancer. The objective in this work was to analyze secondary metabolites in steams and evaluating biological activity of methanol extracts. Phytochemical analysis used grounded steams and extracted with varied polarity solvents. Chromatographic and colored test were performed to determine secondary metabolites in steam extracts. Lethality Test with *Artemia salina* was used to determine biological activity. Phytochemical study results of steam extracts show a varieted of compounds as sterols, carbohydrates, sesquiterpenlactones, flavones and alkaloids. Lethality Test with *Artemia salina* shows a 117.6 $\mu\text{g/ml}$ DL_{50} . These compounds can be a possibility to be used in food, pharmaceutical and cosmetologic industry.

Introducción

Las cactáceas constituyen una de las familias vegetales más ampliamente utilizada por el pueblo mexicano, con usos tan diversos como bardas naturales, material de construcción de viviendas, forraje para animales o alimento para el hombre. Aún así, han sido poco estudiados en lo que corresponde a su composición química, ya que además tienen un importante uso farmacéutico de manera empírica. Sintetizan dos tipos de metabolitos: los primarios, que son esenciales para su crecimiento y desarrollo; entre ellos podemos mencionar a los ácidos nucleicos, las proteínas, lípidos, etcétera; y los secundarios, que son aquellos específicos para ciertas especies de plantas, en este grupo tenemos los flavonoides, alcaloides, aceites esenciales, entre otros (Dominguez, X.A., 1973). *Stenocereus gummosus* (Engelm Gibson

y Horak) llamada “pitaya agria” en la zona norte de México, es una cactácea característica de Baja California y Sonora (figura 1). Su fruto de color rojo es apreciado por su sabor agridulce (Anderson, 2001). Esta especie, por los metabolitos que presenta, tiene diversos usos en la medicina tradicional para combatir algunas enfermedades como úlceras y diversos tipos de cáncer (Bravo y Sánchez-Mejorada, 1978; y Bravo y Scheinvar, 1995).

El ensayo de letalidad de larvas de *A. salina* (Meyer, *et al.*, 1982; Solís *et al.*, 1992) es un método estandarizado, barato, rápido y fácil para búsqueda y fraccionamiento de extractos de plantas fisiológicamente activas, además de ser reconocido por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos. Con esta técnica se determina la dosis letal media DL_{50} , la cual, si es menor de 1000 mg/L, es muy probable que contenga uno o varios compuestos activos.

El objetivo del presente trabajo es identificar los metabolitos secundarios presentes en tallos, así como la actividad biológica de los extractos metanólicos de los mismos.

Material y métodos

Material vegetativo: los tallos de *S. gummosus* fueron colectados en Baja California Sur. Algunas muestras fueron depositadas en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, donde se identificaron, registrándose con el folio 024186.

Extracto metanólico: los tallos frescos de *S. gummosus* se cortaron y molieron para colocarlos en 150 ml de metanol y realizar una extracción en frío (*shaker*). Una vez obtenidos los extractos, se realizaron pruebas coloridas para la determinación de los grupos principales de metabolitos secundarios presentes.

Ensayo de letalidad de Artemia salina: (Meyer *et al.*, 1982; Solís *et al.*, 1992). Los huevecillos de *A. salina* (PETMART, *Brine Shrimp eggs*, San Francisco Bay Brand, INC.) se mantuvieron en refrigeración antes de su uso. Para su eclosión, los huevecillos fueron incubados en agua de mar artificial, en un recipiente de plástico dividido por una pared intermedia con un espacio en la parte baja de 2 mm; se mantuvieron en condiciones de oscuridad y oxigenación. Uno de los compartimentos se mantuvo iluminado con una lámpara de 20 watts. A las 24 horas los nauplios fueron cambiados a otro recipiente con la ayuda de una micropipeta y mantenidos en condiciones de oxigenación y temperatura de 22-29 °C por 24 horas más. En una microplaca de 96 pozos fueron adicionados 100 µL de la suspensión de nauplios a

cada pozo (aprox. 15) y se les adicionó 100 μL de las diluciones de los extractos a probar; las concentraciones probadas fueron 20, 60, 80 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Como control positivo se utilizó dicromato de potasio (400 ppm) y agua de mar como control negativo. 24 horas después de aplicados los extractos y con la ayuda de un microscopio estereoscópico, se realizó el conteo de nauplios vivos por dosis. Utilizando el método Probit se determinó la DL_{50} .

Resultados y discusiones

Los resultados de las pruebas coloridas indican la presencia de esteroides y triterpenos, saponinas, alcaloides y flavonoides. En cuanto al bioensayo de letalidad de *A. salina*, el método Probit arrojó una DL_{50} de 117.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la cual, de acuerdo a lo reportado por Meyer *et al.* (1982) y Solís *et al.* (1992), indica la presencia de principios activos.

Gráfica de viabilidad, prueba Probit

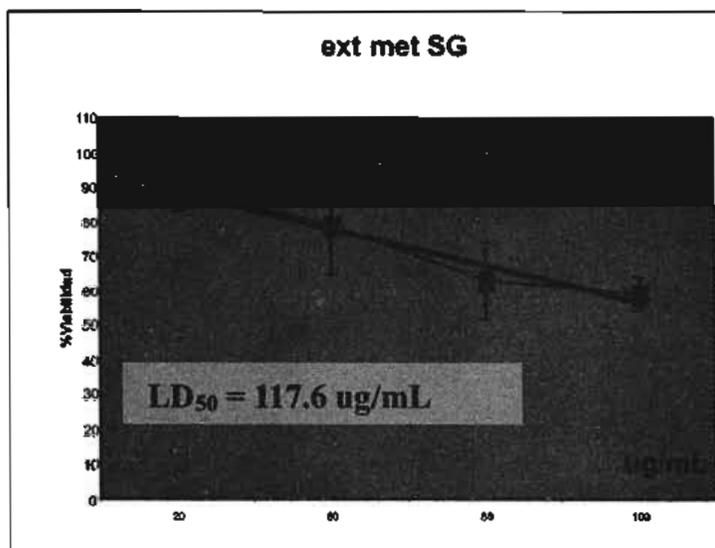
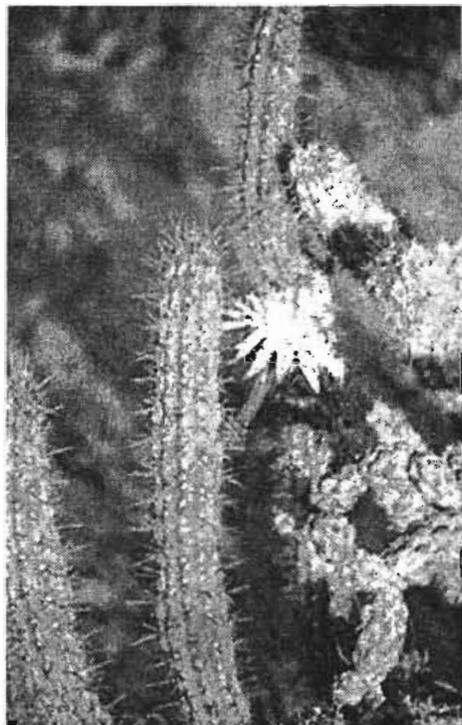


Figura 1. *Stenocereus gummosus*



Bibliografía

- Anderson, E.F. (2001), *The Cactus Family*, Portland, Oregon, Timber Press, 55, 645 y 646.
- Bravo Hollis, H. y Sánchez-Mejorada, H. (1978), *Las Cactáceas de México*, vol. I, México, UAM, 446-453.
- _____ y L. Scheinvar (1995), *El interesante mundo de las cactáceas*, México, CONACYT y FCE, 127.
- Domínguez, X.A. (1973), *Métodos de investigación fitoquímica*, México, Limusa, 39-44: 211-228.
- Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E.; Mc Laughlin, J.L. (1982), "Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents", *Planta Med.*, 45:31-34.
- Solis, P.N.; Wright, C.W.; Anderson, M.M.; Gupta, M.P.; Phillipson, J.D. (1993), "Amicrowell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp)", *Planta med.*, 59: 250-252.

**Detección de organismos transgénicos en granos
y productos procesados**
*Molecular Detection of Genetically Modified
Food Products*

*Mendoza, A. *; Cruz, M.A.; Fernández, S.; Salazar, E.L.*

Resumen

Por medio del método basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar organismos genéticamente modificados (GMO) en cuatro tipos de productos alimenticios de maíz, se estudiaron oligonucleótidos específicos para el transgene p35S y genes nativos de maíz. Los productos de maíz analizados fueron semillas de maíz, harinas, tortillas y frituras. Los métodos mostraron un límite de detección de 0.1% (p/p) de productos alimenticios genéticamente modificados. Observamos que la calidad del ADN es muy importante para una detección precisa de GMOS. Los datos muestran que el método de PCR puede diferenciar un maíz genéticamente modificado de productos no modificados. Los resultados de este estudio también revelan que los productos de maíz comercializados son usualmente mezclados con diferentes tipos de maíz genéticamente modificado, incluyendo aceites vegetales.

Abstract

To detect genetically modified (GM) in four types of maize products, a polymerase chain reaction (PCR) assay was performed in this study by a polymerase chain reaction (PCR) method. Primers specific for inserted genes and crop endogenous genes in maize were

* Centro de Biotecnología Genómica-IPN. Blvd. del Maestro, esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza. Ciudad Reynosa, Tamaulipas, México. C.P. 88710. Tel. (899) 9243627, 9251656 o 9253996, ext. 87702 o 87703.

e-mail: amendoza@mail.cbg.ipn.mx

applied. Two pairs of primers, namely, 35S was used. The maize products analyzed were maize seeds, flour, "tortilla" and "tortilla" chips. The method showed a limit of detection for samples containing 0.1% (w/w) of GM food products. We found that with our method we were able to isolate a high DNA quality from all the samples. We observed that the quality of the DNA is very important in a precise GM detection. Poor DNA extraction could lead a wrong GMO detection. The data further revealed that the PCR method could sufficiently differentiate GM maize from non-GM products. The results of this study also reveal that marketed maize products are usually mixed with different types of GM-maize.

Introducción

La biotecnología aplicada en la agricultura ha abierto nuevos caminos en el desarrollo de plantas para la producción de alimentos, fibras, forestales y otros productos. Antes de los años noventa prácticamente no había cultivos genéticamente modificados en campo. El primer organismo genéticamente modificado (GMO) fue un cultivo de tomate, el cual salió al mercado en 1994 (1). Los GMOS pueden ser definidos como organismos cuyo material genético o genoma (ADN) ha sido modificado por la tecnología del ADN recombinante. No obstante, la situación ha cambiado dramáticamente: el área global cultivada de transgénicos o cultivos genéticamente modificados estimada en 2001 fue de alrededor de 52.6 millones de hectáreas en 13 estados (2). Después de la introducción del primer GMO comercial, el uso de especies de cultivos transgénicos aumentó rápidamente a más de 40 millones de hectáreas alrededor de todo el mundo, aproximadamente 4% del total de áreas cultivables a nivel mundial (1).

La adición de genes foráneos a plantas genéticamente modificadas ha sido utilizada para producir nuevas proteínas que les confieren tolerancia a plagas y enfermedades y recientemente, para mejorar el perfil químico de los productos procesados, por ejemplo aceites vegetales. En la Unión Europea y otras regiones, el uso de esta tecnología, la consecuente liberación de GMOS en el ambiente y la subsecuente comercialización de productos alimenticios derivados de OGM están estrictamente regulados (2, 3,6).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es ampliamente utilizada en muchos campos para detectar cantidades pequeñas de ADN en forma muy específica. Varios sistemas de PCR han sido descritos para diferentes aplicaciones en control de alimentos, por ejemplo: la identificación de especies en carne (1,4), productos pesqueros (5,9), componentes alimenticios (10-13), y la detección de GMOS, tales como tomate, soya y maíz (8,13). Para la detección de GMO pueden ser distinguidos

dos diferentes tipos de sistemas de PCR: los métodos experimentales y las pruebas específicas.

Los métodos experimentales utilizados no son específicos para un GMO en particular pero detectan elementos comúnmente usados en ingeniería genética, tales como los genes promotores o terminadores, por ejemplo: el *promotor 35S* del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) o el *terminador NOS* de *Agrobacterium tumefaciens* (12). La PCR proporciona una herramienta confiable para identificar GMO contenido en alimento, y por tanto, para controlar las regulaciones concernientes al etiquetado de los alimentos que contengan GMO (12).

Las previsiones legales son diferentes para GMOS y para alimentos provenientes de GMO. Un ejemplo de tal discrepancia es la existencia del umbral mínimo para el etiquetado de un producto alimenticio que no contenga una parte detectable, por ejemplo, en el etiquetado de granos GM.

La llamada *regulación del umbral* especifica que los alimentos comestibles deben ser etiquetados cuando el material derivado de estos productos genéticamente modificados está presente en los ingredientes alimenticios en proporción superior a 1% de los ingredientes de alimentos individualmente considerados (5, 7).

Ese límite se refleja en el nivel de los ingredientes, por tanto, si un producto sale positivo después de los métodos experimentales, estos ingredientes deben ser cuantificados respectivamente mediante una prueba para determinar si contiene más o menos de 1% de organismos genéticamente modificados. La detección de transgenes y/o sus productos puede llegar a ser difícil cuando son procesados y altamente refinados, como el almidón, azúcar o aceites vegetales. Un producto alimenticio pudo haber estado bajo un complejo procesamiento hasta el punto en que los ingredientes con origen potencial de GMOS ya no son detectables. La necesidad de monitorear y verificar la presencia y la cantidad de GMO en cultivos agrícolas y en los productos derivados ha generado una demanda de métodos analíticos capaces de detectar, identificar y cuantificar ADN introducido o proteínas expresadas en plantas transgénicas, debido a que esos componentes son considerados constituyentes fundamentales (9, 10, 13).

En este estudio se describe el desarrollo y evaluación de un sistema de detección de transgénicos basado en la PCR, por medio de la detección del promotor 35S y del terminador *nos*. El presente método permite la posibilidad de comprobar los límites para la detección de GMO en plantas o productos alimenticios del maíz. La principal ventaja de este método de investigación es la posibilidad de detectar 90% de las plantas GM por medio de éste. Nuestros resultados mostraron límites máximos de GMOS en productos alimenticios detectados así como el contenido de GMOS en una muestra alimenticia.

Materiales y métodos

Productos alimenticios

En el presente estudio se emplearon cuatro tipos de productos alimenticios provenientes del maíz: semillas, harina, tortillas y productos altamente procesados, tales como frituras. El control positivo utilizado fue una muestra denominada GM-maíz Bt-176 (Monsanto, Co. St. Luis, Mo., USA).

Extracción del ADN genómico

El ADN fue aislado a partir de 4 gr de grano o de harina de maíz, utilizando un estuche comercial de la marca Wizard (Promega, Madison, WI, EU) según las instrucciones del fabricante. La extracción del ADN genómico a partir de tortillas y frituras fue desarrollada por una serie extracciones a base de fenol/cloroformo/octanol (25:24:1) después de la precipitación de las proteínas.

Se tomó en cuenta la separación cuidadosa entre el ADN y los contaminantes presentes en muestras tales como aceites vegetales o frituras. La cuantificación correcta puede ser obstaculizada debido a que el ADN genómico de alimentos procesados frecuentemente está degradado y éste no migra como una zona definida en geles de agarosa.

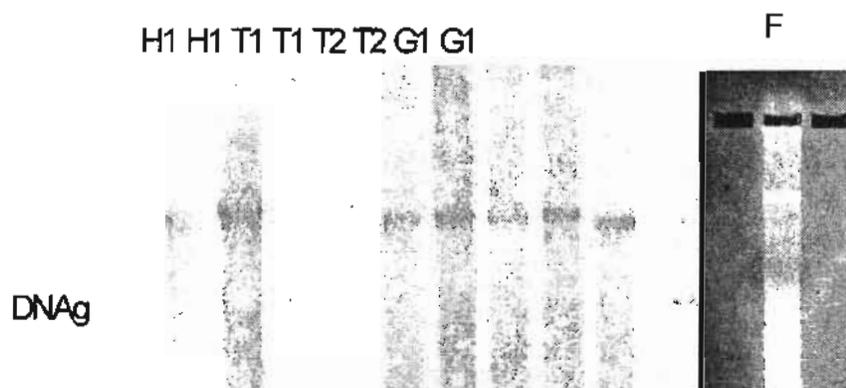
Amplificación y detección

En este estudio se utilizó un sistema de PCR multiplex denominado *Allin 1* de Biosmart (Bern, Suiza) que tiene la capacidad de detectar los genes de maíz, soya y del promotor 35S. Este método hace una detección confiable de GMOS y garantiza una sensibilidad altamente reproductiva de 0.5% (>95%) para el promotor 35S. El sistema de PCR detecta maíz (zeína), soya (lectina) y al promotor 35S, simultáneamente. Además, este método incluye un control interno que indica fallas en la PCR debido a inhibidores, por tanto, no pueden ser amplificados falsos negativos.

Para el mastermix de la primera PCR multiplex del *Allin 1* se utilizaron: 400ng de ADN templado (5ml), control interno (5ml), 40 ml de mastermix (10 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂) y 10mM de primers para zeína, lectina y para el promotor 35S, y

una unidad de la Taq ADN polimerasa en un volumen final de 50 ml. La reacción fue incubada bajo el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, seguido por 40 ciclos de amplificación; con incubaciones a 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto y a 72°C por 1 minuto. La síntesis fue completada por una incubación final de 72°C por 10 minutos. Para la PCR anidada (segunda PCR) se tomó 1 ml de la primera reacción de PCR adicionándole 49 ml del mastermix. El segundo programa fue igual al descrito anteriormente. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de electroforesis, como se mencionó antes.

Figura 1. Extracción del DNA genómico a partir de harina (H), tortilla (T), grano (G) y frituras (F)



Resultados y discusión

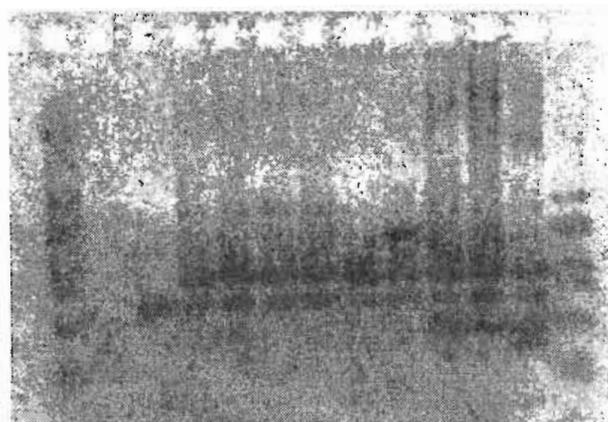
Nuestro método demostró una exitosa extracción de ADN de granos, productos primarios (harina), productos secundarios (tortilla) y en productos industrializados (frituras). Como lo muestra la figura 1, la calidad de ADN es adecuada para el análisis de PCR, es muy importante mencionar que el ADN aislado de tortillas o frituras goza de alta calidad.

**Figura 2. Productos amplificados por PCR a partir de tortilla (T),
harina (H) y grano (G).**

Línea +: Es el control positivo, M: Marcador 100pb.

Los carriles H1 y G1 muestran amplificación del promotor 35S

C T1 T1 T2 T2 T3 T3 H1 G1 + M



Es importante señalar que cuando intentamos extraer el ADN a partir de frituras, advertimos la importancia de eliminar cualquier resto de ácidos grasos presentes en la mezcla de extracción. Nuestra experiencia alerta que estos productos de desecho obstruyen la sensibilidad de la PCR multiplex (datos no mostrados). La presencia del promotor 35S en las muestras de granos (G) y harina (H) (figura 2) indican que éstos fueron contaminados con material transgénico por la presencia del promotor 35S. Sin embargo, las muestras de tortilla no mostraron ninguna evidencia de material transgénico desde que el promotor 35S no amplificó en ninguna de las muestras y en las tres veces que la PCR anidada fue realizada para incrementar el nivel de confiabilidad.

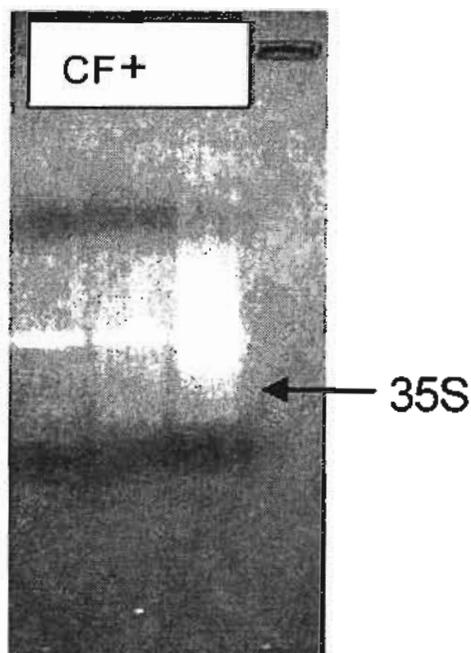
Cuando el ADN extraído de frituras fue analizado bajo la PCR anidada, no encontramos la presencia del promotor 35S (figura 3).

La reproductibilidad de estos resultados fue obtenida en tres reacciones independientes de PCR anidada. Así, podemos confiar en que este producto comercial está libre de cualquier material transgénico.

Conclusiones

Se estableció un método molecular para analizar la presencia de GMOS, basado en el método de la PCR anidada. 400 ng de ADN genómico en la PCR proporcionan un límite

**Figura 3. Productos de PCR amplificados a partir de frituras (F), control negativo (C) y el control positivo (+)
La flecha indica la amplificación del promotor 35S**



de sensibilidad de 0.1% de material posiblemente contaminado. El método de la PCR para la detección de organismos genéticamente modificados concuerda con el sistema oficial para la detección de GMO propuesto por la FDA.

Bibliografía

- Anónimo (2000), Commission regulation (EC) No.49/2000, amending council regulation (EC) No.1139/98 concerning the compulsory indication on the labelling of certain foodstuffs produced from genetically modified organisms of particulars other than those provided for in directive 79/112/EEC, *Official J. Eur. Communities: Legislation*, 6: 13-14.
- _____ (1997), Council regulation (EC) No.285/97, Concerning novel foods and novel food ingredients, *Official J. Eur. Communities: Legislation*, 43: 1-5.

- Beachy, R.N. (1999), "Facing fear of biotechnology", *Science*, 285: 335.
- Editorial (2000), "Overseeing biotech foods", *Genet. Eng. News.*, 20, 1, 37, 83.
- European Standard EN ISO/IEC 17025:1999 CEN/CENELEC (2000), European Committee for Standardisation, Bruselas, Bélgica.
- European Standard EN 45000 Series CEN/CENELEC (1989).
- Gaskel, G. *et al.* (1999), "Worlds apart? The reception of genetically modified food in Europe and the U.S.", *Science*, 285: 335.
- Gilbert, J. (1999), "Sampling of raw materials and processed foods for the presence of GMOS", *Food control*, 10: 363-365.
- Gupta, A. (2000), "Governing trade in genetically modified organisms. The Cartagena Protocol on Biosafety", *Environment*, 42: 22-23.
- Haslberger, A.G. (2000), "Monitoring and labelling for genetically modified products", *Science*, 287: 431-432.
- Horowitz, W. (1988), *Pure Appl. Chem.*, 60: 855-867.
- Schreiber, G.A. (1999), "Challenges for methods to detect genetically modified DNA in foods", *Food control*, 10: 351-352.
- Yates, K. (ed.) (1999), *Detection Methods for Novel Foods Derived from Genetically Modified Organisms*, ILSI, Europa.

**Caracterización física, bioquímica y funcional
de gránulos de almidón de amaranto**
*Physical, Biochemical and Functional Characterization
of Amaranth Starch Granules*

*Bello-Pérez, L.A.¹; Chávez-Guerrero, L.²; Balánzar-Cortez, A.F.¹;
Muñoz-Sandoval, E.²; Terrones, M.; Barba de la Rosa, A.P.^{2*}*

Resumen

El almidón es el principal carbohidrato de reserva sintetizado por las plantas superiores y es utilizado en diversas industrias como la alimentaria y farmacéutica. La principal fuente de obtención de almidón es el maíz, un grano básico para muchos países de América Latina, por lo que es de gran importancia buscar nuevas alternativas para el aislamiento de este polisacárido, ya que en la industria existe demanda de almidones con nuevas propiedades funcionales. El grano de amaranto contiene los gránulos de almidón más pequeños conocidos (1 a 3 μm), están formados por aproximadamente 98 a 99% de amilopectina, sin embargo pocos estudios han reportado sobre sus propiedades, por lo que el objetivo del presente trabajo es purificar el almidón de amaranto y estudiar sus características físico-químicas, funcionales y bioquímicas. El almidón de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) fue extraído con solución de acetato de sodio y cloruro de mercurio. Los gránulos fueron observados por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y las características estructurales fueron determinadas por Microscopía de Fuerza Atómica (MFA). La funcionalidad se determinó por Reología

¹ Ceprobi-IPN, km. 8.5, Carretera Yautepec-Jojutla San Isidro, 62731, Yautepec, Morelos, México.

² Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José, núm. 2055, Lomas 4^a, 78216 San Luis Potosí, S.L.P., México. Departamento de Materiales Avanzados, Departamento de Biología Molecular,

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

Dinámica y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Finalmente las proteínas enlazadas al gránulo de almidón fueron caracterizadas por electroforesis bidimensional. Con estos resultados resaltamos el uso potencial de los almidones de amaranto, así como la caracterización de las enzimas responsables de su biosíntesis.

Abstract

Starch is the main polysaccharide of reserve synthesized by superior plants and is used in different industries as foods and pharmaceuticals. Corn has been the main source of starch, but this is a basic grain consumed in many Latin-American countries, for that, is of great interest to find new sources for isolation of this polysaccharide, besides there is an increased demand for new starches with new functional properties. Amaranth starch granules have the smallest granules known in nature (1 to 3 μm). They are formed with approximately 98-99% amylopectin, however, few is known about their properties. The main objective of this work has been the isolation of amaranth starch granules in order to study physical, chemical, biochemical and functional properties. Starch Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) has been extracted with sodium acetate and mercury chloride solution. Size and morphology was determined with Scanning Electron Microscopy (SEM) and Atomic Force Microscopy (AFM). The functionality was determined by Dynamic Rheology and Differential Scanning Calorimetry (DSC). Finally, the proteins bonded to the starch granules were characterized using two-dimensional electrophoresis. With these results, we are trying to get more knowledge on amaranth starch granule structure, functionality and the enzymes responsible for their biosynthesis, those data could be the basis for the design of new starch granules with new novel functional properties.

Introducción

El almidón es el principal componente en la dieta de todas las poblaciones, su uso se ha incrementado debido a la tendencia de mejorar los hábitos alimenticios, esto es, comer más polímeros en lugar de azúcares refinados. Sin embargo, el principal propósito de la utilización de almidón en alimentos es más bien funcional que nutricional. Este biopolímero constituye un excelente material para modificar la textura y consistencia de los alimentos, siendo importante tanto la cantidad como el tipo de almidón. Las fuentes principales de almidón son las plantas superiores: cereales (40 a 90% del peso seco), tubérculos (65 a 85%) y leguminosas (30 a 75%); en algunas frutas como el plátano y el mango en su estado verde o

inmaduro, los contenidos de almidón alcanzan hasta 70% en base seca (López *et al.*, 1994; Guilbot y Mercier, 1985; Bello-Pérez y Paredes-López, 1999).

La producción mundial de almidón en el periodo 1995-1996 fue de 4.3 millones de toneladas, de las cuales 75% fue de maíz y 5% de papa (Marchal, 1997). En Estados Unidos se produjeron 3.65 millones de toneladas de almidón, principalmente a partir de maíz, de las cuales se utilizó 22% en la industria de alimentos (Alexander, 1999). El uso de almidón es bastante amplio en las diversas industrias como la farmacéutica, química y alimentaria. Debido a que el maíz es en muchos países de América Latina (principalmente en México) un grano básico para la alimentación humana, es de gran importancia encontrar nuevas fuentes de estos biopolímeros; aunado a esto, las diversas industrias demandan almidones con nuevas o diferentes propiedades funcionales.

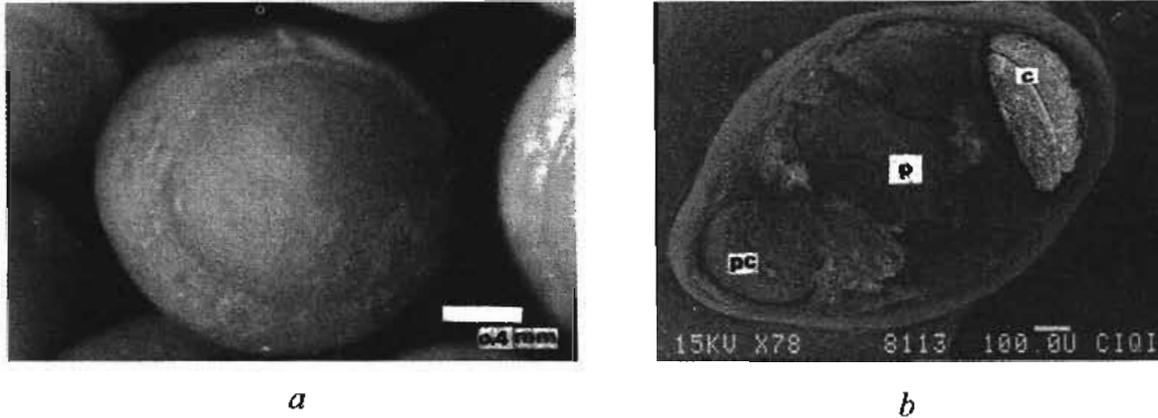
Amaranto

La diversificación de cultivos para la producción de alimentos depende del rápido crecimiento de la planta, la tolerancia a estrés hídrico y su uso como alimento para humanos y animales (Spehar y Teixeira, 2003); de ahí el interés en la producción de grano de amaranto, ya que ésta es una de las pocas especies vegetales con el potencial para convertirse en una importante fuente de alimento en el mundo. *Amaranthaceae* es una familia que comprende más de 60 géneros (NAS, 1984) y alrededor de 800 especies de plantas anuales o perennes, aunque algunas de ellas son consideradas como maleza (Mapes *et al.*, 1996). Existe una amplia variabilidad en las diferentes especies del género y sólo tres de ellas son cultivadas debido a que producen inflorescencias repletas de semillas. Las especies de grano de amaranto *Amaranthus hypochondriacus* y *A. cruentus* son cultivadas en México y Guatemala, en tanto que la *A. caudatus* es cultivada en Perú (Teutonico y Knorr, 1985). Los granos de amaranto son muy pequeños (1.1 mm de ancho por 1.4 mm de largo). El germen tiene forma circular con la punta de la raíz tocando la punta de los cotiledones (figura 1a) que se encuentran en la planta formando panojas coloridas como las del sorgo (Paredes-López *et al.*, 1990). Las proteínas de amaranto contienen un mejor balance de aminoácidos esenciales, poseen mayor contenido de lisina que los cereales y mayor contenido de metionina, aminoácido deficiente en leguminosas. Otra ventaja de las proteínas de amaranto es que pueden ser usadas en dietas especiales libres de gluten.

Las semillas de amaranto poseen una sola capa de testa que está asociada al perispermo, excepto en la región del germen donde se encuentra unida a grandes

Figura 1. Estructura general (a) y corte transversal del grano de amaranto (b).

PC=procambium, P=perispermo; c=cotidélones



células gruesas del endospermo (figura 1b). El tejido principal de almacenamiento es el perispermo compuesto de células del parénquima llenas de gránulos de almidón de forma polihédrica (Paredes-López *et al.*, 1990).

Gránulos de almidón

Otro constituyente principal de granos y semillas es el almidón, organizado en partículas discretas conocidas como gránulos; la morfología, composición química y estructura supermolecular (arreglo relativo de las macromoléculas en el estado sólido) son características de cada especie. El almidón tiene gran importancia tecnológica y nutricional, ya que este polisacárido, aislado de diversas fuentes, es utilizado como ingrediente en industrias como la de alimentos, donde confieren propiedades funcionales como son: capacidad de retención de agua, viscosidad y formación de pastas o geles, entre otras. Por otro lado, el almidón es el principal carbohidrato en la dieta humana y el que suministra el mayor número de calorías. La funcionalidad del almidón se debe a sus dos constituyentes principales, la amilosa y la amilopectina; en un almidón clasificado como normal, la proporción aproximada es de 30% de amilosa y 70% de amilopectina; sin embargo, se han encontrado almidones que contienen una alta proporción de amilosa (de 98 a 99%), y se les conoce como almidones cerosos o *waxys*. El almidón de amaranto cae dentro de esta categoría, por lo que ha cobrado importancia ya que es uno de los almidones que *per se* cuenta con esta característica (Wilhelm *et al.*, 2002).

Extracción de almidón de amaranto

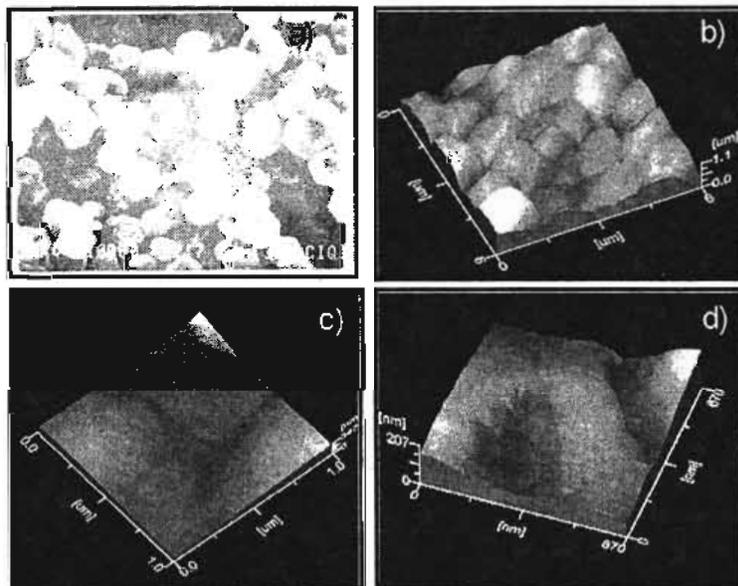
Los gránulos de almidón de amaranto estudiados provienen de harinas de dos variedades de *Amaranthus hypochondriacus*; una variedad comercial (Nutrisol) y otra variedad que ha sido obtenida para adaptarse a suelos áridos de la región de San Luis Potosí, la cual es denominada *variedad criolla*. Los gránulos de almidón intactos se obtuvieron utilizando solución de acetato de sodio 0.02 M (pH 6.5), con sales de cloruro de mercurio (0.01 M) en una relación solución de remojo: harina de 2:1 (v/v) a 5°C por 24 horas. La solución se criba en malla de 40, 100 y 200, y se lava con agua destilada. La suspensión se deja decantar por 24 horas a 4°C. Después, el precipitado se resuspende en una solución de NaCl 0.1 M:tolueno (7:1 v/v) y se mantiene en agitación durante toda la noche. La muestra es centrifugada a 4000 rpm/15 minutos, desechando el sobrenadante. El sólido se resuspende y se repite la agitación con la mezcla de NaCl 0.1:tolueno (7:1 v/v). El almidón se deja a medio ambiente durante 12 horas para eliminar residuos de tolueno y después en estufa a 40°C por 24 horas (López *et al.*, 1994).

Caracterización física

La Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) es una herramienta muy utilizada para estudiar la superficie de materiales. Con ella se puede observar de manera cualitativa que los gránulos de almidón en el amaranto son de forma irregular con dimensiones de ~1.0 a 3.0 μm (figura 2a). Actualmente la Microscopía de Fuerza Atómica (MFA) es una herramienta poderosa en el estudio de la ultraestructura de gránulos de almidón (Ridout *et al.*, 2004). La MFA consta de una punta que se mueve sobre la superficie de inspección detectando variaciones de alturas o composición mediante las fuerzas de interacción de los átomos de las muestras y los de la punta. Sobre la punta incide un haz de láser que se refleja hacia un fotodetector. La MFA tiene la posibilidad de trabajar en el modo *contacto* en el que la punta se encuentra a unos nanómetros de distancia de la superficie y realiza movimientos paralelos a la misma; en el modo *intermitente* (*tapping*) la punta realiza movimientos verticales a la muestra, de manera que se acerca y se aleja de la superficie (vibración). El almidón de amaranto observado al MFA de topografía de modo *intermitente*, confirma la forma irregular y dimensiones observados por la MEB (figura 2b). Sin embargo, usando la MFA hemos podido observar con más detalle y de manera cuantitativa la estructura externa, advirtiendo las uniones entre ellos (figura 2c) y pequeños orificios sobre su superficie de aproximadamente 300 nm de largo por 150 nm de ancho (figura 2d).

Los pequeños orificios encontrados sobre la superficie de gránulos de almidón de otras fuentes se han descrito como canales formados por proteínas y fosfolípidos que conectan la cavidad interior con la superficie externa, existiendo una correlación entre la densidad de canales y la susceptibilidad a la digestión por amilasas (Gibbon *et al.*, 2003). Se ha reportado que los gránulos de almidón de amaranto son digeridos por glucoamilasas alrededor de cinco veces más rápido que los de maíz, y que después de 3 horas de incubación el almidón se degrada casi completamente (Ikawa *et al.*, 1981; Barba de la Rosa *et al.*, 1989), por lo que estos canales observados en el almidón de amaranto son parte importante en el proceso de degradación.

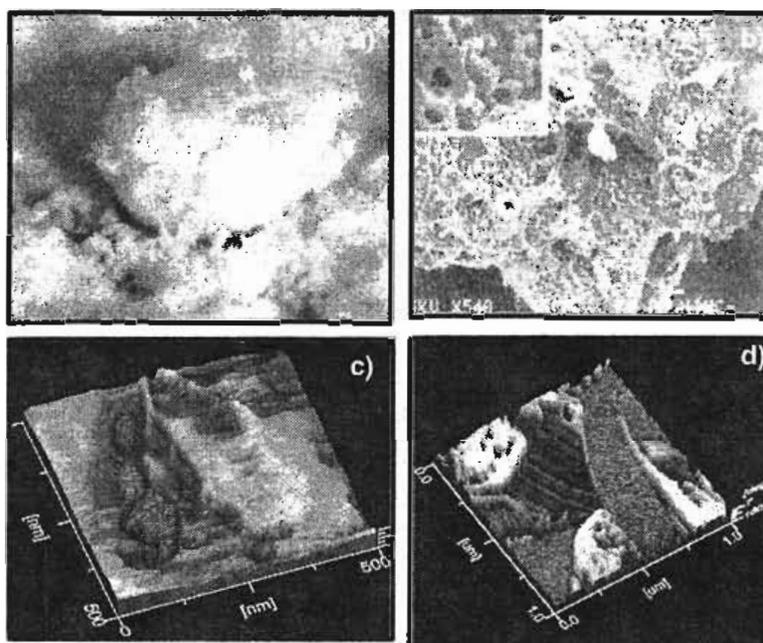
Figura 2. Gránulos de almidón de amaranto observados por Microscopía Electrónica de Barrido (a) y por Microscopía de Fuerza Atómica (b-d).



Por otro lado, se ha descrito que los enzimas responsables de la biosíntesis de los gránulos de almidón están firmemente enlazadas a ellos y son los responsables de la morfología y tamaño. En la figura 3a, el MFA de contacto permite observar micropartículas en la superficie del gránulo, las cuales podrían ser proteínas de reserva contaminantes durante el proceso de extracción o proteínas que están más firmemente enlazadas a los gránulos. Sin embargo, al hacer un pequeño lavado de éstos con agua y al ser observados en MEB (figura 3b) se observa más claramente cómo están firmemente enlazados a

la superficie. Un hecho interesante es que en estos gránulos hinchados con agua y observados por MFA de modo intermitente para obtener las diferencias de fases (figuras 3c, d), se han podido observar dos tipos de zonas: una lisa homogénea y otra amorfa. Es conocido que los gránulos de almidón son sintetizados formando capas concéntricas llamadas anillos de crecimiento, amorfos y cristalinos (Baker *et al.*, 2001; Ridout *et al.*, 2004), así que las diferentes zonas observadas en el almidón de amaranto podrían ser resultado de la formación de estos anillos.

Figura 3. Gránulo de almidón de amaranto observado por Microscopio Óptico (a), Microscopía Electrónica de Barrido (b), y por Microscopía de Fuerza Atómica (c,d).



Estudios funcionales de almidones de amaranto

Método viscoelástico dinámico

Se prepararon dispersiones con almidón comercial y de amaranto al 10% (p/v) de sólidos totales y se analizaron en un Reómetro (TA Instruments, modelo AR1000-N), con un sistema de placas paralelas (la placa superior con terminado rugoso *sand-*

blasted), con un diámetro de 40 mm, un espesor de muestra de 1 mm, y una velocidad de calentamiento y enfriamiento de 2.5 °C/min. En la figura 4, se presenta la cinética de calentamiento-cocción-enfriamiento, cinética de gelificación, donde se observa el cambio que sufre el módulo de almacenamiento, G' , con un aumento en sus valores conforme se presenta la gelatinización del almidón. Se encontraron diferencias entre las muestras estudiadas, siendo las viscosidades más bajas que las de almidón de maíz, como se reportó en trabajos anteriores (Paredes-López *et al.*, 1990).

Los barridos de frecuencia obtenidos durante la segunda etapa (90 °C) (figura 5a), mostraron un aumento en los valores de G' con respecto a la primera etapa; los valores cambiaron de magnitud pasando de una escala de 0.001-10 (gráfica no mostrada) a 10-1000 Pa en la segunda etapa. Esto se debe a que a esta temperatura los gránulos de almidón aumentan la captación de agua en el sistema con un hinchamiento de éste, y como consecuencia, los valores se incrementan. En la figura 5b se muestra el comportamiento para el barrido de frecuencia durante la tercera etapa (25 °C). El intervalo de G' se incrementa ligeramente para los casos de los almidones de amaranto, siendo el

Figura 4. Cinética de gelificación de los almidones de maíz comercial, amaranto comercial y una variedad de amaranto criollo

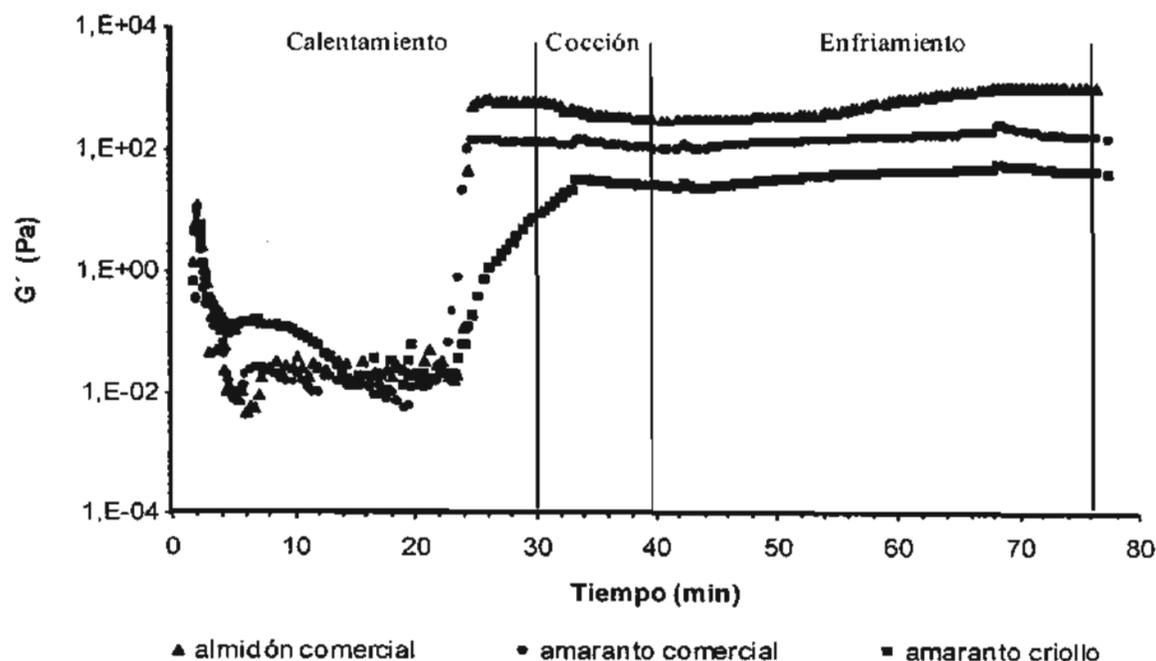
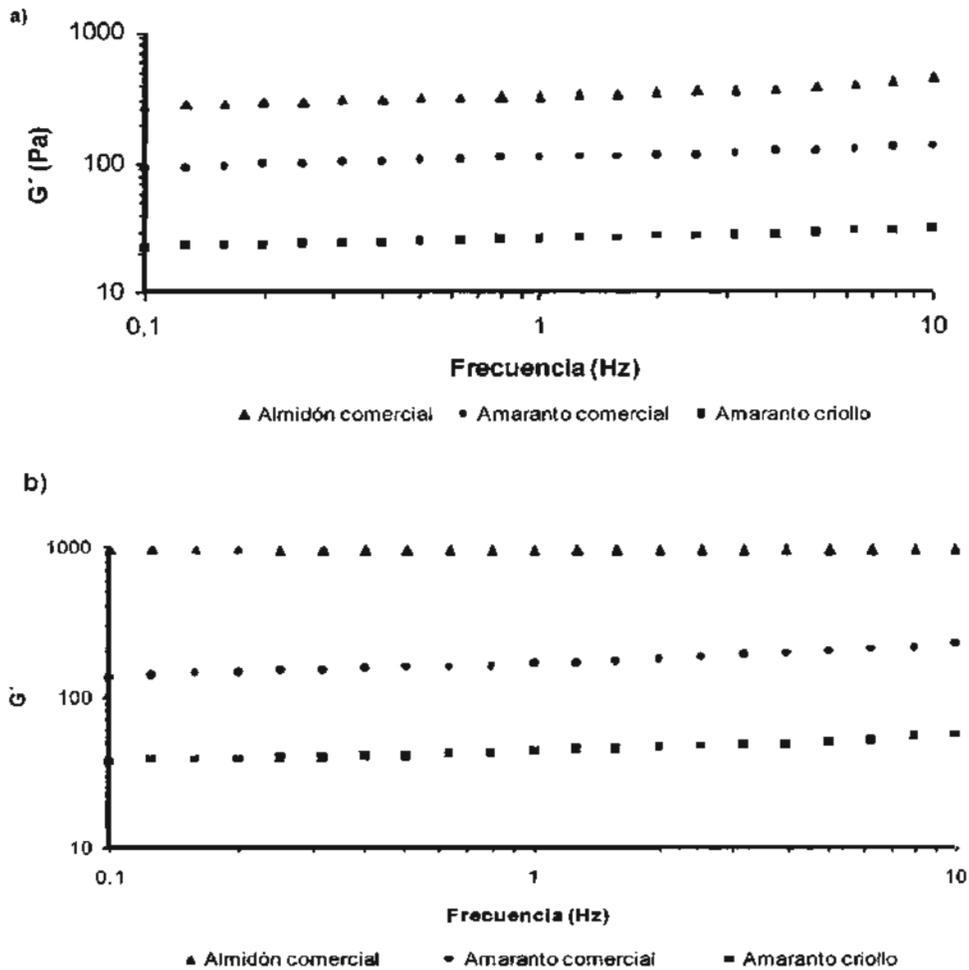


Figura 5. Módulo de almacenamiento de los almidones de maíz comercial, amaranto comercial y una variedad de amaranto criollo, en una cinética de calentamiento-enfriamiento, midiendo a: (a) 90°C y (b) 25 °C, en un barrido de frecuencia.



almidón de amaranto comercial un sistema más flexible que el almidón de amaranto criollo, con respecto a la segunda etapa; en el caso del almidón de maíz el cambio es más notorio.

En ambos experimentos, el almidón de maíz comercial muestra valores de G' mayores que los del almidón de amaranto comercial y éstos, a su vez, que los de almidón de amaranto criollo. Esto sugiere que los valores de G' más altos durante la

etapa de formación del gel son consecuencia del desarrollo de una estructura más compacta en el almidón de maíz comparada con los almidones de amaranto. La cantidad de amilosa presente en el almidón es la responsable de conformar el gel; en el caso de los almidones de amaranto el contenido de amilosa es de sólo 1%, por lo que no es posible la formación de un gel verdadero, de ahí este comportamiento.

En la figura 6 se presentan los valores de $\text{Tan } \delta$ para la segunda y tercera etapa, respectivamente; en la segunda etapa (etapa de gelatinización, figura 5a) no se presentó una diferencia entre los distintos almidones estudiados, pues la proporción entre G' y G'' es muy similar para las muestras estudiadas; sin embargo en la figura 5b, los valores del almidón comercial fueron menores a los de almidones de amaranto. De acuerdo a la descripción que se ha reportado (López *et al.*, 1994), esto se debe a que el almidón de maíz conforma un gel constituido con polímeros cristalinos (valores de $\text{Tan } \delta \cong 0.1$), mientras que los almidones de amaranto conforman un sistema con polímeros principalmente amorfos ($\text{Tan } \delta > 0.1$).

Análisis térmico

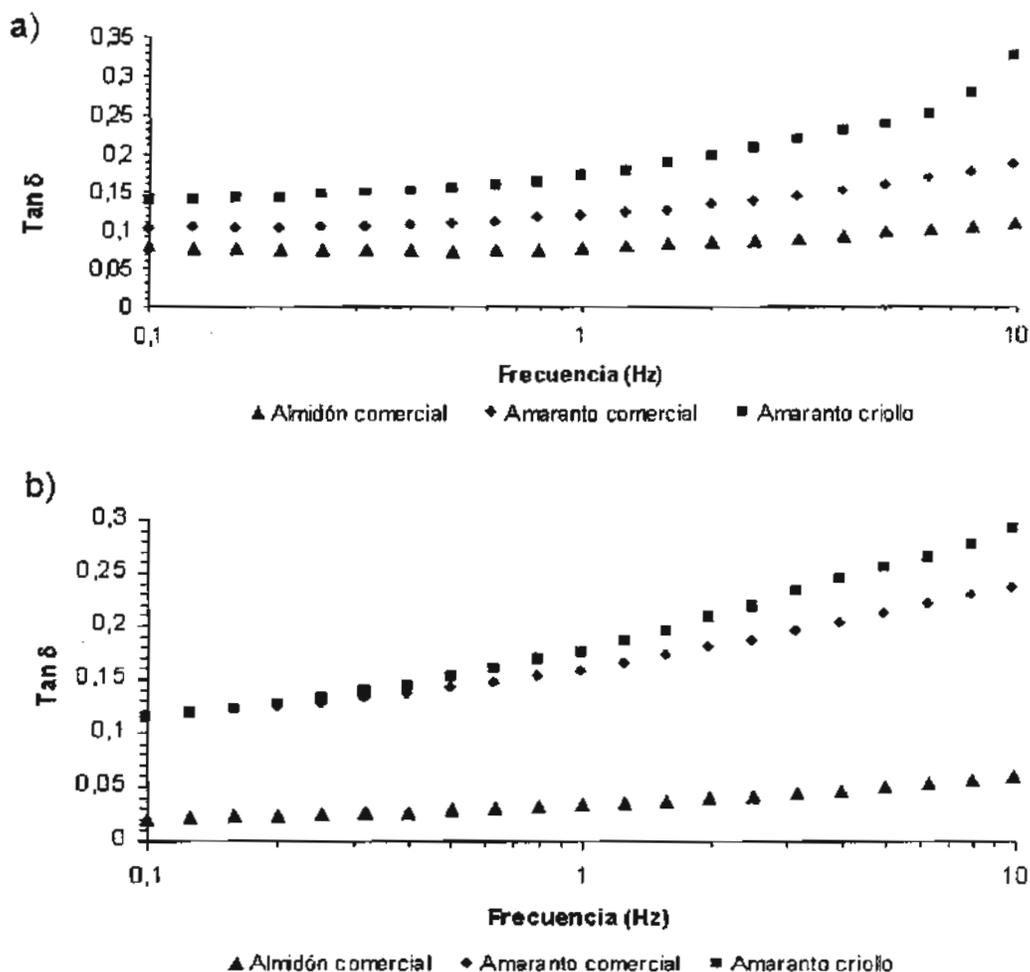
Las propiedades térmicas del almidón son medidas utilizando un calorímetro diferencial de barrido (TA – Instruments, modelo 2010, New Castle, EU), utilizando el método propuesto por Paredes-López y colaboradores (1994). La temperatura de inicio (T_i), temperatura de gelatinización (T_p), temperatura final (T_f), y la entalpía (ΔH) son obtenidas directamente del análisis del software TA Instrument OS/2, versión 2.1.

Los almidones de amaranto presentaron temperaturas de gelatinización muy similares (71.3 y 72.8°C), con valores de entalpía de 4.8 y 4.5 j/g, pero no se presentó una diferencia significativa en estos parámetros analizados. Cuando estos valores fueron comparados con un almidón normal de maíz, éste último mostró una temperatura de gelatinización de 73°C, la cual es ligeramente mayor que la determinada en los almidones de amaranto; en el caso de la entalpía, la del almidón de maíz fue de 13.1 j/g; la diferencia con los almidones de amaranto podría estar relacionada con el contenido de amilosa y aún más con la estructura molecular de la amilopectina (Bello-Pérez *et al.*, 1998a y 1998b) presente en estos dos tipos de almidones.

Estudios bioquímicos de los gránulos de almidón

La presencia de proteínas en la superficie de los canales posibilita la hipótesis sobre su importancia en la biosíntesis del gránulo y su papel como formadoras de canales o

Figura 6. Tangente de delta de los almidones de maíz comercial, amaranto comercial y una variedad de amaranto criollo, en una cinética de calentamiento-enfriamiento, midiendo a: (a) 90°C y (b) 25°C, en un barrido de frecuencia



microtúbulos dentro del gránulo y, por tanto, de la morfología de estos gránulos. En trigo se han reportado dos tipos de proteínas enlazadas a los gránulos (SGP): SGP-140 y SGP-145 que están activamente involucradas en la producción de amilosa y amilopectina. SGP-140 está formada por polipéptidos de 60, 80, 92, 100 y 115 kDa (Peng *et al.*, 2000). Proteínas de 60 kDa, denominadas GBSSI, son necesarias para la síntesis de amilasa y no afectan significativamente el tamaño o estructura de los gránulos. Sin

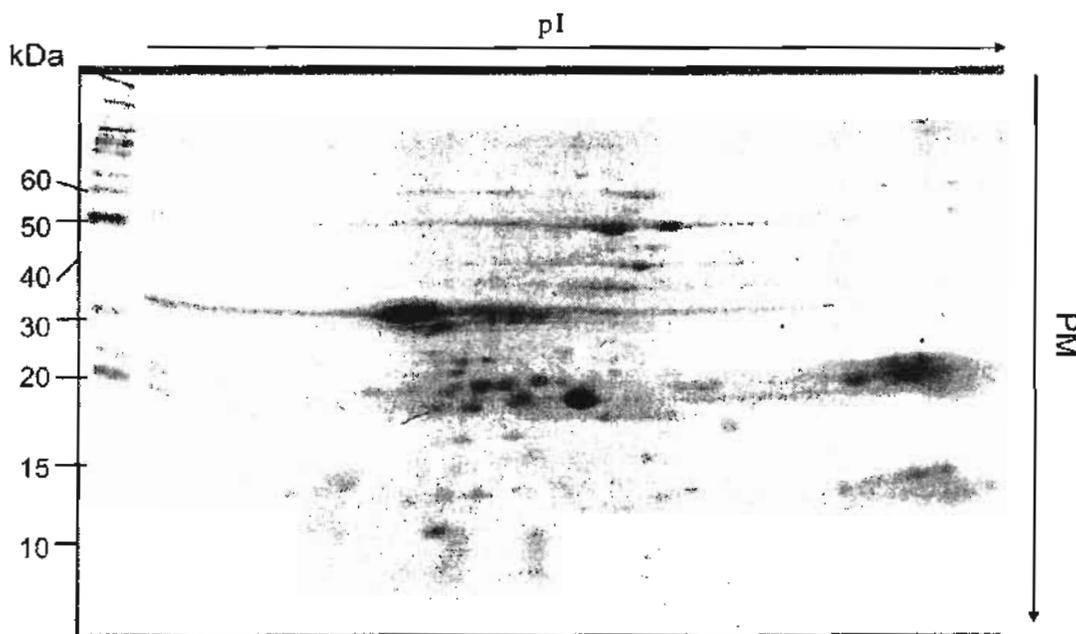
embargo, la ausencia de otra proteína denominada SSII es responsable de la deformación de gránulos grandes y de la producción de almidón con alta capacidad de enlazar yodo (Yamamori, 1998). En el chícharo se han reportado polipéptidos de 77 kDa de almidón sintasa, así como isoformas de 60 y 59 kDa (Edwards *et al.*, 1996), aun así, a la fecha no hay trabajos conclusivos sobre la actividad de los enzimas que sintetizan los gránulos de almidón.

La proteómica ha abierto un gran campo de estudio en la caracterización de las proteínas que se encuentran enlazadas a los gránulos de almidón, las cuales rigen la estructura y cristalinidad (Benmoussa *et al.*, 2004); por tal motivo, empleando las herramientas de proteómica hemos obtenido el patrón bidimensional de las proteínas enlazadas a los gránulos de almidón. Las proteínas totales de gránulos de almidón fueron extraídas con *buffer* de hidratación (8M urea, 2% CHAPS, 2.8 mg/ml DTT y 0.5% anfollinas) y separadas por punto isoelectrico en tiras de 7 cm en un rango de pH de 3-10. La segunda dimensión fue corrida en geles de poliacrilamida al 15% y los geles fueron teñidos con *Sypro-Ruby*. En la figura 8 se muestra el patrón bidimensional en donde se han detectado alrededor de 650 manchas. Aplicando la caracterización por MALDI-TOF podremos tener una caracterización más clara del tipo de proteínas presentes en los gránulos de almidón.

Con estudios proteómicos se han podido determinar los cambios en el patrón de proteínas en las líneas de maíz QPM (Gibbon *et al.*, 2003), también se ha utilizado para detectar enzimas en los procesos metabólicos de endospermos almidonosos de cereales (Wong *et al.*, 2003). Otro aspecto importante que ha tenido un gran avance en el estudio proteómico ha sido el control de calidad de proteínas residuales en almidones de trigo; pequeñas contaminaciones por gliadinas y glutelinas pueden ser críticos para alimentos administrados a pacientes celíacos (Dupont *et al.*, 2004). Además, caracterizar el tipo de enzimas enlazados a los gránulos de almidón será una información valiosa necesaria en los trabajos de manipulación de su biosíntesis, y con ello se podrán obtener almidones que presenten cierta estructura, y por tanto, ciertas propiedades funcionales.

Apoyados en tecnologías de punta como la Microscopía de Fuerza Atómica y en la proteómica, entre otras novedosas técnicas, se podrá obtener mayor información estructural de los gránulos de almidón de amaranto. Esto se aportará las herramientas necesarias para diseñar la biosíntesis de nuevos almidones y en un futuro, aplicando la nanotecnología, se podrán generar nuevos materiales nanoestructurados (Jiang *et al.*, 2004).

Figura 8. Separación bidimensional de proteínas enlazadas a los gránulos de almidón de amaranto



Bibliografía

- Alexander, R.J. (1999), "Starches used in paper", *Cereal Foods World*, 44: 372-380.
- Baker, A.A.; Miles, M.J.; Helbert, W. (2001), "Internal structure of the starch granule revealed by AFM", *Carbohydr. Res.*, 330: 249-256.
- Barba de la Rosa, A.P.; Paredes-López, O.; Cárabez-Trejo, A.; Ordorica-Falomir, C.A. (1989), "Enzymatic hydrolysis of amaranth flour-differential scanning calorimetry and scanning electron microscopy studies", *Starch/Stärke*, 41(11): 424-428.
- Bello-Pérez, L.A.; Paredes-López, O. (1999), "El almidón: lo comemos pero no lo conocemos", *Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*, 50: 29-30.
- _____; Colonna, P.; Roger, P.; Paredes-López, O. (1998a), "Macromolecular features of amaranth starch", *Cereal Chem.*, 75(4): 395-402.
- _____; Roger, P.; Baud, B.; Colonna, P. (1998b), "Macromolecular features of starches determined by aqueous high-performance size exclusion chromatography", *J. Cereal Sci.*, 27: 267-278.

- Benmoussa, M.; Hammaker, B.R.; BeMiller, J.N. (2004), "Proteomic approach for identification of corn starch granule channel proteins", Abstract 47002, Plant Biology Congress, 24-28 julio, Orlando, Fl.
- Dupont, F.M.; Venserl, W.; Hurkman, W.; Lopez, R.; Tanaka, C.; Kasarda, D.D. (2004), "Proteomic comparison of surface proteins from four commercial wheat starch preparations", *Abstract 294*, AACC Meeting: 138-139.
- Edwards, A.; Marshall, J.; Denyer, K.; Sidebottom, Ch.; Visser, R.G.F.; Martin, C.; Smith, A.M. (1996), "Evidence that a 77-kilodalton protein from the starch of pea embryos is an isoform of starch synthase that is both soluble and granule bound", *Plant Physiol.*, 112: 89-97.
- Gibbon, B.C.; Wang, X.; Larkins, B.A. (2003), "Altered starch structure is associated with endosperm modification in quality protein maize", *PNAS* 100: 15429-15334.
- Guilbot, A.; Mercier, C. (1985), "Starch", en Aspinall, O. (ed.), *The polysaccharides*, Nueva York, Academic Press, 209-282.
- Ikawa, Y.; Glover, D.V.; Iida, M.; Takaya, J.; Fuwa, H. (1981), "Properties of residual starches of sugary-2 and sugary 2-opaque (*Zea mays* L.) following amylase hydrolysis", *Starch/Stärke*, 33: 230-233.
- Jiang, K.; Schadler, L.S.; Siegel, R.W.; Zhang, X.; Zhang, H.; Terrones, M. (2004), "Protein immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide-activated amidation", *J. Mater. Chem.*, 14: 37-39.
- López, M.G.; Bello-Pérez, L.A.; Paredes-López, O. (1994), "Amaranth carbohydrates", en Paredes-López, Octavio (ed.), *Amaranth: Biology, Chemistry, and Technology*, Boca Ratón, Florida, CRC Press, 107-131.
- Marchal, L. (1997), *Enzymatic starch conversion: background in HRA. Starches & hydrolyzates: A world wide review of manufactures & production*, EU, Prairie Village.
- Mapes, C.; Caballero, J.; Espitia, E.; Bye, R. (1996), "Morphophysiological variation in some Mexican species of vegetable *Amaranthus*: Evolutionary tendencies under domestication", *Journal of Genetic Resources and Crop Evolution*, 43: 283-290.
- National Academy of Sciences (NAS) (1984), "Amaranth modern prospects for an ancient crop", *Nat. Acad. Sci.*, Washington, D.C.
- Paredes-López, O.; Barba de la Rosa, A.P.; Hernández-López, D.; Cárabez-Trejo, A. (1990), *Amaranto. Características alimentarias y aprovechamiento agroindustrial*, Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Washinton, D.C.
- Peng, M.; Gao, M.; Bâga, M.; Hucl, P.; Chibbar, R.N. (2000), "Starch-branching enzymes preferentially associated with A-Type starch granules in wheat endosperm", *Plant Physiol.*, 124: 265-272.

- Spehar, C.R.; Teixeira, D.L. (2003), "Amaranto BRS Alegria: alternative para diversificar os sistemas de producao", *Pesq. Agropec. Bras.*, 38(5): 659-663.
- Ridout, M.J.; Parker, M.L.; Hedley, C.L.; Bogracheva, T.Y.; Morris, V.J. (2004), "Atomic force microscopy of pea starch: origins of image contrast", *Biomacrol.*, 5: 1519-1527.
- Teutonico, R.A.; Knorr, D. (1985), "Amaranth: Composition, properties and applications of a rediscovered food crop", *Food Technology*, 39: 49.
- Wilhelm, E.; Aberle, T.; Burchard, W.; Landers, R. (2002), "Peculiarities of aqueous amaranth starch suspensions", *Biomacromol.*, 3: 17-26.
- Wong, J.H.; Balmer, Y.; Cai, N.; Tanaka, C.K.; Vensel, W.H.; Hurkman, W.J.; Buchanan, B.B. (2003), "Unraveling thioredoxin-linked metabolic processes of cereal starchy endosperm using proteomics", *FEBS Lett.*, 547: 151-156.
- Yamamori, Y. (1998), "Selection of wheat lacking a putative enzyme for starch synthesis, SGP-1", en Slinkård, A. (ed.), *Proceedings of the 9th International wheat genetics symposium*, vol. 4, Canadá, University Extension Presss, University of Saskatchewan, Saskatoon: 300-302.

**Producción de sustratos para la alimentación
de rumiantes por fermentación en medio sólido
de residuos agroindustriales**

*Production of Substrates for the Feeding of Rumiantes
by in the Middle Solid Fermentation of Agro-industrial
Remainders*

*Ortiz-Tovar, G.; López-Miranda, J.; Cerrillo-Soto, A.;
Favela-Torres, E.; Soto-Cruz, O.**

Resumen

En Durango, México, los residuos más abundantes son: rastrojo de maíz, pajas de frijol y avena, y residuos de manzana. La fermentación en medio sólido es un proceso por medio del cual los microorganismos crecen sobre sustratos sólidos en ausencia de agua libre. Por otra parte, la producción de gas *in vitro* es la técnica más sencilla y rápida para evaluar el potencial de utilización de sustratos como alimento de rumiantes, de acuerdo con el procedimiento de Orskov. En el presente trabajo se utilizaron *Trichoderma harzianum* y *Phanaerochaete chysosporium*, cultivados sobre paja de frijol, paja de avena, rastrojo de maíz, bagazo de manzana y bagazo de maguey, por separado y combinados. Se midió la producción de gas *in vitro* antes y después del tratamiento como una medida indirecta de la digestibilidad. Los resultados preliminares indican, hasta ahora, que no se ha logrado incrementar la digestibilidad de los sustratos en forma significativa.

* Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Durango, Blvd. Felipe Pescador 1830 Ote. 34080, Durango, Dgo. Tel./Fax: 818 5402. E-mail: soto@itdurango.edu.mx

Abstract

In Durango, Mexico, the most abundant residues are maize stubble, bean and oat straws and apple pomace. Solid substrate fermentation is a process in which the microorganisms grow on solid substrates into free water absence. On the other hand, the *in vitro* gas production is the simplest and fastest technique to evaluate the potential of use of substrates for ruminant-fed using the procedure of Orskov. In the present work, *Trichoderma harzianum* and *Phanaerochaete chysosporium* were cultivated on straw of frijol, oats straw, maize stubble, apple pomace and residues of mezcal agave, separately and combined. The gas production was measured *in vitro*, before and after the treatment, like an indirect measurement of the digestibility. The preliminary results indicated no significant increase in the digestibility of the substrates.

Introducción

En el contexto de la producción vegetal, el concepto estricto de residuo agrícola se aplica a la fracción o fracciones de un cultivo que no constituyen la cosecha propiamente dicha y a aquella parte de la cosecha que no cumple con los requisitos de calidad mínima para ser comercializada como tal. También son residuos agrícolas los subproductos de origen vegetal generados por las industrias de transformación agrícola (Manterola, 1999).

El rastrojo de maíz es, por mucho, el residuo agrícola más abundante en Durango, aunque también se generan cantidades importantes de otros residuos, como las pajas de frijol y avena. En cuanto a los residuos provenientes de cultivos perennes, los residuos de manzana son los más abundantes. Más de 90% de los residuos generados en el estado se obtienen en el ciclo primavera-verano, es decir, la disponibilidad de residuos se concentra durante los meses de junio a octubre, principalmente. Los residuos son utilizados en su mayor parte para dos propósitos: fertilización de la misma tierra donde se obtuvo el cultivo principal (que es lo más común) y suplementación de la alimentación animal.

La fermentación en medio sólido (FMS) ha sido definida como un proceso por medio del cual los microorganismos crecen sobre sustratos sólidos en la ausencia de agua libre (Robinson y Nigam, 2003; Lonsane, *et al.*, 1985; Sargantis, 1993). Actualmente, los procesos de FMS se han enfocado en biorremediación y biodegradación de compuestos peligrosos, detoxificación biológica de residuos agroindustriales; biotransformación de cultivos y residuos de las cosechas para el enriquecimiento nutricional, y la obtención de productos con valor agregado, tales como metabolitos secundarios (antibióticos, alcaloides, factores de crecimiento para las plantas) enzimas, ácidos

orgánicos, biopesticidas, biosurfactantes, biocombustibles, compuestos aromáticos, etcétera. Muchas bacterias, hongos y levaduras son capaces de crecer sobre sustratos sólidos, y por ello encuentran aplicación en los procesos de FMS. Entre estos microorganismos, los hongos filamentosos son los mejor adaptados a estos procesos y dominan en las investigaciones realizadas alrededor del mundo (Mitchel, 1992).

En general, los sustratos para la FMS son productos de la agricultura o subproductos de la agroindustria (Raimbault, 1998), pero esto hace difícil la caracterización completa de los materiales y la reproducibilidad del experimento (Robinson y Nigam, 2003). La bioconversión de desechos agrícolas por hongos en alimentos y productos útiles, es uno de los aspectos relevantes en biotecnología para el desarrollo sustentable, el cual ya tiene gran impacto y se predice que éste seguirá aumentando (Singh *et al.*, 1996).

Por otra parte, la producción de gas *in vitro* es la técnica más sencilla para evaluar el potencial de utilización de sustratos para la alimentación de rumiantes. En ella, las muestras de los sustratos en estudio se incuban con líquido de rumen en jeringas de vidrio calibradas. La producción de gas se registra (cada tres horas) durante 96 horas, y a partir de los datos obtenidos, los parámetros de producción de gas se generarán de acuerdo con el procedimiento de Orskov (Menke *et al.*, 1979; Menke y Steingass, 1988).

El objetivo del trabajo es determinar, a nivel laboratorio, el grado de modificación de los residuos agroindustriales con relación a pruebas *in vitro*.

Materiales y métodos

Microorganismo. Se utilizaron los hongos filamentosos *Trichoderma harzianum* (celulolítico) y *Phanaerochaete chysosporium* (ligninolítico). Las cepas fueron conservadas en tubos inclinados con medio papa-dextrosa-agar (PDA) a 4°C hasta su utilización.

Residuos agroindustriales. Se emplearon como soporte-sustrato los siguientes residuos agroindustriales: paja de frijol, paja de avena, rastrojo de maíz, bagazo de manzana y bagazo de maguey.

Producción de inóculo. Se propagó en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio PDA, incubadas a 30°C durante siete días. Una vez que los cultivos esporularon, se adicionaron 30 mL de Tween 80 (0.05%v/v), se resuspendieron las esporas con un agitador magnético y se determinó la concentración de esporas en la suspensión con una cámara de Neubauer.

Medios de cultivo. Los medios utilizados en este trabajo fueron los residuos agroindustriales ya mencionados, los cuales fueron hidratados hasta un 70% de humedad usando el medio Mandels, el cual tiene la siguiente composición (por litro): urea, 0.3 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.4 g; KH_2PO_4 , 2.0 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0.4 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g; peptona de caseína, 0.75 g; extracto de levadura, 0.25 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.6 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.4 mg y $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20, mg.

Fermentación en medio sólido. Se utilizaron dos series de matraces Erlenmeyer de 250 mL, los cuales se esterilizaron a 120°C durante 30 minutos. Posteriormente se inocularon con una suspensión de esporas para tener 2 por 10^7 esporas/g de sustrato seco y humedad de 70%. Se incubaron a 30°C dentro de una cámara con atmósfera húmeda. Después de siete días de incubación, se retiraron los sustratos fermentados de los matraces y se secaron a 60 °C durante 24 horas.

Producción de gas in vitro. Se pesaron muestras de 200 mg (MS) de los sustratos sin tratamiento y sustratos tratados por fermentación en medio sólido, y se colocaron dentro de jeringas de vidrio de 100 ml calibradas (Menke *et al.*, 1979; Menke y Staingass, 1988). Se incluyeron dos blancos (saliva artificial + solución reductora + inóculo) colocados uno al principio y otro al final de cada serie de jeringas, así como una muestra control de producción conocida de gas (heno de alfalfa) para corregir las posibles variaciones entre series. Las jeringas, a las cuales se les incorporó el alimento a evaluar, se incubaron a una temperatura de 39°C en *baño María* con agitación, y se utilizó una cubierta de plexiglás para mantener las jeringas en posición vertical. Este procedimiento se realizó 24 horas antes de inocular las muestras. Para la preparación de saliva artificial se colocó en un matraz de fondo plano una solución compuesta por agua destilada, solución *buffer*, solución de microminerales, solución de macrominerales y solución resazurina. El matraz y la saliva artificial se calentaron en *baño María* a 39°C y se añadió la solución reductora compuesta de agua destilada, hidróxido de sodio y sulfito de sodio. Se colocó en la solución un agitador magnético para mezclar de forma suave y constante. Al mismo tiempo, se hizo burbujear CO_2 dentro de la solución hasta que el color azul de la solución cambió a color rosa y después, la solución se tornó incolora. Estos cambios de coloración son indicativos de una correcta preparación de la solución reductora (Keir y Ørskov, 2000). El líquido ruminal empleado como inóculo se obtuvo de dos borregos fistulados de rumen mantenidos en confinamiento y alimentados con heno de alfalfa. El líquido ruminal se colectó mediante un sistema de vacío operado manualmente con un colador de acero inoxidable en un extremo y se filtro a través de seis capas de gasa; enseguida se mezcló con la solución de saliva artificial en proporción 1:2 (Keir y Ørskov, 2000). El tubo alimen-

tador de CO₂ utilizado durante la preparación de la saliva artificial se colocó por encima de la mezcla de saliva artificial: líquido ruminal para proporcionar una atmósfera libre de O₂. Inmediatamente después, se procedió a dosificar 30 ml de solución en cada jeringa mediante un dosificador automático (Keir y Ørskov, 2000). Las lecturas de producción de gas se realizaron a las 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 y 96 horas. La producción de gas resultante a las 96 horas de incubación, es la producción acumulada de cada tiempo de medición. Para facilitar la manipulación de las jeringas, cuando la acumulación de gas fue superior a 50 ml, entre tiempos de incubación, el gas producido se eliminó tantas veces como fue necesario.

Análisis estadístico. Los datos de producción de gas *in vitro* se ajustaron, mediante el procedimiento PROC NLIN de SAS (1997), y se utilizó un modelo no lineal propuesto por Ørskov y McDonald (1979):

$$p = a + b(1 - e^{-ct})$$

Donde:

p = Producción de gas al tiempo (t).

a = Gas producido (ml) por la fermentación instantánea de la fracción soluble del alimento.

b = Gas producido (ml) por la fermentación de la fracción insoluble, pero de lenta fermentación.

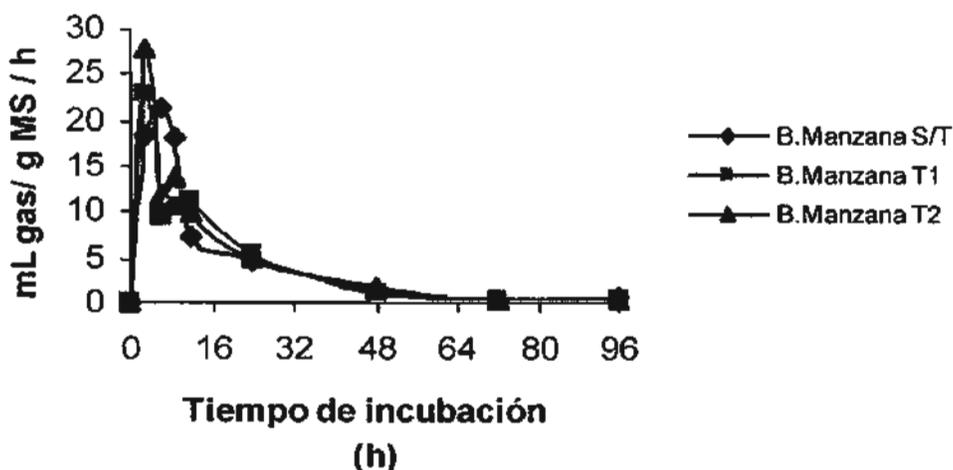
c = Tasa constante de producción de gas.

Resultados y discusión

La figura 1 muestra la tasa de producción de gas (ml/gMS/h) para bagazo de manzana. De acuerdo con Mould (2002, comunicación personal) los picos de producción de gas indicarían, por una parte, la producción de gas proveniente de sustratos solubles y rápidamente fermentables; por otra parte, un pico de producción originado por la fermentación de material más lentamente fermentable. No se observó diferencia estadísticamente significativa en la producción de gas en ninguno de los sustratos. En la tabla 1 se muestran los parámetros de producción de gas *in vitro* de los residuos agroindustriales tratados y no tratados por FMS, definidos por la ecuación de Ørskov.

En general, no se observa diferencia significativa en los parámetros de la ecuación de Ørskov, lo que, aunado a la falta de diferencia significativa en la tasa de producción de gas, indica que la fermentación en medio sólido no modificó la degradabilidad de los sustratos empleados, al menos en cuanto al volumen de gas producido. Sin embargo, es necesario realizar otras pruebas *in vitro* (como determinación del perfil de ácidos grasos volátiles en las jeringas de producción de gas) que permitirían obtener una conclusión soportada en la calidad del gas producido. La realización de lo anterior es importante antes de aventurarse a practicar pruebas *in situ*, que son más costosas en tiempo y recursos materiales. Villas Bôas y colaboradores (2003) reportan 8.2% de incremento en la digestibilidad de residuos de manzana por FMS con *Candida utilis* (celulolítico) y *Pleurtus ostreatus* (ligninolítico), por lo que se han reportado resultados positivos con una estrategia similar a la implementada en el presente trabajo.

Figura 1. Producción de gas acumulado en bagazo de manzana sin tratamiento (S/T) y tratado por FMS con *T. harzianum* (T1) y con *P. chysosporium* (T2)



Conclusiones

Los resultados obtenidos hasta el momento no permiten concluir sobre el efecto de la FMS en la degradabilidad de sustratos.

Perspectivas

Se determinará el perfil de ácidos grasos volátiles, además de la producción de gas *in vitro*, para tener mejores elementos de análisis. Asimismo, se realizarán análisis de contenido de celulosa, lignina, proteína y grasa, antes y después de la FMS.

Tabla 1. Parámetros de producción de gas *in vitro* de sustratos sin tratamiento (S/T) y tratados por FMS con *T. harzianum* (T1) y con *P. chysosporium* (T2).

<i>Residuo de:</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>
Frijol	8.1722 ^a	60.607 ^a	0.0518 ^a
Frijol T1	-5.1506 ^b	59.882 ^a	0.0331 ^a
Frijol T2	-6.6740 ^b	60.644 ^a	0.0301 ^a
Avena S/T	-2.341 ^a	63.633 ^a	0.0502 ^a
Avena T1	-3.633 ^a	66.219 ^a	0.0384 ^b
Avena T2	-4.976 ^a	63.370 ^a	0.0449 ^b
Maíz S/T	-8.881 ^a	79.089 ^a	0.0306 ^a
Maíz T1	-7.841 ^a	80.154 ^a	0.0207 ^a
Maíz T2	-7.519 ^a	63.577 ^a	0.0333 ^a
Manzana S/T	-3.610 ^b	61.674 ^a	0.0972 ^a
Manzana T1	2.877 ^a	48.589 ^b	0.0747 ^a
Manzana T2	6.486 ^a	54.054 ^b	0.0684 ^a
Maguey S/T	4.5531 ^a	54.188 ^a	0.0681 ^a
Maguey T1	-3.4211 ^b	53.291 ^a	0.0521 ^b
Maguey T2	-3.6503 ^b	51.250 ^a	0.0600 ^b

^{a, b, c} Valores con diferente literal dentro de columnas, difieren (P<0.05).

a= Gas producido (ml/200mg MS) por la fermentación instantánea de la fracción soluble del alimento.

b= Gas producido (ml/200mg MS) por la fermentación de la fracción insoluble, pero de lenta fermentación.

c= Tasa constante de producción de gas (h⁻¹).

Bibliografía

- Blümmel, M.; Becker, K. (1997), "The degradability characteristics of fifty-four roughages and roughage neutral detergent fibres and as described by *in vitro* gas production and their relationships to voluntary feed intake", *Brit. J. Nutr.*, 77: 757-768.
- Keir, B.; Ørskov, E.R. (2000) (comunicación personal), MacCaulay Land Use Research Institute Aberdeen, Escocia.
- Lonsane, B.K.; Ghildyal, N.P.; Budiartman, S. y Ramakrishna (1985), "Engineering aspects of solid state fermentation", *Enzyme Microb. Technol.*, 7: 258-265.
- Manterola, H.; D. Cerda, J. Mira (1999), *Los residuos agrícolas y su uso en la alimentación de rumiantes*, Santiago, Chile, Fundación para la Innovación Agraria del Ministerio de Agricultura, 222 páginas.
- Menke, K.H.; Raab, L.; Salewski, A.; Steingass, H.; Fritz, H.; Scheneider, W. (1979), "The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*", *J. Agric. Sci. Camb.*, 93: 217-222.
- _____; Steingass, H. (1988), "Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid", *Anim. Res. Develop.*, 28: 7-55.
- Mitchel, D.A. (1992), "Microbial basis of processes", en Doelle, H.W.; Mitchel, D.A. y Rolz, C.E. (eds.), *Solid substrate cultivation*, Londres y Nueva York, Elsevier Applied Science, pp. 321-340.
- Mould, F. (2002) (comunicación personal), Mérida, Yucatán, Universidad Autónoma de Yucatán.
- Ørskov, E.R.; Mc Donald, I. (1979), "The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to the rate of passage", *J. Agric. Sci. Camb.*, 92: 499-503.
- _____; Ryle, M. (1990), *Energy Nutrition in Ruminants*, Londres y Nueva York, Elsevier Applied Sci.
- Raimbault, M. (1998), "General and microbiological aspects of solid substrate fermentation", *Electronic Journal of Biotechnology*, 3: 1-13.
- Robinson, T.; Nigam, P. (2003), "Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation", *Biochemical Engineering Journal*, Elsevier Applied Science: 197-203.
- Sargantanis, J. (1993), "Effect of operating conditions on solid substrate fermentation", *Biotechnology and Bioengineering*, 42: 149-158.

- Singh, K.; Puniya, A.K.; Singh, S. (1996), "Biotransformation of crop residues into animal feed by solid state fermentation", 55: 472-478.
- Villas-Bôas, S.G.; Esposito, E.; Matos de Mendonça, M. (2003), "Bioconversion of apple pomace into a nutritionally enriched substrate by *Candida utilis* and *Pleurotus ostreatus*", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 19: 461-467.

Hidrólisis ácida de la inulina de *Agave americana* para la obtención de mostos fermentables ricos en fructosa

Acid Hydrolysis of Inulin from *Agave americana* to Obtain Fermentable Solutions Rich in Fructose

Gómez Ayala, R.C.^{1}; Ramírez de León, J.A.¹;
Jacques-Hernández, C.²; Vázquez Vázquez, M.^{1,3}*

Resumen

En Tamaulipas, el agave, principalmente la especie *Agave americana*, se utiliza para la obtención de mostos fermentables ricos en fructosa que, mediante fermentaciones naturales o inducidas con levaduras, permiten la obtención de alcohol. Este proceso se realiza de manera tradicional e involucra cocciones a fuego lento de hasta 72 horas. Actualmente se está desarrollando un proyecto para mejorar el proceso de producción de mostos fermentables a partir de *Agave americana*; asimismo se están diseñando sistemas de cocción a presión para disminuir el tiempo del proceso. El objetivo de este trabajo fue evaluar el tiempo de hidrólisis de la inulina de *Agave americana* para obtener soluciones con una concentración máxima de fructosa y mínima de furfural. Se realizó un diseño factorial incompleto de segundo orden. Las variables estudiadas

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

² Centro de Biotecnología Genómica-IPN. Blvd. del Maestro, esq. Elías Piña, col. Narciso Mendoza. Ciudad Reynosa, Tamaulipas, México. C.P. 88710. Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas.

³ Departamento de Química Analítica y Alimentaria, Área Tecnología de los Alimentos, Universidad de Santiago de Compostela (España).

* E-mail: rocio_gomez_ayala@hotmail.com

fueron concentración de ácido fosfórico (0, 0.5 y 1%), temperatura (80, 100 y 120 °C) y tiempo de hidrólisis (30, 90 y 150 min). Los resultados mostraron que la concentración máxima de fructosa (11.2 g/L) se obtiene aplicando 80°C, 1% ácido fosfórico y 90 minutos de hidrólisis.

Abstract

In Tamaulipas (Mexico), the agave, mainly the species *Agave americana* is used to obtain high fructose fermentable solutions that by natural or induced fermentations with yeasts allows to obtain alcohol. This process is traditional and involves cooking up to 72 hours using mild heating. Nowadays, works to improve the process of fermentable must production from *Agave americana* and studying the use of autoclave cooking systems to decrease the processing time are conducting. The aim of our work was to evaluate the hydrolysis time of the inulin from *Agave americana* to obtain solutions with a maximum concentration of fructose and minimum of furfural. A second order, incomplete, factorial design was performed. The variables studied was phosphoric acid concentration (0, 0.5 and 1%), temperature (80, 100 and 120°C) and process time (30, 90 and 150 min). The results showed a maximum concentration of fructose (11.2 g/L) using 80°C, 1% phosphoric acid and 90 min of hydrolysis.

Introducción

El estado de Tamaulipas cuenta con una amplia diversidad agroecológica, entre la que destaca el cultivo de agave. El agave o maguey tiene muchos usos, pero el más importante es la producción de bebidas alcohólicas. El mezcal (la bebida alcohólica que más se produce en Tamaulipas) es una bebida destilada producida a partir del agave o maguey mezcalero. Las diferencias básicas con el tequila estriban en las especies utilizadas en su elaboración y en la forma artesanal o semiartesanal de obtención de mezcal. Ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial se han propuesto once municipios para obtener la denominación de origen del mezcal, de los cuales ya se han aceptado ocho de Tamaulipas (Burgos, San Carlos, San Nicolás, Miquihuana, Jaumave, Bustamante, Palmillas y Tula), así como de otros estados de la República: Guerrero, Oaxaca, Durango, San Luis Potosí y Zacatecas.

En la actualidad la elaboración de mezcal resulta atractiva debido a las altas cotizaciones y a la gran demanda que este producto ha alcanzado en los mercados nacionales e internacionales. Sin embargo, hay factores que limitan su elaboración, tales como la materia prima, los elevados costos de producción, la falta de

tecnología apropiada, la carencia de asesoría técnica y la comercialización deficiente.

El *Agave americana* tiene un papel muy importante en el estado de Tamaulipas, debido a que esta especie es usada en la producción de mezcal en la zona (Jacques-Hernández, 2002). La mayor parte de la piña del agave está compuesta por inulina, un carbohidrato ramificado que actúa como fuente de reserva de energía (Franck y De Leenher, 2000; Mancilla y López, 2002).

La inulina es la fructosana más difundida (contiene más de 30 unidades de *D*-fructosa); su hidrólisis total produce, además de fructosa, de 5 a 6% de moléculas de glucosa que se encuentran en los extremos de la cadena (Badui, 1993). Este carbohidrato también se encuentra presente en tubérculos y raíces de dalias, alcachofas y diente de león (Murray *et al.*, 2001).

Entre las funciones de la inulina, además de actuar como carbohidrato de reserva, se encuentra la de ser crioprotector y regulador osmótico. En lugares donde hay sequía la inulina se concentra en las raíces de las plantas mientras que en las hojas permanece ausente; en ambientes fríos la inulina es degradada a moléculas de fructosa y glucosa (Franck y De Leenher, 2000).

La utilización de la inulina en los agaves es diferente, puesto que este carbohidrato es utilizado como fuente de energía durante el crecimiento de la inflorescencia. Los diferentes grados de ramificación que se encuentran en la inulina de distintas fuentes trae consigo un gran beneficio, ya que al tener una mayor cantidad de puntos de ramificación la inulina se puede hidrolizar más rápidamente para la producción de energía (Mathews y Van Holde, 1995).

Durante la producción de mezcal, la inulina se hidroliza total o parcialmente para producir principalmente fructosa (Mancilla y López, 2000). Ésta se somete a fermentación alcohólica por microorganismos y mediante destilación del mosto se produce mezcal. La inulina también puede utilizarse como aditivo alimentario, por su función como fibra dietética soluble (Franck y De Leenher, 2000; Niness, 1999; Taper y Roberfroid, 1999).

Los usos del agave son diversos, por eso debe de analizarse el mercado para cada uno de ellos para que, una vez obtenido el producto, se tenga la certeza de venderlo. El mercado para los productos de maguey se encuentra en la demanda que plantea la ganadería, la industria del mezcal, fructosa y fibras, el aprovechamiento de subproductos del mezcal, la artesanía y la gastronomía, entre otras (Morales Carrillo, 2001).

Para la obtención de mostos fermentables, las piñas de agave desprovistas de hojas y raíces, con una maduración de 6 a 10 años, son transportadas a pequeñas

fábricas productoras de mezcal, donde se cortan en partes. La cocción se realiza durante 3 a 5 días, en hornos revestidos de piedra, excavados en la tierra, calentados con leña, y cubiertos con bagazo y tierra. En la siguiente fase se desmenuzan y muelen de forma manual o usando una rueda de piedra (molino chileno). El agave molido pasa a tinajas de fermentación; después se destila para obtener el producto final: mezcal (García Mendoza, 1998).

La optimización de los procesos para la obtención de mostos fermentables pueden mejorar los niveles de empleo e impulsar las pequeñas empresas en la región. El mejoramiento de los procesos para la obtención de mostos puede permitir el progreso de regiones donde no se puede sembrar y cuyo único recurso agrícola son los agaves cultivados.

Una de las finalidades de este trabajo es darle un uso alternativo a las plantas de *Agave americana* mediante la realización de un proceso mediante el que se obtengan mostos ricos en azúcares (principalmente fructosa y glucosa) por medio de hidrólisis ácida, los cuales se utilizarían para la obtención de aditivos alimentarios de mayor valor comercial (por ejemplo, el enzima transglutaminasa o el ácido láctico).

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue evaluar el tiempo de hidrólisis de la inulina de *Agave americana* para obtener soluciones con una concentración máxima de fructosa y mínima de furfural, para su utilización como mostos fermentables en otros procesos biotecnológicos.

Material y métodos

Materia prima

Las muestras de *Agave americana* se obtuvieron del municipio de San Carlos, Tamaulipas, México, del campo donde se desarrollaron de forma natural.

Se trabajó con el tallo, el cual fue cortado en partes y separado de las hojas; el corazón se analizó, se almacenó en bolsas de plástico transparente y se congeló hasta su posterior utilización.

Hidrólisis de la inulina

Se realizó un estudio de optimización con ácido fosfórico, mediante un diseño multifactorial fraccionado, en el cual se estudiaron las variables: concentración de ácido (0, 0.5 y 1 %), temperatura (80, 100 y 120 °C) y tiempo de hidrólisis (30, 90 y 150 minutos). La hidrólisis se realizó con 10 g de materia prima y 50 g de líquido de dilución (agua con ácido), manteniéndose una relación líquido/sólido de 5/1.

Los componentes se pesaron en frascos de vidrio esterilizables de 250 ml, con tapón de rosca. La hidrólisis de agave a 120 °C se llevó a cabo en autoclave, y a 80 y 100 °C en *baño de agua*. Después del tratamiento la muestra se filtró con papel *Whatman* No. 2 (15 cm de diámetro), y finalmente se analizaron carbohidratos y furfural.

Análisis de los hidrolizados

El líquido obtenido se diluyó y se filtró a través de una membrana de 0.45 µm de diámetro de poro. Este líquido se analizó por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE). Se utilizó una columna de intercambio iónico ION-300 con precolumna recomendada para la separación de alcoholes, ácidos orgánicos y carbohidratos, capaz de resolver como picos separados la fructosa, la glucosa, la xilosa y la arabinosa. A este líquido se le determinó la absorbencia en el UV a 280 nm.

Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa estadístico Statgraphics 4.0., realizándose un análisis de superficie de respuesta para determinar la influencia de la temperatura, concentración de ácido y tiempo de hidrólisis de la inulina.

Resultados y discusión

Mediante un análisis de superficie de respuesta se determinaron las condiciones óptimas para la hidrólisis de la inulina de *Agave americana* empleando ácido fosfórico, mediante un diseño multifactorial fraccionado.

En la tabla 1 se muestra la concentración de ácido (C), tiempo (t) y temperatura (T), que fueron consideradas como variables operacionales. Se determinó el efecto que tuvieron las variables operacionales sobre las variables dependientes Y_1 (fructosa), Y_2 (glucosa), Y_3 (furfural) y Y_4 (oligómeros de la inulina).

Efecto del ácido fosfórico

Los azúcares obtenidos fueron fructosa y glucosa. Los productos de degradación obtenidos fueron los compuestos fenólicos expresados como furfural. Se produjeron mostos fermentables ricos en azúcares en función del tiempo y del tratamiento que se utilizó, ya que el ácido fosfórico tiene poco efecto sobre la inulina del agave; realizando una hidrólisis parcial de ésta se obtuvieron valores relativamente bajos de azúcares.

Modelo de producción

La figura 1 muestra el estudio de la producción de fructosa a partir de *Agave americana* utilizando ácido fosfórico a distintas concentraciones. Experimentalmente se encontró que la concentración máxima de fructosa (11.2 g/L) se obtiene a 80°C, 1% ácido fosfórico y 90 minutos de hidrólisis. El modelo matemático nos muestra que las condiciones óptimas para la producción de fructosa son 80°C, 123.8 minutos y 1% ácido fosfórico, las cuales permiten obtener una concentración de 11.4 g/L de fructosa.

El comportamiento de la glucosa se muestra en la figura 2. Experimentalmente se observó que la concentración máxima de glucosa (6 g/L) se obtiene a 80 °C, 1% ácido fosfórico y 90 minutos de hidrólisis. Con el modelo matemático las condiciones óptimas para la producción de glucosa se establecieron en 80 °C, 99 minutos y 1% ácido fosfórico, lo que resulta en una concentración de 6 g/L de glucosa.

El comportamiento del furfural se muestra en la figura 3. Experimentalmente se encontró que la concentración mínima de furfural (0.02 g/L) se obtiene a 120 °C, 0.5% ácido fosfórico y 150 minutos de hidrólisis. Con el modelo matemático las condiciones para la mínima producción de furfural se establecieron en 80 °C, 40 minutos y 0% ácido fosfórico, las cuales permiten no generar furfural (0 g/L).

Respecto al comportamiento de los oligómeros de la inulina, éste se muestra en la figura 4. Experimentalmente se observó que la concentración máxima de oligómeros (16 g/L) se obtiene a 80°C, 0% ácido fosfórico y 90 minutos de hidrólisis. Con el modelo matemático obtenemos que las condiciones óptimas para la producción de oligómeros de la inulina son 80°C, 78 minutos y 0% ácido fosfórico, obteniendo una concentración de 14.61 g/L de oligómeros de la inulina.

Tabla 1. Variables empleadas en términos adimensionales y dimensionales, y resultados experimentales (g/L) obtenidos para la hidrólisis de la inulina de *Agave americana* con ácido fosfórico

	Variables independientes							Variables dependientes (g/L)			
	Adimensionales			Dimensionales				Y_1	Y_2	Y_3	Y_4
	X_1	X_2	X_3	Ácido (C)	Tiempo (t)	Temperatura (T)					
1	0	-1	-1	0.5	30	80	5.4	4.2	0.03	6	
2	-1	-1	0	0	30	100	1.6	2.2	0.03	8	
3	1	-1	0	1	30	120	6.9	4.3	0.03	6	
4	0	-1	1	0.5	30	120	8.1	4.7	0.1	0	
5	-1	0	1	0	90	80	2.2	3.7	0.06	16	
6	1	0	-1	1	80	80	11.2	6.0	0.04	8	
7	0	0	0	0.5	80	100	8.3	5.2	0.04	6	
8	0	0	0	0.5	90	100	9.5	4.1	0.04	6	
9	0	0	0	0.5	90	100	9.1	5.6	0.1	8	
10	-1	0	1	0	90	120	3.2	3.3	0.08	10	
11	1	0	1	1	90	120	9.8	5.8	0.03	6	
12	0	1	-1	0.5	150	80	8.1	5.1	0.05	6	
13	-1	1	0	0	150	100	3.0	3.8	0.05	8	
14	1	1	0	1	150	100	10.5	5.5	0.04	8	
15	0	1	1	0.5	150	120	7.7	4.5	0.02	6	
16	0	0	1	0.5	90	120	8.6	4.2	0.04	4	

X_1 es la concentración de ácido codificada. X_2 es el tiempo de hidrólisis codificado y X_3 es la temperatura codificada. Y_1 es la concentración de fructosa tras la hidrólisis. Y_2 es la concentración de glucosa tras la hidrólisis. Y_3 es la concentración de furfural tras la hidrólisis y Y_4 es la concentración de oligómeros de la inulina después de la hidrólisis.

Figura 1. Modelo de producción de fructosa a partir de *Agave americana* utilizando ácido fosfórico (0, 0.5 y 1%)

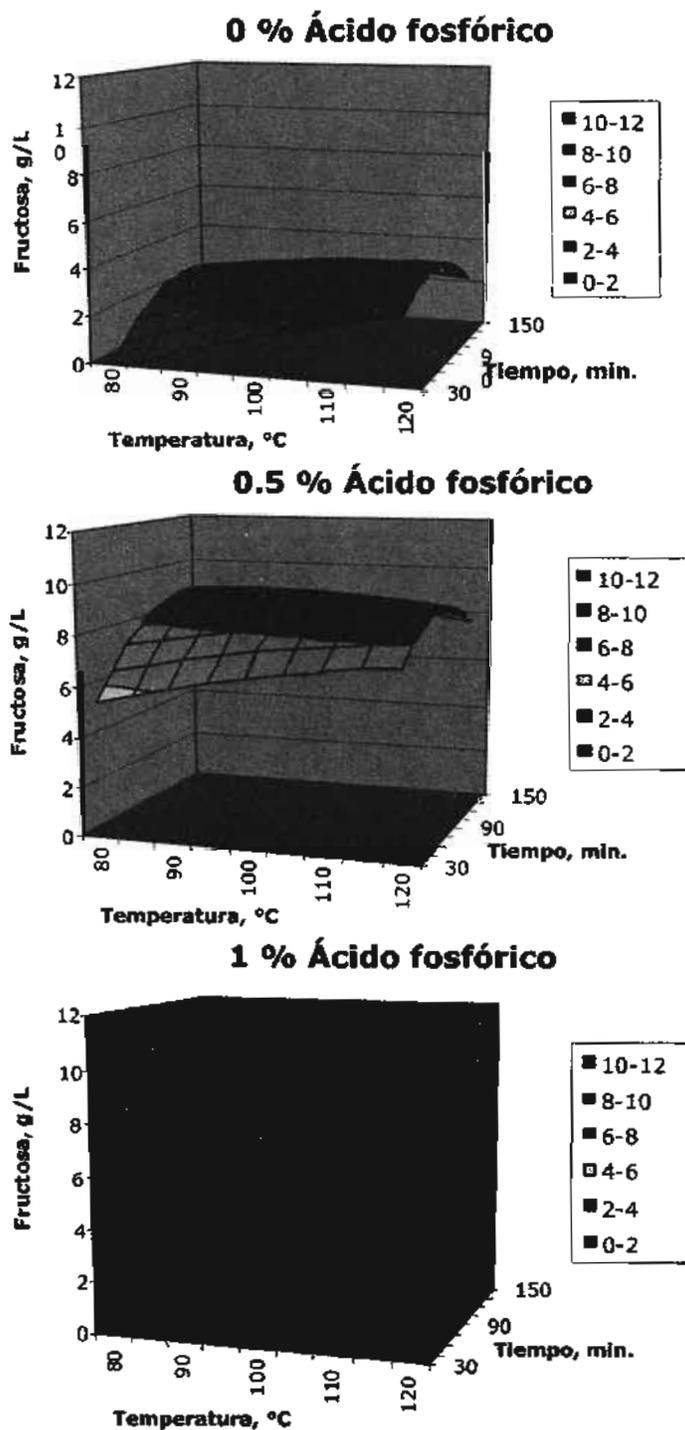


Figura 2. Producción de glucosa a partir de *Agave americana* utilizando ácido fosfórico (0, 0.5 y 1%)

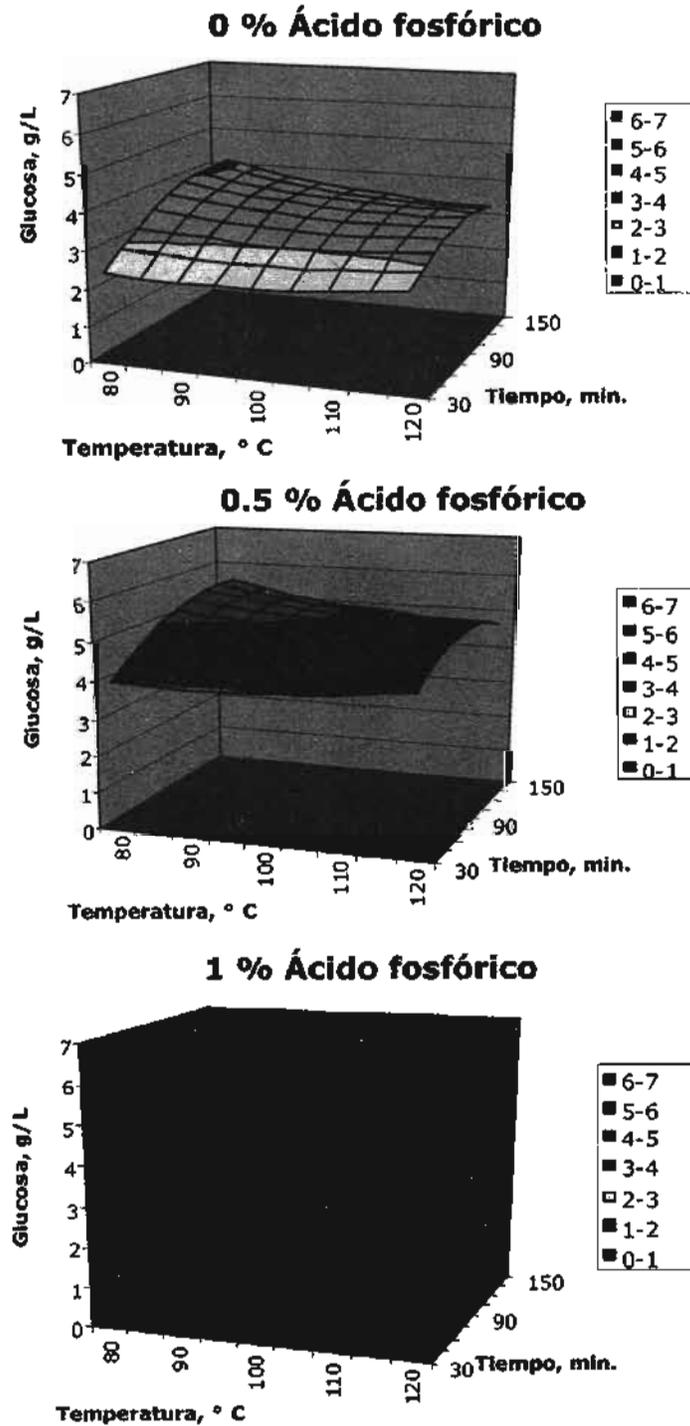


Figura 3. Producción de furfural a partir de *Agave americana* utilizando ácido fosfórico (0, 0.5, 1 %)

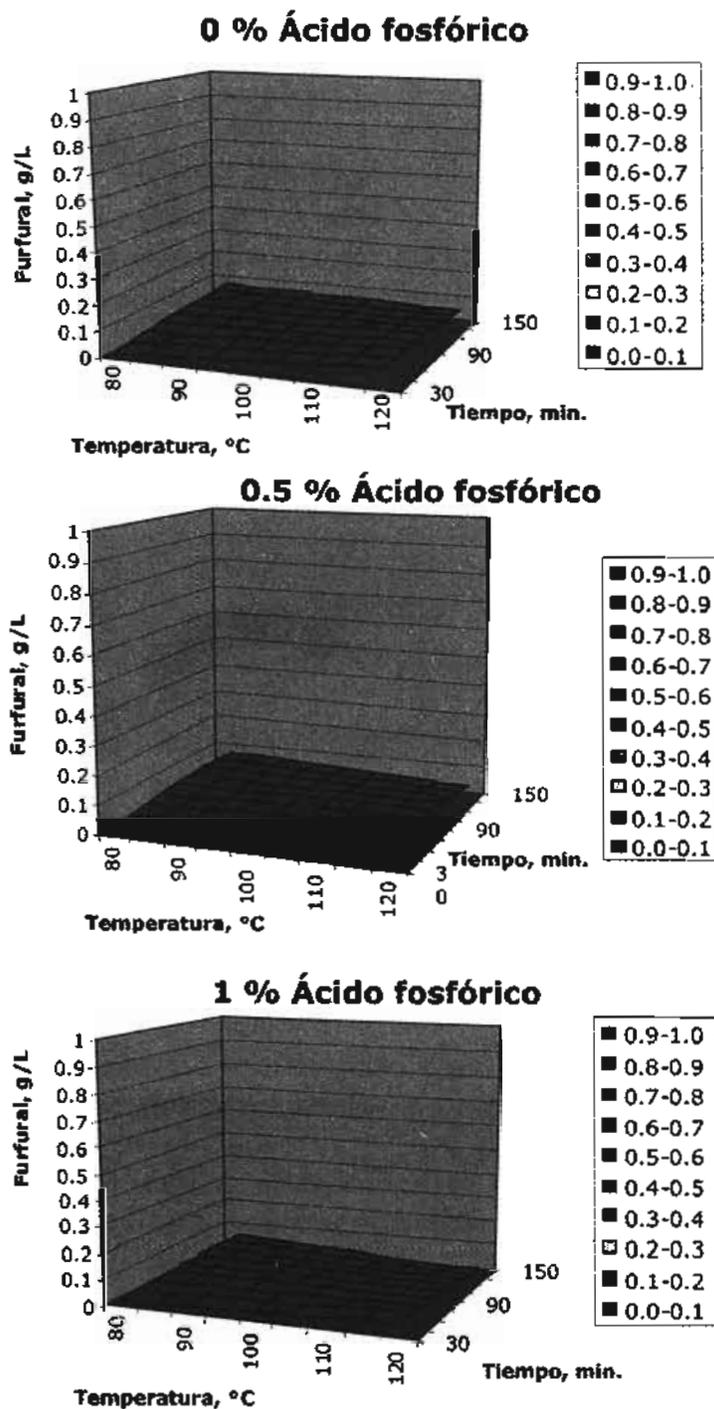
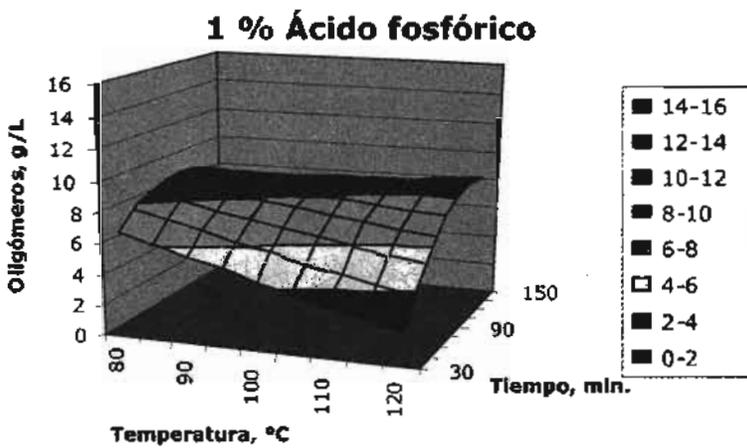
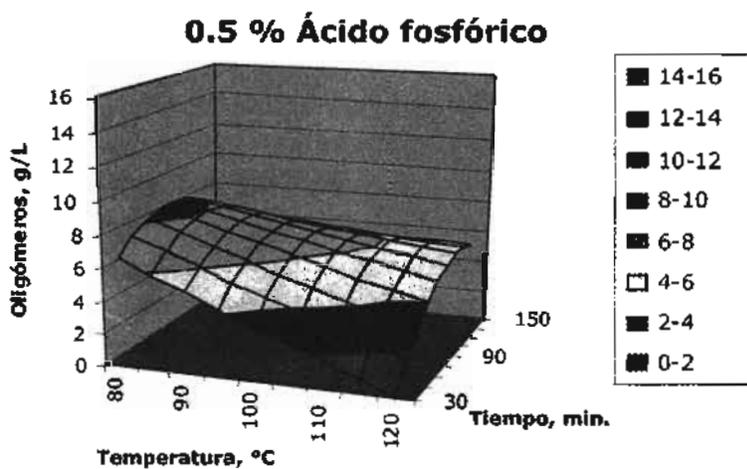
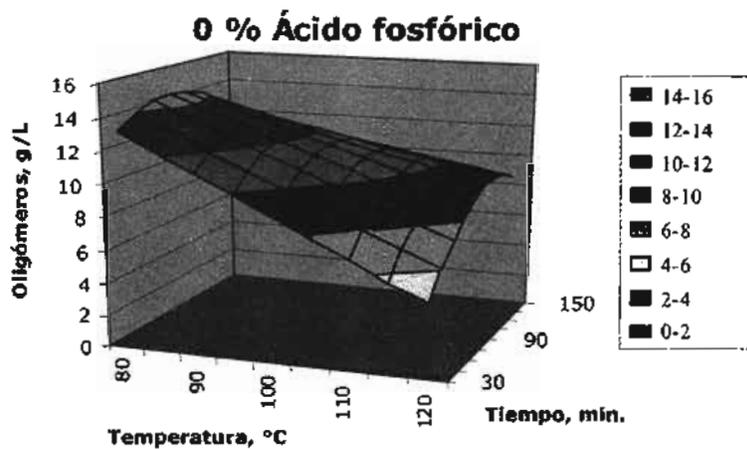


Figura 4. Producción de oligómeros de la inulina a partir de *Agave americana* utilizando ácido fosfórico (0, 0.5 y 1%)



Conclusiones

La hidrólisis ácida de la inulina del *Agave americana*, con ácido fosfórico, da lugar a soluciones ricas en monosacáridos (principalmente fructosa y glucosa), oligómeros de la inulina y furfural.

Estas soluciones se pueden utilizar como mostos para procesos fermentativos, ya sea en la industria alimentaria, mediante la producción de aditivos alimentarios, o en la producción de bebidas alcohólicas (principalmente mezcal).

Para la obtención de estos mostos con alto contenido de fructosa (11.2 g/L) se usaron soluciones ácidas a bajas concentraciones en tiempos cortos, reduciendo así el tiempo y la energía de proceso.

Bibliografía

- Badui, S. (1993), *Química de los Alimentos*, México, Alhambra Mexicana, pp. 116-117, 538.
- Franck, A.; De Leenheer, I. (2000), *Inulin*, Tienen Orafiti, Bélgica, Wiley Publishing.
- García Mendoza, A. (1998), *Con sabor a maguey: Guía de la colección nacional de agaváceas y nolináceas del jardín botánico*, México, Instituto de Biología, UNAM.
- Jacques-Hernández, C. (2002), *Estudio de factibilidad ecosistémica y justificación socioeconómica para el cultivo de agave mezcalero en el Estado de Tamaulipas*, México, Reporte de programa de estudio apoyado por la coordinación General de Posgrado e Investigación del Instituto Politécnico Nacional.
- Mancilla Margall, N.A.; Lopez, M.G. (2002), "Generation of maillard compounds from inulin during the thermal processing of Agave tequilana Weber Var. azul", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 806-812.
- Mathews, C.K.; Van Holde, K.E. (1995), *Biochemistry*, The Benjamín Cummings Publishing Company, 9: 278-290.
- Morales Carrillo, N.; Esparza Frausto, G. (2001), *Guía para el manejo de plantaciones de maguey mezcalero*.
- Murray, R.K.; Granner D.K.; Mayes, P.A, Rodwell, V.W. (2001), *Bioquímica de Harper*, Editorial Manual Moderno, pp. 182.
- Niness, Kathy R. (1999), "Inulin and Oligofructose: What are they?", *American Society for Nutritional Science, J. Nutr.*, 129: 1402s-406s.
- Taper, H.S.; Roberfroid, M. (1999), "Influence of inulin and oligofructose on breast cancer and tumor growth", *American Society for Nutritional Sciences*, 0022-3166/99, 1488-1491s.

Producción de astaxantina por microorganismos crecidos en residuos agropecuarios lignocelulósicos

Astaxanthin Production by Microorganism Grown on Lignocellulosic Farming Wastes

*Vázquez Vázquez, M.**

Resumen

Los residuos agropecuarios lignocelulósicos pueden ser utilizados como materia prima para la obtención de disoluciones de azúcares fermentables. En procesos fermentativos controlados podemos obtener aditivos alimentarios con alto valor añadido a partir de estos residuos. Uno de ellos es la astaxantina. En esta revisión se analizan sus propiedades, características, funciones biológicas y aplicaciones, así como los microorganismos productores. Se hace especial mención a la levadura *Phaffia rhodozyma* actualmente llamada *Xanthophyllomyces dendrorhous*, principal levadura productora de astaxantina. Se revisan sus características y condiciones de fermentación, tanto en medios comerciales como en residuos agropecuarios.

Abstract

The lignocellulosic farming wastes can be used as raw material for the production of fermentable sugar solutions. In controlled fermentable processes it is possible to obtain food additives with high added value from these wastes. One of these additives is the astaxanthin. In this review, its properties, characteristics, biological functions, applications and microbiological producers are analyzed. Special mention is done to

* Área de Tecnología de los Alimentos, Departamento de Química Analítica, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo, 27002- Lugo (España).
e-mail: vazquezm@lugo.usc.es

the yeast *Phaffia rhodozyma* actually called *Xanthophyllomyces dendrorhous*, which is the main yeast producer of astaxanthin. Its characteristics and fermentation conditions in both commercial broth and farming wastes are also revised.

Introducción

Los carotenoides son pigmentos naturales. Se han identificado más de 600 carotenoides, aunque menos de un centenar tienen aplicaciones como aditivos en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Schroeder y Johnson, 1995). La tabla I muestra los principales carotenoides usados como pigmentos en alimentación animal y humana.

Dentro de los carotenoides, destaca el papel de la astaxantina (3,3' dihidroxi- β,β -caroteno-4,4' - diona), un compuesto ampliamente distribuido en la naturaleza, que se encuentra en animales acuáticos como salmones, truchas y crustáceos, así como en huevos, carne y piel de las aves de corral; este compuesto les proporciona un color agradable que aumenta su atractivo para el consumidor (Johnson y An, 1991; Tangerås y Slinde, 1994).

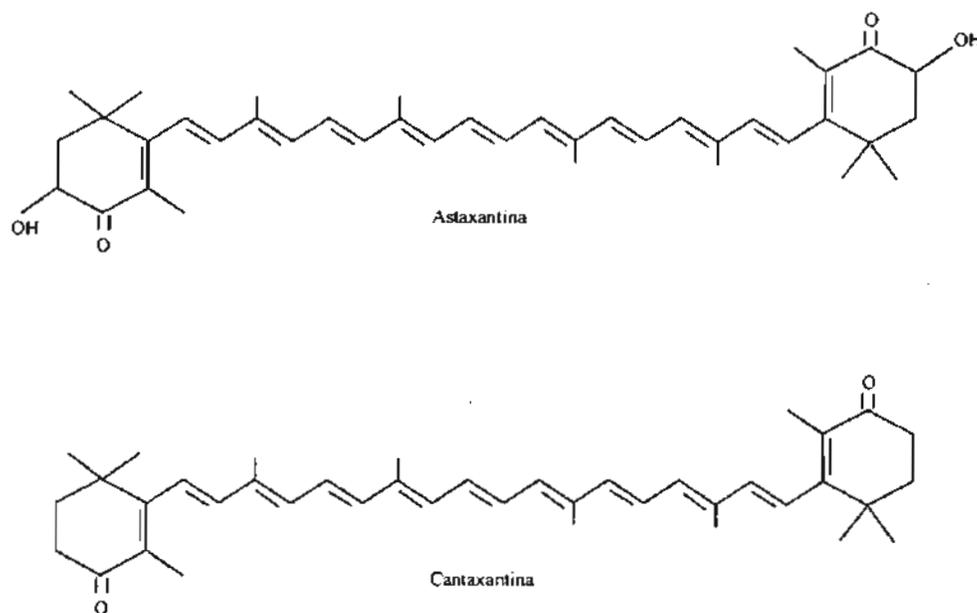
Tabla 1. Carotenoides usados como aditivos alimentarios y su fuente

<i>Carotenoides</i>	<i>Fuente</i>
α -caroteno	Aceite de zanahoria
β -caroteno	Aceite de zanahoria, extracto de tomate, pimiento, azafrán, <i>Blakeslea trispora</i> , <i>Dunaliella salina</i> , síntesis química
Esteres de luteína	Piel de naranja
Luteína	Maíz, harina de alfalfa, aceite de palma
Licopeno	Extracto de tomate
Zeaxantina	Maíz, harina de alfalfa, azafrán
Criptoxantina	Pimiento, harina de alfalfa
Violaxantina	Harina de alfalfa
Neoxantina	Harina de alfalfa
HDCO	<i>Phaffia rhodozyma</i>
Astaxantina	<i>Phaffia rhodozyma</i> , <i>Haematococcus sp.</i> , síntesis química
Cantaxantina	Síntesis química
β -Apo-8'-carotenal	Síntesis química
Esteres β -Apo-8'-carotenoicos	Síntesis química

Los peces y las aves de corral son incapaces de sintetizar astaxantina, por lo que ésta debe ser aportada en la alimentación (An *et al.*, 1991). Dado el gran aumento que está experimentando la cría en cautividad de los peces y aves citados anteriormente, las expectativas de mercado para los carotenoides son muy favorables. Especialmente, el marcado ascenso que ha registrado en los últimos años la producción de salmón por técnicas de acuicultura ha determinado, a su vez, la gran demanda de carotenoides (Tangerås y Slinde, 1994). En el mismo sentido, cabe resaltar que las previsiones de crecimiento del mercado que se han formulado para la próxima década son muy optimistas. Por esto, estimamos el valor del mercado para la astaxantina en unos 1000 millones de dólares para el año 2010.

Al comienzo de los años ochenta, el principal carotenoide incluido en los piensos para salmones era la cantaxantina (β,β -caroten-4,4'-diona) de origen sintético. Estudios posteriores demostraron que la astaxantina resultaba preferible, al depositarse más eficientemente en la carne de salmones y truchas (Torrissen *et al.*, 1989). Así, en piensos para salmones son necesarios aproximadamente 40 mg de cantaxantina/Kg de pienso, mientras que usando astaxantina como pigmento, son necesarios solamente 20 mg de astaxantina/Kg de pienso (Schroeder y Johnson, 1995). La figura 1 muestra las estructuras químicas de ambos compuestos, observando las leves diferencias entre ambas moléculas.

Figura 1. Estructura química de la astaxantina y cantaxantina



La astaxantina es el carotenoide que se encuentra de forma natural en los salmónidos (Torrissen *et al.*, 1989), en concentraciones entre 3 y 37 mg/Kg de carne, destacando por su alto valor de mercado la astaxantina comercial, obtenida por vía química, cuyo precio de mercado es superior a \$2000 kg. Su repercusión sobre el coste final de piensos para salmones es del orden de 10-15% del valor de mercado de éstos (Johnson y An, 1991).

En comparación con la síntesis química de aditivos y colorantes alimentarios, los procedimientos biotecnológicos presentan la ventaja de favorecer la producción de compuestos que pueden ser considerados como *naturales*, mejor aceptados por los consumidores, aunque obviamente la estructura química sea idéntica en ambos casos.

Otros dos factores que priman el interés de los procesos biotecnológicos para la producción de astaxantina son el elevado coste de los carotenoides producidos por vía química y la prevención de los productores, consumidores y autoridades sanitarias respecto a introducir en la cadena alimentaria preparados alimenticios que contienen compuestos obtenidos por síntesis química, ya que en ellos pueden aparecer isómeros con configuraciones no naturales o intermedios de reacción. Finalmente, cabe resaltar que los carotenoides de origen sintético se absorben peor que los de origen biotecnológico cuando se integran con otros componentes biológicos en formulaciones de piensos (Fang y Cheng, 1993).

Estructura y propiedades

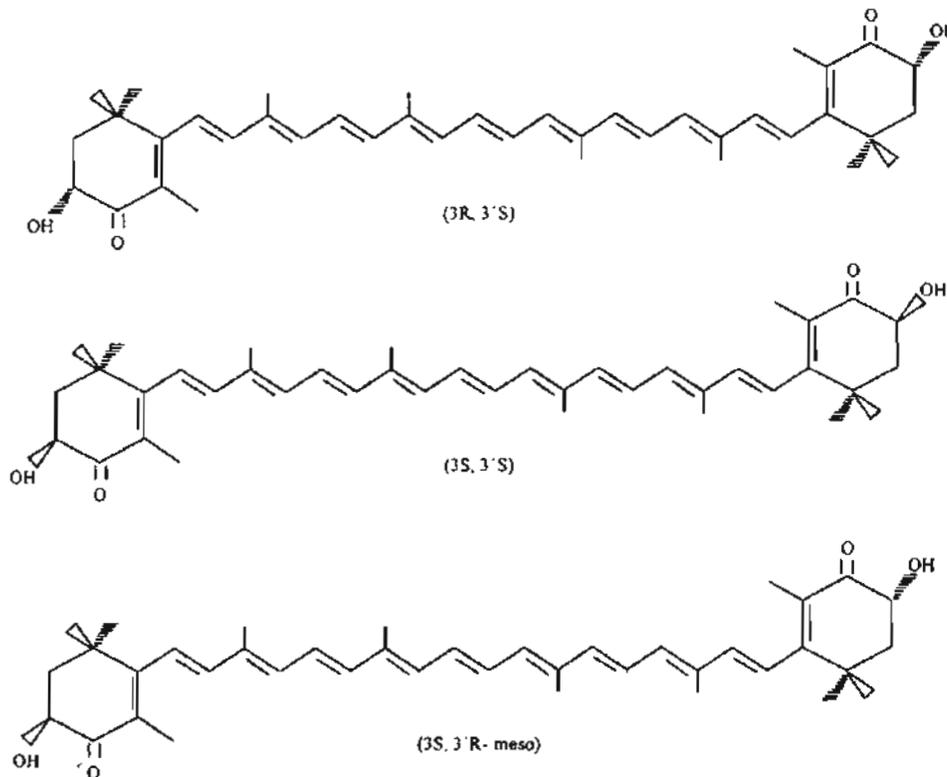
La astaxantina es un oxicarotenoide con fórmula $C_{40}H_{52}O_4$ y peso molecular 596.86. Su punto de fusión es 224 °C, es insoluble en agua y soluble en disolventes apolares. La astaxantina cristalina tiene aspecto de polvo fino, color violeta oscuro. Su espectro de absorción tiene un máximo de 489 nm en cloroformo, 480 en acetona, 478 en etanol y 476 en hexano. La astaxantina puede aparecer en la naturaleza de forma libre, como complejo carotenoide-proteína o en forma esterificada.

Tiene dos carbonos asimétricos en las posiciones 3 y 3', por lo que posee 3 estereoisómeros (véase figura 2). De ellos, el (3S,3'S) es el más abundante en la naturaleza, mientras que el (3R,3'R) es el que se encuentra predominantemente (92%) en la levadura roja *Phaffia rhodozyma*, microorganismo que se ha propuesto para la producción biotecnológica de astaxantina (aspecto que se desarrolla en apartados siguientes). La forma (3R,3'R) también se ha encontrado en la naturaleza, específicamente en el *krill* antártico, *Euphansia superba* (Maoka *et al.*, 1985).

La astaxantina posee una cadena de enlaces conjugados, por lo que también tiene isomería *cis-trans*. Mayoritariamente se encuentran todos los dobles enlaces de la

cadena conjugada en la forma *trans*, pero se han detectado los isómeros 9-*cis* y 13-*cis*. En los primeros estudios se consideró que las moléculas de astaxantina con isómeros *cis* eran originadas durante los procesos de extracción y análisis de la astaxantina. Estudios posteriores concluyeron que los isómeros *cis* eran productos biosintetizados por la *Phaffia* (Andrewes *et al.*, 1976).

Figura 2. Estereoisómeros de la astaxantina



La síntesis química de la astaxantina se obtuvo por primera vez en Suiza por investigadores de la multinacional Hoffmann-LaRoche. En 1967 consiguieron la síntesis de la astaxantina a partir de cantaxantina, a través de la formación de compuestos intermedios como astaceno, pero el rendimiento del proceso no pasó de 20%. Hasta 1978 se publicó la primera síntesis completa de la astaxantina con unos rendimientos comerciales, ésta se llamó síntesis Kienzle/Mayer y partía de β -ionona (Kienzle y Mayer, 1978). Variaciones de este proceso se practican actualmente a escala industrial (Bernhard, 1990).

Funciones biológicas

La función biológica principal de los carotenoides consiste en actuar como pigmentos fotorreceptores para llevar a cabo la fotosíntesis, aprovechando radiaciones de longitudes de onda que no son absorbidas por las clorofilas.

A diferencia de muchos carotenoides, la astaxantina no actúa como precursora de vitamina A en las células animales (Jyonouchi *et al.*, 1995). Su actividad más significativa se basa en el poder antioxidante que le confieren el tamaño y reactividad del sistema de dobles enlaces conjugados de su molécula, que actúan atrapando radicales libres. Este efecto le permite impedir la oxidación de otros compuestos presentes en el medio, como lípidos, además de evitar daños en las membranas celulares y en el ADN (Schroeder y Johnson, 1995). Además, esta propiedad también le confiere unas características importantes dentro de la tecnología de los alimentos: por ejemplo, la astaxantina protege del enranciamiento al músculo de salmón, mientras que carnes análogas carentes de astaxantina (como la de la trucha arcoiris) son sensibles al enranciamiento (Andersen *et al.*, 1990).

La astaxantina comienza a adquirir cierta importancia en medicina. Con base en las ideas anteriores, se ha postulado que la astaxantina podría impedir la carcinogénesis gracias a su capacidad de inhibir la peroxidación de los lípidos de las membranas biológicas, pues se ha comprobado la actividad antitumoral de este compuesto en fibrosarcomas de células de ratones (Bendich, 1990). También se observó un efecto positivo como agente preventivo de enfermedades cardiovasculares y degenerativas, además del efecto potenciador de la longevidad (Schroeder y Johnson, 1995).

Por último, recientes estudios *in vitro* muestran que la astaxantina incrementa las defensas del organismo al favorecer la producción de inmunoglobulinas (Jyonouchi *et al.*, 1995) lo que ha abierto un nuevo campo de aplicación para la astaxantina.

Aplicaciones de la astaxantina

La astaxantina se emplea en todo el mundo (particularmente en Canadá y los países nórdicos) como componente de piensos para salmones criados en piscifactorías. Se utiliza en raciones que contienen entre 20 y 75 mg de astaxantina/Kg de pienso.

Sigurgisladottir *et al.* (1994) establecieron que los consumidores prefieren salmones con color producido por astaxantina al producido por otros carotenoides, y encontraron que la astaxantina afecta tanto a la textura como al gusto del salmón, sin alterar la composición de lípidos ni el perfil de ácidos grasos. Este hecho repercute de

modo significativo en el coste de los piensos. Sin embargo, el sobrecoste derivado de introducir astaxantina en los piensos se compensa ampliamente porque los consumidores asocian el color del pescado a su calidad y frescura, por lo que un mejor color se traduce en un mayor valor de mercado (Tangerås y Slinde, 1994).

La astaxantina se ha empleado también como componente de los piensos para truchas arcoiris, habiéndose observado para ella una deposición sobre la carne más eficaz que la determinada para otros carotenoides (Bjerkeng *et al.*, 1990). También se ha comprobado que la astaxantina o sus precursores juegan un importante papel en la formación de los aromas en el salmón horneado (Fang y Cheng, 1993).

Otra aplicación de la astaxantina es su utilización en piensos de aves de corral, particularmente, en la pigmentación de la yema de los huevos. En este campo, con base en sondeos de opinión realizados por la International Egg Commission y por la Egg Farmers of Victoria, en Europa occidental y Australia, se ha indicado que las tonalidades más deseables de las yemas no pueden conseguirse suplementando los piensos exclusivamente con pigmentos amarillos, por lo que resulta imprescindible incorporar adicionalmente carotenoides rojos (Papa *et al.*, 1985; Dike *et al.*, 1992).

Johnson *et al.* (1980a) estudiaron la utilización de astaxantina de origen biotecnológico como componente de piensos para gallinas y codornices, determinando su efecto sobre la pigmentación de los huevos. Los resultados demuestran que con este procedimiento puede obtenerse un amplio intervalo de coloraciones de las yemas, en función de la concentración de astaxantina empleada y de su combinación con otros componentes de los piensos. En un estudio relacionado con el anterior, Dike *et al.* (1992) evaluaron la viabilidad de la astaxantina para pigmentar yemas de huevos, comparando su capacidad para este fin con la de *Carophyll red 10*, un compuesto comercial de cantaxantina (el carotenoide sintético comercial más utilizado). Los resultados de este estudio demostraron que el color de las yemas de huevos de gallinas alimentadas con pienso que contenía astaxantina, se ajustaba más a las características deseadas por los consumidores que otras formulaciones alternativas.

Producción biotecnológica de astaxantina

La astaxantina puede obtenerse de distintos microorganismos que son capaces de sintetizarla. Se ha encontrado astaxantina en bacterias como *Agrobacterium aurantiacum* (Yokoyama *et al.*, 1994), *Mycobacterium lacticola* y *Brevibacterium spp.* (Simpson *et al.*, 1981); en varias algas verdes como *Haematococcus spp.* (Bubrick, 1991), *Neochloris wimmeri* y *Chlamydomonas nivalis* (Schroeder y Johnson, 1995); en hongos como *Peniophora spp.* (Goodwin, 1980) y en levadu-

ras como *Xanthophyllomyces dendrorhous*, microorganismo anteriormente conocido como *Phaffia rhodozyma* (Johnson y Lewis, 1979).

En Japón se ha aislado la bacteria marina *Agrobacterium aurantiacum*, que produce hasta 89.7 µg/L de astaxantina (Yokoyama *et al.*, 1994). Aunque la concentración de astaxantina es baja, posteriores estudios de optimización podrían hacer viable la utilización comercial de esta bacteria. Las otras bacterias conocidas por contener astaxantina, *Mycobacterium lacticola* y *brevibacterium spp*, también tienen productividades demasiado bajas para hacer factible el desarrollo de procesos industriales (Nelis y Leenher, 1991).

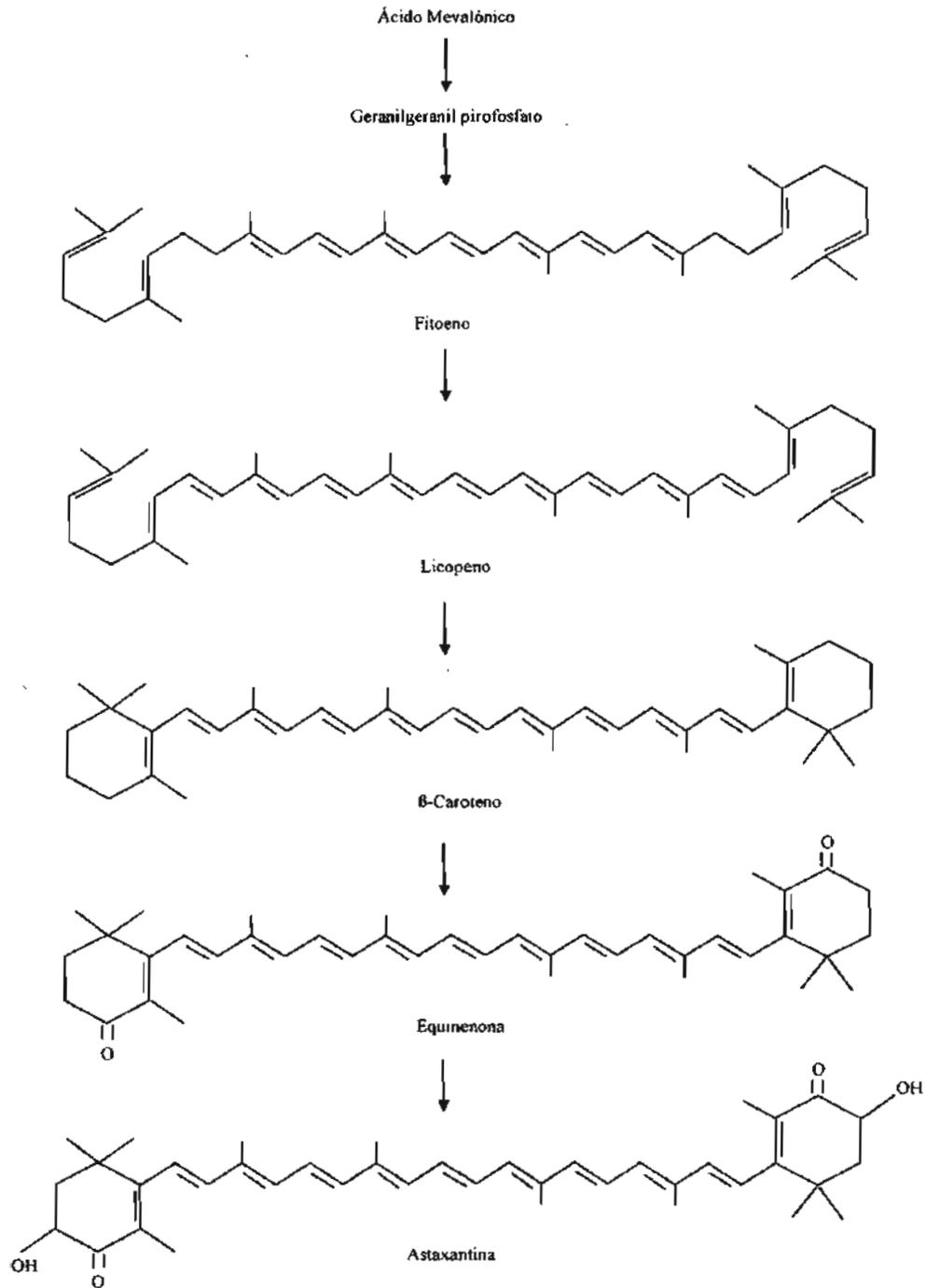
El alga *Haematococcus pluvialis* produce carotenoides, de los cuales entre 85 y 95% corresponden a astaxantina, alcanzándose una concentración en el medio de fermentación de hasta 8 mg de astaxantina/L (Bubrick, 1991; Tjahjono *et al.*, 1994). La acumulación de astaxantina en esta alga se incrementa bajo limitación de nitrógeno, sulfato y fosfato, así como en presencia de inhibidores del crecimiento, mientras que la carotenogénesis se estimula en presencia de especies dadoras de oxígeno (como H₂O₂, radicales peróxido o radicales hidroxilo) y bajo iluminación continua con luz azul de intensidad moderada (Kobayashi *et al.*, 1992a y b; Tjahjono *et al.* 1994). La producción comercial de astaxantina a partir de este alga se ha hecho en Estados Unidos, pero cuenta con dos problemas fundamentales: la contaminación con algas externas y la posible actuación de depredadores, que pueden eliminar 90% de la biomasa del alga en 72 horas (Bubrik, 1991).

Andrewes *et al.* (1976) establecieron la presencia de astaxantina en la levadura roja *Phaffia rhodozyma*, que desde entonces ha sido ampliamente estudiada. Por su favorable contenido en astaxantina, *Phaffia rhodozyma* es la fuente microbiana más prometedora para la producción de este compuesto, particularmente en aplicaciones destinadas a la acuicultura (Fang y Cheng, 1993). A continuación se desarrollan los aspectos más relevantes que condicionan su utilización práctica.

Características de la levadura Phaffia rhodozyma (actualmente llamada Xanthophyllomyces dendrorhous)

El género *Phaffia* se caracteriza por su capacidad para asimilar una gran variedad de fuentes de carbono, incluyendo D-glucosa, maltosa, sacarosa, celobiosa, xilosa, arabinosa y lactosa (Johnson y An, 1991; Fang y Cheng, 1993). La astaxantina es un metabolito secundario de *Phaffia rhodozyma*, que se sintetiza por la ruta metabólica, mostrada de forma simplificada en la figura 3 (Andrewes *et al.*, 1976; Girad *et al.*,

Figura 3. Ruta metabólica propuesta para la producción de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*



1994; Calo *et al.*, 1995). Se puede diferenciar de otras levaduras productoras de carotenoides porque no asimila inositol ni nitratos, no forma micelios ni tiene estados sexuales. En la tabla 2 se comparan estas características de la *Phaffia* con las de otras levaduras productoras de carotenoides (Davenport, 1990).

Según la cepa de *Phaffia* utilizada, la producción de astaxantina aparece asociada al crecimiento (Johnson y Lewis, 1979; Meyer y Du Preez, 1994a) o no asociada al mismo (Fang y Cheng, 1993). En cultivos discontinuos (*batch*), la acumulación de astaxantina se produce tanto durante la fase de crecimiento exponencial como durante la fase estacionaria, aunque en este último caso a menor velocidad.

La concentración volumétrica de pigmentos permanece casi constante durante la fase estacionaria y se observa un incremento del contenido en astaxantina de la biomasa celular debido a una disminución de ésta (Meyer *et al.*, 1994b). Sin embargo, el leve descenso de la biomasa no se debe a autólisis celular, pues en el medio no se encuentra astaxantina.

Variables significativas en la producción de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*

El tipo y concentración de la fuente de carbono tienen un efecto importante sobre la producción de astaxantina. Empleando glucosa como fuente de carbono, se encontró

Tabla 2. Un método simple de identificación de levaduras productoras de carotenoides

<i>Levadura</i>	<i>Inositol</i>	<i>Glucosa</i>	<i>Nitratos</i>	<i>Micelios</i>	<i>Estados sexuales</i>
<i>Phaffia</i>	-	+	-	-	-
<i>Cryptococcus</i>	+	-	x	-	-
<i>Rhodotorula</i>	-	-	x	+	-
<i>Rhodospiridium</i>	-	-	x	+	+
<i>Sporobolomyces</i>	x	-	x	-	-
<i>Sporidiobolus</i>	x	-	+	+	+

+ = Asimila/fermenta/produce/tiene en todas las especies.

- = No asimila/fermenta/produce/tiene en todas las especies.

x = Asimila/fermenta/produce/tiene en algunas especies.

que se favorecía la concentración de astaxantina en las células operando con concentraciones bajas de sustrato. Así, con disoluciones de 10 g de glucosa/L, se obtuvieron 1082 mg de astaxantina/kg de biomasa; mientras que con 50 g de glucosa/L se llegó sólo a 770 mg de astaxantina/kg de biomasa (Meyer y Du Preez, 1994a). Este efecto se conoce como *crabtree* y se debe a que a altas concentraciones de azúcares metabolizables en condiciones totalmente aeróbicas disminuyen el rendimiento en biomasa y forman productos de fermentación aeróbica, como ácido acético o etanol (Reynders *et al.*, 1997).

La celobiosa es una fuente de carbono muy favorable para la producción de astaxantina (Johnson y Lewis, 1979; An *et al.*, 1989). Fang y Cheng (1993) han observado que la celobiosa sólo puede ser utilizada aeróbicamente por el ciclo del ácido tricarboxílico, y que su asimilación estimula la producción de astaxantina. Algunos autores encontraron que la D-xilosa y L-arabinosa son los azúcares que producen menos astaxantina entre los estudiados (Fang y Cheng, 1993; Johnson y Lewis, 1979; Okagbue y Lewis, 1983; Meyer *et al.*, 1993a). Sin embargo, otros estudios demostraron que en determinadas condiciones la xilosa es la fuente de carbono que permite obtener una mayor concentración de astaxantina, llegando hasta 5 mg/L de astaxantina con una concentración másica de 571 mg de astaxantina/kg (Parajó *et al.*, 1998).

La tabla 3 muestra algunos datos representativos correspondientes a las concentraciones de astaxantina obtenidas en ensayos realizados en medios que contienen diferentes fuentes de carbono de origen comercial.

El tipo de la fuente de nitrógeno también tiene un efecto importante sobre la producción de astaxantina. Los pocos estudios realizados indican que una limitación de nitrógeno en el medio de cultivo disminuye la síntesis de astaxantina. La fuente de nitrógeno no sólo afecta a la pigmentación, también afecta al crecimiento de la *Phaffia*. Se han estudiado fuentes de nitrógeno orgánicas, e inorgánicas en mezclas con orgánicas. Se encontró que utilizando una sola fuente de nitrógeno orgánica, la mayor pigmentación se consigue usando peptona (Fang y Cheng, 1993).

Entre las fuentes inorgánicas de nitrógeno destaca el KNO_3 , que a concentraciones de 0.2 g/L permite obtener mayores cantidades de astaxantina (Parajó *et al.*, 1998). Se comprobó que la *Phaffia* no puede asimilar nitratos, por lo que el efecto del KNO_3 es, cuando menos, llamativo. Se cree que el efecto positivo de esta sal se debe a interacciones con la pared celular. Ciertos aminoácidos como leucina y valina estimulan la carotenogénesis en hongos por medio de su conversión a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, pero este efecto no se ha observado en *Phaffia* (Johnson y An, 1991).

Tabla 3. Datos sobre el contenido en astaxantina de células de *Phaffia rhodozyma* cultivadas en distintas fuentes de carbono sintéticas

Fuente de carbono	Concentración fuente de carbono (g/L)	Concentración volumétrica de astaxantina (mg/L)	Concentración másica de astaxantina (mg/g levadura)	Referencias bibliográficas
Glucosa	4-60	1.30-10.12	325-1633	Johnson y Lewis, 1979; Haard, 1988; An <i>et al.</i> , 1989; Fang y Cheng, 1993; Meyer <i>et al.</i> , 1993a; Meyer y Du Preez, 1993b; Meyer y Du Preez, 1994a y 1994d.
Celobiosa	4-51	0.22-4.10	270-1812	Johnson y Lewis, 1979; Okagbue y Lewis, 1983; An <i>et al.</i> , 1989; Fang y Cheng, 1993.
Maltosa	4-15	1.03-5.33	512-1317	Johnson y Lewis, 1979; Fang y Cheng, 1993.
Sacarosa	4-49	1.40-8.4	508-1690	Johnson y Lewis, 1979; Okagbue y Lewis, 1983; Haard, 1988; Fang y Cheng, 1993; Meyer y Du Preez, 1994c.
Xilosa	4-15	0-1.48	0-819	Johnson y Lewis, 1979; Okagbue y Lewis, 1983; Fang y Cheng, 1993.
Arabinosa	4-15	1.25-9.30	1.4-1014	Johnson y Lewis, 1979; Okagbue y Lewis, 1983; Fang y Cheng, 1993.
Lactosa	10	2.34	1072	Fang y Cheng, 1993.
Mezclas sintéticas glucosa-fructosa	50-51	2.8-29	150-1060	Meyer y Du Preez, 1994c.
Xilosa	20	5	570	Parajó <i>et al.</i> , 1998.

La temperatura es una variable de operación controlante en la producción de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*. La temperatura óptima de crecimiento varía en función del sustrato y de la cepa de levadura empleada (particularmente, si ésta proviene de mutagénesis). Utilizando glucosa como fuente de carbono, se ha determinado una velocidad máxima de crecimiento específico de 0.2 h^{-1} a $22 \text{ }^\circ\text{C}$. La máxima temperatura a la que se observó crecimiento fue $27 \text{ }^\circ\text{C}$, encontrándose que por encima de $22 \text{ }^\circ\text{C}$ disminuye la producción de astaxantina (Johnson y An, 1991).

Martín *et al.* (1993) encontraron que la temperatura óptima de fermentación era 18°C para cepas de *Phaffia* cultivadas sobre turba. Fang y Cheng (1993) han conseguido medios fermentativos conteniendo 9.28 mg de astaxantina/L, empleando células procedentes de mutaciones que tienen una temperatura óptima de crecimiento de 15°C y que no producen astaxantina por encima de 20°C.

La relativamente baja temperatura óptima para la producción de astaxantina constituye un importante problema para su escalado a nivel industrial. Durante la fermentación se libera calor que eleva la temperatura del fermentador por encima del óptimo para la producción de astaxantina e incluso para el crecimiento, por lo que es necesario un sistema de refrigeración. Esto puede elevar de forma importante el coste de la producción de astaxantina.

El pH tiene un efecto moderado sobre la producción de astaxantina, dependiendo del sustrato utilizado. El valor óptimo del pH inicial se sitúa en 5 para sustratos sintéticos (Meyer *et al.*, 1993a; Fang y Cheng, 1993; Meyer y Du Preez, 1994d), pero en 7-7.19 para medios fermentativos obtenidos a partir de hidrolizados de turba (Martin *et al.*, 1992 y 1993; Vázquez y Martin, 1998). Además, el pH afecta tanto a la velocidad específica máxima de crecimiento como al rendimiento en biomasa.

La concentración de oxígeno disuelto es un factor importante en la producción biotecnológica de astaxantina; dado que la síntesis de este compuesto se produce en presencia de O₂, elevados porcentajes de saturación de oxígeno en el medio permiten optimizar la producción (Tangerås y Slinde, 1994). Reynders *et al.* (1997) demostraron que en la *Phaffia* el catabolismo de la glucosa transcurría principalmente por la vía de la fermentación aeróbica, remarcando el importante papel de la presencia de O₂.

Meyer y Du Preez (1994d) estudiaron el efecto inductivo de la radiación luminosa sobre la síntesis de astaxantina en cepas mutantes de *Phaffia rhodozyma*. En este estudio concluyeron que se obtiene una concentración celular de astaxantina máxima cuando el biorreactor se ilumina continuamente con luz azul de intensidad moderada durante la fase exponencial del crecimiento. Otros autores también han observado el efecto estimulante de la luz (An y Johnson, 1990). Teniendo en cuenta que la astaxantina tiene capacidad para proteger las membranas biológicas de la acción de radicales libres, y que la presencia de éstos es favorecido por la luz ultravioleta, la acumulación de astaxantina puede entenderse como un mecanismo de protección del microorganismo (Adrio *et al.*, 1993; Schroeder y Johnson, 1995). Otros estudios comprobaron que la luz no sólo tiene efecto sobre la cantidad de astaxantina producida, sino que también afecta al perfil de carotenoides globales obtenido, provocando que en algunas cepas, en ausencia de luz, se deje de producir totalmente astaxantina y se

obtengan otros carotenoides, o solamente uno como el HDCCO (Vázquez y Santos, 1998; Vázquez, 2001).

Se han realizado estudios (Okagbue y Lewis, 1984a) para determinar el efecto inhibitorio de las saponinas (compuestos tensioactivos constituidos por una cadena glicosídica unida a un grupo esteroide o triterpenoide) sobre la proliferación de *Phaffia rhodozyma*. La importancia de este tipo de compuestos radica en su amplia distribución en la biomasa vegetal, por lo que pueden aparecer en medios fermentativos no sintéticos formulados con base en azúcares. Incluso a bajas concentraciones (del orden del 0.075%), las saponinas pueden inhibir tanto el crecimiento de la levadura como la producción de astaxantina. La toxicidad de las saponinas se ha atribuido al efecto adverso que ejercen sobre la permeabilidad de las membranas biológicas (Bangham y Horne, 1962) y a la interferencia en la síntesis de ácidos grasos insaturados y esteroides que contribuyen a la estabilidad y actividad biológica de la membrana de la levadura (Okagbue y Lewis, 1984a).

En el mismo sentido, se ha considerado el efecto que ejercen diversos monoterpenos sobre la producción de astaxantina por una cepa mutante de *Phaffia rhodozyma* con alta producción de astaxantina (Meyer *et al.*, 1994e). Se encontró que sólo el β -pineno (en concentración de 500 μ L/L) incrementa levemente la producción de astaxantina (desde 1554 a 1883 μ g/g); mientras que otros monoterpenos (como limoneno, piperitona, geraniol o linalol) disminuían la producción de astaxantina, independientemente de su concentración (Meyer *et al.*, 1994e).

Dado que el ácido acético es un precursor directo de la acetil-CoA, se cree que su presencia en el medio podría favorecer la síntesis de astaxantina. Estudios llevados a cabo con el fin de evaluar esta posibilidad demostraron que el ácido acético no tiene ningún efecto positivo para la producción de astaxantina, y que una concentración de este compuesto superior a 2 g/L inhibe completamente el crecimiento (Meyer y Du Preez, 1993b).

Calo *et al.* (1995) sostienen que la suplementación de los medios de cultivo con 0.01% de ácido mevalónico (ácido 3,5-dihidroxi-3-metilpentanoico), un precursor biosintético de la astaxantina (véase figura 4), permite multiplicar por un factor de 4 la concentración de astaxantina en células de *Phaffia*, pasándose de 180 a 760 mg/g de biomasa.

En los últimos años se han empleado cepas mutantes de *Phaffia rhodozyma*, que presentan una mejor capacidad que las originales para producir astaxantina. Adrio *et al.* (1993) emplearon con este fin agentes mutagénicos como el N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) y el etilmetanosulfonato (EMS). Con EMS se han conseguido mutantes 50% más productivos (An *et al.* 1989; Girard *et al.* 1994); mientras los mutantes obtenidos con NTG destacan por su mayor estabilidad (An *et al.*, 1989).

Fang y Cheng (1993) emplearon células mutadas con NTG para conseguir medios de cultivo con 8.6 mg de astaxantina/L. Con el mismo agente mutagénico, Meyer *et al.* (1993a) obtuvieron una cepa que permite alcanzar 10.12 mg de astaxantina/L. An (1997) ha propuesto un método para la identificación de las cepas hiperproductoras basado en el efecto conjunto de la luz, toluidina azul y bajas temperaturas (2°C); así se consigue que las colonias hiperproductoras destaquen sobre las demás.

De cara a la producción comercial de astaxantina, se hace necesario determinar el efecto de las mutaciones en el genoma de la levadura, lo que requiere establecer su secuenciación genética. Estudios demuestran el polimorfismo existente en las cadenas de ARN de la *Phaffia*, identificando cepas con 2, 3 y hasta 4 tipos de ARN de doble cadena. De forma sorprendente también se detectaron partículas icosaédricas, como las de los virus (Pfeiffer *et al.*, 1996). Por medio de técnicas de electroforesis se ha estimado el tamaño del ADN de la *Phaffia* entre 0.48 y 3.1 Mb (Adrio *et al.*, 1995).

Meyer *et al.* (1994b) han aplicado la técnica *Randomly Amplified Polymorphic DNAs* (o RAPDS), derivada de la reacción de polimerasa en cadena (PCR), que presenta ventajas frente a otras técnicas de detección de variaciones en la secuencia genética al no requerir uso de radioactividad y poder trabajar con cantidades de muestra más pequeñas. Chun *et al.* (1992) estudiaron la fusión protoplasmática en *Phaffia rhodozyma*. De 30 híbridos generados a partir de auxótrofos previamente aislados, obtuvieron tres que producían cantidades elevadas de astaxantina (2000 mg/Kg). Estos tres híbridos tenían un solo núcleo, indicando una correcta fusión nuclear; eran estables y contenían de dos a tres veces más ADN que las células madre.

Recuperación de la astaxantina de la biomasa celular

La astaxantina se acumula en el interior de la levadura *Phaffia rhodozyma*, por lo que es necesario romper la membrana celular como paso previo a la recuperación del pigmento por extracción con un disolvente orgánico. A nivel analítico, se ha desarrollado un método químico para la extracción de la astaxantina que utiliza dimetilsulfóxido (DMSO) en caliente (Sedmark *et al.*, 1990).

Okagbue y Lewis (1984c) han explorado la autólisis de *Phaffia* con el fin de liberar la astaxantina de la biomasa celular. El proceso que proponen consta de una primera etapa, en que se favorece la degradación de la pared celular por medio de enzimas de la propia levadura, seguida de otra, donde las células se someten a un shock osmótico manteniéndolas en el seno de agua destilada. Para un posible escalado a nivel industrial se han propuesto métodos mecánicos, como el empleo de válvulas

de homogenización. Con esta tecnología, operando a presiones entre 80 y 100 MPa, se consigue una liberación de astaxantina entre 75 y 90% (Tangerås y Slinde, 1994).

Con el mismo fin se han propuesto procedimientos enzimáticos. Johnson *et al.* (1978), y Okagbue y Lewis (1985) estudiaron cultivos mixtos de *Phaffia rhodozyma* y *Bacillus circulans*, basándose en que esta bacteria produce enzimas exocelulares capaces de romper la membrana de la levadura, con lo que astaxantina puede extraerse directamente (hasta 91.5%) con acetona.

Phaffia rhodozyma tratada con *Bacillus circulans* se ha utilizado directamente como alimento para truchas arcoiris. Se aprovecha de este modo la astaxantina producida y los nutrientes de la *Phaffia* (véase tabla 4). En los estudios realizados, el proceso de pigmentación fue más rápido, pero el crecimiento de las truchas fue más lento que cuando se utilizó como alimento *Phaffia rhodozyma* tratada mecánicamente. Se cree que este efecto se debe a que la bacteria *Bacillus circulans* consume nutrientes importantes para los salmones (Johnson *et al.*, 1980b). Alternativamente, pueden utilizarse enzimas comerciales (conteniendo actividad β -(1-3)-glucanasa) para romper la pared de las células de las levaduras (Gentles y Haard, 1990; Sorum y Robertsen, 1991; Tangerås y Slinde, 1994).

Tabla 4. Composición aproximada de la levadura *Phaffia rhodozyma**

	Contenido (%)
Carbohidratos totales	40.3-32.0
Proteína	30.1-49.0
Lípidos totales	17.0-13.0
Cenizas	5.6-5.0
Astaxantina	0.06-0.04

* Fuente: Johnson *et al.*, 1980b; Vázquez y Martín, 1997.

Sustratos no refinados utilizados en la producción de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*

Desde un punto de vista práctico, resulta más interesante la utilización de medios fermentativos procedentes del tratamiento de materias primas brutas, en comparación con los medios que contienen azúcares puros. Así que se han empleado para el cultivo de *Phaffia* medios hechos con fuentes de carbono no refinadas, procedentes

de biomasa vegetal o desechos industriales. Los residuos agrícolas derivados de material vegetal permiten obtener por diversos medios disoluciones de azúcares adecuados para su fermentación por esta levadura. La tabla 5 muestra los sustratos no refinados utilizados para el cultivo de *Phaffia* y las concentraciones de astaxantina obtenidas.

Se observan mejores resultados que al utilizar fuentes de carbono sintéticos (tabla 4). Las condiciones óptimas de producción dependen del origen del medio fermentativo: por ejemplo, la síntesis de astaxantina está inhibida en medios sintéticos con más de 40 g de glucosa/L (Johnson y Lewis, 1979); pero no se encuentra inhibición al crecer sobre melazas que contienen 100 g de azúcar/L, en las que llegan a obtenerse hasta 1086 mg de astaxantina/Kg de biomasa (Haard, 1988). En medios fermentativos generados con hidrolizados de turba, se obtienen hasta 1567 mg de astaxantina/Kg

Tabla 5. Sustratos no refinados utilizados para la producción de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*

<i>Sustrato</i>	<i>Cepa de Phaffia</i>	<i>Carotenoides, mg/L</i>	<i>Astaxantina, mg/L</i>	<i>Referencia</i>
Mosto blanco	Mutante N9	9.6-24.9	4.2-14.0	Meyer <i>et al.</i> , 1994b.
Mosto rojo	Mutante N9	7.9-24.9	2.0-13.8	Meyer <i>et al.</i> , 1994b.
Jugo de caña de azúcar	ATCC 24202	—	6.0-7.0	Fontana <i>et al.</i> , 1996a, 1996b.
Hidrolizado de turba	ATCC 24202	—	2.67-7.25	Martin <i>et al.</i> , 1993a, 1993b; Acheampong y Martin, 1995; Vázquez y Martin, 1997, 1998.
Residuo de la fermentación alcohólica del almidón de maíz	NRRL Y-17270 Mutante JB2	— 9.5	1.0-2.1 —	Hayman <i>et al.</i> , 1995. Bon <i>et al.</i> , 1997.
Gluten de maíz procesado	NRRL Y-17270	—	0.1-1.5	Hayman <i>et al.</i> , 1995.
Sólidos del procesado de maíz	NRRL Y-17270	—	0.6-2.4	Hayman <i>et al.</i> , 1995.
Melazas	Mutante UCT-1N-3693	5.46	0.8-15.3	Reynders <i>et al.</i> , 1996; Haard, 1988.
Melazas			0.8-15.3	
Hidrolizados de madera de <i>Eucalyptus globulus</i>	NRRL Y-17268	33.5	30.5	Vázquez <i>et al.</i> , 1998.

biomasa, a partir de una concentración de carbohidratos totales de 15 g/L (Martin *et al.*, 1993). Sin embargo, en experimentos de proliferación de *Phaffia rhodozyma* en medios generados con jugo residual de alfalfa, la producción de astaxantina aparece inhibida a concentraciones de sustrato mayores del 12.5 g/L (Okagbue y Lewis, 1984b).

Meyer y Du Preez (1994c) han realizado estudios sobre la producción de astaxantina utilizando medios fermentativos sintéticos compuestos por mezclas de glucosa y fructosa, en concentraciones y proporciones relativas similares a las encontradas en mostos de uva; y han comparado los datos con los obtenidos sobre medios fermentativos fabricados con este tipo de mostos. En condiciones de operación seleccionadas (22°C, pH=6, 5 días de fermentación, velocidad de agitación 150 rpm), utilizando mostos como sustrato, se aumenta la producción de biomasa y se disminuye la producción de astaxantina respecto de los medios sintéticos con base en mezclas de glucosa y fructosa. La suplementación de los mostos con extracto de levadura, peptona y extracto de malta favorece la acumulación de astaxantina, pasando de 2.8 a 13.3 mg/L de astaxantina al suplementar un mosto diluido (con 7.4 g/L de glucosa y 6.3 g/L de fructosa). La producción de astaxantina es desfavorecida tanto por altas concentraciones de azúcares como por la limitación de oxígeno en el medio.

La fracción hemicelulósica de los residuos lignocelulósicos agropecuarios contiene xilosa. Después de un proceso de hidrólisis podemos obtener disoluciones de xilosa a partir de estos residuos. Los estudios realizados utilizando madera de eucalipto mostraron la viabilidad de este proceso para la producción de astaxantina por la levadura *Phaffia rhodozyma*. En fermentaciones *fed-bacht* se lograron obtener hasta 30 mg de astaxantina/L (Vázquez *et al.*, 1998).

Estudios realizados recientemente en la Universidad Autónoma de Tamaulipas, en Reynosa, México, muestran que la paja de sorgo y el bagazo de la caña de azúcar son residuos que se pueden utilizar para la generación de disoluciones de azúcares con características adecuadas para su uso como medios de cultivo para la obtención de aditivos alimentarios por fermentación (Bustos *et al.*, 2003; Herrera *et al.*, 2003). Estudios posteriores permitirán determinar la viabilidad de su uso para la obtención de astaxantina.

Bibliografía

- Acheampong, E.A.; Martin, A.M. (1995), "Kinetic studies on the yeast *Phaffia rhodozyma*", *J. Basic Microbiol.*, 35: 147-155.

- Adrio, J.L.; López, M.; Casqueiro, J.; Fernández, C.; Veiga, M. (1995), "Electrophoretic karyotype of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*", *Curr. Genet.*, 27: 447-450.
- _____; Veiga, M.; Casqueiro, J.; López, M.; Fernández, C. (1993), "Isolation of *Phaffia rhodozyma* auxotrophic mutants by enrichment methods", *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 39: 303-312.
- An, G.H. (1997), "Photosensitization of the yeast *Phaffia rhodozyma* at low temperature for screening carotenoid hyperproducing mutants", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 66: 263-268.
- _____; Bielich, J.; Auerbach, R.; Johnson, E.A. (1991), "Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting", *Bio/technology*, 9: 70-73.
- _____; Johnson, E.A. (1990), "Influence of the light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*", *Antonie Van Leeuwenhoek*, 57: 191-203.
- _____; Schuman, D.B.; Johnson, E.A. (1989), "Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content", *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 116-124.
- Andersen, N.H.; Bertelsen, N.G.; Christophersen, A.G.; Ohlen, N.A.; Skibsted, L.H. (1990), "Development of rancidity in salmonoids steaks during retail display. A comparison of practical storage life of wild salmon and farmed trout", *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 191: 119-122.
- Andrewes, A.G.; Phaff, H.J.; Starr, M.P. (1976), "Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast", *PhytoChemistry*, 15: 1003-1007.
- Bangham, A.D.; Horne, R.W. (1962), "Action of saponin on biological cell membranes", *Nature*, 196: 952-953.
- Bendich, A. (1990), "Carotenoids and the immune system", en *Carotenoids: Chemistry and biology*, Nueva York, Plenum Press.
- Bernhard, K. (1990), "Synthetic astaxanthin. The route of a carotenoid from research to commercialisation", en *Carotenoids: Chemistry and Biology*, Nueva York, Plenum Press.
- Bjerkeng, B.; Storebakken, T.; Liaaen-Jensen, S. (1990), "Response to carotenoids by rainbow trout in the sea: resorption and metabolism of dietary astaxanthin and canthaxanthin", *Aquaculture*, 91: 153-162.
- Bubrik, P. (1991), "Production of asthaxantin from *Haematococcus*", *Biores. Technol.*, 38: 237-239.
- Bustos, G.; Ramírez, J.A.; Garrote, G.; Vázquez, M. (2003), "Modeling of the hydrolysis of sugar cane bagasse with hydrochloric acid", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 104(1): 51-68.

- Calo, P.; De Miguel, T.; Velázquez, J.B.; Villa, T.G. (1995), "Mevalonic acid increases *trans*-asthaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*", *Biotechnol. Lett.*, 17: 575-578.
- Chun, S.B.; Chin, J.E.; Bai, S.; An, G.H. (1992), *FEMS Microbiol. Lett.*, 93: 221-225.
- Davenport, R.R. (1990), "An introduction to yeast and yeast-like organism", en Skinner, F.A.; Passmore, S.M.; Davenport, R.R., *Biology and activity of yeasts*, Symposium Series, 9, RU, S.A.B.
- Dike, A.O.; Lettner, F.; Zollitsch, W. (1992), "The supplementation of layers' feed with the yeast *Phaffia rhodozyma* as pigment carrier", *Archiv fur Geflügelkunde*, 5: 205-210.
- Fang, T.J.; Cheng, Y. (1993), "Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions", *J. Ferment. Bioeng.*, 75: 466-469.
- Fontana, J.D.; Guimaraes, M.F.; Martins, N.T.; Fontana C.A.; Baron, M. (1996a), "Culture of the astaxanthinogenic yeast *Phaffia rhodozyma* in low cost media", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57/58: 413-422.
- _____; Czczuga, B.; Bonfim, T.M.B.; Chociai, M.B.; Oliveira, B.H.; Guimaraes, M.F.; Baron, M. (1996b), "Bioproduction of carotenoids: The comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*", *Bioresource Technology*, 58(2): 121-125.
- Gentles, A.; Haard, N. (1990), "Bioavailability of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*", en *Advances in Fisheries Technology and Biotechnology for Increasing Profitability*. Lancaster, PA, EU, Technomic Publishing C.
- _____; Haard, N. (1991), "Pigmentation of rainbow trout with enzyme-treated and spray-dried *Phaffia rhodozyma*", *The Progressive Fish Culturist*, 53: 1-6.
- Girad, P.; Falconnier, B.; Bricout, J.; Vladescu, B. (1994), "β-Carotene producing mutants of *Phaffia rhodozyma*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41: 183-191.
- Goodwin, T.W. (1980), *The biochemistry of the carotenoids*, 2a. ed. Londres, Chapman and Hall.
- Haard, N.F. (1988), "Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses", *Biotechnol. Lett.*, 10: 609-614.
- Hayman G.T.; Mannarelli, B.M.; Leathers, T.D. (1995), "Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* grown on media composed of corn wet-milling co-products", *J. Industrial Microbiol.*, 14: 389-395.
- Herrera, A.; Téllez-Luis, S.J.; Ramírez, J.A.; Vázquez, M. (2003), "Production of xylose from sorghum straw using hydrochloric acid", *Journal of Cereal Science*, 37(3): 267-274.

- Johnson, E.A.; An, G. (1991), "Astaxanthin from microbial Sources", *Crit. Rev. Biotechnol.*, 11: 297-326.
- ; Lewis, M.J. (1979), "Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*", *J. Gen. Microbiol.*, 115: 173-183.
- ; Lewis, M.J.; Grau, C.R. (1980a), "Pigmentation of egg yolks with astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*", *Poultry Sci.*, 59: 1777-1782.
- ; Villa, T.G.; Lewis, M.J. (1980b), "*Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets", *Aquaculture*, 20: 123-134.
- ; Villa, T.G.; Lewis, M.J.; Phaff, H. J. (1978), "Simple method for the isolation de astaxanthin from the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 35: 1155-1159.
- Jyonouchi, H.; Sun, S.; Gross, M. (1995), "Effect of carotenoids on *in vitro* immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells", *Nutr. Cancer*, 23: 171-183.
- Kienzle, F.; Mayer, H. (1978), "Synthese von optisch aktiven, natürlichen Carotinoiden und strukturell verwandten Naturprodukten. II. Synthese von (3S, 3'S)-Astaxanthin", *Hev. Chim., Acta* 61: 2609-2618.
- Kobayashi, M.; Kakizono, T.; Nishio, N.; Nagai, S. (1992b), "Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*", *J. Ferment. Bioeng.*, 74: 61-63.
- ; Kakizono, T.; Yamaguchi, K.; Nishio, N.; Nagai, S. (1992a), "Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions", *J. Ferment. Bioeng.*, 74: 17-20.
- Maoka, T.; Katsuyama, M.; Kaneko, N.; Matsuno, T. (1985), "Stereochemical investigation of carotenoids in the antarctic krill *Euphasia superba*", *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 51: 1671-1679.
- Martín, A.M.; Acheampong, E.; Patel, T.R. (1993), "Production of astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* using peat hydrolysates as substrate", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 58: 223-230.
- ; Acheampong, E.; Patel, T.R.; Chornet E. (1993b), "Study of growth parameters of *Phaffia rhodozyma* cultivated in peat hydrolysates", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 37: 235-241.
- ; Acheampong, E.; Patel, T.R.; Chornet E. (1992), "Study of growth parameters for *Phaffia rhodozyma* cultivated in peat hydrolysates", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 37: 235-241.
- Meyer, P.S.; Du Preez, J.C. (1993b), "Effect of acetic acid on astaxanthin production", *Biotechnol. Lett.*, 15: 919-924.

- Meyer, P.S.; Du Preez, J.C. (1994a), "Effect of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40: 780-785.
- ; Du Preez, J.C. (1994c), "Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grapejuice", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 10: 178-183.
- ; Du Preez, J.C. (1994d), "Photo-regulated astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants", *System. Appl. Microbiol.*, 17: 24-31.
- ; Du Preez, J.C.; Van Dyk, M.S. (1994e) "The effect of monoterpenes on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma*", *Biotechnol. Lett.*, 16: 125-128.
- ; Du Preez, J.C.; Kilian, S.G. (1993a), "Selection and evaluation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 9: 514-520.
- ; Wingfield B.D.; Du Preez J.C. (1994b), "Genetic analysis of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* using RAPDS", *Biotechnol. Techniq.*, 8: 1-6.
- Nelis, H.J.; De Leenheer, A.P. (1991), "Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds", *J. Appl. Bacteriol.*, 70: 181-191.
- Okagbue, R.N.; Lewis M.J. (1983), "Mixed culture of *Bacillus circulans* wl-12 and *Phaffia rhodozyma* on different carbon sources: yeast-wall lytic enzyme production and extractability of astaxanthin", *Biotechnol. Lett.*, 5: 731-736.
- Okagbue, R.N.; Lewis M.J. (1984b), "Use of alfalfa residual juice as a substrate for propagation of the red yeast *Phaffia rhodozyma*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 33-39.
- ; Lewis, M.J. (1984a), "Inhibition of the red yeast *Phaffia rhodozyma* by saponin", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 278-280.
- ; Lewis, M.J. (1984c), "Autolysis of the red yeast *Phaffia rhodozyma*: a potential to facilitate extraction of astaxanthin", *Biotechnol. Lett.*, 6: 247-250.
- ; Lewis, M.J. (1985), "Influence of mixed culture conditions on yeast-wall hydrolytic activity of *Bacillus circulans* WL-12 and on extractability of astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*", *J. Appl. Bacteriol.*, 59: 243-255.
- Papa, C.M.; Fletcher, D.L.; Halloran, H.R. (1985), "Utilization and yolk colouring capability of xanthophylls from synthetic and high xanthophyll concentrates", *Poultry Sci.*, 64: 1464-1469.
- Parajó, J.C.; Santos, V.; Vázquez, M. (1998), "Optimisation of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose", *Process Biochemistry.*, 33: 181-187.

- Pfeiffer, I.; Kucsera, J.; Varga, J.; Parducz, A.; Ferenczy, L. (1996), "Variability and inheritance of double-stranded RNA viruses in *Phaffia rhodozyma*", *Current Genetics*, 30: 294-297.
- Reynders, M.B.; Rawlings, D.E.; Harrison, S.T.L. (1997), "Demonstration of the crabtree effect in *Phaffia rhodozyma* during continuous and fed-batch cultivation", *Biotechnol. Lett.*, 19: 549-552.
- Schroeder, W.A.; Johnson, E.A. (1995), "Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage", *J. Ind. Microbiol.*, 14: 502-507.
- Sedmark, J.J.; Weerasinghe, D.K.; Jolly, S.O. (1990), "Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*", *Biotechnol. Techniq.*, 4: 107-112.
- Sigurgisladottir, S.; Parrish, C.C.; Lall, S.P.; Ackman, R.G. (1994), "Effects of feeding natural tocopherols and astaxanthin on Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillet quality", *Food Res. Int.*, 27: 23-32.
- Simpson, K.L.; Katamaya, T. y Chichester, C.O. (1981), "Carotenoids from microorganisms", en Bauernfeld, J.C. (ed.), *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors*, Londres, Academic Press, pág. 463.
- Sorum, U.; Robertsen, B. (1991), "Lysis of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma* by lytic enzymes from the fungus *Trichoderma harzianum*", 27th Wintermeeting of the Norwegian Biochemical Society, Storefjell, Noruega.
- Tangerås, A.; Slinde, E. (1994), "Coloring of salmonids in aquaculture: the yeast *Phaffia rhodozyma* as a source of astaxanthin", en *Fisheries Processing: Biotechnological applications*, Londres, Chapman & Hall.
- Tjahjono, A.E.; Hayama, Y.; Kakizono, T.; Terada, Y.; Nishio, N.; Shiro, N. (1994), "Hyper-acumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures", *Biotechnol. Lett.*, 16: 133-138.
- Torrissen, O.J.; Hardy, R.W.; Shearer, K.D. (1989), "Pigmentation of salmonids-carotenoid deposition and metabolism in salmonids", *Crit. Rev. Aquatic Sci.*, 1: 209-220.
- Vázquez, M.; Martín, A.M. (1998), "Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology", *Biotechnol. Bioeng.*, 57: 314-320.
- _____; Martín, A.M. (1998), "Mathematical model for *Phaffia rhodozyma* growth using peat hydrolysates as substrate", *J. Sci. Food Agric.*, 76: 481-487.
- _____; Santos, V. (1998), "3-Hydroxy-3',4'-Didehydro- β -y-Caroten-4-One (HDCO) from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) cultivated on xylose media", *Biotechnology Letters*, 20: 181-182.
- _____. (2001), "Effect of the light on carotenoid profiles of *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains (formerly *Phaffia rhodozyma*)", *Food Technology and Biotechnology*, 39: 121-126.

- Vázquez, M.; Santos, V.; Parajó, J.C. (1998), "Fed-Batch cultures of *Phaffia rhodozyma* in xylose-containing media made from wood hydrolysates", *Food Biotechnology*, 12: 43-55.
- Yokoyama, A.; Izumida, H.; Miki, W. (1994), "Production of astaxanthin and 4-ketozeaxanthin by the marine bacterium, *Agrobacterium aurantiacum*", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58: 1842-1844.

Producción de transglutaminasa por *Streptovercillium ladakanum* NRRL-3191 desarrollado en medios hechos de hidrolizados de paja de sorgo

Transglutaminase Production by *Streptovercillium ladakanum* NRRL-3191 Growing on Media Made from Hydrolysates of Sorghum Straw

Téllez Luis, S. J.^{1}; Ramírez de León, J.A.¹; Vázquez Vázquez, M.^{1,2}*

Resumen

La transglutaminasa microbiana (TM) es un enzima extracelular producido por varios microorganismos, entre ellos *Streptovercillium ladakanum*. Este enzima difiere de los de mamíferos, peces y otros animales vertebrados debido a que es independiente de calcio lo que aumenta el interés en esta enzima de la industria alimentaria. El objetivo de este trabajo fue explicar la factibilidad de la producción biotecnológica de transglutaminasa a partir del microorganismo *S. ladakanum* NRRL-3191 en medios nutritivos de hidrolizados de paja de sorgo. La actividad de la transglutaminasa fue determinada en medios de fermentación en hidrolizados de paja de sorgo y en xilosa comercial, con 10, 20, o 30 g/L de xilosa inicial por un procedimiento calorimétrico basado en la formación de hidroxamato de N-carbobenzoxil-L-glutaminilglicina. En los medios con 20g/L de xilosa comercial, la actividad de transglutaminasa fue de

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

² Área de Tecnología de los Alimentos, Departamento de Química Analítica, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo, 27002-Lugo (España).

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

0.282 U/mL a 96 horas. Usando hidrolizado de paja de sorgo, neutralizado y clarificado con 20g/L de xilosa, la actividad de transglutaminasa fue de 0.348 U/mL a 72 horas. Se demostró que los hidrolizados de paja de sorgo son medios convenientes para la producción de transglutaminasa por *S. ladakanum*.

Abstract

The microbial transglutaminase is an extracellular enzyme produced for several microorganisms as *Streptoverticillium ladakanum*. This enzyme differs from mammal, fishes and other vertebrates animals because is independent ion calcium. These properties increase interesting of food industry by enzyme. The aim of this work was to elucidate if the biotechnological production of transglutaminase by *S. ladakanum* NRRL-3191 growing on media made from hydrolysates of sorghum straw is suitable. Transglutaminase activity was determined in fermentations on sorghum straw hydrolysates with 10, 20, 30 g initial xylose/L and commercial xylose as control in the same concentrations. Using media containing 20 g commercial xilose/L, transglutaminase activity up to 0.282 U/ml was obtained at 96 hours. Using neutralized, charcoal-treated hydrolysates of sorghum straw with 20g xylose /L that were sterilized by filtration through membranes of 0.2 mm, up to 0.348 U/mL was obtained in 72 hours. The results showed that hydrolysates of sorghum straw are suitable media for transglutaminase production by *S. ladakanum*.

Introducción

La transglutaminasa microbiana (TM) (EC 2.3.2.13) es un enzima que cataliza una reacción de transferencia de grupos acilo entre grupos α -carboxiamida de residuos glutamil de proteínas. Destacan dos características en el enzima transglutaminasa: es extracelular y es independiente de los iones calcio para su funcionamiento. Estas propiedades aumentan el interés de las industrias alimentarias por la utilización de la transglutaminasa. Se propone usar la TM en procesos industriales para la formación de geles estables térmicamente (Motaki *et al.*, 1987; Nonaka *et al.*, 1989), pues la TM cataliza la formación de enlaces covalentes entre proteínas mejorando la estructura del gel.

La TM se ha empleado para mejorar las propiedades mecánicas y texturales de diferentes proteínas alimentarias, incluyendo productos del surimi o productos de pescado reestructurado (Téllez-Luis *et al.*, 2002b). Este enzima es la responsable del fenómeno del asentamiento en las proteínas del pescado (Ramírez *et al.*, 2000). El medio de fermentación representa aproximadamente 30% del costo para una fermentación microbiana (Miller *et al.*, 1986). El medio de fermentación empleado para

el desarrollo de *Streptoverticillium ladakanum* no es económicamente atractivo debido al costo elevado de los nutrientes, como el extracto de levadura y peptona. La xilosa es un azúcar hemicelulósico que se usa como fuente de carbono y energía para el desarrollo de microorganismos. La conveniencia de usar la xilosa puede incrementarse si el medio de fermentación es preparado a partir de hidrolizados hemicelulósicos de materia prima como la paja de sorgo o bagazo de caña de azúcar (Aguilar *et al.*, 2002; Herrera *et al.*, 2003).

El objetivo de este trabajo fue indagar si es conveniente la producción biotecnológica de transglutaminasa por *Streptoverticillium ladakanum* NRRL-3191 desarrollados en medios hechos a partir de hidrolizados de paja de sorgo.

Materiales y métodos

La paja de sorgo utilizada se obtuvo de una empresa agrícola. La muestra molida se tamizó y se seleccionó un tamaño de partícula menor a 0.5 mm. Posteriormente se secó en una estufa de aire forzado. La muestra deshidratada se almacenó en recipientes de plástico cerrados herméticamente para evitar fluctuaciones de humedad durante la investigación.

La hidrólisis se realizó bajo condiciones selectas (se utilizó ácido sulfúrico en concentraciones de 2%, a 122°C, por 70 min, relación líquido/sólido a 10/1) (Téllez-Luis *et al.*, 2002a). Los hidrolizados se neutralizaron con CaCO₃ (pH=6) formándose CaSO₄ y separándose por filtración.

Los hidrolizados neutralizados con CaCO₃ se mezclaron con carbón activo por 90 minutos a temperatura ambiente usando una relación hidrolizado/carbón a 50/1 (g/g). Los hidrolizados tratados con carbón activo se concentraron por evaporación al vacío para obtener soluciones de xilosa con una concentración de 10-30 g/L.

El microorganismo utilizado en este estudio fue *Streptoverticillium ladakanum*. Los microorganismos fueron mantenidos en agar a 4°C. Los experimentos fueron realizados por 120 horas a 26°C en una cámara de agitación (250 rpm) usando matraces con 50 mL de medio de cultivo. Los medios consistieron en hidrolizados o xilosa comercial con 10, 20 o 30 g/L de xilosa, el cual se suplementó con: 2.5 g/L de extracto de levadura, 10.5 g/L de peptona, 0.5 g/L de MgSO₄, 2 g/L de KH₂PO₄, 5 g/L de Na₂HPO₄ y 20 g/L de caseinato de sodio. Las muestras se retiraron del medio de fermentación a 72, 96, y 120 horas, posteriormente se centrifugaron (4500 x g, 10 min) y el sobrenadante se analizó en HPLC para la determinación de xilosa y ácido acético, usando una columna de intercambio iónico ION 300 transgenomic (temperatura 45°C) con elusión isocrática (velocidad de flujo 0.4 mL/min, fase

movil: 0.005 NH₂SO₄) y un detector de índice de refracción. El sobrenadante se lavó dos veces con una solución de cloruro de sodio en agua desionizada, se centrifugó otra vez, secándose a 102°C por 48 horas a fin de calcular la concentración de biomasa con base en el peso seco.

La actividad de transglutaminasa se midió por un procedimiento calorimétrico basado en la formación de hidroxamato de N-carbobenzoxil-L-glutaminy-glicina (Grossowicz *et al.*, 1950). La unidad de actividad enzimática es definida como la formación de un ímol de monohidroxamato a 37°C por minuto.

Los datos experimentales se realizaron por triplicado. El rendimiento en biomasa y producto se calculó de la siguiente manera:

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

$$Y_{p/s} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$

Donde X es la concentración de biomasa (g/L); X_0 es la concentración de biomasa inicial (g/L); S es la concentración de xilosa (g/L); S_0 es la concentración de xilosa inicial; P es la actividad de transglutaminasa (unidades); P_0 es la actividad de transglutaminasa inicial (unidades), $Y_{x/s}$ coeficiente del rendimiento en biomasa (g/g), y $Y_{p/s}$ coeficiente en rendimiento en producto ((TM/U)/ (consumo de xilosa/g)).

Resultados y discusiones

Se realizó una serie de experimentos tomando en consideración la concentración de hidrolizados de paja de sorgo con xilosa (10, 20 y 30 g/L) con el propósito de estimar la posibilidad de usar hidrolizados de paja de sorgo neutralizados y clarificados como medio nutritivo para el desarrollo de *Streptoverticillium ladakanum* NRRL-3191. En la figura 1 se muestra la idea general del proceso. La composición inicial de hidrolizados fue: xilosa (12.13±0.32) g/L, glucosa (3.27± 0.56) g/L, arabinosa (1.99±0.15) g/L, ácido acético (3.19± 0.28) g/L, la cual varió con la concentración del proceso.

Para propósitos comparativos, se realizaron una serie de experimentos con disoluciones de xilosa comercial. Se observó que el desarrollo de *Streptoverticillium ladakanum* en xilosa comercial fue más rápido que en los hidrolizados. A las 72 horas, se detectaron 4.5 g/L de xilosa en los experimentos realizados con 30 g/L de

xilosa comercial. Usando hidrolizados al mismo tiempo (72 horas) permanecieron 5 g/L de xilosa comercial en experimentos con 10 g/L de xilosa, en un medio con 20 g/L de xilosa inicial se detectaron 8.75 g/L de xilosa, y en un medio con 30 g/L de xilosa comercial permanecieron 9.9 g/L de xilosa. Esto se debe al desarrollo lento causado por la presencia de inhibidores. Los otros azúcares de los hidrolizados (glucosa y arabinosa) se agotaron a las 72 horas.

En la figura 2 se muestran las actividades de la TM obtenidas en los medios con xilosa comercial. Usando 10 g/L de xilosa, se obtuvieron 0.170 U/mL en 72 horas, disminuyendo hasta 0.108 U/mL en 120 horas. Estos resultados contradicen a los obtenidos por Junqua *et al.* (1997), en los que no se detectó actividad de TM usando un medio con 10 g/L de xilosa. La actividad más alta obtenida en un medio con xilosa comercial fue de 0.282 U/mL, usando 20 g/L de xilosa durante 96 horas. Esto se debe a que las células continúan generando el enzima extracelular después del agotamiento completo de la fuente de carbón a las 72 horas.

Se detectó una actividad baja de TM de 0.099 U/mL aumentando el tiempo de fermentación; este hecho se atribuye a la actividad de proteasas. No se mostró aumento en la actividad de TM incrementando la concentración de xilosa (30 g/L). En todos los casos se observó una disminución en la actividad de TM a 120 horas, lo cual se atribuye a la proteólisis presente.

La actividad máxima de TM (0.155 U/mL) se obtuvo usando hidrolizados con 30 g/L de xilosa a 96 horas con un $Y_{p,s}$ de 5 U/g y $Y_{x/p}$ de 0.39 g/g durante la fermentación de *Streptoverticillium ladakanum* en hidrolizados de paja de sorgo esterilizados en autoclave a 121°C (figura 3). En estas condiciones, se obtuvieron 8 U/g y 0.19 g/g en medios sintéticos, sugiriendo que en los hidrolizados el metabolismo celular se orienta más hacia el incremento de la biomasa que hacia el incremento de la TM.

Se observó una actividad de TM más baja en los hidrolizados que en la xilosa comercial; esto puede deberse al rompimiento de los constituyentes de la paja de sorgo provocados por la esterilización en autoclave. Por tanto, se realizó una serie de experimentos usando hidrolizados esterilizados por filtración a través de membranas de 0.2 µm. Los resultados se muestran en la figura 4.

Comparando los resultados de actividad de TM obtenidos en los hidrolizados esterilizados por calentamiento, se observa un aumento en la actividad obtenida en los hidrolizados esterilizados por filtración en todas las fermentaciones. Usando hidrolizados esterilizados por filtración con 20 g/L de xilosa, se obtuvo una actividad de TM de 0.348 U/mL en un tiempo de 72 horas. Esta actividad de TM es más alta que la máxima obtenida usando xilosa comercial (0.282 U/mL), atribuyéndose a posibles inductores de la producción de TM que son degradados por calentamiento.

Figura 1. Diagrama general del proceso

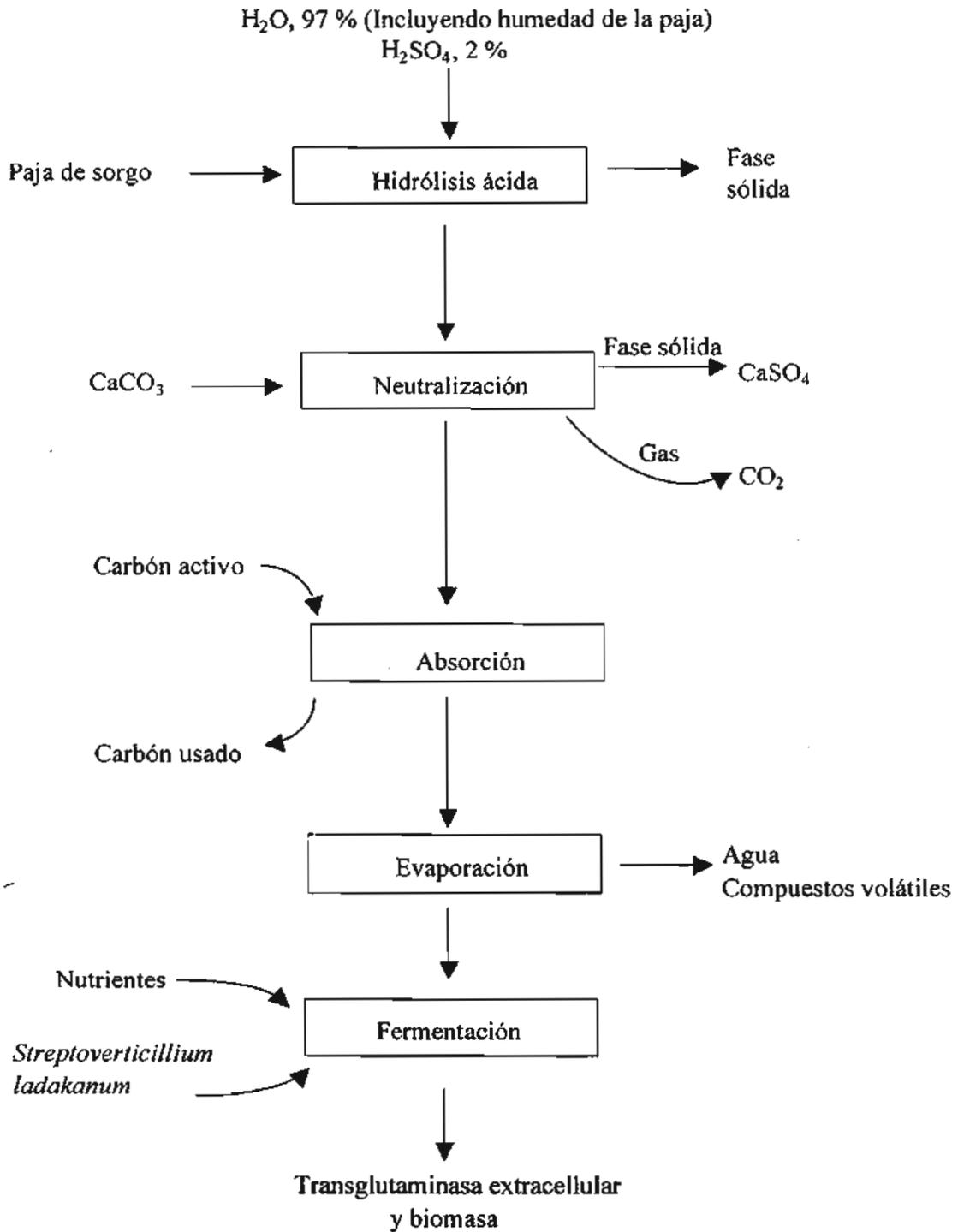


Figura 2. Actividades de transglutaminasa microbiana obtenidas en medios de xilosa comercial

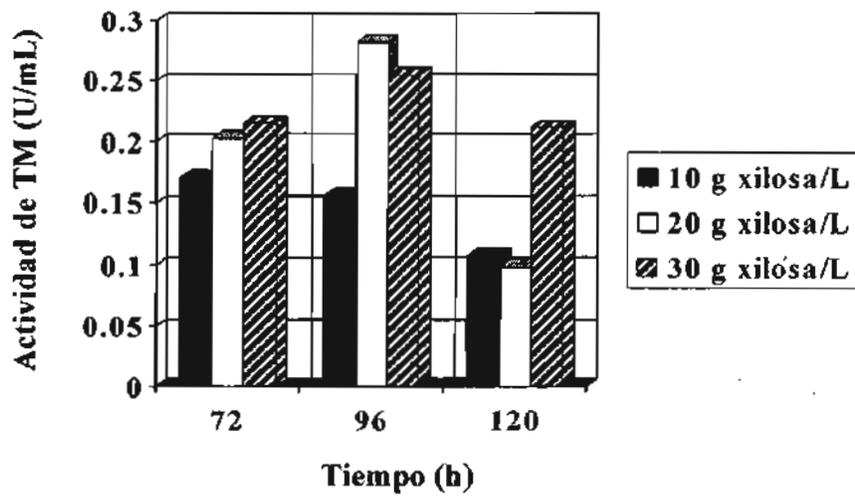


Figura 3. Actividades de transglutaminasa microbiana obtenidas en medios de hidrolizados de paja de sorgo esterilizados por calor

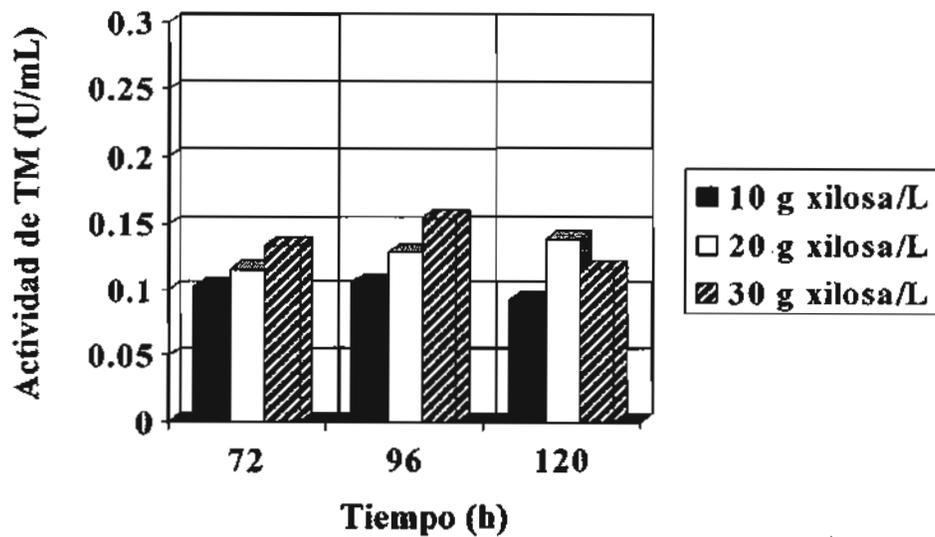
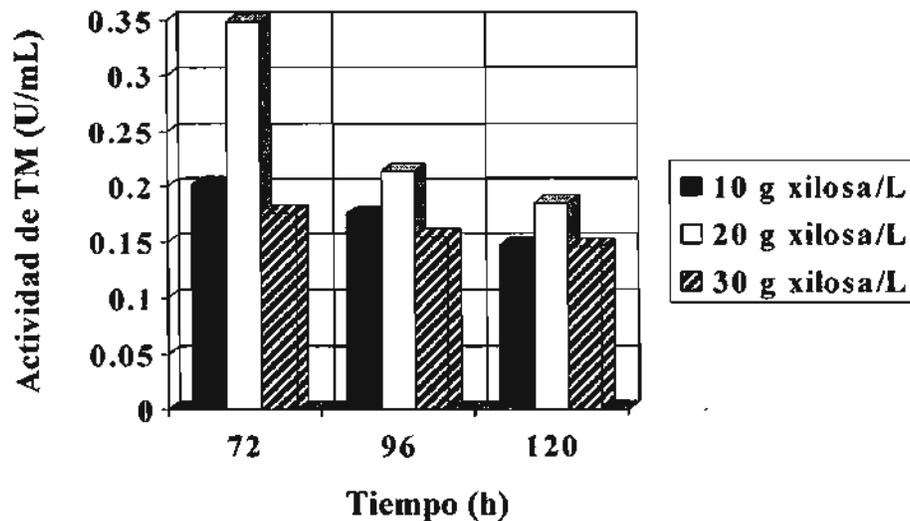


Figura 4. Actividades de transglutaminasa obtenidas en medios de hidrolizados de paja de sorgo esterilizados por filtración



La actividad más baja de TM en los hidrolizados obtenidos por filtración puede ser causada por el incremento del desarrollo de los inhibidores presentes (furfural y ácido acético). Se detectaron 2.2 g/L de ácido acético en los hidrolizados obtenidos por filtración con 30 g/L de xilosa, y en los hidrolizados obtenidos por autoclave con la misma concentración de xilosa la concentración de ácido acético fue de 1.8 g/L. La actividad de TM obtenida en los hidrolizados de paja de sorgo está en el rango de otros estudios reportados con diferentes sustratos (Zhu *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1997; Téllez-Luis, 2004). Se demostró que los hidrolizados de paja de sorgo esterilizados por filtración son medios disponibles para la producción de TM por *Streptoverticillium ladakanum*.

Bibliografía

- Aguilar, R.; Ramírez, J.A.; Garrote, G.; Vázquez, M. (2002), *J. Food Eng.*, 55: 309-318.
- Grossowicz, N.; Wainfan, E.; Borek, E.; Waelsch, H. (1950), *J. Biol. Chem.*, 187: 111-125.

- Herrera, A.; Téllez-Luis, S.J.; Ramírez, J.A.; Vázquez, M. (2003), *J. Cereal Sci.*, 37: 267-274.
- Junqua, M.; Duran, R.; Gañiste, C.; Goulas, P. (1997), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48: 730-734.
- Miller, T.L.; Churchill, B.W. (1986), "Substrates for Large-Scale Fermentations", en Demian, A.L.; Solomon, L.A. (eds.), *Manual of industrial Microbiology and Biotechnology*, Washington D.C., American Society for Microbiology.
- Motaki, M.; Aso, H.; Seguro, K.; Nio, N. (1987), *Agric. Biol. Chem.*, 51: 993-996.
- Nonaka, M.; Tanaka, H.; Okiyama, A.; Motoki, M.; Ando, H.; Umeda, K.; Mansura, K. (1989), *Agric. Biol. Chem.*, 53: 2619-2623.
- Ramírez, J.A.; Santos, I.A.; Morales, O.G.; Morrissey, M.T.; Vázquez, M. (2000), *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 3: 21-28.
- Téllez-Luis, S.J.; Ramírez, J.A.; Vázquez, M. (2002a), *J. Food Eng.*, 52: 285-291.
- _____; Uresti, R.M.; Ramírez, J.A.; Vázquez, M. (2002b), *J. Sci. Food Agric.*, 82: 953-959.
- _____; Uresti, R.M.; Ramírez, J.A.; Vázquez, M. (2004), *J. Food Sci.*, 69: 1-5.
- Zhu, Y.; Rinzema, A.; Tamper, J. (1995), *J. Biol. Biotechnol. Bioeng.*, 50: 291-298.
- _____; Rinzema, A.; Tramper, J.; De Bruin, E. (1997), *J. Biol. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49: 251-257.

Producción biotecnológica de transglutaminasa **Biotechnological Production of Transglutaminase**

Portilla Rivera, O.M.^{1}; Téllez Luis, S.J.¹;
Ramírez de León, J.A.¹; Vázquez Vázquez, M.^{1,2}*

Resumen

El creciente desarrollo de la biotecnología ha permitido la producción industrial de nuevos aditivos alimenticios. Uno de esos aditivos es el enzima transglutaminasa. Este enzima cataliza reacciones de ligado de proteínas, lo cual tiene múltiples aplicaciones en tecnología de productos cárnicos y pesqueros. La producción biotecnológica de esta enzima requiere la utilización de medios de cultivo económicos. Los residuos agroindustriales constituyen materias primas de gran interés para la formulación de estos medios de cultivo debido a su contenido potencial en azúcares fermentables. En esta revisión se presentan las características del enzima transglutaminasa y sus principales aplicaciones. Por último, se muestra la producción biotecnológica a partir de residuos agroindustriales.

Abstract

The great interest in biotechnology has allowed the industrial production of new food additives. One of these additives is the transglutaminase. This enzyme catalyses reactions of protein crosslinking which have several applications in technology of meat and fish

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

² Área de Tecnología de los Alimentos, Departamento de Química Analítica, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Santiago de Compostela-Campus de Lugo, 27002-Lugo (España).

* e-mail: manuelportillarivera@hotmail.com

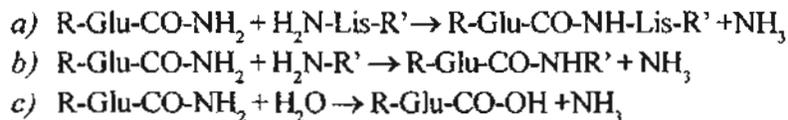
products. The biotechnological production of this enzyme required the use of economical culture media. Agricultural and industrial wastes are raw materials of great interest for formulation of this culture media due to potential content of fermentable sugars. This review shows the properties of transglutaminase and its main applications. The biotechnological production using agricultural and industrial waste is revised.

Introducción

La transglutaminasa (TGasa: EC 2.3.2.13) es un enzima que cataliza una reacción de transferencia de grupos acilo entre grupos α -carboxiamida de residuos glutamilo de proteínas (figura 1). La diferencia entre la TGasa con respecto de la mayoría de los enzimas utilizados en la industria alimentaria es que estos últimos son hidrolasas, y por tanto, rompen enlaces covalentes, mientras que la transglutaminasa crea enlaces covalentes entre proteínas. En la práctica, esto se traduce en la posibilidad de *ligar* proteínas alimentarias. El pH óptimo de este enzima es 7 y la temperatura de máxima actividad es 50° C.

Figura 1. Reacciones catalizadas por la transglutaminasa.

- a) *Cross-linking* entre proteínas, b) Reacción de transferencia de acilos,
c) Reacción de desamidación



Los primeros estudios de aplicación de la transglutaminasa en alimentos se hicieron con enzimas extraídos de mamíferos, lo cual representaba un gasto excesivo a escala industrial. El problema se ha resuelto mediante la producción de este enzima a través de microorganismos, encontrándose un enzima con mejores propiedades. La TGasa microbiana, a diferencia de la proveniente de animales, es independiente de los iones Ca^{++} . Otro aspecto importante de la TGasa microbiana lo constituye el hecho de que es extracelular, por lo que se facilita su aislamiento.

Este enzima es activo en un amplio intervalo de pH (5-9) y temperatura (45-55°C), lo cual le permite una gran variedad de aplicaciones en la elaboración de productos alimenticios.

Aplicaciones de TGasa en tecnología alimentaria

La aplicación de la TGasa en productos cárnicos se centra en la propiedad ligante de las proteínas miofibrilares que mejora la textura de los productos, aumenta la capacidad de retención de agua y su rendimiento comercial.

Otro punto a favor del enzima es su aplicación en la producción de alimentos cárnicos con bajo contenido en sal. En este caso, el uso de TGasa permite reducir el contenido en sal de estos productos, lo que representa un beneficio para las personas con padecimientos de hipertensión arterial crónica.

Por otro lado, se ha demostrado la posibilidad del uso de la TGasa como aditivo para la reestructuración de productos cárnicos; es decir, se logra la utilización de cortes de bajo valor comercial para la obtención de productos reestructurados. En los reestructurados de pescado, por ejemplo, se ha comprobado que mezclas del enzima con caseinato de sodio favorecen la formación de filetes (Uresti *et al.*, 2004).

La aplicación de TGasa también es posible en productos derivados de la soya, debido a la cantidad abundante de proteína en este vegetal. El tofu, un alimento muy común en China, es otro ejemplo de aplicación de TGasa. Los estudios realizados en la elaboración de tofu usando el enzima como factor de coagulación, demuestran que al adicionar enzima a la leche de soya se obtiene un producto con una fuerza de ruptura más alta (115 g/cm²) que la que muestran los producidos sin la enzima (41 g/cm²) (Kuraishi *et al.*, 2001).

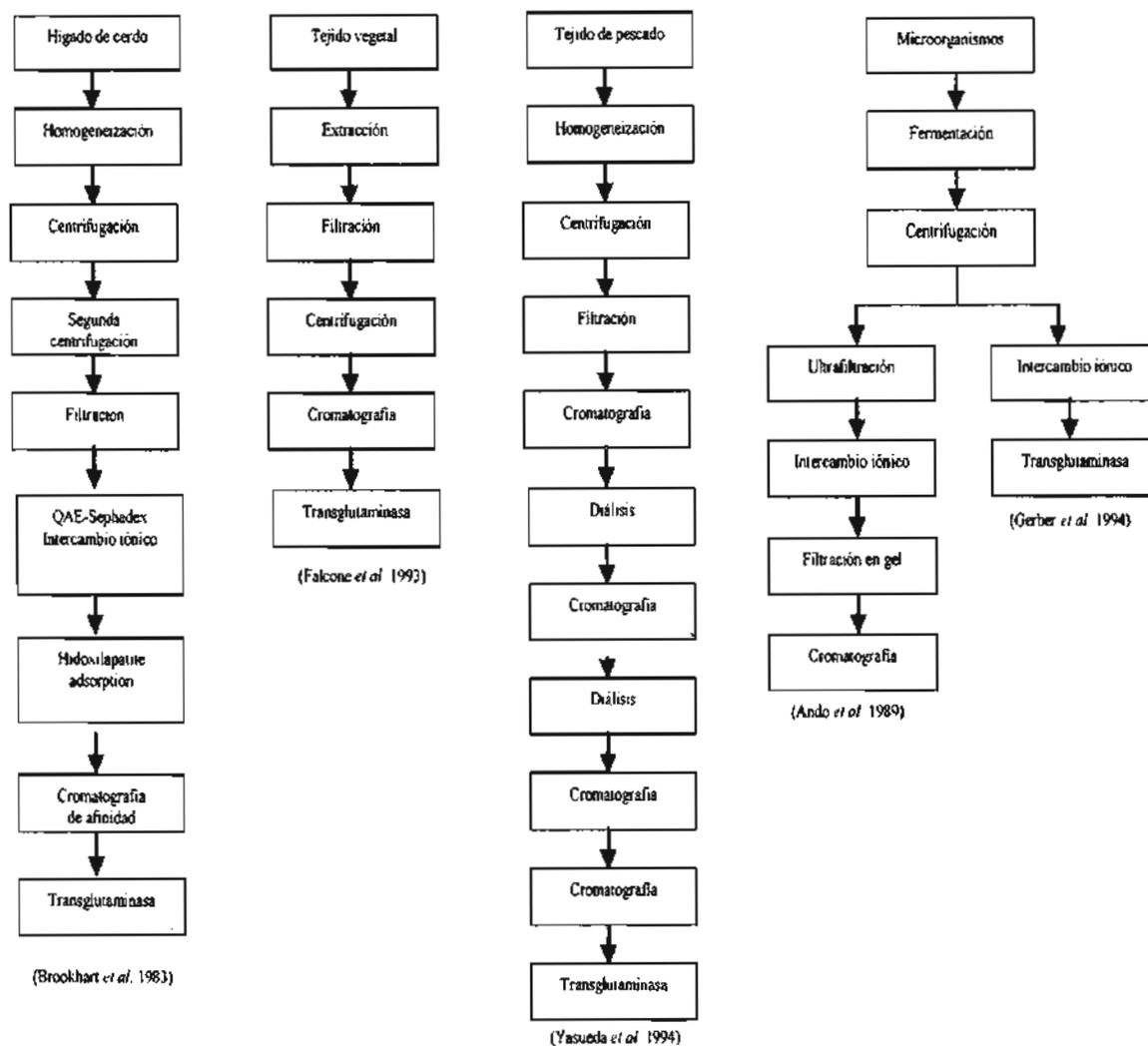
Este breve esbozo nos muestra la **gran aplicabilidad** del enzima en la producción de alimentos con alto contenido proteico, lo cual justifica la búsqueda de nuevas y mejores alternativas para su producción.

Producción de transglutaminasa

La transglutaminasa puede obtenerse de tejidos vegetales y de sangre de mamíferos (factor XIII de la coagulación) pero, como ya se ha mencionado, el proceso es muy costoso a escala industrial. La producción del enzima se realiza mediante fermentaciones con microorganismos, pues ya que es un producto extracelular se facilita su obtención. La figura 2 muestra un resumen de las distintas fuentes de enzima transglutaminasa y técnicas de purificación.

La producción de transglutaminasa a partir de microorganismos (TGasa microbiana) se descubrió a finales de la década de los ochenta. Ando *et al.* (1989) investigaron 5 mil cepas aisladas de suelos de varios lugares y encontraron que las *Streptovercillium* S-8112 producían el enzima. La tabla 1 muestra los microorganismos que producen transglutaminasa.

Figura 2. Principales procesos para la purificación de la transglutaminasa



La producción de la TGasa microbiana se realiza mediante fermentaciones cuyas condiciones han sido descritas por Ando *et al.* (1989, 1992) y Motoki *et al.* (1989), según las cuales se obtienen actividades de enzima que van de 0.28 U/mL a 2.5 U/mL. De acuerdo al método descrito por Grossowicz *et al.* (1950), para determinar actividad de enzima, una unidad de TGasa microbiana se describe como la formación de 1 μ m de ácido L-glutámico β -monohydroxamato durante un minuto a 37°C.

El microorganismo *Streptoverticillium mobaraensis* NRRL 3191 es el más utilizado para la producción de la TGasa microbiana, aunque se han realizado estudios

Tabla 1. Microorganismos que producen transglutaminasa (* TGasa extracelular; ** TGasa intracelular)

<i>Microorganismo</i>	<i>Autor</i>
<i>Streptovercillium griseocarneum</i> * <i>Streptovercillium cinnamoneum</i> subsp. <i>cinnanoneum</i> * <i>Streptovercillium movaraense</i> *	Motoki <i>et al.</i> (1989)
<i>Bacillus circulans</i> *	Zachia Ayub <i>et al.</i> (2003)
<i>Actinomadura sp</i> *	Kim H. S. <i>et al.</i> (2000)
<i>Bacillus subtilis</i> ** <i>Physarum polycephalum</i> **	Ho <i>et al.</i> (2000)
Especies de <i>Oomycetos</i> **	Zhu <i>et al.</i> (1999)

con *Streptovercillium cinnamoneum* CBS 683.68 en los que se obtuvieron unidades de enzima dentro de los rangos antes mencionados.

Los esfuerzos por encontrar mejores condiciones de producción consideran distintas variables, por lo que se han realizado diferentes estudios. Zhu *et al.* (1997) propusieron un estudio para la evaluación de los lotes alimentados con el fin de prevenir la limitación de fuente de nitrógeno en los cultivos durante la producción. Encontraron que la alimentación con peptona como fuente de nitrógeno no ofrece un beneficio para la producción, debido al entrecruzamiento causado por el enzima producido, por lo que es recomendable el uso de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno para evitar este problema. También se observó la dependencia entre las fuentes de carbono y nitrógeno con el aumento de biomasa. Por otro lado, se han evaluado las condiciones de agitación de los medios de cultivo en *batch* (Yan, G. L. *et al.*, 2005) y estrategias del control del pH (Zheng M. Y., 2002).

El método para la purificación del enzima propuesto por J. Chen *et al.* (2002) incluye centrifugación a 6000 rpm por 10 minutos para separar el líquido sobrenadante de la biomasa; concentración del sobrenadante mediante ultrafiltración con una presión de 0.1 Mpa de operación, lavado con alcohol, centrifugación a 3° C a 3000 rpm por 7 minutos y liofilización (0°C, 760 mmHg y 24h). De esta manera se obtiene enzima crudo, el cual se somete a diálisis en 0.02 M *buffer* de fosfato (pH 6.5, 12h y 4°C). Esta solución se somete a separación por cromatografía de columna de CMC de 2.6x20 cm previamente equilibrada con 0.02 M de fosfato *buffer* a pH 6.5 (velocidad de flujo de 1 mL/min; incremento lineal de un gradiente de fosfato de 0.02 a

0.05 M). Las fracciones de 11 mL con el enzima activo se colectan y concentran por Polyoxialquyleno 20000 que se cargan en una columna de Sephadex G-75 (1.6 x 80cm) equilibrada con 0.05 M de Tris/HCl *buffer* (pH 6.0). La columna se lava con el mismo *buffer* y las fracciones de 3.0 mL se colectan a 1 mL/min.

Alternativas para la producción de TGasa microbiana

Se ha encontrado que el glicerol y la caseína tienen efecto significativo sobre el incremento de biomasa y la actividad de TGasa microbiana (Junqua *et al.*, 1997). Téllez-Luis *et al.* (2004a) encontraron que un medio con 50.5 g glicerol/L y 20 g caseína/L producen 0.725 U de enzima/mL.

Con el fin de proponer alternativas para la producción de TGasa microbiana a partir de materias primas de bajo costo, se ha investigado la posibilidad de variar las fuentes de carbono de los medios de cultivo y usar residuos agroindustriales, por su alto contenido en azúcares fermentables. Recientemente, se ha comprobado la viabilidad de la producción de TGasa microbiana mediante el uso de hidrolizados de paja de sorgo como sustrato (Téllez-Luis *et al.*, 2004b), obteniéndose 0.348 U/mL de actividad en 72 horas a partir de soluciones de xilosa 20 g/L.

Por otro lado existen residuos agroindustriales con amplias posibilidades de aplicación en la producción de aditivos alimentarios, tal es el caso de la melaza de caña de azúcar, la cual, al contener altas concentraciones de azúcares incristalizables (sacarosa, glucosa y fructosa), puede ser utilizada como sustrato para producción de transglutaminasa. El proceso de producción de la caña de azúcar implica la formación de compuestos de la familia del furfural, por lo que estos compuestos se presentan en la composición de la melaza final. Una vez que se decide usar como sustrato esa melaza, es necesario evaluar el contenido de estos compuestos debido a su acción inhibitoria del crecimiento microbiano. Actualmente no se cuenta con información con respecto a la utilización de esta fuente de carbono como sustrato, por lo que se han realizado evaluaciones de la composición de esta mezcla rica en azúcares para establecer la viabilidad de la producción biotecnológica del enzima TGasa.

Bibliografía

Ando, H.; Adachi, M.; Umeda, K.; Matsuura, A.; Nonaka, M.; Uchio, R.; Tanaka, H.; Motoki, M. (1989), "Purification and characteristics of a novel transglutaminase

- derived from microorganisms”, *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(10): 2613-2617.
- ; Matura, A.; Hirose, S. (1992), *Manufacture of transglutaminase with Streptomyces*, Japón, Kokai Tokkyo Koho, JP 04108381.
- Brookhart, P.P.; McMahon, P.L.; Takahashi, M. (1983), “Purification of guinea pig liver transglutaminase using a phenylalanine-sepharose 4B affinity column”, *Analytical Biochemistry*, 128(1): 202-205.
- Chen, J.; Lu, S. Y.; Zhou, N.D.; Tian, Y.P.; Li, H.Z. (2002), “Purification and properties of transglutaminase from *Streptovercillium mobaraense*”, *Journal o food chemistry*, 27(2003): 109-125.
- De Jongand, G.A.H.; Koppelman, S.J. (2002), “Transglutaminase catalyzed reactions: impact in food applications”, *Journal of food science*, 67(8): 2798-2806.
- Falcone, P.; Serafini-Fracassini, D.; Del Duca, S. (1993), “Comparative studies of transglutaminase activity and substrates in different organs of *Helianthus tuberosus*”, *J. Plant Physiol.*, 142: 263-273.
- Gerber, U.; Juckniskhe, U.; Putzien, S.; Fuchsbauer, H.L. (1994), “A rapid and simple method for the purification of transglutaminase from *Streptovercillium mobaraense*”, *Biochemical Journal*, 299(3): 825-829.
- Grossowicz, N; Wainfan, E.; Borek, E.; Waelsch, H. (1950), “Enzymic formation of hydroxamic acids from glutamine an asparagine”, *Journal of Biological Chemistry*, 187: 111-125.
- Ho, M.L.; Leu, S.F.; Hsieh, J.F.; Jiang S.T. (2000), “Technical approach to simplify the purification method and characterization of microbial transglutaminase produced from *Streptovercillium ladakanum*”, *J. Food Sci.*, 65(1): 76-80.
- Junqua, M.; Duran, R.; Gancet, C.; Goulas, P. (1997), “Optimization of microbial transglutaminase production using experimental designs”, *Appl Microbiol.*, 48: 730-734.
- Kim, H.S.; Jung, S.H.; Lee, I.S.; Yu, T.S. (2000), “Production and characterization of a novel microbial transglutaminase from *Actinomadura* SP T-2”, *Journal of microbiology and biotechnology*, 10(2): 187-194.
- Kurashi, C.; Katsutoshi, Y.; Susa, Y.; (2001), “Transglutaminase: Its utilization in the food industry”, Maecel Dekker, Inc., *Food Reviews International*, 17(2): 221-246.
- Motoki, M.; Okiyama, A.; Nonaka, M.; Tanaka, H.; Uchio, R.; Matura, A.; Ando, H. Umeda, K. (1989), *Novel tranlglutaminase manufacture for preparation of protein gelling compounds*, Japón, Kokai Kokkyo Koho, JP 0127471.
- Ramírez de León, J.A.; Téllez-Luis, S. Josías; Uresti Marín, R.; Vázquez, M. (2004), “Aplicaciones de la enzima transglutaminasa en alimentos”, *Alimentación, equi- pos y tecnología*, 189: 69-73.

- Ramírez, J.A.; Rodríguez-Sosa, R.; Morales, O.G.; Vázquez, M. (2000), "Surimi gels from striped mullet (*Mugil cephalus*) employing microbial transglutaminase", *Food Chemistry*, 70: 443-449.
- _____; Santos, I.A.; Morales, O.G.; Morrissey, M.T.; Vázquez, M. (2000), "Application of microbial transglutaminase to improve mechanical properties of surimi from silver carp", *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3: 21-28.
- Téllez-Luis, S.J.; González-Cabriales, J.J.; Ramírez, J.A.; Vázquez, M. (2004b), "Production of Transglutaminase by *Streptoverticillium ladakanum* NRRL-3191 grown on Media Made from hydrolysates of Sorghum Straw", *Food technology and biotechnology*, 42(1): 1-4.
- _____; Ramírez, J.A.; Vázquez, M. (2004), "Application in restructured fish products of transglutaminase obtained by *Streptoverticillium ladakanum* in media made from hydrolysates of sorghum straw", *Journal of Food Science*, 69(1): FMS1-FMS5.
- _____; Ramírez, J.A.; Vázquez, M. (2004a), "Production of transglutaminase by *Streptoverticillium ladakanum* NRRL-3191 using glycerol as carbon source", *Food technology and biotechnology*, 42(2): 75-81.
- Uresti, R.M.; Téllez-Luis, S.J.; Ramírez, J.A.; Vázquez, M. (2004), "Use of dairy proteins and microbial transglutaminase to obtain low-salt fish products from filleting waste from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)", *Food Chemistry*, 86(2): 257-262.
- Yan, G.L.; Du, G.C.; Li, Y.; Chen, J.; Zhong, J.J. (2005), "Enhancement of microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium mobaraense*: application of a two-stage agitation speed control strategy", *Process biochemistry*, 40(2): 963-968.
- Zhu, Y.; Bol, J.; Rinzema, A.; Tramper, J.; Wijngaards, G. (1999), "Transglutaminase as a potencial tool in developing novel protein foods", *Agro-Food-Industry Hi-Tech.*, enero-febrero, 10(1): 8-10.
- _____; Rinzema, A.; Tramper, J.; Bol, J. (1995), "Microbial transglutaminase -a review of its production and application in food processing", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44: 277-282.

**Baculovirus recombinantes: desarrollo de nuevos
bioinsecticidas para el control de plagas
de insectos lepidópteros**
*Recombinant Baculoviruses: New Bioinsecticides
to Control Lepidopteran Insect Pests*

*Rodríguez-Pérez M.A.¹, Beckage N.E.², Dumpit R.³, Lizarazo O.¹,
Barrera-Saldaña H. A.⁴, Bonning B.⁵*

Resumen

Patógenos de insectos, tales como los baculovirus, pueden ser utilizados como potentes agentes de control biológico ya que producen alta tasa de mortalidad en los insectos plaga. Sin embargo, dos problemas asociados con el uso de los baculovirus como bioinsecticidas que todavía persisten son tanto su lentitud para matar insectos, como la reducida gama de especies que infectan. Las pérdidas de cultivos agrícolas podrían reducirse de manera significativa mediante el desarrollo de baculovirus recombinantes que podrían expresar moléculas tóxicas para los insectos. Por ejemplo, ya se han diseñado baculovirus que expresan toxinas o proteasas que potencian su modo de acción contra las plagas agrícolas. Su potencial utilidad en el control de plagas se ha incrementado

¹ Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Cd. Reynosa, Tamaulipas, México.

² Departments of Entomology & Cell Biology and Neuroscience, 382 Entomology Building, University of California, Riverside, CA, EU.

³ Graduate Program in Biochemistry and Molecular Biology, University of California, Riverside, CA, EU.

⁴ Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, Monterrey, N.L., México.

⁵ Department of Entomology, Iowa State University, Ames, Iowa, EU.

debido a que estos baculovirus recombinantes están siendo integrados a programas de manejo de plagas de insectos (MPI) en sistemas agrícolas. Estas acciones ofrecen al MPI nuevas opciones para bioinsecticidas, mientras que reducen las cantidades usadas de pesticidas químicos en el campo. Lo que presentamos aquí son las estrategias para la construcción genética de baculovirus que expresan genes de polidnavirus y de proteasas, para controlar plagas de insectos lepidópteros. La tarea es evaluar el efecto de los baculovirus recombinantes sobre diversas especies de insectos plaga de importancia para la agricultura, tales como *H. virescens*, *Diatraea saccharalis*, *Helicoverpa (Heliothis) zea*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua* y *Manduca sexta*. Estos nuevos bioinsecticidas tendrán un impacto favorable en varios ecosistemas agrícolas (incluidos cultivos de tomate, algodón, maíz y frijol y de los pastizales) de países cuyo bienestar económico depende notablemente de la agricultura, al implementar métodos más eficientes, potentes y amigables con el ambiente.

Abstract

Insect pathogens such as baculoviruses can be exploited as potent mortality-inducing agents for the biological control of insect pests. However, two problems associated with using baculoviruses as biopesticides is their inherently delayed speed-of-kill and relatively narrow host range. Crop losses could be significantly reduced by the development of recombinant baculoviruses which express toxic molecules to insects. For example, researchers have engineered baculoviruses that express toxins or proteases that enhance their mode of action against agricultural pests. Their potential role in pest control is increasing because recombinant baculoviruses are being integrated into insect pest management programs (IPM) in agricultural systems. This action gives IPM's newer options for biopesticides while reducing the amount of usage of chemical pesticides in the field. This paper presents the strategies which can be used for construction of baculoviruses with polydnavirus and protease genes to control lepidopteran insect pests. Our goal is to evaluate the genetically modified baculoviruses activity in several insect pests such as *H. virescens*, *Diatraea saccharalis*, *Helicoverpa (Heliothis) zea*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, and *Manduca sexta*. Thus, novel biopesticides, such as recombinant baculoviruses, will have a positive impact upon agricultural ecosystems (such as those of tomato, cotton, corn, grass, and bean) in countries which rely heavily on agricultural crops for their economic welfare by implementation of more efficient, potent, and environmentally-safe methods for agricultural insect pest control.

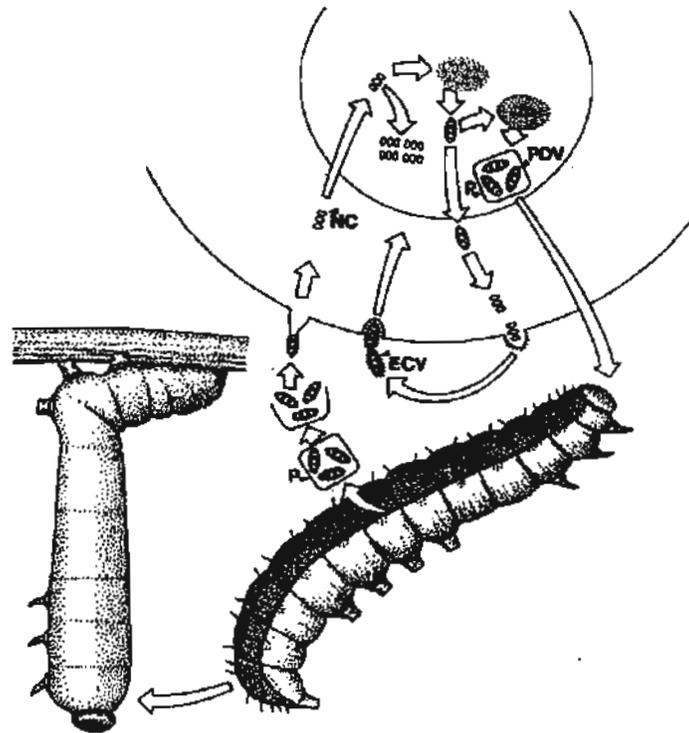
Introducción

Los baculovirus son patógenos específicos de artrópodos, los cuales infectan a un gran número de especies de insectos del orden *Lepidóptera* (Adams y McClintock, 1991). Debido a que los baculovirus son amigables con el medioambiente y no se reproducen en los vertebrados, han sido sujeto de muchos estudios como una posible alternativa o suplemento de los insecticidas químicos convencionales (Black *et al.*, 1997; Moscardi, 1999). Los baculovirus tienen un genoma compuesto de ADN de doble cadena circular que está dentro de una envoltura viriónica. Los viriones del baculovirus están dentro de una matriz cristalina protectora que consiste de proteína polihedrina y forma lo que se denomina el poliedro. Los poliedros pueden ser aplicados para el control de insectos plaga de una manera convencional como se hace con los insecticidas químicos clásicos. La infección primaria en el huésped se inicia cuando la larva del insecto plaga ingiere los poliedros. La matriz cristalina de polihedrina se disuelve en el ambiente alcalino del estómago del insecto, liberando los viriones, los cuales infectan las células del estómago. Los baculovirus que producen esta infección primaria establecen una infección secundaria en otros tejidos del insecto huésped. Después de que se expresan los genes virales y los viriones se ensamblan, se producen poliedros, en cantidad masiva, en los tejidos del insecto huésped (figura 1). Cuando el insecto huésped muere de la infección, el cadáver se disuelve liberándose poliedros en el medioambiente, con lo cual se inician nuevas rondas de infección.

Una de las desventajas de los baculovirus silvestres es su baja capacidad para eliminar en tiempo al insecto huésped. Para sobrepasar esta limitante, se han desarrollado baculovirus mejorados genéticamente que expresan genes y productos que afectan la fisiología del insecto huésped, de tal manera que éste muere más rápido (van Beek y Hughes, 1998; Harrison y Bonning, 2000, 2001). Un baculovirus mejorado genéticamente óptimo es aquel que pueda producir descendencia lo más pronto posible una vez que haya infectado las células del huésped y que pueda establecer una infección sistémica en los tejidos del mismo de forma rápida, una vez pasada la infección primaria de células del estómago.

Un elemento clave para la acción de los baculovirus lo constituye la membrana basal. La membrana basal es una capa extracelular proteínica que rodea los tejidos de células animales, provee una estructura de soporte, tiene función de filtración y es una superficie de anclaje, migración y diferenciación celulares (Yurchenco y O'Rear, 1993). Smith-Johannsen *et al.*, (1986) encontraron que la infección con baculovirus de las células foliculares de la pupa del gusano de seda, *Bombyx mori*, aumentaba si, además, se inyectaba colagenasa clostridial (una proteína que degrada las proteínas

Figura 1. Representación gráfica del ciclo de vida de un baculovirus en la larva y la célula del insecto huésped



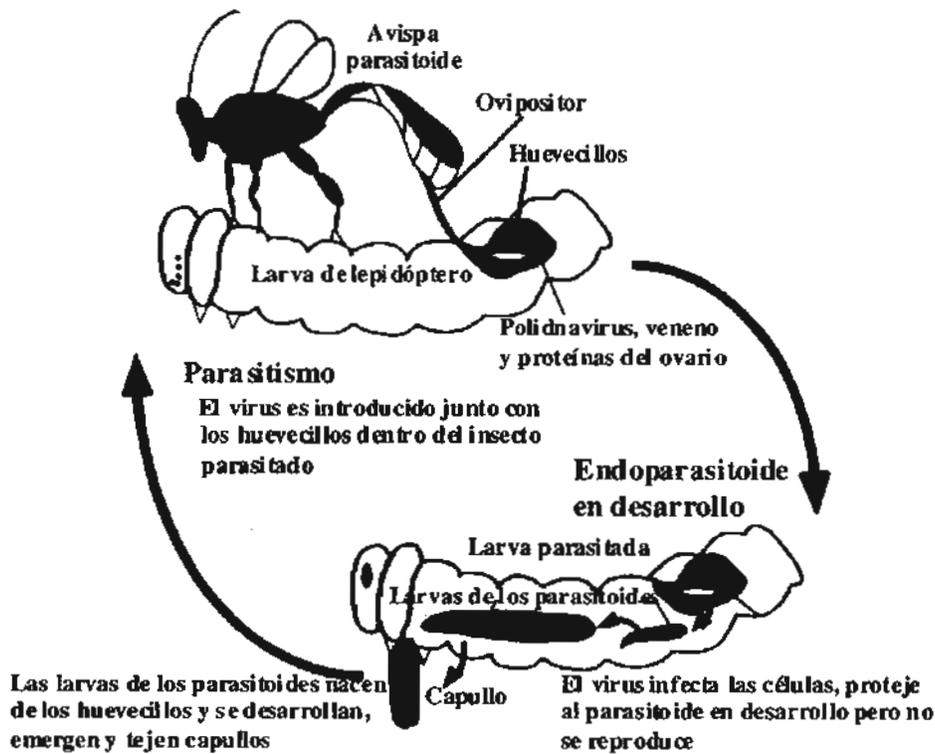
La larva del insecto plaga ingiere los poliedrovirus (PDV) y en su estómago se disuelve la matrix cristalina de polihedrina (P) liberando los viriones que infectan las células del estómago (NC). Los virus extracelulares (ECV), producto de la infección primaria, establecen una infección secundaria en otras células y tejidos del insecto huésped. Después de que se expresan los genes virales, los viriones se ensamblan en poliedros (PDV), en cantidad masiva, en las células y tejidos del insecto huésped. El insecto muere y los PDV se liberan en el medioambiente. Abreviaciones: P matrix de polihedrina, (ECV) virus extracelular, (PDV) poliedrovirus, (NC) nucleocápsula. Reproducción de King y Possee (1992) con permiso de la Editorial Chapman y Hall.

de la membrana basal de los tejidos). Por tanto, la degradación de la membrana basal podría provocar que la infección sistémica de los tejidos del insecto huésped con el baculovirus fuera más rápida y que un mayor número de insectos fueran más susceptibles a la infección. En este sentido, una estrategia fue el desarrollar un baculovirus que produjera una proteína que afectara la membrana basal de los tejidos del insecto huésped. Un recombinante de este tipo se desarrolló a partir del nucleopoliedrovirus (o baculovirus) de *Autographa californica* (AcNPV) capaz de expresar proteasas que digieren las proteínas de la membrana basal y éste fue

denominado AcMLF9.ScathL. El AcMLF9.ScathL expresa la proteasa catepsina L de la mosca *Sarcophaga peregrina* y fue capaz de eliminar, en tiempo récord, a las larvas de *H. virescens* infectadas con el baculovirus (Harrison y Bonning, 2001).

Otra estrategia para mejorar la acción de un baculovirus es el uso de genes de los polidnavirus. Los polidnavirus son organismos que viven en simbiosis genética con más de 30 mil especies de avispas parasitoides que se desarrollan en un notable número de especies de insectos plaga. Los polidnavirus se replican en las células del cáliz de los ovarios de la hembra avispa y son depositados dentro de una larva de insecto como huésped durante el proceso de parasitismo (figura 2), la cual, por lo

Figura 2. Ciclo de vida del parasitoide himenóptero



El insecto huésped es parasitado por la avispa adulta hembra. Durante el proceso de parasitismo, los huevos de la avispa, los polidnavirus, el veneno y varias proteínas del aparato reproductor de la hembra son inoculados dentro del insecto huésped. Las larvas del parasitoide nacen de los huevos y se desarrollan a través de varios estadios larvales, salen del insecto parasitado, tejen capullos, se desarrollan en la pupa y nacen como avispas adultas para copular y buscar nuevos hospederos. El insecto huésped muere en todos los casos. Reproducción de Webb (1998) con permiso de la Editorial Plenum, Nueva York (A Division of Plenum Publishing Corporation).

general, es un gusano que causa daño económico a cultivos agrícolas y/o alimentos almacenados. El gen CrVI del polidnavirus de *C. congregata* causa la muerte masiva (apoptosis) de las células de defensa que circulan en la hemolinfa del insecto huésped, lo cual deprime su sistema inmune, por lo que el insecto plaga se vuelve más susceptible al ataque de otros parásitos y patógenos.

A continuación explicaremos, en detalle, la asociación entre parasitoides y polidnavirus y cómo éstos pueden ser utilizados para el control de insectos plaga. Se sabe que los parasitoides han desarrollado complejos mecanismos de asociación con el insecto huésped. En primer lugar, los parasitoides han desarrollado estrategias para evitar ser eliminados por el sistema inmune del insecto huésped, de tal manera que pueden establecerse con éxito. Existe evidencia que indica que, en varios casos, los parasitoides regulan la fisiología de su huésped para su propio beneficio: promueven cambios de la respuesta inmune celular y humoral, afectan la fisiología hormonal y el desarrollo y comportamiento del insecto huésped. Uno de los ejemplos más sobresalientes de estas estrategias de los parasitoides es la inmunodepresión provocada al huésped y, esto se observa en los parasitoides que inoculan polidnavirus dentro de la hemolinfa de su huésped al momento de ser parasitado. El genoma del polidnavirus se integra al genoma de la avispa y éstos se replican en los ovarios de la avispa hembra, por tanto, se establece una estrecha comunicación entre éstos y el insecto huésped. Por otro lado, una de las estrategias primordiales de un insecto para evitar la invasión de un parasitoide es el fenómeno de encapsulación o movilización de células de la hemolinfa para formar una cápsula multicapa de hemocitos que engloban al parasitoide o patógeno invasor. En contraste, la función del polidnavirus es neutralizar la acción de los hemocitos de insectos que son atacados por los parasitoides. El gusano del cuerno del tabaco, *Manduca sexta*, y su parasitoide, la avispa *C. congregata*, sirven de modelo para estudiar cómo el polidnavirus interfiere en la respuesta de encapsulamiento de los hemocitos, además de provocarles la muerte. Así, las larvas de insectos infectadas con el polidnavirus de *C. congregata* y con el baculovirus silvestre (AcNPV) mueren más rápido que aquellas larvas infectadas únicamente con los baculovirus; esto indica que la infección conjunta, producida por el polidnavirus y el baculovirus, provoca la muerte del insecto con mayor velocidad (figura 2; Rodríguez-Pérez y Beckage, 2006).

El descubrimiento del mecanismo regulatorio del sistema inmune de insectos parasitados por los polidnavirus es reciente. En los últimos años, diversas investigaciones se han concentrado en estudiar la relación parasitoide-polidnavirus-insecto huésped, y han dado como resultado el aislamiento y caracterización de genes del polidnavirus que deprimen la respuesta inmune del insecto huésped. Los genes del polidnavirus (asociado con el parasitoide *Microplitis demolitor*) incluyen los que codifi-

can proteínas ricas en cisteína; el gen del polidnavirus VHv1.1 en *Campoletis sonorensis*; el gen que codifica la proteína CrV1 en *Cotesia rubecula*, y el gen de 2.0 kb (ARN mensajero) en *Cotesia kariyai* (Beckage y Gelman, 2004; Kromer y Webb, 2004), entre otros. Los genes del polidnavirus (en el parasitoide *C. congregata*) con función relevante son los que codifican para una proteína primaria (EP1) y para una proteína homóloga de CrV1. La proteína CrV1 produce cambios morfológicos y fisiológicos en los hemocitos de las larvas parasitadas por *C. rubecula* (Asgari *et al.*, 1996, 1997). El efecto del gen CrV1 fue más persistente en el caso de larvas parasitadas por *C. congregata* (Le *et al.*, 2003; Amaya *et al.*, 2005). El gen homólogo CrV1 en *C. congregata* fue reportado por Le *et al.* (2003) demostrando que el genoma del polidnavirus contiene el gen, ya que una secuencia específica de CrV1 tuvo afinidad con el ADN del polidnavirus de *C. congregata* y con un ARNm aislado del cuerpo graso de *M. sexta* recién parasitada (Le *et al.*, 2003). Posteriormente, el genoma completo, incluyendo la secuencia del gen CrV1, del polidnavirus de *C. congregata* fue reportada por Espagne *et al.* (2004) y, en un estudio de genómica comparativa, Desjardins *et al.* (2005) contrastaron el genoma del polidnavirus y del mimivirus que codifica para un notable número de proteínas. El gen CrV1 del polidnavirus de *C. congregata* es un buen candidato para ser incorporado dentro del genoma del baculovirus ya que tiene un efecto inmunodepresor persistente y causa apoptosis de los hemocitos en larvas parasitadas de *M. sexta* (Amaya *et al.*, 2005).

Esto último también se fundamenta en el hecho de que los genes del polidnavirus pueden aumentar la capacidad infecciosa de baculovirus patógenos que causan mortalidad de larvas de insectos plaga. Por ejemplo, Washburn *et al.* (2000) demostraron que las larvas de *M. sexta* que están parasitadas de manera natural y aquellas larvas no parasitadas, pero con una dosis equivalente de polidnavirus de cuatro avispas, fueron más susceptibles a AcNPV en contraste con las larvas no parasitadas tratadas con la misma dosis oral. De manera natural, las larvas del gusano del cuerno del tabaco son resistentes al AcNPV y requieren de una sobredosis para sucumbir a la infección. Se ha observado que la diseminación de la infección del baculovirus se desarrolla alrededor del epitelio traqueal. El parasitismo o inoculación del polidnavirus incrementó, de manera significativa, la mortalidad de las larvas que fueron sujetas a infección con el baculovirus (Washburn *et al.*, 2000). El objetivo de este trabajo fue desarrollar un baculovirus con el gen CrV1 del polidnavirus asociado con *C. congregata*. Nuestro baculovirus recombinante producirá los poliedros, un factor importante si éste desea ser utilizado como bioinsecticida. En este sentido, hemos utilizado el vector pAcUW21 (BD Biosciences) para integrar el CrV1 al lado de un potente promotor (p10), con lo cual el gen se expresará en la fase tardía de la infección. El AcMLF9.ScathL, que expresa la proteasa catépsina L, ha sido construido

usando el vector pACMLF9, el cual también produce poliedros. El gen que codifica para las proteasas está incorporado justo al promotor 6.9, un potente promotor de fase tardía. El baculovirus recombinante que expresa el gen de proteasas en fase temprana de infección (el AcIE1TV3.ScathL) contiene el gen al lado del promotor ie1. Sin embargo, éste es un promotor débil, por lo que no tuvo el efecto insecticida deseado, el que sí se consiguió con el AcMLF9.ScathL (Harrison y Bonning, 2001).

Material y métodos

Las líneas celulares de insectos, los baculovirus y colonias de insectos se establecieron en los laboratorios de las Dras. Nancy Beckage y Bryony Bonning en los Estados Unidos. El baculovirus AcMNPV silvestre de la variante C6 (Possee, 1986) y los baculovirus recombinantes (AcMLF9.ScathL y AcP10.CrV1) fueron propagados en células Sf9. El baculovirus AcMLF9.ScathL expresó, mediante el promotor 6.9, la proteasa catepsina L de *S. peregrina* (la cual perfora la membrana basal del tejido del insecto huésped; Harrison y Bonning, 2000, 2001). Este baculovirus fue desarrollado en el laboratorio de la Dra. Bryony Bonning en la Universidad de Iowa.

El baculovirus AcP10.CrV1 que expresa, mediante el promotor p10, la proteína CrV1 del polidnavirus de *C. congregata* que afecta la función de los hemocitos (deteriora el citoesqueleto de actina de esta célula de defensa; Le *et al.*, 2003) fue construido por el Dr. Mario Rodríguez en el laboratorio de la Dra. Beckage en la Universidad de California, Riverside. Estos baculovirus recombinantes y los silvestres producen, además, la proteína polihedrina y pueden ser usados como biopesticidas específicos de insectos lepidópteros plaga.

Las especies de insectos *M. sexta* y *Diatraea saccharalis* se cultivaron en el laboratorio de la Dra. Beckage en la Universidad de California, Riverside. Las larvas de estos insectos se nutrieron con dietas artificiales a 27°C y ciclos de 14/10 horas de luz y oscuridad. Los huevos, que fueron colocados por las palomillas adultas, se cosecharon y se incubaron para producir nuevas larvas.

La producción de partículas virales en poliedros y bioensayos se han realizado utilizando el baculovirus AcMLF9.ScathL y *H. virescens* en el laboratorio de la Dra. Bryony Bonning. Se requiere de realizar los bioensayos con el baculovirus AcP10.CrV1. Por tanto, la producción de poliedros de los dos baculovirus recombinantes y la evaluación de su actividad insecticida será reportada sobre las siguientes especies de insectos de importancia en materia agrícola: *Diatraea saccharalis*, *Helicoverpa (Heliothis) zea*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua* y *Manduca sexta*. Estas especies de insectos plaga, incluyendo *H. virescens*, pertenecen a tres familias

diferentes del orden Lepidóptera: *Pyralidae*, *Noctuidae* y *Sphingidae*. Por tanto, los bioensayos en estos grupos de insectos considerados como nocivos para la agricultura, abarcarán las principales plagas que afectan la agricultura en México y en Estados Unidos.

Posteriormente, se elaborarán formulados de los diferentes bioinsecticidas (baculovirus recombinantes y silvestres) y se llevará a cabo la evaluación en condiciones de confinamiento. Se pretende evaluar estos baculovirus bajo diferente concentración de poliedros/g o poliedros/ml del NPV de *A. californica* mejorado genéticamente. Los bioinsecticidas contendrán partículas virales que infectarán las células de los insectos (las seis especies de insectos plaga mencionadas arriba) y éstas expresarán la proteína CrV1 y proteasa catepsina L. Es probable que el efecto de sinergia que produce la doble infección y la expresión de proteína CrV1 conduzca a la eliminación del insecto plaga en un tiempo significativamente menor, si se compara con el tiempo que se tardaría en eliminar al insecto plaga con el uso único del baculovirus silvestre. Los poliedros contienen partículas virales embebidas en ellos y es la forma en que el baculovirus sobrevive fuera del insecto huésped. Las larvas de estos insectos plaga que se alimenten con plantas rociadas con el bioinsecticida podrían ingerir los poliedros que contienen el baculovirus recombinante, con lo cual se provocará una infección sistémica que acelerará la muerte del insecto.

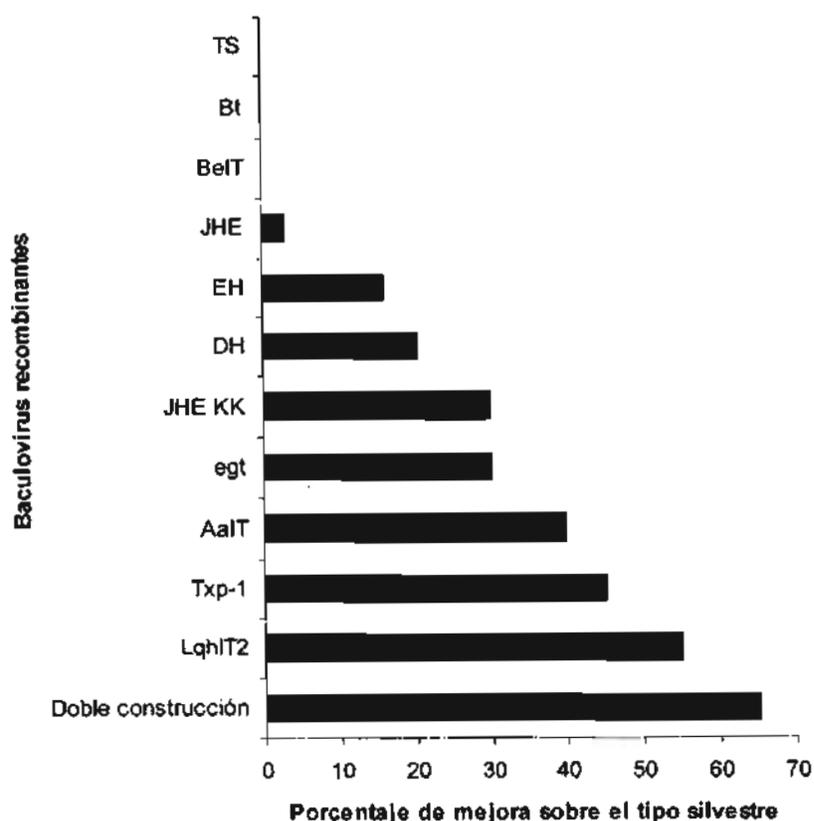
Resultados y discusiones

El grupo de investigación de la doctora Bryony en la Universidad de Iowa ha desarrollado baculovirus recombinantes con acción insecticida de la proteasa catepsina L. Al momento en que la larva del insecto *H. virescens* se infecta con el baculovirus recombinante, se produce enzima proteolítica, lo cual ocasiona la muerte del insecto debido a la infección viral y por el efecto de la proteína (Harrison y Bonning, 2001).

El baculovirus recombinante que produce la proteasa catepsina L ha probado eliminar en un tiempo incluso menor (30% más rápido) a las larvas de *H. virescens* que lo que tarda un baculovirus recombinante que produce una neurotoxina de escorpión específica de insectos (AcMLF9.LqhIT2; véase figura 3). Asimismo, las larvas de *H. virescens* infectadas con el baculovirus recombinante con proteasa catepsina L consumieron, de manera significativa, menor cantidad de lechuga que las larvas infectadas con el baculovirus del tipo silvestre (Harrison y Bonning, 2001). Las siguientes investigaciones tendrán como hipótesis que el insecto plaga (*H. virescens*) morirá mucho más rápido si se le provoca una infección doble con baculovirus recombinantes

(que produzcan el CrVI y proteasa catepsina L). Sin embargo, el efecto de la acción combinada con los dos baculovirus recombinantes en esta especie de insecto plaga y en otras especies requiere ser determinado. Hasta el momento, el baculovirus recombinante con el gen que produce la proteasa catepsina L, es el baculovirus más eficaz para eliminar una larva de insecto plaga si se compara con su contraparte silvestre (doctora Bryony Bonning, comunicación personal).

Figura 3



Un panorama global del porcentaje de eficacia de varios baculovirus mejorados genéticamente o velocidad para eliminar al insecto huésped en comparación con el silvestre de AcNPV. Abreviaciones: (TS) tipo silvestre, (Bt) con la endotoxina de *Bacillus thuringiensis*, (BeIT) con la toxina de insectos de *Buthus eupeus*, (EH) con la hormona de eclosión, (DH) con la hormona diurética, (JHE) con la hormona juvenil, (JHE KK) con la hormona juvenil estabilizada, (EGT) con una delección o mutación del ecdisteroide (UDP) glucosiltransferasa, (AaIT) con la toxina de insectos de *Androctonus australis*, (Txp-1) con la toxina de insectos de *Pyemotes triciti*, (LqhIT2) con la toxina de insectos de *Leiurus quinquestriatus* y la construcción doble con expresión simultánea de (LqhIT2) y (LqhAIT). Reproducción de Inceoglu *et al.* (2001) permiso de la Editorial Pest. Manag. Sci.

Los baculovirus recombinantes y silvestres son específicos de larvas de insectos plaga y no presentan ningún efecto adverso sobre otros insectos benéficos y otros tipos de insectos plaga (Harrison *et al.*, 2004; Cory, 2004). Por esta razón, estos bioinsecticidas son ideales para ser integrados en programas de manejo de plagas agrícolas. La alta especificidad de ataque de estos baculovirus significa que los depredadores o parasitoides en el cultivo seguirán reduciendo las poblaciones del insecto plaga durante y después de la aplicación del bioinsecticida. Es muy importante retener a estos insectos benéficos en el cultivo. Aunque el uso de insecticidas menos específicos ofrece, al inicio, un buen control del insecto plaga, posteriormente puede causar que las poblaciones del insecto plaga se incrementen debido a la eliminación de sus enemigos naturales. Los baculovirus recombinantes que hemos desarrollado no han sido evaluados en campo abierto pero sí han mostrado un notable efecto insecticida bajo condiciones de laboratorio. Los genes de CrV1 y de proteasa catépsina L incorporados dentro del genoma de los baculovirus ya han sido investigados, por lo que es necesario evaluar estos insecticidas en una variedad de insectos que causan pérdidas a la agricultura en Estados Unidos y México.

Nuestra hipótesis es que los baculovirus recombinantes serán más eficaces comparados con el uso único de baculovirus silvestres y controlarán, de manera específica, un número mayor de insectos lepidópteros, plaga que se alimenta de cultivos agrícolas como tomate, caña de azúcar, frijol, maíz, algodón y pastizales. En el caso del baculovirus AcP10.CrV1, la hipótesis se fundamenta en el estudio de Washburn *et al.*, (2000), quienes demostraron que la capacidad infecciosa del baculovirus silvestre (NPV de *A. californica*) sobre *M. sexta*, mejora significativamente si este insecto plaga también está parasitado por la avispa *C. congregata*. En este estudio, se observó que el baculovirus tuvo mayor capacidad de infección sobre este insecto plaga debido a la expresión del gen CrV1 del polidnavirus de *C. congregata*. El producto génico CrV1 afectó el sistema de defensa del insecto huésped, lo que produjo mayor susceptibilidad a la infección con el baculovirus.

A campo abierto existen, sin embargo, factores medioambientales que podrían afectar la acción de nuestros baculovirus recombinantes; y tales factores también afectan la acción de los baculovirus silvestres, así como de cualquier otro bioinsecticida. En este sentido, la cobertura con el bioinsecticida es el factor más importante. En varios estudios se ha demostrado que la mejor forma de aplicación de los baculovirus silvestres es mediante su rociamiento a ultra bajo volumen (UBV; Vivus Gold Helicoverpa Biocontrol, 2004). Esto se debe a que la aplicación a UBV ofrece mayor cobertura debido al notable número de gotas pequeñas combinada con la gran turbulencia generada por la aplicación aérea. Por tanto, se ha recomendado aplicar un baculovirus silvestre a UBV, usando aceite (D-C-Tron) como acarreador (Vivus Gold Helicoverpa

Biocontrol, 2004) y cuando se presenten las condiciones ambientales óptimas para obtener una buena cobertura. Esto se logra cuando se tiene una humedad relativa alta y temperaturas entre 25 y 35°C. Durante los meses cálidos de primavera-verano estas condiciones se presentan en las primeras horas de la mañana entre las 02:00 y las 08:00 hrs. Asimismo, se recomienda elaborar formulados con Calcofluor (M2R), el cual protege al baculovirus, recombinante o silvestre, de la luz ultravioleta (doctora Bryony Bonning, comunicación personal).

Existen también otros factores que podrían afectar la acción de nuestros baculovirus. Por ejemplo, sería necesario aplicarlo cuando el tamaño de las larvas sea pequeño. Las larvas de *Heliothis* menores de 7 mm de longitud ingieren más poliedros y mueren entre los dos y tres días post-infección con un baculovirus silvestre. Sin embargo, larvas más grandes (>13 mm) requieren de una dosis mayor del baculovirus y pueden sobrevivir hasta seis días (Vivus Gold Helicoverpa Biocontrol, 2004). El uso de sustancias que contienen azúcares como glucosa o fructosa (tales como "Amino feed" de Vivus Gold Helicoverpa Biocontrol, 2004; Jenkins y Gryzwacs, 2003) pueden mejorar la acción del baculovirus, ya sean silvestres o recombinantes. La mejor formulación de un baculovirus silvestre en contra de larvas *Heliothis* se logró con el siguiente contenido: 10% Amino feed, 2% aceite emulsificable. Por ejemplo, para aplicar cinco litros/hectárea del baculovirus mediante UVB, la mezcla sería de 0.5 litros del baculovirus + 1 litro de Amino + 3.5 litros de aceite D-C Tron como acarreador.

Los poliedros se disuelven en el ambiente alcalino del estómago de la larva, por lo que liberan las partículas virales. Por tanto, para proteger al baculovirus, se recomienda que el contenido presente un pH menor o igual de siete y se aplique tan pronto como se realice la mezcla para evitar la degradación del baculovirus en el tanque de rociado. Los baculovirus producen un control excelente en cultivos abiertos tales como sorgo, maíz, etc. Esto se debe a que se obtiene una buena cobertura de todas las plantas, permitiendo que un gran número de larvas ingieran el baculovirus. En cultivos más densos y en aquellos donde no se favorece una buena cobertura (tales como cultivos de algodón), se requiere de una mayor atención durante la aplicación del producto para asegurar una buena cobertura. Cuando el cultivo madura (con aparición de flores y frutos) se vuelve más denso y, por tanto, la cobertura con el baculovirus se reduce porque hay más sitios de protección para las larvas. Los baculovirus no pueden controlar las larvas que se alimentan dentro del fruto del algodón, los corazones de las lechugas, frutos del maíz, etcétera (Vivus Gold Helicoverpa Biocontrol, 2004).

Una estimación del costo de los baculovirus recombinantes sería de entre cinco y diez dólares/hectárea. Sin embargo, esto es sólo un costo estimado. La mayoría de

las formulaciones utilizadas en países en desarrollo son suspensiones simples de baculovirus silvestres sin purificar, pero una formulación comercial puede ser muy sofisticada, incluyendo sustancias fago-estimulantes y potenciadores, agentes estructurales y estabilizantes, dispersadores y adhesivos (Burges y Jones, 1998). Sin embargo, el proceso para producir baculovirus *in vivo* es conceptualmente muy simple y requiere de poca infraestructura. Por tanto, es necesario determinar el costo de los biopesticidas bajo diferentes formulaciones.

En general, se deben de tomar en cuenta otras consideraciones. Por ejemplo, las especificaciones del bioinsecticida deberían incluir la identidad y cantidad del ingrediente activo. Esto se expresa como porcentaje mínimo del producto técnico (v/v) o como poliedros/g en polvo seco o poliedros/ml en formulaciones líquidas que contienen los aditivos. Se recomienda especificar el porcentaje de ingrediente inerte, la viscosidad a una temperatura dada y el tamaño de la partícula, así como las condiciones de almacenamiento, el promedio de vida en anaquel a temperatura ambiente (aprox. 20°C) o el promedio de vida bajo otras condiciones (por ejemplo en refrigeración, en congelación, seco o liofilizado; Jenkins y Grzywacs, 2003).

Como puede apreciarse, el desarrollo, elaboración y evaluación de formulados de baculovirus silvestres y/o recombinantes que sean efectivos en condiciones de campo es un proceso amplio. Sin embargo, se ha demostrado que esto es factible incluso en países en vías de desarrollo, pues como mencionamos, el proceso para producir baculovirus *in vivo* es muy simple y requiere de poca infraestructura. Es necesario, por consiguiente, evaluar los baculovirus recombinantes en distintas formulaciones considerando las condiciones locales.

Se requiere, asimismo, que nuestros bioinsecticidas sean probados en varias especies de insectos plaga bajo condiciones de laboratorio, en pruebas de confinamiento y en campo abierto. Así, sugerimos evaluar el efecto de estos dos nuevos bioinsecticidas sobre seis especies de insectos plaga: *H. virescens*, *Spodoptera exigua*, *S. frugiperda*, *D. saccharalis*, *Helicoverpa (Heliothis) zea*, y *M. sexta*.

Conclusión y perspectivas

En resumen, el gen CrV1 del polidnavirus de *C. congregata* que causa apoptosis y afecta el sistema inmune de los insectos de la familia Lepidóptera ya se tiene identificado y caracterizado en nuestro laboratorio. Se encuentra en evaluación el baculovirus recombinante con el gen CrV1. El baculovirus recombinante (con el gen que expresa la proteasa catepsina L) que perfora la membrana basal facilitando el proceso de

infección del baculovirus fue desarrollado en el laboratorio de la doctora Bonning, y su efecto insecticida fue evaluado en *H. virescens*. El efecto individual o combinado de los baculovirus recombinantes (generación de una infección doble) sobre la fisiología de insectos plaga podría ser la reducción del periodo de tiempo entre infección y muerte de los mismos. Estos nuevos bioinsecticidas serán seguros, eficaces y específicos para eliminar insectos plaga que causan daño económico a la agricultura y son análogos a los insecticidas del tipo de los piretroides pero con mayores ventajas. Son específicos de ciertos insectos plaga, dejan intacta la fauna benéfica de insectos y son amigables con el medio ambiente y salud humana. Asimismo, es poco probable que estos baculovirus recombinantes generen la aparición de resistencia. El efecto de formulaciones de estos bioinsecticidas (único o combinando) sobre larvas de *H. virescens*, *D. saccharalis*, *Helicoverpa zea*, *Spodoptera exigua*, *S. frugiperda* y *M. sexta* en condiciones de laboratorio, en pruebas de confinamiento y en campo abierto aún no se ha determinado. Se requiere precisar el grado de susceptibilidad de estas especies a los nuevos bioinsecticidas bajo distintas formulaciones, dosificaciones y el rendimiento en campo.

Agradecimientos

El trabajo para el desarrollo del baculovirus recombinante con el gen CrV1 es una continuación de proyectos de investigación sobre secuenciación, identificación y caracterización de genes del polidnavirus en *C. congregata* y en otras especies del género *Cotesia*. Este material está basado en trabajo realizado gracias al financiamiento del Instituto México-Estados Unidos de la Universidad de California (UC MEXUS) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (Conacyt). Este proyecto también recibió apoyo del Instituto Politécnico Nacional (México, Secretaría de Investigación y Posgrado, proyectos núms.: 2005-327 y 2006-138). Doctor Mario A. Rodríguez-Pérez es becario de la COFAA, IPN.

Bibliografía

Adams, J.R.; McClintock, J.T. (1991), "Nuclear polyhedrosis viruses of insects", en Adams, J.R.; Bonami, J.R. (eds.), *Atlas of Invertebrate Viruses*, Boca Raton, Florida, CRC.

- Amaya, K.E.; Asgari, S.; Jung, R.; Hongskula, M.; Beckage, N.E. (2005), "Parasitization of *Manduca sexta* larvae by the wasp *Cotesia congregata* induces an impaired host immune response", *J. Insect Physiology*, 51: 505-512.
- Asgari, S.; Hellers, M.; Schmidt, O. (1996), "Host haemocyte inactivation by an insect parasitoid: transient expression of a polydnavirus gene", *J. General Virol.*, 77: 2653-2662.
- _____; Schmidt, O.; Theopold, U. (1997), "A polydnavirus-encoded protein of an endoparasitoid wasp is an immune suppressor", *J. General Virol.*, 78: 3061-3070.
- Beckage, N.E.; Gelman, D.B. (2004), "Wasp parasitoid disruption of host development: Implications for new biologically based strategies for insect control", *Ann. Rev. Entomol.*, 49: 299-330.
- Black, B.C.; Brennan, L.A.; Dierks, P.M.; Gard, I.E. (1997), "Commercialization of baculoviral insecticides", en Miller, L.K. (ed.), *The Baculoviruses*, Nueva York, Plenum.
- Burges, H.D.; Jones, K.A. (1998), "Formulation of bacteria viruses and protozoa to control insects", en Burges, H.D. (ed.), *Formulation of Microbial Biopesticides*, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- Cory, J.S. (2004), "Potential and risks of deploying transgenic entomopathogens", resumen en *International Congress of Entomology*, Brisbane, Australia.
- Desjardins, C.; Eisen, J.A.; Nene, V. (2005), "New evolutionary frontiers from unusual virus genomes", *Genome Biology*, 6: 212.
- Espagne, E.; Dupuy, C.; Huguet, E.; Cattolica, L.; Provost, B.; Martins, N.; Poire, M.; Periquet, G.; Drezen, J.M. (2004), "Genome sequence of a polydnavirus: insights into symbiotic virus evolution", *Science*, 306: 286-289.
- Harrison, R.L.; Bonning, B.C. (2000), "Genetic engineering of biological control for insects", en Rechcigl, J.E. y Rechcigl, N.A. (eds.), *Biological and Biotechnological Control of Insect Pests*, Boca Raton, Florida, CRC, Lewis Publishers.
- _____; Bonning, B.C. (2001), "Use of proteases to improve the insecticidal activity of baculoviruses", *Biol. Control.*, 20: 199-209.
- _____; Boughton, A.J.; Obrycki, J.J.; Bonning, B.C. (2004), "Recombinant baculovirus insecticide expressing a novel intrahemocoelic toxin", resumen en *International Congress of Entomology*, Brisbane, Australia.
- Inceoglu, A.B.; Kamita, S.G.; Hinton, A.C.; Huang, Q.; Severson, T.F.; Kang, K.; Hammock, B.D. (2001), "Recombinant baculoviruses for insect control", *Pest. Manag. Sci.*, 57: 981-987.
- Jenkins, N.E.; Grzywacz, D. (2003), "Towards the Standardization of Quality Control of Fungal and Viral Biocontrol Agents", en Lenteren, J.C. (ed.), *Quality Control*

- and Production of Biological Control Agents, Theory and Procedures*, CABI Publishing.
- King, L.A.; Possee, R.D. (1992), *The Baculovirus Expression System. A Laboratory Guide*, Chapman y Hall.
- Kroemer, J.A.; Webb, B.A. (2004), "Polydnavirus genes and genomes: emerging gene families and new insights into polydnavirus replication", *Ann. Rev. Entomol.*, 49: 431-456.
- Le, N.T.; Asgari, S.; Amaya, K.; Tan, F.F.; Beckage, N.E. (2003), "Persistence and expression of *Cotesia congregata* polydnavirus in host larvae of the tobacco hornworm", *J. Insect Physiol.*, 49: 533-543.
- Moscardi, F. (1999), "Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera", *Ann. Rev. Entomol.*, 44: 257-289.
- Possee, R.D. (1986), "Cell-surface expression of influenza virus haemagglutinin in insect cells using a baculovirus vector", *Virus Res.*, 5: 43-59.
- Rodríguez Pérez, M.A.; Beckage, N. (2006), "Estrategias co-evolutivas de la interacción entre parasitoides y polidnavirus (Co-evolutionary strategies of interaction between parasitoids and polydnaviruses)", *Rev. Latin. Microbiol.*, 48: 31-43.
- Smith-Johannsen, H.; Witkiewics, H.; Iatrou, K. (1986), "Infection of silkworm follicular cells with *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus", *J. Invertebr. Pathol.*, 48: 74-84.
- Van Beek, N.A.M.; Hughes, P.R. (1998), "The response time of insect larvae infected with recombinant baculoviruses", *J. Invertebr. Pathol.*, 72: 338-347.
- Vivus Gold *Helicoverpa* Biocontrol (2004), *Technical Manual*, Ag. Biotech Australia Pty Ltd.
- Washburn, J.O.; Haas-Stapleton, E.J.; Tan, F.F.; Beckage, N.E.; Volkam, L.E. (2000), "Co-infection of *Manduca sexta* larvae with polydnavirus from *Cotesia congregata* increases susceptibility to falca infection by *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus", *J. Ins. Phy.*, 46: 179-190.
- Webb, B.A. (1998), "Polydnavirus biology genome structure and evolution", en Ball, A. y Miller L.K. (eds.), *The Insect Viruses*, Nueva York, Plenum Press, pp. 105-139.
- Yurchenco, P.D.; O'Rear, J. (1993), "Supramolecular organization of basement membranes", en Rohrbach, D.H. y Timpl, R. (eds.), *Molecular and Cellular Aspects of Basement Membranes*, Nueva York, Academic Press.

El nopal *Opuntia ssp*: aprovechamiento integral de sus alimentos derivados y sus componentes funcionales

The Nopal *Opuntia ssp*: Integral Advantage of its Derived Foods and their Functional Components

Pérez-Quilantan, L. M.; Hurtado González, M.*

Resumen

El nopal es una planta de la familia de las cactáceas; la mayoría de éstas son originarias del continente americano. En México se encuentra una gran diversidad genética de esta planta, por lo cual se le considera como su país de origen. Su importancia es relevante en la agricultura, como alimento, en la industria farmacéutica y de fermentaciones. Son conocidas las diversas formas de consumo de esta especie; su fruto, aparte de ser comestible, tiene otros posibles usos, como la obtención de colorantes por medio de su cáscara; los nopalitos de los que se obtienen verdura, jarabes, jugos, etcétera. Actualmente, ha empezado a ser utilizado como materia prima para la elaboración de fibras dietéticas y recientes estudios han demostrado que el nopal también tiene aplicaciones potenciales en medicina. Por lo anterior, se presenta un análisis de los alimentos derivados y sus componentes funcionales como alternativa potencial de su aprovechamiento, tanto en forma de fruto, como de sus cladodios y los subproductos. Es a través de esta alternativa que se observa un futuro promisorio para el desarrollo de nuevos productos alimenticios y compuestos funcionales elaborados a partir de esta especie, lo que ayudará a darle un valor agregado a un cultivo que ocupa zonas de escaso valor agrícola.

* Universidad Autónoma de Tamaulipas, Blvd. Adolfo López Mateos, núm. 928, Ciudad Victoria, Tamaulipas. E-mail: lperez@uat.edu.mx

Abstract

The nopal is a plant of cactaceas family. The majority of these are native of the American continent. In Mexico, which is considered the country of origin, a great variety is found. It is very important in the agriculture and medicine industry. There's knowledge of the different ways this plant can be used, such as its fruit, which besides being edible, has other possible uses. For example, colorants, syrups, juices, etc. Nowadays it's being used for the elaboration of dietary fibers, and recent studies have shown that it has potential applications in medicine. Due to this, information about the functional components and potential alternative or its use is presented. We can see that there is a great future in the development of new products based on this plant, which will give a higher value to poor agricultural zones.

Introducción

Nopal es el nombre común que reciben las plantas del género *Opuntia*; este género pertenece a la familia de las cactáceas, originarias del continente americano y una de las familias más representativas de la flora de México, con aproximadamente 52 géneros y 850 especies. Debido esta diversidad de especies localizadas en su territorio, México es considerado como país de origen.

El cuidado especial del nopal por parte de las culturas prehispánicas, se debía a la crianza de la cochinilla, insecto que invade la penca y del cual se extrae la grana, uno de los colorantes orgánicos más preciados. Los *opuntias* determinaron en muchos casos la formación de asentamientos humanos, ya que en la época de fructificación muchas tribus emigraban a la región donde abundaban estas plantas y fijaban allí su residencia. La palabra nopal se deriva del náhuatl *nopalli*; y el fruto era llamado *nochtli*. En México existen algunos lugares en cuyo nombre aparece el prefijo *nochtli*, lo que indica que en estos sitios abunda o abundaba el nopal; tal es el caso de Nocheztlán (Nochixtlán), en el estado de Oaxaca, que significa “lugar donde abunda la grana”; Nochtepec, “cerro de tunas”; Xoconochco (Soconusco), “lugar de tunas agrias”, en el estado de Chiapas (Bravo-Hollis y Sánchez Mejorada, 1978).

El uso del nopal ha evolucionado de la utilización de nopaleras silvestres a la domesticación en huertos familiares, hasta llegar a la explotación intensiva en plantaciones comerciales.

La evidencia más antigua del uso del nopal se encontró en excavaciones realizadas en Tamaulipas y Tehuacán (Puebla) en las que se hallaron semillas y cáscara de tuna, así como fibras de pencas de nopal en el interior de cuevas, presuntamente

habitadas por el hombre hace 7 mil años aproximadamente (Bravo-Hollis y Sánchez Mejorada, 1991).

El uso de las cactáceas en México es muy variado y se remonta a la época prehispánica, pues su uso como alimento, medicina, materia prima y en ceremonias religiosas estaba muy extendido entre las diferentes culturas de nuestro país. El consumo de tallos y frutos como alimento humano es probablemente el uso más común que los antiguos pobladores de México dieran a estos vegetales. Las especies empleadas para el consumo humano pertenecen al género *Opuntia*, de las que se utilizan los cladodios tiernos, que son los brotes nuevos de los tallos aplanados, comúnmente conocidos como *nopalitos*, los cuales son incluidos tradicionalmente en la dieta de los mexicanos como una hortaliza. La *tuna* es su fruto de temporada y varía en forma y fisiología de acuerdo con la especie. En la actualidad se percibe un futuro promisorio para esta cactácea gracias a la diversidad en su utilización y aprovechamiento integral de sus componentes funcionales.

A continuación se presenta información sobre sus usos y componentes funcionales, así como la posibilidad de aprovechar la composición de la tuna, los nopales y otras cactáceas en la elaboración de nuevos alimentos.

Componentes funcionales

La principal función de la dieta alimenticia es aportar los elementos necesarios para satisfacer las necesidades nutricionales de las personas. Existen cada vez más pruebas científicas que apoyan la hipótesis de que ciertos alimentos, así como algunos de sus componentes, tienen efectos físicos y psicológicos benéficos, gracias al aporte de los nutrientes básicos. Las investigaciones se han centrado más en la identificación de componentes biológicamente activos en los alimentos que ofrezcan la posibilidad de mejorar las condiciones físicas y mentales, así como de reducir el riesgo de contraer enfermedades. Se ha demostrado que muchos productos alimenticios tradicionales como fruta, verdura, soya, granos enteros y leche, contienen componentes que pueden resultar positivos para la salud. Además, se están desarrollando nuevos alimentos que añaden o amplían estos componentes benéficos dadas las ventajas que suponen para la salud.

El concepto de *alimentos funcionales* nació en Japón. Durante los años ochenta, las autoridades sanitarias de ese país se dieron cuenta de que para controlar los gastos sanitarios (que aumentaban de igual manera que la esperanza de vida de la población), había que promover también una mejor calidad de vida. De esta forma

surgió un nuevo concepto de alimentos, desarrollados específicamente para mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades. Sin embargo, estos alimentos no han sido regulados por la legislación europea. Generalmente, se considera alimentos funcionales a aquellos consumidos dentro de una dieta normal y que contienen componentes biológicamente activos, los cuales ofrecen beneficios para la salud y reducen el riesgo de sufrir enfermedades. Destacan, por ejemplo, los que contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos o fibra; alimentos a los que se han añadido sustancias biológicamente activas, como antioxidantes; y los probióticos, que tienen cultivos vivos de microorganismos benéficos (Sloan, 2000; Ashwell, 2001). A continuación se presentan algunos componentes del nopal y la tuna que se consideran funcionales.

Fibra dietética. Los cladios del nopal, así como la cáscara de tuna, son una fuente importante de fibra, el contenido de fibra cruda aumenta con la edad del cladodio. La fibra está constituida por diferentes componentes resistentes a enzimas digestivos, según su solubilidad en agua, se le clasifica en soluble o insoluble.

Fibra insoluble. En el nopal, es una mezcla de celulosa, lignina y hemicelulosa remanente; el contenido de estas sustancias varía de acuerdo a la especie. La celulosa constituye el componente principal de la pared celular de las plantas superiores y es una fuente de glucosa inagotable que se recupera con la fotosíntesis; la lignina es una cadena de compuestos fenólicos y la hemicelulosa es un grupo de polisacáridos que también se encuentran en la pared celular (Badui, 1994).

La fibra insoluble se asocia con la capacidad de retención de agua, el intercambio iónico, la absorción de ácidos biliares, minerales, vitaminas y su interacción con la flora microbiana (Periago, 1993, citado por Sáenz, 2004).

Fibra soluble. Está constituida por gomas, mucílagos, sustancia pécticas y algo de hemicelulosas; estos componentes están asociados con la reducción de los niveles de glucosa y colesterol.

Cuando las cactáceas sufren algún daño físico comienzan exudar gomas. A la goma exudada por algunas especies de *Opuntia* se le conoce comúnmente como goma de nopal, la cual está compuesta de ácido D-galacturónico, L-arabiosa, D-xilosa, D-galactosa y L-ramnosa (Bravo-Hollis y Sánchez Mejorada, 1978).

Los mucílagos son sustancias análogas a las gomas. El mucílago del nopal es un polisacárido complejo que contiene arabinosa, galactosa, xilosa, ácido galacturónico y ramnosa. Forman dispersiones en contacto con el agua y la embeben con facilidad. Su función principal es la retención del agua en las cactáceas y éstas las contienen en las células vesiculares de los parénquimas.

Los mucílagos de nopal, por su poder viscosante, podrían reemplazar a algunos hidrocoloides de amplio uso en la actualidad, sin embargo, tienen una limitación en los procesos de extracción que se han aplicado, pues se han obtenido bajos rendimientos (Sáenz, 2004).

Debido a su alto valor comercial en la industria de la confitería, la pectina se extrae de frutos de cactáceas como pitahayas y tunas; existen diferencias en los contenidos dependiendo de la especie. *Opuntia robusta* contiene un alto contenido de pectina total, protopectina y pectina soluble en agua en comparación con otras especies, por lo que ésta es la que representa mayores ventajas si se desea extraer pectina.

Contenido de fibra cruda en especies de *Opuntia*

<i>Especie</i>	<i>% Contenido</i>
<i>O. ficus indica</i>	14.37
<i>O. ficus indica</i>	37.34
<i>O. hyptiacantha</i>	13.13
<i>O. tomentosa</i>	11.75
<i>O. megacantha</i>	19.10
<i>O. robusta</i>	21.21

Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos se forman durante los procesos metabólicos de las cactáceas; el más abundante es el ácido oxálico, al cual se le encuentra en forma de sal de calcio. El oxalato de calcio, una vez formado, no se disuelve, por lo que se va acumulando en los tallos de las cactáceas hasta llegar a constituir 85% de las cenizas de nopales de mayor edad; el calcio tiene como función principal precipitar el ácido oxálico, de tal manera que constituye un factor de protección para la planta contra el daño físico.

El ácido cítrico es otro ácido orgánico que se encuentra en forma libre en las cactáceas; éste se cuenta en un rango de 1.2 a 3% (Bravo-Hollis y Sánchez Mejorada, 1978).

Colorantes

La clorofila es el principal pigmento de las cactáceas; se localiza en el parénquima clorofiliano debajo de la epidermis de hojas y tallos.

Otros pigmentos encontrados en el nopal son los carotenoides, los cuales abarcan dos grupos: carotenos y xantofilas. La carotina o β -caroteno es el principal constituyente carotenoide de hojas y tallos de las cactáceas (Bravo-Hollins y Sánchez Mejorada, 1978).

También existen las antocianinas, betaxantinas, betaninas, betacianos y flavonol (Granados y Castañeda, 1996).

Algunas variedades de nopal tunero producen frutos de color púrpura que contienen betalainas, pigmentos solubles en agua derivados del ácido betalámico, cuya estabilidad se ve afectada por el pH, siendo más estables a pH entre 4.0 y 6.0. Están formadas por dos grupos principales: las betacianinas (rojas) y las betaxantinas (amarillas). Entre las betacianinas se encuentra la betanina, que suele ser el mayor responsable del color rojo (Sáenz, 2004).

Edulcorantes

El alto contenido de azúcares en los frutos de las cactáceas hace que sean atractivos para la obtención de un edulcorante. Se ha encontrado que el jugo de tuna presenta un contenido de 14-17% de sólidos solubles. El jugo de *Opuntia cardona* contiene fructosa, glucosa, maltosa y sacarosa.

Otros

El nopal es una fuente importante de nutrientes como aminoácidos, minerales y vitaminas. Se han identificado 17 aminoácidos en *Opuntia ficus indica*; entre las vitaminas se encuentran el ácido ascórbico, tiamina, riboflavina y niacina, destacando en cantidad la vitamina C, con 16 mg/100g.

Los minerales que destacan por su contenido en el nopal son: calcio, fósforo y hierro.

Alimentos derivados

Además del uso del nopal en forma de verdura (cladodios) y del consumo directo de su fruto fresco, son varias las formas en las que pueden obtenerse alimentos deriva-

dos de éste, como una alternativa para proporcionar un valor agregado a la materia prima producida en el campo. Lógicamente, las dos partes aprovechables del nopal presentan características distintas, por lo que los procesos tecnológicos difieren aunque permiten obtener una variedad de productos como los que se mencionan a continuación.

De los cladodios, existen alternativas de proceso como la elaboración en encurtidos, salmuera, mermeladas y la obtención de harina para la elaboración de tortillas, así como otros productos, por ejemplo, galletas, cremas y postres.

De la tuna se podrían obtener jugos, néctares, láminas deshidratadas, fruta enlatada, fruta congelada, mermeladas, almíbar, geles, cristalizados y algunas bebidas fermentadas, así como queso, el cual se elabora en forma artesanal.

Bibliografía

- Ashwell, M. (2001), "Functional Foods: a simple scheme for establishing the scientific basis for all claims", *Public Health Nutrition*, 4: 859-863.
- Badui, S. (1994), *Química de los alimentos*, México, Alambra Mexicana.
- Bravo-Hollis, H.; Sánchez Mejorada, H. (1978), *Las cactáceas de México*, vol. 1, México, UNAM.
- _____; Sánchez Mejorada, H. (1991), *Las cactáceas de México*, vol. 3, México, UNAM.
- Granados, D.; Castañeda, A. D. (1996), *El Nopal*, México, Trillas.
- Sáenz, C. (2004), "Alimentos derivados de *Opuntia ssp*", en Esparza, G.; Váldez, R y Méndez, S. (eds.), *El Nopal. Tópicos de actualidad*, México, Universidad Autónoma de Chapingo/Colegio de Posgraduados.
- Sloan, E. (2000), "The top ten functional food", *Food Tech.*, 54: 33-62.

**Aprovechamiento de residuos vitivinícolas
contaminantes para la obtención de nutrientes
fermentativos económicos y aditivos alimentarios**
*Utilization of Viticulture Pollutant Wastes for Obtaining
Economic Fermentative Nutrients and Food Additives*

Domínguez González, J.M.;¹ De la Torre Sayáns, N.

Resumen

La viticultura es un subsector de gran importancia en numerosos países y que genera grandes cantidades de residuos de carácter lignocelulósico (como las maderas de poda) y biomasa microbiana (lías), que pueden llegar a ser muy nocivos para el medio ambiente y la salud humana.

Las maderas de poda de las cepas (principalmente sarmiento), son un residuo agroindustrial que generalmente se quema en el campo, causando problemas medioambientales y ecológicos, y representa un riesgo para la salud humana debido a la formación de compuestos tóxicos durante la combustión de la lignina. Las levaduras proliferadas durante la fermentación del mosto en vino mueren cuando se terminan los nutrientes, depositándose en el fondo de las cubas junto con otros microorganismos, sólidos en suspensión, materias orgánicas y coloides, constituyendo la fracción conocida como lías.

Las maderas de poda tienen carácter lignocelulósico, es decir, están formadas mayoritariamente por celulosa, hemicelulosas y lignina. A través de etapas químicas y enzimáticas se pueden fraccionar para obtener disoluciones de azúcares, que tras ser suplementadas con nutrientes, se pueden emplear como medios fermentativos para la obtención de aditivos alimentarios como ácido láctico.

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

Los nutrientes empleados tradicionalmente en los medios fermentativos resultan muy costosos para desarrollar el proceso a escala industrial, por lo que la búsqueda de nutrientes alternativos que sean económicamente competitivos es particularmente interesante. Dado que las lías son básicamente levaduras muertas, esta fracción residual constituye una fuente potencial de nutrientes. En este trabajo se desarrolló una tecnología rentable para el aprovechamiento de lías como nutrientes económicos y para la formulación de medios fermentativos a partir de las maderas de poda. Bajo las mejores condiciones operacionales ensayadas se llegaron a producir 21.8 g/L de ácido láctico a partir de los azúcares hemicelulósicos empleando la cepa *L. pentosus* ($Q_p = 0.844$ g/L·h; $Y_{p/s} = 0.77$ g/g) y 21.8 g/L de ácido láctico a partir de la fracción celulósica empleando la cepa *L. rhamnosus* ($Q_p = 0.360$ g/L·h).

Abstract

Viticulture is a subsector of great importance in many countries and generates a huge amount of residues with lignocellulosic nature (as trimmings) and microbial biomass (lees), that should be managed to avoid harmful effects on both environment and human health.

Agroindustrial wastes such as prunings of the vine-stocks (principally vineshoots) are usually burned in the field, causing environmental and ecological problems, as well as a risk for the human health owing to the formation of toxic compounds from lignin combustion.

Yeasts proliferated during the fermentation of the must into wine die when nutrients are depleted and settle at the bottom of the barrels together with other microorganisms, suspended solids, colloids and organic matter to give the lees fraction.

The lignocellulosic prunings are mainly made up of cellulose, hemicelluloses and lignin. Upon chemical and/or enzymatic stages, they can be fractionated to obtain sugar solutions, which (after nutrient supplementation) can be used as fermentative media for the production of food additives like lactic acid.

Nutrients traditionally used in the fermentative media turn out to be very expensive to carry out the process at an industrial scale. Because of this, the search for alternative, financially competitive nutrient sources is particularly interesting. Considering that lees are basically death yeasts, this waste fraction represents a potential source of nutrients.

The main purpose of this project was to develop a profitable technology for the benefit of lees as economic nutrients and prunings as fermentation media suitable for the manufacture of food additives. Under the best operational conditions assayed 21.8 g/L of lactic acid were produced from the hemicelulósicos sugars using the strain *L. pentosus* ($Q_p = 0.844$ g/L·h; $Y_{p/s} = 0.77$ g/g) and 21.8 g/L of lactic acid were also produced from the cellulósica fraction using the strain *L. rhamnosus* ($Q_p = 0.360$ g/L·h).

Introducción

La elaboración de vino es una actividad con creciente mercado internacional, ya que continuamente se están abriendo nuevos mercados, por ejemplo el sudeste asiático. Su importancia estriba en que es una de las actividades agrícolas más significativas en países como España o México, pues llega a representar 10% de la producción agrícola total (Bustos *et al.*, 2004a).

Por vinificación se entiende el conjunto de etapas involucradas en la elaboración de vino a partir de uvas. Esta actividad genera diferentes residuos, como se puede ver en el proceso que se muestra en la figura 1 (Bustos *et al.*, 2004b).

La vinificación es una actividad estacional. Entre el 60 y 70% de las corrientes líquidas generadas se obtienen tres meses después de la vendimia. Los principales residuos son:

- Restos vegetales procedentes del despalillado.
- Fangos obtenidos durante la clarificación.
- Bagazo de prensa.
- Lías obtenidas en diferentes trasiegos.

Se estima que aproximadamente 93% de estos residuos son maderas de poda (principalmente sarmientos) (Bustos *et al.*, 2004c). Este residuo generalmente es quemado en el campo para prevenir la proliferación de fitopatógenos, lo que provoca problemas medioambientales y ecológicos, que resulta en riesgo para la salud humana, ya que cuando se degrada por calor la lignina, uno de los principales componentes de estos residuos agroindustriales produce compuestos hidrocarbonados policíclicos aromáticos tales como benzopireno, hidroquinona y naftaleno, estos compuestos pueden inhibir la síntesis de ADN y favorecer la aparición de tumores cancerígenos en el hígado, pulmones y laringe en animales y humanos (Kjallstrand *et al.*, 1998).

Otro residuo importante generado por las actividades vitivinícolas son las lías, que a diferencia de las de poda se producen en las propias bodegas durante el proceso de elaboración del vino. En este caso, a medida que transcurre la transformación del mosto en vino, las levaduras muertas se van depositando en el fondo de las cubas o toneles. Junto con las levaduras se depositan también otros organismos (principalmente bacterias), residuos sólidos, materias orgánicas, etcétera, originándose un depósito de composición heterogénea que generalmente no es conveniente que permanezca en contacto con el vino, ya que le podría transmitir sabores indeseables en un corto periodo de tiempo, como consecuencia de la putrefacción de los cadáveres

de las levaduras, desprendimientos olorosos de las materias orgánicas, etc. Para separarlo del vino, se requiere un trasiego o cambio del vino de un recipiente a otro. El número de trasiegos que se aplican a un vino varía dependiendo del tipo de vino, tipo de envase, vejez del vino, porcentaje de lías, etcétera.

Las lías procedentes de la fermentación pueden ser destiladas en bodega para recuperar alcoholes y sustancias aromáticas, resultando lías empobrecidas en estos compuestos. La composición de las lías varía en función de si se destilaron o no y del trasiego del que proceden. El porcentaje total de lías se estima en 2% de kilogramos de uvas empleadas. En la actualidad, salvo en casos muy particulares en que el vino se pone en contacto con un pequeño porcentaje de lías (por ejemplo, en la crianza sobre lías de vinos blancos fermentados en barrica), éstas se procesan con otros lodos residuales en depuradoras para tratar de disminuir en la medida de lo posible su impacto ecológico.

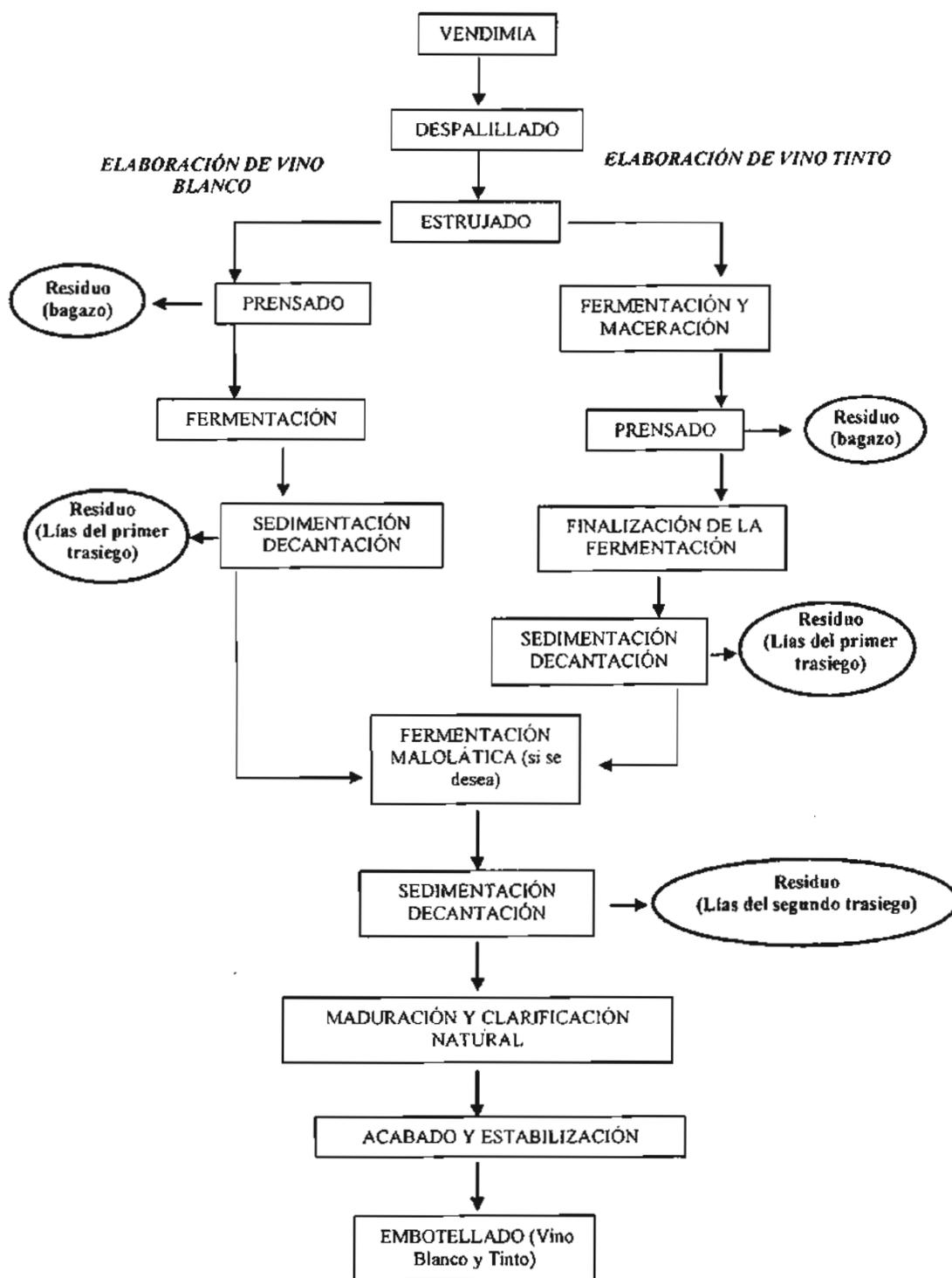
Las maderas de poda son residuos agroindustriales de carácter lignocelulósico, y como tales están compuestas principalmente por tres fracciones: celulosa, hemicelulosas y lignina. La utilización de las fracciones polisacáridas de estos materiales lignocelulósicos (celulosa y hemicelulosas) comienza con una etapa de prehidrólisis, en la que se transforman los polisacáridos hemicelulósicos (xilano, manano, galactano) en sus correspondientes monosacáridos (xilosa, manosa, galactosa). Ya que el xilano es el principal polímero hemicelulósicos de estos materiales, la xilosa es el principal azúcar presente en los licores obtenidos.

Una vez acondicionados los hidrolizados, añadiéndoles los nutrientes necesarios, se realiza la bioconversión de los azúcares en ácido láctico empleando la cepa *L. pensosus* (Bustos *et al.*, 2004c). El ácido láctico es un producto de creciente demanda principalmente en la industria alimentaria, como acidulante, aromatizante y conservante, debido a su suave sabor ácido que no enmascara los sabores de los alimentos, por lo que se emplea para prolongar la vida de leche, carne, huevos, mariscos, etcétera.

Otras aplicaciones sobresalientes del ácido láctico fuera de la industria alimentaria se dan en la producción de cosméticos, fármacos y producción de plásticos polilácticos biodegradables. El ácido láctico se puede obtener por vía química o por vía biotecnológica. En los últimos años la producción biotecnológica ha aumentado debido a la preferencia de los consumidores por los productos obtenidos de forma natural; además, a través de la vía fermentativa se produce exclusivamente uno de sus isómeros, el L, que participa de modo natural en el metabolismo humano, al absorberse en el intestino más rápidamente que el isómero D (Moldes *et al.*, 2002).

Tras la eliminación selectiva de las hemicelulosas (causada por la prehidrólisis), se obtiene un residuo sólido rico en celulosa y lignina. Con el fin de convertir este residuo

Figura 1



en un sustrato apto para la hidrólisis enzimática que nos permita la obtención de disoluciones de glucosa, se debe realizar una etapa de deslignificación, ya que la lignina forma una barrera física que dificulta el acceso de los enzimas a la celulosa. La eliminación de la lignina por tratamientos alcalinos conlleva ventajas colaterales, ya que provoca una serie de alteraciones estructurales de las fibras de celulosa tales como disminución de la cristalinidad, aumento de la superficie específica y disminución del grado de polimerización, que implican una mejor susceptibilidad hacia la hidrólisis enzimática (Moldes *et al.*, 2002). La disolución de glucosa obtenida tras la hidrólisis enzimática de la celulosa también se puede fermentar a ácido láctico empleando la cepa *L. rhamnosus* (Bustos *et al.*, 2005).

Para la obtención biotecnológica de ácido láctico a partir de un residuo lignocelulósico es necesario hacer una hidrólisis enzimática de celulosa a glucosa y posterior fermentación de las disoluciones de glucosa a ácido láctico. Cuando las condiciones de operación de la hidrólisis enzimática y fermentación (principalmente pH y temperatura) son compatibles, la hidrólisis enzimática se puede realizar conjuntamente con la fermentación en un mismo recipiente, denominándose este proceso SSF (siglas en inglés de sacarificación y fermentación simultáneas), aumentando así la productividad y rendimiento. En la bibliografía se recogen algunos procesos de SSF con bacterias lácticas a partir de distintos residuos celulósicos (Roy *et al.*, 2001; Sreenath *et al.*, 2001). Además, el ácido láctico se puede obtener por hongos como el *Rizhopus oryzae* (Zhou *et al.*, 1999); pero éstos presentan el inconveniente de que sus cinéticas de fermentación y rendimientos son comparativamente reducidos, limitando su utilización. Una vez obtenido, el ácido láctico puede ser recuperado del medio de fermentación utilizando resinas de intercambio iónico (Moldes *et al.*, 2001).

A pesar de las ventajas que presentan los productos biotecnológicos, las tecnologías de fermentación deben ser competitivas en costes con la síntesis química. En las fermentaciones microbiológicas, el coste del medio fermentativo puede representar 30% del total. La mayoría de los estudios sobre producción de ácido láctico fueron realizados en medios con nutrientes muy caros tales como extracto de levadura, extracto de malta y peptona, los cuales no son económicamente viables. En este contexto, la búsqueda de medios alternativos más baratos tiene un obvio interés económico.

Durante los procesos fermentativos con bacterias lácticas se ha probado una gran variedad de fuentes de nitrógeno como medio fermentativo, pero en ningún caso se consiguieron concentraciones tan elevadas como aquellas obtenidas con extracto de levaduras (Nancib *et al.*, 2001). El extracto de levadura es un concentrado obtenido

a partir de la parte soluble de las células de levadura, ya que éstas contienen una serie de componentes estructurales entre los que se han identificado largas fracciones de glucanos, mananos y proteínas. Dicho extracto se puede utilizar como suplemento nutricional en fermentaciones. Las principales contribuciones del extracto de levadura son las bases púricas y pirimídicas, así como las vitaminas del complejo B. Dado que las bacterias ácido lácticas tienen limitada capacidad para sintetizar vitaminas B y aminoácidos, el extracto de levadura se utiliza a menudo para suplir estos factores (Hofvendahl y Hahn-Hagerdal, 2000).

Las proteínas que contienen las levaduras se encuentran dentro de la célula, y generalmente no pueden ser secretadas al medio a no ser que la propia levadura presente enzimas endógenos que induzcan la autólisis. Por tanto, se debe recurrir a distintos métodos de rotura celular, o bien a la liberación de determinados productos (permeabilización). Las ventajas e inconvenientes de la utilización de uno u otro son considerables, por lo que su uso depende de la finalidad del producto a obtener. Con la rotura celular todos los componentes intracelulares son eliminados al medio, con lo que se obtiene una compleja mezcla de proteínas, ácidos nucleicos y fragmentos celulares, que podrían complicar la recuperación de algún producto de interés. Otro inconveniente es que la liberación de los ácidos nucleicos al medio debido a la rotura celular puede provocar un considerable incremento en la viscosidad del medio.

La autólisis es el método de ruptura celular más empleado en la obtención de extracto de levadura. En él, las levaduras se rompen por acción de sus enzimas endógenos. El proceso de autólisis puede iniciarse a una temperatura controlada o choque osmótico, que causa la muerte celular sin que se hayan inactivado sus enzimas endógenos. Por tanto, temperatura, pH y duración de la autólisis son factores decisivos para la optimización de un tratamiento de este tipo. Diversos estudios bibliográficos han considerado el empleo de levaduras autolisadas como nutrientes del medio fermentativo, por ejemplo en la fermentación de trigo (Jones y Ingledew, 1994). Además, se ha utilizado la levadura procedente de los procesos de producción de cerveza como suplemento para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* en suero (Selmer-Olsen y Soerhaug, 1998) o *Bacillus thuringiensis kurstaki* (Saksinchai *et al.*, 2001). La obtención de ácido láctico utilizando autolisados de levadura como suplemento nutricional ha sido también considerado (Amrane, 2000), por lo que resulta atractiva la hipótesis de emplear las lías procedentes de la fermentación del vino, tras las etapas de acondicionamiento necesarias, como nutrientes económicos en aquellos procesos fermentativos que involucren nutrientes de coste elevado, con la ventaja adicional de eliminar una fuente contaminante, con las ventajas competitivas y de imagen de las empresas involucradas.

La idea de este trabajo surgió a partir de una necesidad concreta de un grupo de empresas vitivinícolas por aprovechar unos residuos perjudiciales para el medio ambiente: maderas de podas y lías. La cercanía de las industrias y la Universidad, y sobre todo la experiencia del grupo solicitante en el procesamiento de otros materiales lignocelulósicos para la obtención de aditivos alimentarios, dándoles de este modo un elevado valor añadido, han hecho posible los contactos y la búsqueda de soluciones a este problema.

Metodología y plan de trabajo

Recogida de la materia prima y acondicionamiento para conservación

Tanto maderas de poda como lías fueron suministradas por la empresa Cooperativa Vitivinícola do Ribeiro, Ourense, España. Las maderas de poda están disponibles alrededor de noviembre-diciembre, dependiendo de la época en que se efectúe la poda, mientras que las lías están disponibles principalmente entre noviembre y enero del año siguiente. Se prevé tomar muestra durante tres años para verificar la posible variación en la composición y para disponer de nueva materia prima.

Las maderas de poda, luego de ser secadas a temperatura ambiente, se almacenaron tras una serie de etapas: molienda, tamizado y homogeneización con el fin de obtener un material de tamaño y composición uniforme (tamaño de partícula inferior a 8 mm). Las lías se guardaron por congelación a -96°C .

Caracterización de la materia prima

Determinación de la humedad de la madera de poda y lías. Con el objetivo de poder referir los datos de los diferentes lotes a una base fiable que permita establecer comparaciones directas, los resultados se expresaron en función del peso del material seco al horno. Para su determinación se colocaron dos vasos de precipitados en una estufa a 105°C durante al menos 6 horas. A continuación se trasladaron a un desecador que contenía gel de sílice, se dejaron enfriar y se determinó su peso. Posteriormente se pesó dentro del vaso una cantidad aproximada de 1g de muestra y

se introdujo otra vez en la estufa a 105°C. Después de 48 horas se retiró al desecador, donde se dejó enfriar y se pesó.

Determinación de polisacáridos y lignina. La determinación del contenido de polisacáridos y lignina en las maderas de poda se realiza a través de una hidrólisis ácida cuantitativa en dos etapas (Vázquez *et al.*, 1991).

Determinación de azúcares por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE). Para aplicar este tipo de análisis a las muestras, se centrifugan a 4 500 rpm durante 15 minutos, obteniéndose un sobrenadante en el que están disueltas las sustancias a determinar y un precipitado que se descarta. El sobrenadante se filtra a través de una membrana de 0.22 µm de tamaño de poro consiguiendo así las condiciones adecuadas para realizar el análisis. Este tipo de determinación necesita de un patrón que contenga una concentración conocida (1g/L) de los componentes que se quieren analizar.

La Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE) permite un análisis preciso, rápido, específico y reproducible de los azúcares presentes: glucosa, xilosa, arabinosa, etc. A continuación se describen las características del equipo a usar, así como las condiciones de trabajo.

a) *Especificaciones del equipo:* cromatógrafo líquido de alta eficacia Agilent 1100 con detector diferencial de índice de refracción Agilent 1047A, termostato, columna Interaction Ion-300 y Software Hichemstation A.07.01.

b) *Condiciones de operación utilizadas:*

Régimen de elución: isocrático.

Caudal de fase móvil: 0.4 mL/min.

Composición de fase móvil: disolución de H₂SO₄ 0.007M.

Temperatura de las columnas: 65°C.

Volumen de inyección: 10 mL.

Determinación de la composición de las lías. Los compuestos orgánicos en las lías (glucosa, etanol, ácido láctico y acético) se analizaron por CLAE.

Los porcentajes de nitrógeno y carbón se obtuvieron usando un Analizador Elemental Flash Thermo Finningan 1112 series, San José, CA (EU).

Cu, Mg, Fe, Mn, Ca, Al y Zn se analizaron en cenizas usando un Espectrofotómetro de Absorción Atómica 220 Fast Sequential, VARIAN, Palo Alto, CA (EU). Previamente, se digirieron 0.15 g de cenizas con 5 mL HNO₃ 65%, 1 mL H₂O₂ 30% y 0.5 mL HF 40% en Microondas Labstation mls 1200 mega, MILESTONE, Bergamo (Italia).

Procesamiento químico de las maderas de poda

Etapa de prehidrólisis ácida. La madera de poda se someterá en autoclave (Sterilclav-70, Trade Raypa) a tratamientos térmicos en presencia del catalizador H_2SO_4 a $130^\circ C$ variando la concentración de catalizador (1 a 5%), el tiempo de contacto (0 a 180 min.) y la relación líquido/sólido seco (8 g/g). Posteriormente se filtró para separar la fase sólida (conteniendo la fracción celulósica y la lignina), de la fase líquida (en donde estarán los azúcares hemicelulósicos en disolución).

Con este estudio se pretende optimizar las condiciones de prehidrólisis con el objetivo de obtener disoluciones con la mayor cantidad posible de xilosa, y la menor concentración posible de compuestos inhibidores (ácido acético, furfural, HMF, et- cétera).

Fase líquida: en ésta se obtienen unos licores que se neutralizan con $CaCO_3$ hasta un pH final de 6.3 dando como resultado un precipitado de $CaSO_4$ que se eliminará por filtración. Su composición se determinará por CLAE; además de los azúcares, se determinará la concentración de ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF).

Fase sólida: se procede a su lavado y secado al aire para una posterior caracterización.

Deslignificación del residuo sólido obtenido tras la etapa de hidrólisis. Después de secar el material sólido se trató en autoclave con soluciones que contenían 4-12% de NaOH a $50-130^\circ C$ durante 30-120 min. La relación líquido/sólido se fijó en 10 g/g. Al final de los tratamientos, los residuos sólidos se separaron por filtración, se lavaron con agua, se secaron con aire y se analizaron, como se describió para los materiales crudos.

Fermentación del hidrolizado hemicelulósico

Microorganismo. Se empleó la cepa *Lactobacillus pentosus* CECT-4023T (ATCC-8041) obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España). La cepa se creció en placas usando el medio completo propuesto por Mercier y colaboradores (1992), que contiene 20 g glucosa/L, 5 g extracto de levadura/L, 10 g peptona/L, 5 g acetato sódico/L, 2 g citrato sódico/L, 2 g K_2HPO_4 /L, 0.58 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ /L, 0.12 g $MnSO_4 \cdot H_2O$ /L, 0.05 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ /L y 20 g agar/L a $31^\circ C$ durante 24 horas. Los inóculos se prepararon por solubilización de células a partir de platos con 5 mL de agua estéril. La biomasa en los inóculos se midió por densidad óptica a 600 nm y se ajustó por dilución con agua hasta alcanzar una concentración en el inóculo de 4.0 g/L.

Fermentación a ácido láctico. Los hidrolizados seleccionados para fermentar se neutralizaron con CaCO_3 hasta obtener un pH final de 6.5, y el precipitado de CaSO_4 se separó del sobrenadante por filtración. Los licores clarificados se suplementaron con 10 g de extracto de levadura/L y 10 g de *corn steep liquor*/L, se esterilizaron y se emplearon directamente como medios de fermentación. Los experimentos se desarrollaron en frascos Erlenmeyer de 250 mL *flasks* con un volumen final de 100 mL. Se añadieron 30 g de carbonato cálcico/L para neutralizar el ácido láctico producido. Las fermentaciones se hicieron en agitadores orbitales a 150 rpm a 31°C. Se tomaron 2 mL de muestra a determinados tiempos de fermentación y se centrifugaron a 6 000 rpm. El líquido sobrenadante se almacenó para analizar la composición de glucosa, xilosa, ácido acético y ácido láctico.

Sacarificación y fermentación simultánea del hidrolizado celulósico: (SSF)

Microorganismo. Se empleó la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CECT-288 obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España). La cepa se creció en placas usando el medio completo propuesto por Mercier y colaboradores (1992).

Procesos fermentativos para la obtención de ácido láctico. Los experimentos de SSF se realizaron en frascos Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de volumen final consistente en una relación líquido/sólido de 30 g de líquido por g de madera de poda tratada y 2 g de CaCO_3 a fin de neutralizar el ácido láctico. Los nutrientes que se emplearon durante la SSF fueron los propuestos por Mercier y colaboradores (1992), o 20 g de lías/L procedentes de la elaboración del vino blanco. Tras la esterilización, se añadió una mezcla de celulasa con una relación enzima/sustrato de 28 UPF/g y 10 mL de inóculo a fin de alcanzar una concentración de biomasa de 0.15 g de células secas de *L. rhamnosus*/L. Las SSF se hicieron a 45°C y 150 rpm durante 72 horas.

Resultados y discusión

Caracterización de las lías

Contenido en sólidos, cenizas, nitrógeno y carbono. El contenido en sólidos, cenizas, nitrógeno y carbono están recogidos en la tabla 1. Nitrógeno y carbono fueron analizados a partir de la fracción sólida de las lías, y las cenizas se determinaron por incineración de dicha fracción sólida. Como se observa en la tabla 1, el contenido en sólidos es mayor en las lías procedentes del primer trasiego que en las del segundo,

porque las primeras contienen una cantidad mayor de restos vegetales y tierra. La excepción la encontramos en las lías de vino tinto destiladas centrifugadas, en las que el porcentaje en sólidos encontrado fue mucho mayor a las demás (44.65%), esto se debe a la operación de centrifugado realizada en bodega, mediante la cual se concentró la fracción sólida.

Tabla 1. Porcentaje de sólidos de las lías y porcentaje en la fracción sólida de cenizas, carbono y nitrógeno (Bustos *et al.*, 2004a)

	% Sólidos	% Ceniza	% N	% C
Lías vino de prensa	19.9	8.2	2.61	36.84
Lías vino blanco 1er. trasiego sin destilar	34.2	28.1	2.02	31.57
Lías vino blanco 2° trasiego sin destilar	31.1	11.7	3.07	34.62
Lías vino blanco destiladas	17.2	23.4	1.97	31.06
Lías vino tinto 1er. trasiego sin destilar	16.7	6.1	2.88	43.86
Lías vino tinto 2° trasiego sin destilar	10.7	10.8	3.28	40.72
Lías vino tinto destiladas centrifugadas	44.7	7.9	3.12	31.85
Lías tinto vino destiladas	3.3	16.9	2.06	37.36

El porcentaje de cenizas determinado a partir de la fracción sólida comprendió un rango entre 6.073-28.119%.

El rango de porcentaje en nitrógeno encontrado en las lías utilizadas en este proceso es 1.97-3.28%, y para carbono es de 31.06-43.86%.

El contenido de carbono y nitrógeno es significativamente más bajo que el recogido por Rivas y colaboradores (2003) para levadura *Debaryomyces hansenii* procedente de la producción de xilitol (42.2-46.2 y 5.7-6.3% respectivamente), la cual también ha sido utilizada como fuente nutritiva de bajo coste para la producción de ácido láctico. Ziegler (1990) encontró valores de nitrógeno en lías alrededor de 3-6%.

Contenido en compuestos orgánicos. Los compuestos orgánicos analizados se muestran en la tabla 2. La concentración de glucosa es muy baja, menor de 1.4 g/L en todos los casos ensayados, lo que indica que los azúcares fueron consumidos durante la fermentación y transformados a etanol.

El etanol aparece en concentraciones superiores a 55 g/L en las lías no destiladas, y en las destiladas en concentraciones inferiores a 9 g/L, estas diferencias son lógicas, ya que en la destilación se retira el etanol para la obtención de alcohol vínico.

Las concentraciones de ácido láctico son particularmente elevadas en las lías procedentes del vino tinto de segundo trasiego sin destilar y destiladas, seguramente debido

a que este vino produce la fermentación maloláctica, durante la cual el ácido málico es descarboxilado a ácido láctico principalmente por el *Oenococcus oeni* (Moreno-Arribas y Lonvaud-Funel, 2000), lo que provoca una disminución de la acidez del vino confiriendo estabilidad y características organolépticas apropiadas para el vino tinto. La velocidad a la que se produce la fermentación maloláctica y, consecuentemente la cantidad final de ácido láctico, está relacionada con la cantidad de compuestos fenólicos tales como: ácido gálico, ácido caféico, ácido ferúlico, etcétera (Minarik, 2002).

Tabla 2. Concentración de compuestos orgánicos (Bustos *et al.*, 2004a)

	Glucosa (g/L)	Á. Láctico (g/L)	Á. Acético (g/L)	Etanol (g/L)
Lías vino de prensa	0.4	4.3	1.6	61.9
Lías vino blanco 1er. trasiego sin destilar	1.4	5.0	2.4	80.9
Lías vino blanco 2º trasiego sin destilar	0.0	2.2	1.6	55.8
Lías vino blanco destiladas	0.0	5.90	2.3	8.6
Lías vino tinto 1er. trasiego sin destilar	0.0	3.30	1.3	74.5
Lías vino tinto 2º trasiego sin destilar	0.0	11.4	6.7	63.5
Lías vino tinto destiladas centrifugadas	0.0	21.2	10.8	5.0
Lías tinto vino destiladas	0.0	2.4	11.4	2.2

Se observó un comportamiento similar para el ácido acético, con valores superiores en las lías procedentes del vino tinto. Las bacterias productoras de ácido acético (*Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter pasteurianus* y *Acetobacter aceti*) están presentes durante el proceso fermentativo procedentes de la propia uva. Los niveles de ácido acético en el vino pueden verse incrementados por exposición de éste al aire, incluso por periodos cortos de tiempo, o por altas temperaturas o pH (Joyeux, 1984). Debido a que en el vino tinto el mosto y la uva están en contacto, la posibilidad de encontrar estas bacterias es mayor en el vino tinto que en el vino blanco.

Contenido en minerales. La tabla 3 muestra las concentraciones de minerales expresadas en mg de Cu, Mg, Fe, Mn, Ca, Al y Zn por Kg de fracción sólida de lía. Cabe destacar los elevados valores de Cu presentes en las lías procedentes de la vinificación de vino tinto respecto a las de vino blanco. Estos valores pueden deberse a las diferencias entre el proceso de vinificación de ambos tipos de vino, ya que la fermentación alcohólica del mosto tinto es simultánea a la maceración con el bagazo, que puede contener restos de fitosanitarios que contengan cobre en su composición.

Tabla 3. Contenido en minerales de la fracción sólida de las lías (Bustos *et al.*, 2004a)

	<i>Cu</i> (mg/kg)	<i>Mg</i> (mg/kg)	<i>Fe</i> (mg/kg)	<i>Mn</i> (mg/kg)	<i>Ca</i> (mg/kg)	<i>Al</i> (mg/kg)	<i>Zn</i> (mg/kg)
Lías vino prensa	191.8	59.1	160.7	23.9	409.4	76.4	52.2
Lías vino blanco 1er tras. sin destilar	492.6	297.2	486.7	26.4	351.2	854.5	48.4
Lías vino blanco 2º tras. sin destilar	410.5	30.5	203.9	13.7	359.9	157.7	12.7
Lías vino blanco destiladas	347.9	126.0	289.8	24.1	684.0	N.D	18.6
Lías vino tinto 1er tras. sin destilar	666.6	468.8	465.1	55.6	1242.3	319.5	341.4
Lías vino tinto 2º tras. sin destilar	197.5	69.3	394.1	59.4	1492.7	N.D	21.0
Lías vino tinto dest. centrifugadas	617.8	230.0	977.7	47.6	1832.9	N.D	41.7
Lías vino tinto destiladas	39.3	N.D	366.7	51.0	971.3	N.D	19.5

Caracterización de las maderas de poda

La composición de las maderas de poda se muestra en la tabla 4. Cabe destacar el elevado contenido en glucosa (34.1%), lignina (27.1%) y hemicelulosas (19.0%).

Tabla 4. Composición de residuos de poda utilizados en este estudio (los resultados se expresan como porcentaje del peso inicial de muestra seca). Los datos indican los valores medios de tres réplicas y las desviaciones estándar (Bustos *et al.*, 2004a)

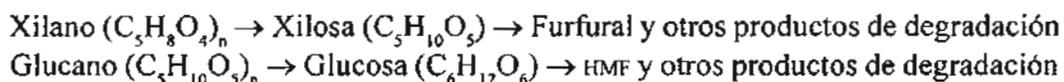
<i>Fracción</i>	<i>Contenido</i>
Extractos	7.1±0.2
Celulosa	34.1±1.3
Hemicelulosas	19.0±0.3
Xilano	12.8±0.2
Arabano	0.9±0.1
Grupos acetilo	5.3±0.3
Lignina	27.1±1.1
Otros	12.7±0.5

Fraccionamiento de las maderas de poda
Etapa de prehidrólisis ácida

La etapa de prehidrólisis ácida de las maderas de poda conduce a la solubilización de los azúcares hemicelulósicos (principalmente xilosa) y de glucosa como componentes principales. Sin embargo, simultáneamente, se liberan toxinas que pueden afectar a los posteriores procesos de fermentación, mostrando cinéticas y productividades más bajas en comparación con los medios hechos a partir de azúcares comerciales o hidrolizados destoxificados (Parajó *et al.*, 1996).

La tabla 5 muestra la concentración de xilosa alcanzada. El tiempo de reacción necesario para alcanzar la máxima concentración de xilosa varía ampliamente dependiendo de la concentración de catalizador empleado. La velocidad de reacción aumentó con la concentración de catalizador empleado. La concentración inicial de xilosa muestra que una parte del xilano reaccionó durante el periodo de calentamiento. Usando 1% H_2SO_4 , la xilosa aumentó continuamente con el tiempo de hidrólisis. Por el contrario, con 5% H_2SO_4 , la concentración máxima de xilosa se alcanzó a los 10-15 minutos de reacción, disminuyendo con los tiempos de reacción prolongados debido a la participación de reacciones de degradación. A 2, 3 y 4% H_2SO_4 mostraron un comportamiento intermedio.

El esquema de reacción puede expresarse considerando la conversión de xilano y glucano en sus respectivos azúcares monoméricos y su posterior descomposición:



Durante la hidrólisis, una parte significativa de glucano, tanto de la fracción celulósica como de la hemicelulósica, se convirtió a glucosa en cantidades importantes. La tabla 5 muestra estos valores. La concentración de glucosa aumentó continuamente ante la severidad de las condiciones experimentales, mostrando una tendencia similar a la observada en la xilosa.

Las condiciones óptimas de operación para elaborar los medios de cultivo se seleccionaron de modo que se alcanzasen los valores más altos de xilosa y glucosa y las concentraciones más bajas de inhibidores de fermentación (ácido acético, furfural e HMF) que se muestran en la tabla 6. Así, aunque la concentración más alta de xilosa fue de 18.2 g/L las condiciones óptimas de operación seleccionadas fueron: 2% H_2SO_4 por 30 minutos, 3% H_2SO_4 por 15 minutos y 4% H_2SO_4 por 10 minutos.

Tabla 5. Concentraciones de xilosa, glucosa y arabinosa alcanzadas bajo diferentes condiciones de operación. Los datos indican la media de tres réplicas y sus desviaciones estándar

<i>Xilosa (g/L)</i>					
<i>Tiempo (min.)</i>	<i>1% H₂SO₄</i>	<i>2% H₂SO₄</i>	<i>3% H₂SO₄</i>	<i>4% H₂SO₄</i>	<i>5% H₂SO₄</i>
0	3.1±0.2	4.3±0.3	5.4±0.4	6.5±0.5	9.4±0.8
5	4.8±0.3	8.0±0.5	11.2±0.8	13.1±0.6	13.3±1.0
10	5.4±0.4	12.8±0.6	14.8±1.1	17.8±1.2	18.1±1.5
15	5.8±0.6	14.4±1.1	17.4±1.2	18.0±1.7	18.2±1.7
30	7.7±0.7	17.5±1.1	18.2±1.8	18.0±1.8	17.9±1.6
60	10.9±0.9	18.1±1.3	17.9±1.3	17.1±1.6	17.3±1.5
120	16.8±1.3	18.2±1.5	17.2±0.9	15.1±1.3	14.9±1.1
180	17.9±1.8	17.6±1.9	16.6±0.9	13.7±1.0	11.5±1.0
<i>Glucosa (g/L)</i>					
<i>Tiempo (min.)</i>	<i>1% H₂SO₄</i>	<i>2% H₂SO₄</i>	<i>3% H₂SO₄</i>	<i>4% H₂SO₄</i>	<i>5% H₂SO₄</i>
0	3.1±0.3	2.9±0.2	5.4±0.5	6.4±0.5	6.5±0.5
5	4.1±0.3	6.3±0.3	7.7±0.7	8.8±0.7	8.9±0.6
10	4.9±0.4	8.7±0.4	8.8±0.9	10.3±0.7	10.6±0.7
15	5.6±0.5	10.8±0.6	11.1±1.0	11.8±0.8	12.0±0.8
30	7.9±0.7	11.6±0.7	11.8±1.0	12.3±0.9	12.2±1.0
60	10.7±0.8	12.0±0.9	12.4±1.1	12.5±0.8	12.4±1.0
120	11.5±0.8	12.3±1.1	12.2±1.2	12.3±1.0	12.4±1.0
180	11.8±0.9	12.3±1.2	12.4±1.2	12.4±1.0	12.5±1.1
<i>Arabinosa (g/L)</i>					
<i>Tiempo (min.)</i>	<i>1% H₂SO₄</i>	<i>2% H₂SO₄</i>	<i>3% H₂SO₄</i>	<i>4% H₂SO₄</i>	<i>5% H₂SO₄</i>
0	1.6±0.1	2.8±0.2	2.8±0.3	3.4±0.3	3.5±0.3
5	2.3±0.2	3.3±0.3	3.3±0.4	3.7±0.3	3.9±0.4
10	4.0±0.2	4.4±0.3	4.3±0.4	4.2±0.4	4.0±0.4
15	4.0±0.2	4.6±0.4	4.3±0.4	4.0±0.4	4.1±0.4
30	4.5±0.3	4.7±0.4	4.7±0.4	4.0±0.4	4.6±0.4
60	4.8±0.4	4.6±0.4	4.7±0.4	4.6±0.5	5.1±0.5
120	5.2±0.4	5.0±0.5	4.3±0.4	4.4±0.4	4.0±0.4
180	5.3±0.5	4.7±0.5	3.8±0.5	3.8±0.4	3.3±0.4

Tabla 6. Concentraciones de furfural, HMF y ácido acético alcanzadas bajo diferentes condiciones de operación. Los datos indican la media de tres réplicas y sus desviaciones estándar

<i>Furfural (g/L)</i>					
<i>Tiempo (min.)</i>	<i>1% H₂SO₄</i>	<i>2% H₂SO₄</i>	<i>3% H₂SO₄</i>	<i>4% H₂SO₄</i>	<i>5% H₂SO₄</i>
0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.1±0.0	0.0±0.0
5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
10	0.1±0.0	0.2±0.0	0.3±0.0	0.6±0.0	0.8±0.0
15	0.2±0.0	0.3±0.0	0.7±0.1	0.9±0.1	1.0±0.0
30	0.7±0.1	0.8±0.1	1.1±0.1	1.2±0.2	1.5±0.1
60	0.7±0.1	1.6±0.2	2.3±0.2	2.4±0.2	1.7±0.3
120	2.8±0.1	4.7±0.3	5.7±0.5	6.9±0.5	7.3±0.5
180	3.1±0.3	4.9±0.4	7.4±0.9	8.2±0.9	8.6±1.2
<i>Hidroximetilfurfural (g/L)</i>					
<i>Tiempo (min.)</i>	<i>1% H₂SO₄</i>	<i>2% H₂SO₄</i>	<i>3% H₂SO₄</i>	<i>4% H₂SO₄</i>	<i>5% H₂SO₄</i>
0	<0.1±0.0	<0.1±0.0	<0.1±0.0	<0.1±0.0	<0.1±0.0
5	<0.1±0.0	<0.1±0.0	<0.1±0.0	<0.1±0.0	<0.1±0.0
10	<0.1±0.0	<0.1±0.0	<0.1±0.0	<0.1±0.0	<0.1±0.0
15	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0
30	0.2±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0
60	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0
120	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0
180	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0
<i>Ácido acético (g/L)</i>					
<i>Tiempo (min.)</i>	<i>1% H₂SO₄</i>	<i>2% H₂SO₄</i>	<i>3% H₂SO₄</i>	<i>4% H₂SO₄</i>	<i>5% H₂SO₄</i>
0	0.8±0.0	1.9±0.0	2.4±0.0	3.1±0.0	3.3±0.1
5	1.2±0.0	2.2±0.0	3.4±0.1	3.6±0.0	3.8±0.1
10	3.2±0.2	3.4±0.1	3.5±0.1	3.8±0.0	4.3±0.1
15	3.5±0.2	3.7±0.1	4.0±0.1	4.9±0.2	5.0±0.2
30	4.5±0.3	4.7±0.2	5.9±0.3	5.0±0.3	5.2±0.2
60	5.2±0.4	5.6±0.3	5.9±0.4	6.0±0.3	5.9±0.3
120	5.7±0.4	5.8±0.3	5.8±0.4	6.0±0.3	6.1±0.3
180	5.4±0.3	6.0±0.5	6.0±0.4	6.1±0.3	6.3±0.3

Fermentación de la fracción hemicelulósica

Los hidrolizados obtenidos bajo las condiciones de operación seleccionadas (2% H₂SO₄, 30 min; 3% H₂SO₄, 15 min; y 4% H₂SO₄, 10 min) se acondicionaron para permitir las fermentaciones a ácido láctico con *L. pentosus*. La tabla 7 muestra las cinéticas de consumo de xilosa y glucosa, así como de la producción de ácido láctico y acético. Los resultados experimentales mostrados son la media de tres ensayos, la desviación media de los ensayos fue de 2.6 por ciento.

Tabla 7. Parámetros estequiométricos, productividades y rendimientos para las bioconversiones realizadas bajo diferentes condiciones experimentales (los resultados se calcularon para tiempos de fermentación que llevaron al máximo consumo de azúcares) (Bustos *et al.*, 2004c)

	2%-30 min	3%-15 min	4%-10 min
Xilosa $t=0$ (g/L)	17.2±1.8	17.5±1.9	17.3±2.0
Xilosa $t=final$ (g/L)	1.1±0.1	0.8±0.0	0.7±0.0
Glucosa $t=0$ (g/L)	10.1±0.7	10.3±0.6	9.8±0.5
Glucosa $t=final$ (g/L)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Ácido láctico $t=0$ (g/L)	1.6±0.2	1.5±0.1	1.3±0.2
Ácido láctico $t=final$ (g/L)	20.9±0.8	21.8±1.0	20.5±0.9
Ácido acético $t=0$ (g/L)	4.7±0.3	4.0±0.4	3.8±0.3
Ácido acético $t=final$ (g/L)	9.0±0.5	9.1±0.8	9.0±0.9
Tiempo (h)	24	24	24
¹⁾ Q _p (g/L·h)	0.804	0.844	0.798
¹⁾ Q _s (g/L·h)	1.091	1.097	1.098
¹⁾ Y _{P/S} (g/g)	0.74	0.77	0.73
²⁾ Rendimiento teórico (%)	97.8	99.6	97.1

¹⁾ Nomenclatura: Q_p, productividad volumétrica de ácido láctico; Q_s, velocidad de consumo de azúcares; Y_{P/S}, rendimiento de ácido láctico (g de ácido láctico producido/(g de glucosa consumida + g de xilosa consumida)).

²⁾ Rendimiento teórico (%): (Ácido láctico producido)*100/(Xilosa consumida*0.6 + Glucosa consumida).

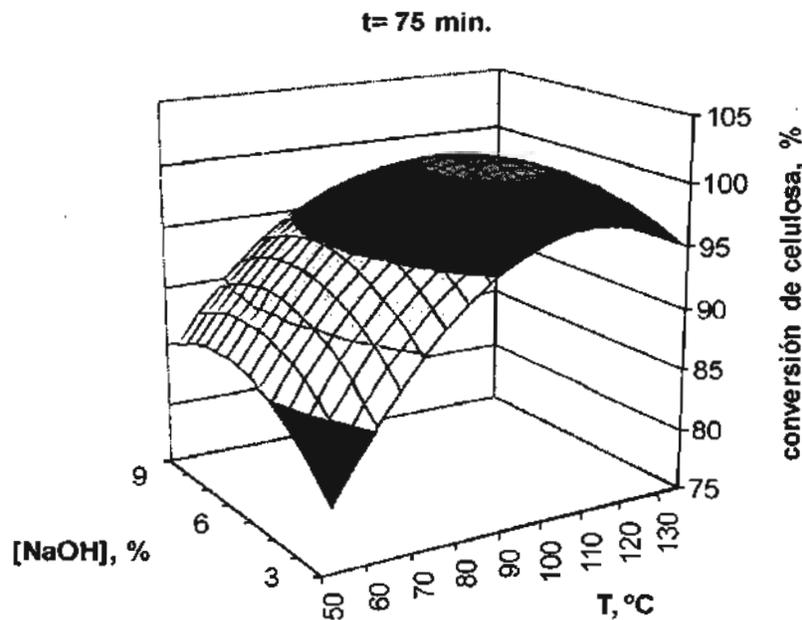
En todos los casos se observó una producción de ácido láctico satisfactoria, alcanzándose productividades volumétricas superiores a 0.800 g/L·h y rendimientos

superiores a 73%. Estos resultados son particularmente interesantes sobre todo si resaltamos la ausencia de tratamientos de destoxificación. Cabe señalar que en los tres casos se produjeron alrededor de 5 g de ácido acético/L, lo que representa casi 25% del ácido láctico formado en este mismo paso.

Deslignificación

Las etapa de deslignificación se analizaron por medio de un diseño factorial incompleto, en el que se consideraron como variables independientes y rangos de variación: temperatura (50-130°C); duración de los tratamientos (30-120 min) y concentración de NaOH (4-12% en peso). La variable dependiente más significativa estudiada fue la conversión alcanzada en la etapa de hidrólisis enzimática, resultando el mayor porcentaje de conversión de celulosa en glucosa (75.2%) al trabajar a 130°C, 75 minutos y 12% NaOH, consecuentemente, éstas se consideraron las condiciones óptimas de deslignificación para conseguir la hidrólisis enzimática. En la figura 2 se muestra la dependencia predicha de esta variable sobre la temperatura y la concentración de NaOH a 75 minutos.

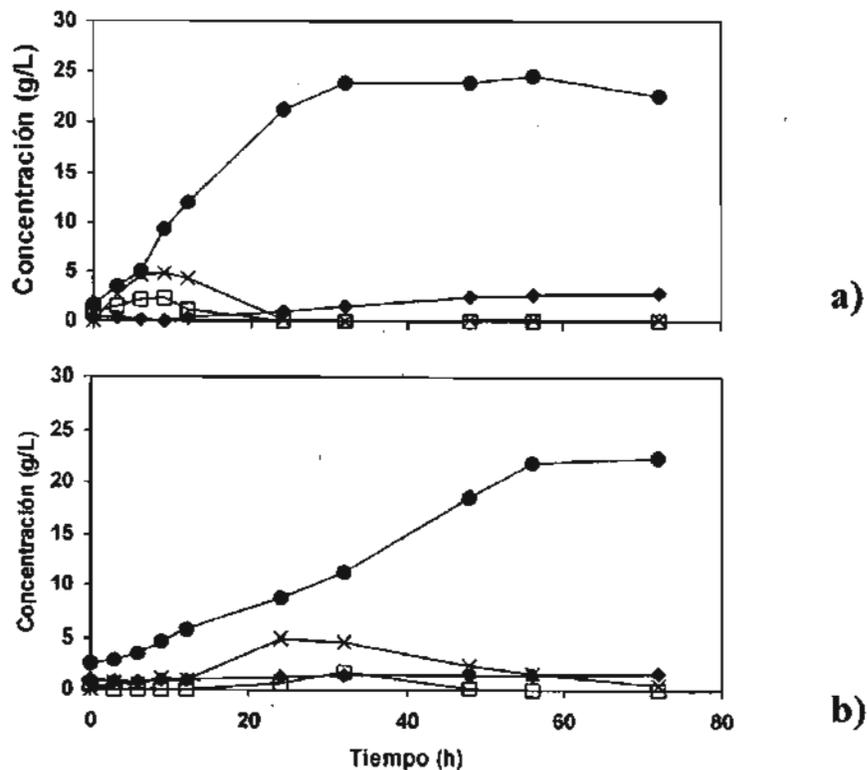
Figura 2. Dependencia de la conversión de celulosa en glucosa sobre la concentración de NaOH y el tiempo predicho para muestras deslignificadas a 130°C (Bustos *et al.*, 2005)



Sacarificación y fermentación simultánea (SSF) del residuo celulósico

La figura 3 muestra la producción de ácido láctico, así como la glucosa y celobiosa generada y consumida durante la SSF aplicada al residuo celulósico deslignificado bajo las condiciones óptimas (130°C, 75 min., 12% NaOH). Estas SSF se realizaron empleando *L. rhamnosus* usando dos medios nutricionales: el medio general de *Lactobacillus* (figura 3a) o el más barato, hecho con 20 g/L de lías residuales de vinificación procedentes de la elaboración de vino blanco (figura 3b). Al emplear las lías se observó un cierto efecto inhibitorio sobre la actividad celulásica en relación al empleo del medio general. Así, la figura 3b muestra un retraso en la producción de glucosa y celobiosa en comparación con la figura 3a, probablemente debido a la presencia de compuestos fenólicos y otros compuestos orgánicos en las lías que no afectan la etapa de fermentación pero producen efectos inhibitorios sobre la hidrólisis

Figura 3. Perfiles de glucosa (y), celobiosa (C), ácido acético (u) y ácido láctico (l) durante la sacarificación y fermentación simultánea de residuos celulósicos tratados a 130°C durante 75 minutos con 12% de NaOH usando el medio general de *Lactobacillus* (a) o lías blancas (b) (Bustos *et al.*, 2005)



enzimática, disminuyendo la productividad de 0.69 a 0.36 g/L·h, aunque la concentración final de ácido láctico fue similar en ambos casos (23.8 g/L usando el medio general y 21.8 g/L usando lías).

Conclusiones

Los diferentes experimentos realizados nos permiten concluir que la poda de sarmiento puede ser una buena fuente de carbono, y que tanto la fase líquida que resulta de una etapa de prehidrólisis, como el residuo sólido, se pueden emplear para obtener disoluciones de azúcares. Por su parte, las lías de vinificación se pueden emplear como nutrientes económicos para la producción de ácido láctico por cepas de *Lactobacillus*. Así, al tiempo que se eliminan dos residuos contaminantes muy importantes en la industria vitivinícola se consigue revalorarlos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a las siguientes instituciones por el respaldo financiero para la realización de este trabajo: Ministerio de Ciencia y Tecnología de España (proyecto PPQ2003-02802, que tiene una financiación parcial a cargo de fondos FEDER de la Unión Europea), Xunta de Galicia (PGIDIT04PXIC38302PN) y Universidad de Vigo (K412 122F 64102).

Bibliografía

- Amrane, A. (2000), "Evaluation of lactic acid bacteria autolysate for the supplementation of lactic acid bacteria fermentation", *World J. Microb. Biotechnol.*, 16(2): 207-209.
- Bustos, G.; Moldes, A.B.; Cruz, J.M.; Domínguez, J.M. (2004a), "Formulation of low-cost fermentative media for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus* using vinification lees as nutrients", *J Agric. Food Chem.*, 52(4): 801-808.
- _____; Moldes, A.B.; Cruz, J.M.; Domínguez, J.M. (2004b), "Evaluation of vinification lees as nutrients for various *Lactobacilli* strains", *J Agric. Food Chem.*, 52(16): 5233-5239.

- Bustos, G.; Moldes, A.B.; Cruz, J.M.; Domínguez, J.M. (2004c), "Production of fermentable media from vine-trimming wastes and bioconversion into lactic acid by *Lactobacillus pentosus*", *J. Sci. Food Agric.*, 84(15): 2105-2112.
- ; Moldes, A.B.; Cruz, J.M.; Domínguez, J.M. (2005), "Production of lactic acid from vine trimming wastes and viticulture lees using a simultaneous saccharification fermentation method", *J. Sci. Food Agric.*, en prensa.
- Hofvendahl, K.; Hahn-Hagerdal, B. (2000), "Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources", *Enzyme Microb. Technol.*, 26: 87-107.
- Jones, A.M.; Ingledew, W.M. (1994), "Fermentation of very high gravity wheat mash prepared using fresh yeast autolyzate", *Bioresource Technol.*, 50(2): 97-101.
- Joyeux, A.; Lafon-Lafourcade, S.; Ribereau-Gayon, P. (1984), "Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine", *Appl. Environ. Microb.*, 48(1): 153-6.
- Kjallstrand, J.; Ramnas, O.; Petersson, G. (1998), "Gas chromatographic and mass spectrometric analysis of 36 lignin-related methoxyphenols from uncontrolled combustion of wood", *J. Chromatogr.*, 824(2): 205-210.
- Mercier, P.; Yerushalmi, L.; Rouleau, D.; Dochain, D. (1992), "Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus*", *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 55: 111-121.
- Minarik, E. (2002), "Effect of phenols on malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*", *Vinohrad.*, 40(4): 5-6.
- Moldes, A.B.; Alonso, J.L.; Parajó, J.C. (2001), "Resin selection and single-step production and recovery of lactic acid from pretreated wood", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 95(2): 69-81.
- ; Cruz, J.M.; Domínguez, J.M.; Parajó, J.C. (2002), "Production of a cellulosic substrate susceptible to enzymatic hydrolysis from prehydrolyzed barley husks", *Agr. Food Sci. Finland*, 11(1): 51-58.
- Moreno-Arribas, M.V.; Lonvaud-Funel, A. (2000), "The involvement of lactic acid bacteria in winemaking", *Recent Res. Develop. Microbiol.*, 4(2): 481-504.
- Nancib, N.; Nancib, A.; Boudjelal, A.; Benslimane, C.; Blanchard, F.; Boudrant, J. (2001), "The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus rhamnosus*", *Bioresource Technol.*, 78: 149-153.
- Parajó, J.C.; Domínguez, H.; Domínguez, J.M. (1996), "Production of xylitol from concentrated wood hydrolyzates by *Debaryomyces hansenii*: Effect of the initial cell concentration", *Biotechnol. Lett.*, 18: 593-598.

- Rivas, B.; Moles, A.B.; Domínguez, J.M.; Parajó, J.C. (2004), "Development of culture media containing yeast cells and corn spent liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*", *Int. J. Food Microb.*, 97(1): 93-98.
- Roy, S.; Gudi, R.D.; Venkatesh, K.V.; Shah, S.S. (2001), "Optimal control strategies for simultaneous saccharification and fermentation of starch", *Process Biochem.*, 36(8-9): 713-722.
- Saksinchai, S.; Suphantharika, M.; Verduyn, C. (2001), "Application of a simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*: A physiological study", *World J. Microb. Biot.*, 17(3): 307-316.
- Selmer-Olsen, E. y Soerhaug, T. (1998), "Comparative studies of the growth of *Lactobacillus plantarum* in whey supplemented with autolyzate from brewery yeast biomass or commercial yeast extract", *Milchwissenschaft.*, 53(7): 367-370.
- Sreenath, H.K.; Moldes, A.B.; Koegel, R.G.; Straub, R.J. (2001), "Lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of alfalfa fiber", *J. Biosci. Bioeng.*, 92(6): 518-523.
- Vázquez, D.; Lage, M.A.; Parajó, J.C.; Vázquez, G. (1991), "Conversion of lignocellulose materials: composition, fractionation and applications", *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 31(2): 143-64.
- Zhou, Y.; Domínguez, J.M.; Cao, N.J.; Gong, C.S.; Tsao, G.T. (1999), "Optimization of L-Lactic Acid Production from Glucose by *Rhizopus oryzae* ATCC 52311", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 77/79: 401-407.
- Ziegler, B. (1990), "Nutrients and heavy metal contents in lees and fining residues", *Wein-Winssenschaft.*, k 24-26.

**Producción de ácido láctico a partir de azúcares
hemicelulósicos de la poda de sarmiento
y lías de vinificación como medio nutritivo
utilizando *Lactobacillus pentosus***
Lactic Acid Production for Hemicellulosic Sugars
from Vine-trimming Wastes and Vinification Lees
as a Nutritional Medium by *Lactobacillus Pentosus*

*Bustos Vázquez, G. *; De la Torre, N.; Martínez, M.; Moldes, A.B.;
Cruz, J.M.; Domínguez, J.M.*

Resumen

La poda de sarmiento, un residuo agrícola de escasa aplicación, se hidrolizó con ácido sulfúrico diluido para obtener soluciones de azúcares útiles como medios de fermentación. Las condiciones operacionales de la hidrólisis (3% H₂SO₄ y 15min), se seleccionaron con base en la generación de azúcares hemicelulósicos (principalmente xilosa), glucosa y la concentración de los subproductos de reacción que afectaban a la fermentación (furfural, hidroximetilfurfural y ácido acético). Los hidrolizados hemicelulósicos se suplementaron con diferentes concentraciones de lías (10, 20, 30 o 40 g/L) procedentes del proceso de elaboración de vinos blancos y tintos, y se fermentaron con *Lactobacillus pentosus* sin previa etapa de destoxificación para producir ácido láctico. Los resultados se compararon con los obtenidos al emplear el medio general de *Lactobacillus*. Con el fin de no diluir los hidrolizados, las

* Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Vigo (Campus Ourense), As Lagoas s/n, 32004, Ourense, España. Teléfono: 34-988-387047, Fax: 34-988-387001. E-mail: gbvazquez@uvigo.es

lías se sometieron a un proceso de liofilización. Al utilizar el medio general de *Lactobacillus* la concentración máxima de ácido láctico fue de 16.1 g/L ($Q_p = 0.458$ g/L·h; $Y_{p/S} = 0.56$ g/g). Al reemplazar este medio por 20, 30 o 40 g/L de lías procedentes del proceso de elaboración de vino blanco se obtuvieron concentraciones de ácido láctico superiores (16.6, 16.8 y 17.0 g/L respectivamente). Las productividades volumétricas de estas fermentaciones, calculadas después de 33 horas, muestran también valores similares (0.433-0.464 g/L·h). Los rendimientos oscilaron entre 0.43 y 0.59 g/g. En el caso de las lías procedentes de la elaboración de vino tinto, sólo se alcanzaron valores similares al emplear 40 g/L de lías ($P_{\max} = 15.0$ g/L; $Q_p = 0.458$ g/L·h; $Y_{p/S} = 0.56$ g/g).

Abstract

Trimmings of vineshoots, an agricultural waste with scarce use, were hydrolyzed with dilute sulfuric acid in order to obtain sugar solutions suitable as fermentation media. The operational conditions for hydrolysis were selected on the basis of both: the generation of hemicellulosic sugars (mainly xylose) and glucose and the concentrations of reaction byproducts affecting fermentation (furfural, hydroxymethylfurfural and acetic acid). Hemicellulosic hydrolyzates were supplemented with different concentrations (10, 20, 30 or 40 g/L) of lees coming from the white and red wine making technology and were fermented with *Lactobacillus pentosus*. With the purpose of not diluting the hydrolyzates, lees were freeze-dried. Using the general medium of *Lactobacillus*, the maximum lactic acid concentration achieved was 16.1 g/L ($Q_p = 0.458$ g/L·h; $Y_{p/S} = 0.56$ g/g). Changing this medium by 20, 30 or 40 g/L of lees coming from the white wine making technology the lactic acid concentrations were even higher (16.6, 16.8 and 17.0 g/L respectively). The volumetric productivities of these fermentations after 33 hours, showed similar values (0.433-0.464 g/L·h). Yields oscillated among 0.43 and 0.59 g/g. Using lees coming from the red wine making technology, only similar values were achieved when 40 g/L of lees were used ($P_{\max} = 15.0$ g/L; $Q_p = 0.458$ g/L·h; $Y_{p/S} = 0.56$ g/g).

Introducción

La viticultura, como una de las actividades agrícolas de mayor importancia en España, principalmente en Galicia, situada al noroeste del país, produce anualmente más de 70 mil toneladas de residuos agroindustriales, principalmente restos de poda y fangos del proceso de vinificación (Bustos *et al.*, 2004 a y b). Los restos de poda, principalmente sarmientos, pueden llegar a ser nocivos para el medio ambiente ya que generalmente se queman en el campo, causando problemas medioam-

bientales y ecológicos, así como para la salud humana por la formación de compuestos tóxicos durante la combustión de la lignina. El sarmiento de vid es un material lignocelulósico (MLC) con un gran potencial como materia prima para la obtención de disoluciones de azúcares hemicelulósicos (Bustos *et al.*, 2004c). Este residuo rico en polisacáridos es particularmente interesante debido a su abundancia, accesibilidad, dispersión geográfica, capacidad de regeneración y bajo precio. La poda de sarmiento es residuo lignocelulósico formado principalmente por celulosa (glucosa), hemicelulosa (hexosas y pentosas) y lignina. Una de las utilidades de la fracción hemicelulósica es el empleo de sus azúcares constituyentes en procesos de bioconversión, ya que a partir de estas fracciones, se pueden obtener productos de gran importancia en la industria alimentaria, entre los cuales destaca el ácido láctico (Moldes *et al.*, 2001).

El ácido láctico fue descubierto en 1780 por el químico sueco C. W. Scheele en la leche cortada. Su obtención industrial tiene una larga tradición que data de 1881 (Chahal, 1989), y, anualmente, su producción a nivel mundial excede, aproximadamente, las 80 mil TM (Hofvendahl y Hahn-Hagerdal, 1999b). Su importancia radica en varios aspectos, siendo uno de los más destacados su aplicación en la industria alimentaria, debido a sus propiedades como acidulante y conservante, o bien, a su intervención durante la fermentación láctica en procesos como la fabricación del yogur (Parajó *et al.*, 1995a) o la elaboración de quesos.

Para una producción biotecnológica competitiva de ácido láctico a gran escala se necesitan medios nutritivos de bajo coste. El extracto de levadura y la peptona son los principales componentes del medio general de *Lactobacillus* propuesto por Mercier *et al.* (1992), pero éstos alcanzan precios muy elevados, por lo que resulta apremiante encontrar una alternativa para sustituirlo por otros medios nutritivos económicamente más rentables.

Durante la elaboración del vino se generan principalmente levaduras y bacterias además de sólidos en suspensión, coloides y materia orgánica que son depositados en el fondo de los barriles formando lo que se conoce como fangos o lías. Las lías o fangos suelen transmitir al vino olores y sabores peculiares, buscados en una minoría de los casos e indeseables en la mayoría, por lo que se desechan, pero hoy día es necesario su procesamiento en costosas plantas de tratamiento. Bustos *et al.* (2004a y b) propusieron la utilización de lías de vinificación destiladas y sin destilar, procedentes tanto de vino tinto como de vino blanco, para su utilización como medio nutritivo durante las fermentaciones de glucosa a ácido láctico por distintas cepas de *Lactobacillus*.

En este proyecto, con base en trabajos anteriores (Bustos *et al.*, 2004a, b y c), se pretende utilizar de lías de vinificación (tintas y blancas, destiladas y procedentes del segundo trasiego) como medio nutritivo, así como el aprovechamiento de disolucio-

nes de azúcares hemicelulósicos procedentes de la poda de sarmiento de vid para la obtención de ácido láctico mediante *Lactobacillus pentosus*. La importancia de este trabajo radica en que las especies de *Lactobacillus* que son capaces de fermentar las hexosas, generalmente son incapaces de utilizar pentosas como fuente de carbono. Sin embargo, se ha centrado la atención en especies tratadas genéticamente que pueden utilizar eficientemente ambos azúcares: hexosas y pentosas (Aristidou y Penttila, 2000; Martínez, *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2001). En este estudio se emplea la bacteria *Lactobacillus pentosus*, capaz de consumir ambos azúcares, ya que puede fermentar homolácticamente la glucosa a ácido láctico, y la xilosa a ácido láctico y acético por fermentación heteroláctica.

Materiales y métodos

Materia prima: poda de sarmiento, recolectada localmente después de ser sometida a molienda, tamizado y homogeneización para obtener un tamaño de partícula de 1 mm y composición uniforme.

Análisis de la poda de sarmiento: las alícuotas del lote homogeneizado se sometieron a determinación de humedad e hidrólisis cuantitativa en un tratamiento ácido de dos etapas (la primera etapa, con 72% de ácido sulfúrico a 30°C por 1h; la segunda, después de diluir el medio de ácido sulfúrico a 3% a 121°C por 1h). El residuo sólido después de la hidrólisis ácida se consideró como lignina de Klason. Los hidrolizados se analizaron por HPLC usando una columna de interacción Ion-300 (Transgenomic Inc., San José, CA), (fase móvil 0.01N H₂SO₄ con un caudal de 0,4 mL/min⁻¹ y detector de IR y UV). Este método permitió la determinación directa de glucosa, xilosa, arabinosa, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF).

Análisis ácida de la poda de sarmiento: la muestra se sometió a tratamiento térmico a 130°C durante 15 minutos en autoclave, empleando como catalizador H₂SO₄ diluido al 3% con una relación líquido/sólido de 8 g·g⁻¹ (Bustos *et al.*, 2004c). Posteriormente, mediante filtración, se separó la fase sólida, conteniendo la fracción celulósica y la lignina de la fase líquida en la cual están solubilizados los azúcares procedentes de la fracción hemicelulósica. El H₂SO₄ presente en los licores se neutralizó con CaCO₃ (Panreac) hasta alcanzar un pH final de 6.3 formándose CO₂ y un precipitado de CaSO₄ eliminado por filtración.

Análisis de las lías de vinificación: las lías procedentes de la campaña 2002, fueron cedidas amablemente por la Cooperativa Vitivinícola del Ribeiro (Orense, España) y almacenadas a 4°C. Se seleccionaron lías tintas y blancas, destiladas y

procedentes del segundo trasiego de acuerdo a los trabajos publicados por Bustos *et al.* (2004a y b). El contenido en sólidos se calculó con 1 g de lía, en crisoles de vidrio a 102°C y 48 horas para determinar su peso. El porcentaje en carbono y nitrógeno se analizó utilizando un analizador elemental Thermo Finningan Flash Elemental Analyser 1112 series (San José, CA, EU).

Las cenizas se determinaron con 0.5 g de muestra a 550°C. Ambos análisis de porcentaje de cenizas y de sólidos, se realizaron por triplicado para minimizar errores. Los componentes orgánicos de las lías: glucosa, ácido láctico y ácido acético se determinaron por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE) utilizando las mismas condiciones que para los azúcares hemicelulósicos.

Los elementos minerales: Cu, Mg, Fe, Mn, Ca, Al y Zn, se determinaron a partir de las cenizas por absorción atómica. Para ello, 0.15 g de cenizas se sometieron a un proceso de digestión con 5 mL de HNO₃ al 65%, 1 mL de H₂O₂ al 30% y 0.5 mL de HF al 40% en horno de microondas.

Liofilización de las lías

Debido a la imposibilidad de utilizar las lías de forma líquida, ya que ello implicaría la disolución de los hidrolizados, éstas se liofilizaron, tras ser congeladas, en un liofilizador Lyovac GT 2E.

Microorganismo. El *Lactobacillus pentosus* CECT-4023T se obtuvo de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España). La cepa se hizo crecer en placas a temperatura ambiente por 24 horas usando el medio completo propuesto por Mercier *et al.* (1992), que contiene: 20 g/L glucosa; 4 g/L extracto de levadura; 10 g/L peptona; 8 g/L extracto de carne; 5 g/L acetato sódico; 2 g/L citrato de sodio; 2 g de K₂HPO₄; 0.12 g de MgSO₄·7H₂O; 0.05 g de MnSO₄·H₂O; 0.05 g de FeSO₄·7H₂O; y 20 g de agar. El inóculo se preparó por solubilización de las células de las placas con 5 mL de hidrolizado esterilizado. La biomasa en el inóculo se midió por densidad óptica a 600 nm y se ajustó con agua esterilizada.

Fermentaciones. Se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con un volumen final de 100 mL. Se emplearon 90 mL del hidrolizado de sarmiento de vid y 10 mL de inóculo. También se hizo un control utilizando el medio general de *Lactobacillus* MRS. En los experimentos se utilizaron lías tintas y blancas destiladas y liofilizadas en concentraciones (10, 20, 30 y 40 g/L). Para neutralizar el ácido láctico producido, en todos los casos se añadió una cantidad de CaCO₃ equiparable a la cantidad de ácido láctico que estequiométricamente se puede producir en cada fermentación. Antes de

la inoculación (10 mL), los matraces se esterilizaron a 121°C por 15 minutos. Posteriormente se mantuvieron en agitadores orbitales a 150 rpm y 31.5°C, tomando muestras (2 mL) a diferentes tiempos de fermentación y centrifugando a 6000 rpm durante 3 minutos. Los sobrenadantes se almacenaron para analizar la glucosa, xilosa, arabinosa, ácido láctico y ácido acético. Los experimentos se realizaron por triplicado, reportando los resultados; la desviación estándar estuvo cerca de 3.5% del promedio, la productividad volumétrica Q_p se calculó después de 33 horas, cuando los azúcares se consumieron completamente.

Análisis de datos

Los datos experimentales se analizaron con el software comercial Solver, de Microsoft Excel 2002, utilizando los modelos propuestos de regresión no lineal y usando el método de los mínimos cuadrados. La producción de ácido láctico se trazó matemáticamente siguiendo la ecuación propuesta por Mercier *et al.* (1992).

$$P = \frac{P_0 P_m e^{P_r t}}{P_m - P_0 + P_0 e^{P_r t}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde t es tiempo, P es la concentración de ácido láctico, P_m es la concentración máxima de ácido láctico y P_r es la relación entre la productividad volumétrica inicial del producto formado (r_p) y la concentración inicial del producto P_0 . Los parámetros del modelo P_0 , P_m y P_r fueron calculados para cada medio de fermentación. El consumo de glucosa por *Lactobacillus pentosus* se interpretó por medio de la siguiente ecuación:

$$S = S_0 - \frac{1}{Y_{p/s}} (P - P_0) \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde $Y_{p/s}$ es el rendimiento del producto, P y P_0 son la concentración final e inicial de ácido láctico, respectivamente (g/L), y finalmente, S y S_0 son la concentración final e inicial de glucosa (g/L), respectivamente. El modelo del parámetro $Y_{p/s}$ se calculó para cada medio de fermentación de la serie de datos experimentales de concentración/tiempo de glucosa, P_0 y el valor de P para cada tiempo se calculó a través de los parámetros de regresión de la ecuación 1.

Resultados y discusión

*Producción de ácido láctico por *Lactobacillus pentosus* a partir de glucosa, utilizando como nutrientes lías de vinificación*

Para una producción biotecnológica competitiva de ácido láctico a gran escala, se necesitan medios nutritivos de bajo coste. El extracto de levadura y la peptona son los principales componentes del medio general de *Lactobacillus* propuesto por Mercier *et al.* (1992); pero éstos alcanzan precios muy elevados, por lo que sería interesante sustituirlo por otros medios nutritivos económicamente rentables.

Muchos compuestos que contienen nitrógeno se encuentran en las uvas y el vino. Estos incluyen formas inorgánicas, tales como amonio y nitratos, y diversas formas orgánicas incluyendo aminas, amidas, aminoácidos, bases nitrogenadas, proteínas y ácidos nucleicos. Por otra parte, los niveles de vitaminas en el vino son generalmente abundantes para el crecimiento microbiano de levaduras y bacterias lácticas. Durante y después de la fermentación del vino existe una liberación lenta de compuestos nitrogenados, probablemente debido a la autólisis de las células de levaduras muertas (Jackson, 1994).

En general las lías son una suspensión de biomasa microbiana, sólidos, coloides y materia orgánica en vino. Las lías utilizadas en este trabajo proceden de vinos tintos y blancos, sometidos a destilación para la producción de aguardiente. Este hecho presenta una ventaja al utilizar las lías como nutrientes, ya que determinados compuestos volátiles presentes en las lías sin destilar, que pasan al aguardiente durante la destilación, podrían ejercer un efecto inhibitorio en el crecimiento de las bacterias.

Sustancias presentes en las lías como: etanol, alcoholes superiores, metanol, fenil-2 etanol, acetato de alcoholes superiores, ésteres etílicos de ácidos grasos, acetato de etilo, diacetilo, ácidos volátiles (más de 95% de la acidez volátil producida por la levadura es del ácido acético), lactato de etilo y butanodiol 2-3, destilan de forma integral (alcoholes superiores y ésteres etílicos de ácidos grasos) o parcialmente. Los ésteres etílicos de ácidos grasos y los ácidos grasos de alto peso molecular son liberados por las levaduras durante la autólisis que sucede durante el calentamiento (Jouret *et al.*, 2003).

Como inconveniente, al utilizar las lías destiladas como nutrientes, resalta la presencia en las lías recuperadas al salir de la columna de destilación, de una tasa elevada de polifenoles ligados a las proteínas, lo que las podría convertir en no asimilables, así como elementos tóxicos procedentes de residuos de tratamientos que se acumulan en los lípidos de las levaduras (Bourzeix *et al.*, 2003).

Para poder evaluar las lías como nutrientes se establecen comparaciones entre los resultados obtenidos en fermentaciones con medio completo de *Lactobacillus* (MRS) y los resultados obtenidos trabajando con distintas concentraciones de lía.

Fermentación con medio general de *Lactobacillus*

La figura 3.1 muestra el ajuste de los datos experimentales a los calculados teóricamente, según el modelo propuesto para la fermentación con el medio completo de *Lactobacillus* (MRS). Además, en la tabla 3.1 se recogen los parámetros cinéticos obtenidos a partir de las ecuaciones 1 y 2, así como los parámetros estadísticos y de regresión de la misma fermentación.

Los datos experimentales (*exp*) se ajustan perfectamente a los propuestos por el modelo matemático (*th*) con r^2 de 0.995 y 0.987 para el consumo de glucosa y para la producción de ácido láctico, respectivamente.

En esta fermentación con medio general de *Lactobacillus*, la glucosa fue rápidamente transformada a ácido láctico alcanzando la concentración máxima de 88.5 g/L a las 28 horas. El rendimiento en producto calculado por regresión fue de 0.90 g/g (tabla 3.1).

Figura 3.1 Fermentación con medio general de *Lactobacillus*
(Bustos *et al.*, 2004d)

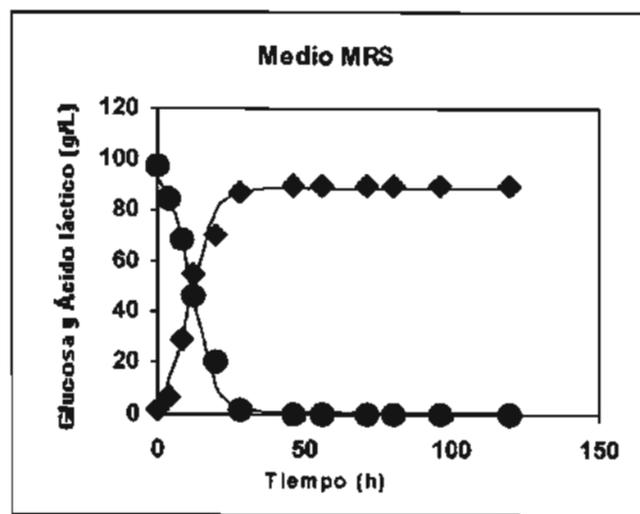


Tabla 3.1 Valores cinéticos, estadísticos y de regresión para el ácido láctico y la glucosa, correspondientes a las fermentación con medio general de *Lactobacillus* (Bustos et al., 2004d).

	Producción de ácido láctico					Consumo de glucosa		
	P_0 (g/L)	P_{max} (g/L)	P_r (h ⁻¹)	r^2	F-Test. Prob.	$Y_{p/S}$ (g/g)	r^2	F-Test Prob.
Medio general de <i>Lactobacillus</i>	5.4	88.5	0.243	0.987	280.6	0.90	0.995	1597.5

P_0 = Concentración inicial de ácido láctico (g/L), P_{max} = Concentración máxima de ácido láctico (g/L), P_r = Relación entre la productividad volumétrica inicial de producto formado (r_p) y la concentración inicial de producto (P_0), $Y_{p/S}$ = Rendimiento en producto (g/g), r^2 = Coeficiente de regresión, y F-Test Prob. = Parámetro estadístico.

Fermentaciones con lías de vinificación como nutrientes

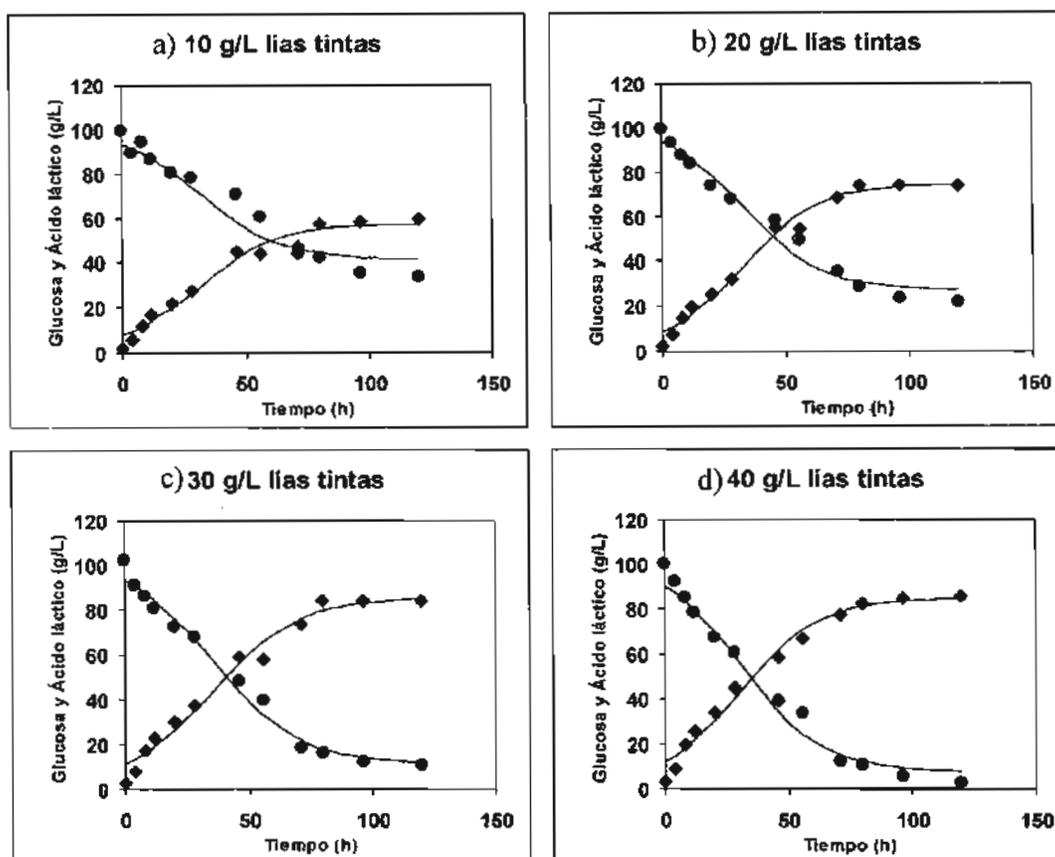
Lías tintas

La figura 3.2 recoge las cinéticas de fermentación cuando utilizamos lías tintas en diferentes concentraciones. En la tabla 3.2 se muestran los valores cinéticos de estas fermentaciones, así como los parámetros estadísticos y de regresión. Los parámetros r^2 para el consumo de glucosa y r^2 para la producción de ácido láctico nos muestran una buena concordancia entre los resultados teóricos (*th*) y los experimentales (*exp*).

Se puede observar que las fermentaciones realizadas con lías procedentes de la vinificación de vino tinto muestran en todos los casos un rendimiento en producto mayor a 0.88 g/g. Si se comparan todas las cinéticas de la figura 3.2 y se tiene en cuenta la tabla 3.2, se puede observar que a medida que aumentamos la concentración de lía hasta 30 g/L, se produce un mayor consumo de glucosa, a la vez que se obtiene una mayor concentración de ácido láctico. Cuando empleamos 40 g/L de lía, aunque el azúcar residual resulta menor, no se llega a obtener una mayor concentración de ácido láctico.

Comparando estos resultados con los obtenidos al utilizar el medio general de *Lactobacillus*, se observa que, aunque la cinética de estas fermentaciones es mucho más lenta y no se llega a consumir toda la glucosa como ocurre cuando utilizamos el

Figura 3.2. Fermentación con lía tinta (Bustos *et al.*, 2004d)



medio general, se alcanza en todos los casos un rendimiento en producto igual o superior al obtenido usando el medio MRS.

Utilizando 30 y 40 g/L de lía se obtienen unas concentraciones máximas de ácido láctico de 85.4 g/L y 84.7 g/L respectivamente. Estos valores son cercanos a los 88.5 g/L obtenidos con el medio general de *Lactobacillus*.

Lías blancas

La figura 3.3 recoge las cinéticas de fermentación cuando utilizamos lías blancas en diferentes concentraciones. En la tabla 3.3 se muestran los valores cinéticos de estas

Tabla 3.2 Valores cinéticos, estadísticos y de regresión para el ácido láctico y la glucosa correspondientes a las fermentaciones con lías tintas (Bustos *et al.*, 2004d)

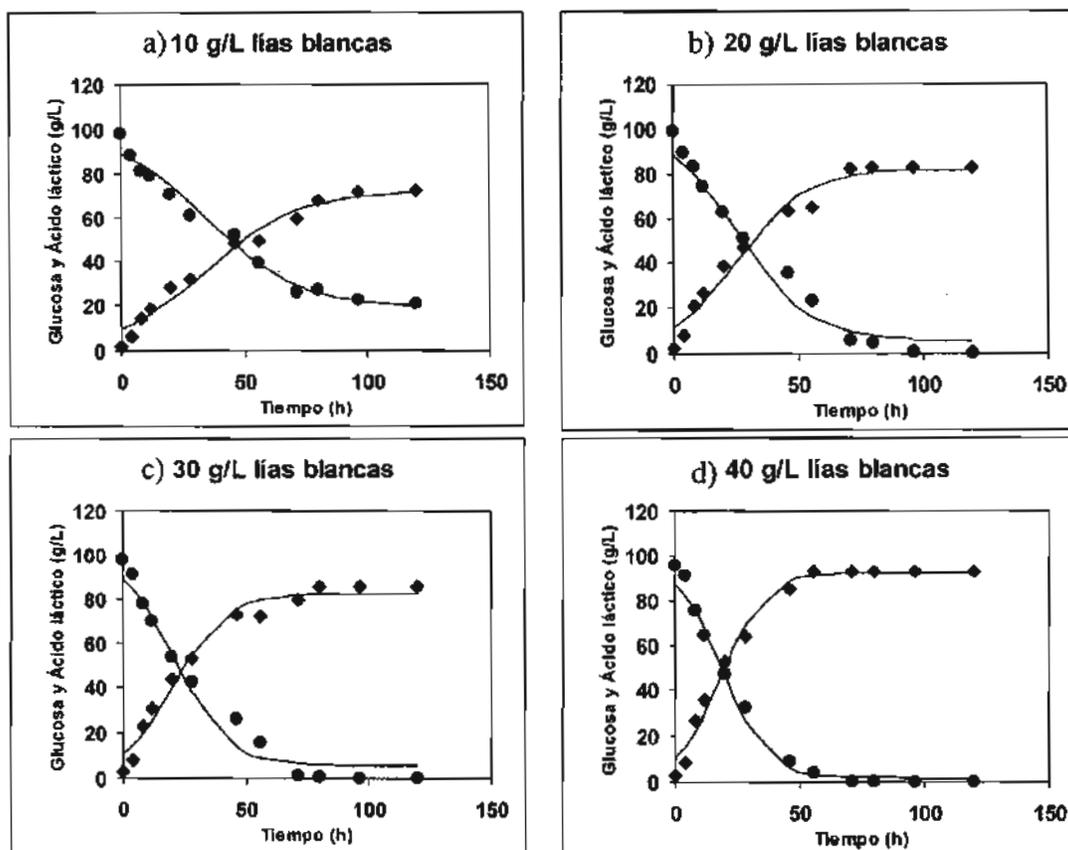
	Producción de ácido láctico					Consumo de glucosa		
	P_0 (g/L)	P_{max} (g/L)	P_r (h ⁻¹)	r^2	F-Test. Prob.	$Y_{P,S}$ (g/g)	r^2	F-Test Prob.
10 g/L lía tinta	7.6	57.4	0.061	0.972	117.8	0.95	0.942	119.6
20 g/L lía tinta	8.5	74.5	0.063	0.986	233.3	0.99	0.968	248.6
30 g/L lía tinta	10.9	85.4	0.055	0.978	144.1	0.90	0.984	442.2
40 g/L lía tinta	12.1	84.7	0.060	0.981	171.3	0.88	0.984	392.8

P_0 = Concentración inicial de ácido láctico (g/L), P_{max} = Concentración máxima de ácido láctico (g/L), P_r = Relación entre la productividad volumétrica inicial de producto formado (r_p) y la concentración inicial de producto (P_0), $Y_{P,S}$ = Rendimiento en producto (g/g), r^2 = Coeficiente de regresión, y F-Test Prob. = Parámetro estadístico.

fermentaciones, así como los parámetros estadísticos y de regresión. Al igual que con las lías tintas, se observa una concordancia positiva entre los resultados teóricos (*th*) y los experimentales (*exp*).

Si comparamos las cinéticas de la figura 3.3 o los parámetros cinéticos P_r (el cual nos da una idea de la velocidad de producción de ácido láctico) y P_{max} de las distintas fermentaciones, se puede observar que a medida que aumentamos la concentración de lía se alcanza una mayor velocidad de producción de ácido láctico, además de que se obtiene una mayor concentración del mismo. El rendimiento en producto de estas fermentaciones está comprendido entre 0.85 g/g y 0.96 g/g.

Comparando estos resultados con los obtenidos en la fermentación con medio general de *Lactobacillus*, se observa que cuando utilizamos 40 g/L de lía blanca como nutriente se logra obtener una concentración de ácido láctico superior a la obtenida con el medio general, aunque con una cinética un poco más lenta. Así, se consigue una concentración máxima de ácido láctico de 92.3 g/L frente a los 88.5 g/L de ácido láctico que se producen con el medio MRS. También es importante resaltar que utilizando 20 g/L y 30 g/L de lía blanca se alcanzan concentraciones de ácido láctico significativas: 81.8 g/L y 82.2 g/L, respectivamente.

Figura 3.3 Fermentación con lías blancas (Bustos *et al.*, 2004d)

Si se comparan todas las cinéticas de las figuras 3.2 y 3.3 tomando en cuenta las tablas 3.2 y 3.3, se puede observar que los experimentos realizados con las lías procedentes de vinificación de tinto muestran una cinética de fermentación más lenta y con menor producción de ácido láctico que en los experimentos realizados con las lías de vinificación de blanco, hecho que coincide con lo expuesto por Bustos *et al.* (2004a y b) en trabajos anteriores donde se llevaron a cabo fermentaciones con distintas cepas de *Lactobacillus* utilizando lías de vinificación tintas y blancas como nutrientes.

Utilizando solamente 20 g/L de lía blanca se llega a alcanzar aproximadamente la misma concentración de ácido láctico que empleando 40 g/L de lía tinta, sin embargo, la cinética de fermentación de la primera es ligeramente más rápida.

Tabla 3.3. Valores cinéticos, estadísticos y de regresión para el ácido láctico y la glucosa, correspondientes a las fermentaciones con lías blancas (Bustos *et al.*, 2004d)

	Producción de ácido láctico					Consumo de glucosa		
	P_0 (g/L)	P_{max} (g/L)	P_r (h ⁻¹)	r^2	F-Test. Prob.	$Y_{p/s}$ (g/g)	r^2	F-Test Prob.
10 g/L lía blanca	9.5	72.1	0.054	0.975	118.7	0.89	0.979	337.5
20 g/L lía blanca	11.3	81.8	0.071	0.973	124.1	0.85	0.980	317.7
30 g/L lía blanca	10.5	82.2	0.093	0.977	164.4	0.86	0.974	291.2
40 g/L lía blanca	10.4	92.3	0.111	0.985	241.7	0.96	0.992	697.4

P_0 = Concentración inicial de ácido láctico (g/L), P_{max} = Concentración máxima de ácido láctico (g/L), P_r = Relación entre la productividad volumétrica inicial de producto formado (r_p) y la concentración inicial de producto (P_0), $Y_{p/s}$ = Rendimiento en producto (g/g), r^2 = Coeficiente de regresión, y F-Test Prob. = parámetro estadístico.

Este comportamiento distinto entre ambas fermentaciones está relacionado con la diferencia de composición entre lías procedentes de vino tinto y lías de vino blanco. El contenido en minerales como Mg, Zn o Cu, imprescindibles para el crecimiento de las bacterias lácticas, se presentan en las lías procedentes de vino blanco, en concentraciones superiores a las encontradas en lías procedentes de vino tinto (Bustos *et al.*, 2004a). Debido a los resultados obtenidos en las fermentaciones, cabría pensar que las lías procedentes de vino tinto, con respecto a las lías procedentes de vino blanco, presentan un menor contenido en algún nutriente necesario para el crecimiento y desarrollo de *Lactobacillus pentosus*.

Lías destoxificadas

Las lías, al salir de la columna de destilación, presentan una tasa elevada de polifenoles ligados a las proteínas (Bourzeix *et al.*, 2003). Estos polifenoles podrían impedir la asimilación de algunas proteínas por *Lactobacillus pentosus*.

Con una destoxificación de las lías se consigue eliminar muchos compuestos fenólicos presentes en las mismas, con lo cual podemos hacer de las lías un mejor medio nutritivo para *Lactobacillus pentosus*. En este experimento hicieron fermen-

taciones con lías blancas y tintas destoxificadas en concentración de 20 g/L; los resultados se compararon con los obtenidos en las fermentaciones en las que se utilizaron lías sin destoxificar.

En la figura 3.4 se muestran los resultados obtenidos cuando se utilizan lías procedentes de vino blanco y de vino tinto destoxificadas frente a los resultados obtenidos anteriormente con las mismas lías sin destoxificar. En la tabla 3.4 se muestran los valores cinéticos así como los parámetros estadísticos y de regresión.

Cuando utilizamos 20 g/L de lía tinta destoxificada se obtiene una P_{max} de 74.9 g/L, mientras que con 20 g/L de la misma lía sin destoxificar se obtuvo una P_{max} de 74.5 g/L; asimismo, empleando 20 g/L de lía blanca destoxificada se obtiene una P_{max} de 85.1 g/L, mientras que con 20 g/L de la misma lía sin destoxificar se obtuvo una P_{max} de 81.8 g/L. El parámetro P_r , el cual nos da una idea de la velocidad de producción de ácido láctico, muestra valores superiores en las fermentaciones realizadas con lías destoxificadas.

Podemos concluir que al destoxificar la lías conseguimos que la fermentación transcurra a velocidad ligeramente mayor, pero no conseguimos que *Lactobacillus pentosus* produzca una mayor concentración de ácido láctico; por tanto, en nuestra opinión, este resultado no compensa la realización de esta etapa de destoxificación.

Figura 3.4. Fermentaciones con 20 g/L de lía tinta y blanca destoxificada y sin destoxificar

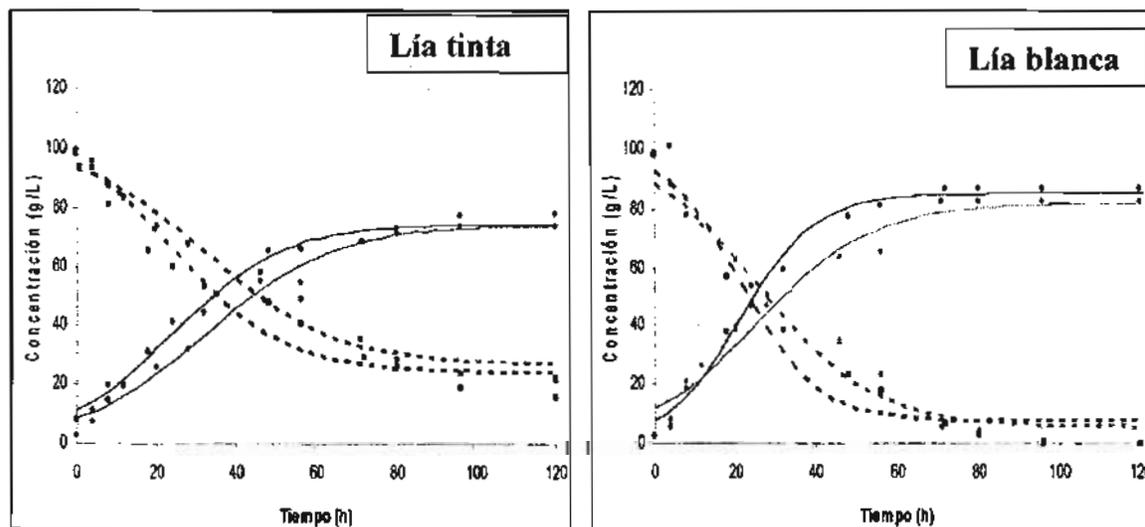


Tabla 3.4 Valores cinéticos, estadísticos y de regresión para el ácido láctico y la glucosa correspondientes a las fermentaciones con lias destoxificadas y lias sin destoxificar

	Producción de ácido láctico					Consumo de glucosa		
	P_0 (g/L)	P_{max} (g/L)	P_r (h ⁻¹)	r^2	F-Test. Prob.	$Y_{p/s}$ (g/g)	r^2	F-Test Prob.
20 g/L lía tinta	8.5	74.5	0.063	0.986	233.3	0.99	0.968	248.6
20 g/L lía tinta destoxificada	11.1	74.9	0.072	0.986	297.8	0.90	0.944	146.1
20 g/L lía blanca	11.3	81.8	0.071	0.973	124.1	0.85	0.980	317.7
20 g/L lía blanca destoxificada	7.7	85.1	0.108	0.988	303.1	0.91	0.961	224.9

P_0 = Concentración inicial de ác. láctico (g/L), P_{max} = Concentración máxima de ác. láctico (g/L), P_r = Relación entre la productividad volumétrica inicial de producto formado (r_p) y la concentración inicial de producto (P_0), $Y_{p/s}$ = Rendimiento del producto (g/g), r^2 = Coeficiente de regresión, y F-Test Prob. = Parámetro estadístico.

Producción de ácido láctico por Lactobacillus pentosus a partir de hidrolizados hemicelulósicos de la poda de sarmiento utilizando como nutrientes lias de vinificación

Cabe resaltar la escasez de trabajos existentes sobre la utilización de hidrolizados hemicelulósicos para la obtención de ácido láctico. Así, Hofvendahl y Hahn-Hägerdal (2000) realizaron una revisión bibliográfica sobre la producción biotecnológica de ácido láctico empleando principalmente bacterias lácticas a partir de distintos residuos agroindustriales. En la mayoría de los trabajos se utilizó, como fuente de carbono, hexosas o materiales amiláceos. Por el contrario, cuando se utilizan pentosas como fuente de carbono para la producción de ácido láctico algunos autores recomiendan el uso de cepas mutadas de *Lactobacillus* (Ishizaki *et al.*, 1992b; Ishizaki *et al.*, 1995). Recientemente han aparecido algunos trabajos que apuntan a la utilización de *Lactobacillus pentosus* para la producción de ácido láctico por medio de pentosas en trabajos en discontinuo (Perttunen *et al.*, 2001, Garde *et al.*, 2002) o en continuo (Periscal, 2004).

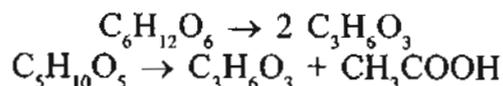
En este trabajo se utilizó poda de sarmiento de vid como sustrato para la obtención de azúcares hemicelulósicos susceptibles de ser fermentados a ácido láctico por *Lactobacillus pentosus*. Con base en trabajos anteriores, Bustos *et al.* (2004c), sometieron la poda de sarmiento a un proceso de prehidrólisis con H₂SO₄ al 3% durante 15 minutos. Tras el tratamiento de prehidrólisis y neutralización se obtuvieron licores hemicelulósicos con la siguiente composición: 8 ± 1 g/L de glucosa, 17 ± 1 g/L de xilosa, 4.5 ± 0.5 g/L de ácido acético y 3 ± 0.5 g/L de arabinosa.

Una vez obtenidos los azúcares hemicelulósicos, se suplementan con diferentes concentraciones de lía, procedentes tanto de vino blanco como de vino tinto, y se comparan con los resultados obtenidos al suplementar los licores hemicelulósicos con el medio general de *Lactobacillus*. Cabe resaltar que las lías de vinificación nunca han sido utilizadas como nutrientes en fermentaciones realizadas a cabo a partir de hidrolizados hemicelulósicos. En este experimento, con el fin de no diluir estos medios, las lías se liofilizaron.

Las figuras 3.5 y 3.6 muestran las cinéticas de fermentación referentes al consumo de glucosa, xilosa y arabinosa, así como de producción de ácido láctico y ácido acético para *Lactobacillus pentosus*.

En la tabla 3.5 se muestra la concentración de sustrato inicial y residual y de ácido láctico alcanzada en cada caso, así como la productividad volumétrica después de 33 horas y el rendimiento producto/sustrato (por sustrato se entiende la suma de los azúcares hemicelulósicos). También se recoge en dicha tabla información relativa al ácido acético producido en la fermentación: concentración inicial, concentración final y rendimiento (Bustos *et al.*, 2004d).

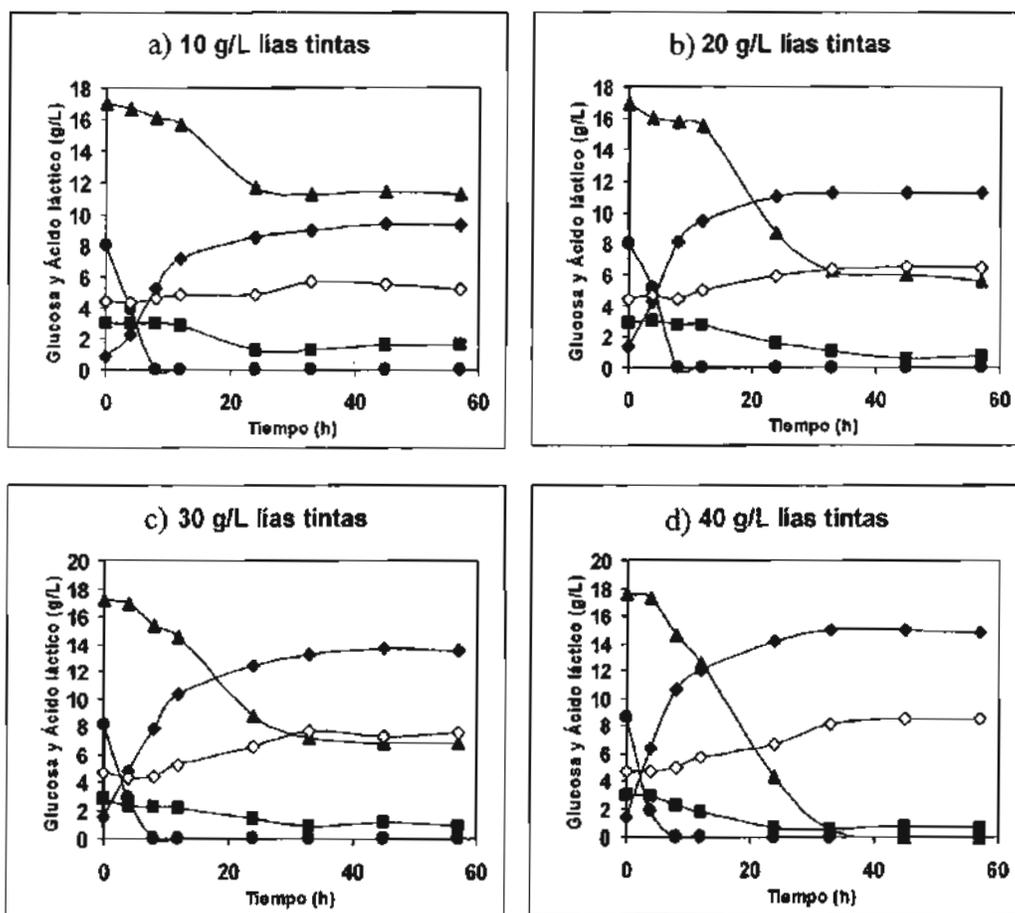
La bacteria *Lactobacillus pentosus* desarrolla una fermentación homoláctica para transformar la glucosa en ácido láctico y una fermentación heteroláctica para transformar la xilosa a ácido láctico (60% aproximadamente) y a ácido acético (40% aproximadamente), siguiendo la estequiometría:



Como se puede observar en las figuras 3.5 y 3.6, el primer azúcar que se consume es la glucosa y, una vez que ésta casi desaparece, comienza a consumirse la xilosa. En cuanto a la arabinosa, ésta es consumida de forma simultánea a la xilosa, quedando siempre una cierta cantidad residual de arabinosa en el medio. Los rendimientos de ácido láctico en estas fermentaciones oscilaron entre 0.43 y 0.59 g/g. Estos valores son similares a los obtenidos por otros autores (Tyree *et al.*, 1990; Ishizaki *et al.*, 1992b).

En lo que se refiere a la utilización de las lías procedentes de vino blanco, cabe destacar que empleando 20, 30 y 40 g/L de lía blanca se obtuvieron concentraciones de ácido láctico similares o incluso superiores a las alcanzadas utilizando el medio general de *Lactobacillus*. Las productividades volumétricas de estas fermentaciones calculadas 33 horas después, muestran también valores similares (Bustos *et al.*, 2004d). Por otra parte, en lo que se refiere a la utilización de las lías procedentes de vino tinto, también es importante destacar que empleando 40 g/L de lía tinto se obtuvo una concentración de ácido láctico de 15.0 g/L, concentración cercana a los 16.1 g/L obtenidos con el medio general de *Lactobacillus*. De igual manera, la productividad volumétrica alcanzada a las 33 horas con 40 g/L de lía tinto fue de 0.41 g/L·h, siendo 0.46 g/L·h la productividad volumétrica alcanzada con el medio general de

Figura 3.5. Fermentación del hidrolizado hemicelulósico y lías tintas a diferente concentración (Bustos *et al.*, 2004d)

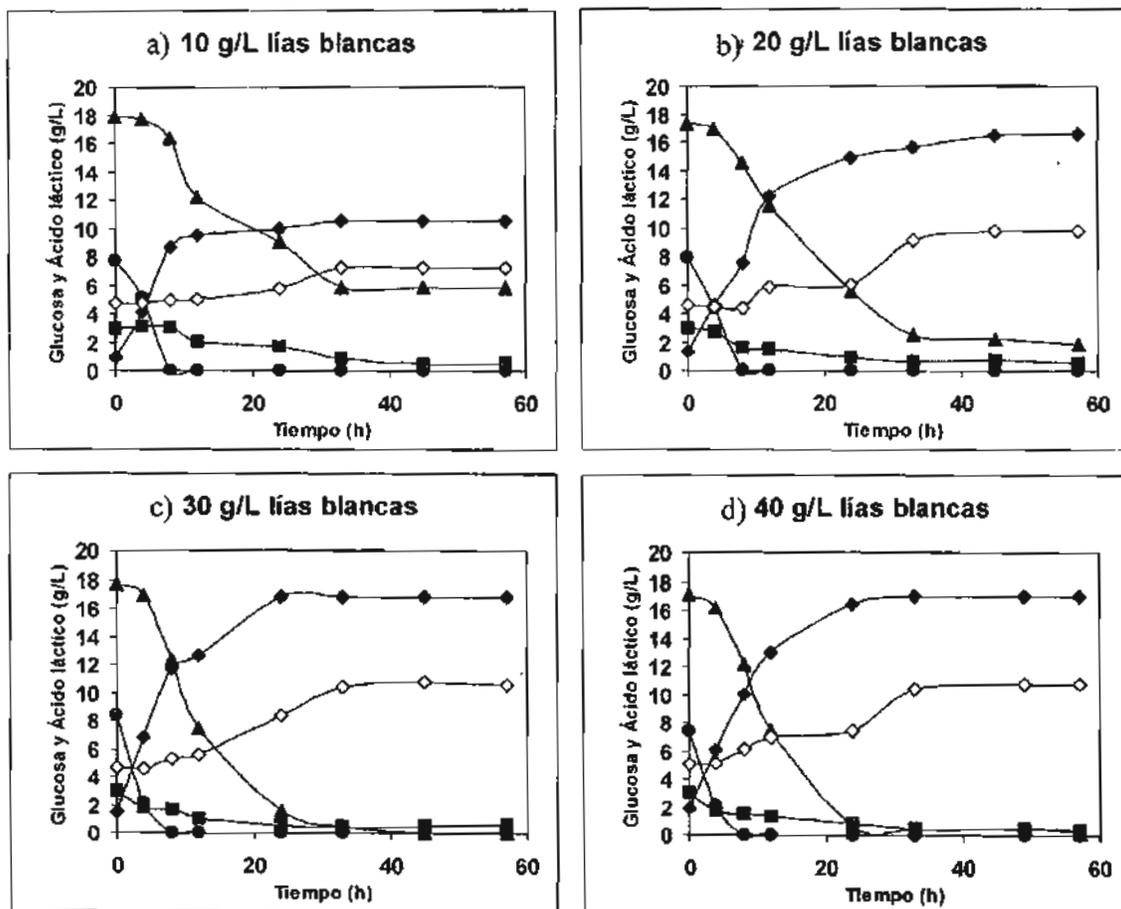


Lactobacillus (Bustos *et al.*, 2004d). También se puede observar en la tabla 3.5, que a medida que se aumenta la concentración de lía, se logra una mayor metabolización de las pentosas y se obtiene una mayor concentración de ácido acético.

Perttunen *et al.* (2001), utilizando *Lactobacillus pentosus* obtuvieron concentraciones de ácido láctico de 33 g/L a partir de hidrolizados hemicelulósicos procedentes de madera de juncos, pero para ello pretrataron el hidrolizado con carbón activo con el objetivo de extraer compuestos inhibidores. En este trabajo no fue necesaria la etapa de destoxificación.

En las figuras 3.5 y 3.6, y en la tabla 3.5, se puede observar que *Lactobacillus pentosus* fue capaz de fermentar la xilosa en presencia de concentraciones de glucosa superiores a 5 g/L. Estos resultados son más prometedores que los logrados por Tyree

Figura 3.6. Fermentación del hidrolizado hemicelulósico y lías blancas a diferente concentración (Bustos *et al.*, 2004d)



et al. (1990) en su trabajo con *Lactobacillus xilosus*, el cual no fue capaz de fermentar la xilosa en presencia de concentraciones de glucosa superiores a 5 g/L, y concentraciones de glucosa de 2 g/L en el medio de fermentación, lo que sólo permitió metabolizar 29% de la xilosa. Además, en el presente trabajo los resultados se alcanzaron trabajando con un medio nutricional de bajo coste, como son las lías de vinificación.

Como conclusión en lo referente a la utilización de hidrolizados hemicelulósicos como fuente de carbono para *Lactobacillus pentosus*, se puede decir que la poda de sarmiento de vid es una buena fuente de azúcares hemicelulósicos asimilables por *L. pentosus*, incluso en presencia de medios nutricionales de bajo coste como son las lías de vinificación.

Agradecimientos

Los autores agradecen a las siguientes instituciones por el respaldo financiero para la realización de este trabajo: Ministerio de Ciencia y Tecnología de España (proyecto

Tabla 3.5. Valores cinéticos de las fermentaciones con hidrolizado hemicelulósico y diferentes medios nutritivos (Bustos *et al.*, 2004d)

	S_0 (g/L)	S (g/L)	LA_0 (g/L)	LA_{max} (g/L)	$Y_{P(LA)/S}$ (g/g)	$Q_{P(LA)}$ (g/L·h)	AcH_0 (g/L)	AcH_{max} (g/L)	$Y_{P(AcH)/S}$ (g/g)
Medio general de <i>Lactobacillus</i>	27.5	0.4	1.0	16.1	0.56	0.458	8.3	17.4	0.33
10 g/L de lía tinta	27.9	12.4	0.9	9.4	0.55	0.242	4.5	5.7	0.08
20 g/L de lía tinta	27.9	6.4	1.3	11.3	0.47	0.303	4.5	6.5	0.09
30 g/L de lía tinta	28.2	7.6	1.5	13.6	0.59	0.355	4.6	7.6	0.15
40 g/L de lía tinta	29.0	0.6	1.4	15.0	0.48	0.412	4.6	8.4	0.13
10 g/L de lía blanca	28.6	6.5	1.0	10.5	0.43	0.288	4.7	7.2	0.11
20 g/L de lía blanca	28.2	2.4	1.3	16.6	0.59	0.433	4.6	9.7	0.20
30 g/L de lía blanca	29.0	0.7	1.5	16.8	0.54	0.464	4.6	10.8	0.22
40 g/L de lía blanca	27.5	0.5	1.8	17.0	0.56	0.460	4.9	10.8	0.22

S_0 = Concentración inicial de sustratos (xilosa, glucosa y arabinosa), S = Concentración final de sustratos (xilosa, glucosa y arabinosa). LA_0 = Concentración inicial de ácido láctico (g/L), LA_{max} = Concentración máxima de ácido láctico (g/L). $Y_{P(LA)/S}$ = Rendimiento en ácido láctico (g/g). $Q_{P(LA)}$ = Productividad volumétrica de ácido láctico calculada a las 33 horas (g/L·h), AcH_0 = Concentración inicial de ácido acético, AcH_{max} = Concentración máxima de ácido acético, $Y_{P(AcH)/S}$ = Rendimiento en ácido acético.

PPQ2003-02802, que tiene una financiación parcial a cargo de fondos FEDER de la Unión Europea); Xunta de Galicia (PGIDIT04PXIC38302PN) y Universidad de Vigo (K412 122F 64102). También agradecemos a la Universidad Autónoma de Tamaulipas (México) por el respaldo económico otorgado a doña Guadalupe Bustos Vázquez (convenio P/PROME:UATAM-2002-02-01, folio UATAM-153).

Bibliografía

- Aristidou, A.; Penttila, M. (2000), "Metabolic engineering applications to renewable resource utilization", *Curr Opin Biotechnol.*, 1(2): 187-198.
- Bourzeix, M.; Escudier, J.L.; Mourgues, J. (2003), "Productos de diversificación", en Flancy, Claude, *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*, Mundi-Prensa, 23: 707-716.
- Bustos, G.; Moldes, A.M.; Cruz, J.M.; Domínguez, J.M. (2004a), "Formulation of low-cost fermentative media for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus* using Vinification Lees as Nutrients", *J. Agric. Food Chem.*, 52: 801-808.
- _____; Moldes, A.M.; Cruz, J.M.; Domínguez, J.M. (2004b), "Evaluation of vinification lees as a general medium for *Lactobacilli* strains", *J. Agric. Food Chem.*, 52: 5233-5239.
- _____; Moldes, A.M.; Cruz, J.M.; Domínguez, J.M. (2004c), "Production of fermentable media from vine trimming wastes and bioconversion into lactic acid by *Lactobacillus pentosus*", *J. Sci. Food Agric.*, 84: 2105-2112.
- _____; De la Torre, N; Martínez, M; Casares, A; Domarco, Y. (2004), "Evaluación de azúcares hemicelulósicos de las podas de sarmiento y lías de vinificación como medio nutritivo para la producción de ácido láctico por *Lactobacillus pentosus*", *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 4(4), pp. 283-291.
- Chahal, S.P. (1989), "Lactic acid", en *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Berlín, VCH Verlag.
- Garde, A.; Jonsson, G.; Schmidt, A.S.; Ahring, B.K. (2002), "Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*", *Bioresource Technol.*, 81(3): 217-23.
- Hofvendahl, K.; Hahn-Hagerdal, B. (1999b), "Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources", *Enzyme Microbiol. Technol.*, 26: 87-107.
- _____; Hahn-Hagerdal, B. (2000), "Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources", *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2-4): 87-107.

- Ishizaki, A.; Ueda, T.; Tanaka, K.; Stanbury, P.F. (1992b), "L-Lactate production from xylose employing *Lactococcus lactis* IO-1", *Biotechnol. Lett.*, 14: 599-604.
- _____; Ueda, T. (1995), "Growth kinetics and product inhibition of *Lactococcus lactis* IO-1 culture in xylose medium", *J. Ferment. Bioeng.*, 80(3): 287-90.
- Jackson, R. (2004), "Fermentation", en *Wine Science: Principles and Applications*, San Diego, CA, Academic Press, pp. 220-276.
- Jouret, C.; Cantagrel, R.; Galy, B. (2003), "Aguardientes de origen vitícola", en Flancy, Claude, *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*, Mundi Prensa, 659-676.
- Martínez, A.; Rodríguez, M.E.; York, S.W.; Preston, J.F.; Ingram, L.O. (2000), "Effects of Ca(OH)₂ treatments ('Overliming') on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates", *Biotechnol Bioeng.*, 69(5): 526-536.
- Mercier, P.; Yerushalmi, L.; Rouleau, D.; Dochain, D. (1992), "Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus*", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 55: 111-121.
- Moldes, A.B.; Alonso, J.L.; Parajó, J.C. (2001), "Strategies to improve the bioconversion of processed wood into lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76(3): 279-284.
- Parajó, J.C.; Alonso, J.L.; Santos, V.; Moldes, A.B. (1995a), "Producción biotecnológica de ácido láctico: aspectos generales", *Alimentación Equipos y Tecnología*, 15(1): 91-100.
- Periscal, F. (2004), "Aprovechamiento de residuos agroindustriales para la producción en continuo de ácido láctico", proyecto final de carrera, Ingeniería Técnica Agrícola. Departamento de Enxeñaría Química. Facultad de Ciencias de Ourense. Universidad de Vigo.
- Perttunen, J.; Myllykoski, L.; Keiski, R.L. (2001), "Lactic acid fermentation of hemicellulose liquors and their activated carbon pretreatments", *Focus Biotechnol.*, 4: 29-38.
- Takahashi, C.M.; Lima, K.G.C.; Takahashi, D.F.; Alterthum, F. (2001), "Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate and sugar mixtures to ethanol by recombinant *Escherichia coli* KO11", *World J. Microb Biot.*, 16(8-9): 829-834.
- Tyree, R.W.; Clausen, E.C.; Gaddy, J.L. (1990), "The fermentative characteristics of *Lactobacillus xylosus* on glucose and xylose", *Biotechnol. Lett.*, 12(1): 51-6.

Transformación biotecnológica de los residuos de camarón de cultivo

Biotechnological Transformation from Cultivated Shrimp Waste

Sánchez Machado, D.I.; López Cervantes, J.; Ríos Vázquez, N.J.*

Resumen

La finalidad de este trabajo fue evaluar el efecto de la fermentación láctica de los residuos de camarón sobre la calidad y rendimiento de la quitina, proteína y pigmentos obtenidos. Durante la fermentación láctica fue monitoreado pH y Acidez Total Titulable (ATT). Del fermentado se separaron dos fases: una líquida, utilizada para la extracción de proteínas y pigmentos, los cuales fueron recuperados; y una fase sólida, que corresponde a la quitina cruda. Posteriormente, el residuo sólido fue despigmentado, desproteinizado y desmineralizado. La calidad de la quitina se determinó en cuanto al contenido de nitrógeno, cenizas, humedad y proteínas, además del color y rendimiento final. Se observaron diferencias significativas en los parámetros de calidad entre las quitinas obtenidas con y sin fermentación láctica, pero no para el rendimiento. Por tanto, la fermentación láctica permite obtener quitina de excelente calidad para ser utilizada en el tratamiento de aguas residuales, agricultura, entre otros usos.

Abstract

The purpose of this research work is to evaluate the effect of the lactic fermentation of shrimp waste in obtained chitin, protein and pigments' quality

* Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora, Apartado Postal 541, Ciudad Obregón, Sonora, México. Tel.: +52-644-4109000 Fax: +52-644-4109001. e-mail: jlopezc@itson.mx

and yield. The pH and Titular Total Acidity was monitored during fermentation. We separated two phases from the final fermentation, one liquid phase was used for protein extraction and we recovered its pigments, and a solid phase which corresponds to raw chitin. Subsequently, the wasted solid did not contain pigment, neither protein and was demineralised as well. We could determine chitin's quality according to the amount of nitrogen, ashes, humidity, protein, final yield, and colour. There were significant differences among the quality parameters among the obtained chitin with and without lactic fermentation, but not for its yield. Therefore, lactic fermentation allows obtaining an excellent quality chitin to be used in waste water, agricultural usage, among others.

Introducción

En la década de los noventa, se inicia en el noroeste de México una nueva alternativa para la producción de camarón: la acuicultura, que ha sido bien aceptada por pescadores de la región, quienes preocupados por la disminución en la captura del crustáceo de bahía buscan otras alternativas de trabajo, así como por inversionistas que han promovido su desarrollo. La industria camaronera en Sonora es muy productiva, pues ofreció incrementos anuales de 17%, con una producción de 40 389 toneladas métricas (TM) en 2004, de las cuales, 55% corresponde a producción de cultivo (SEMARNAP, 2004).

El camarón (*Penaeus sp.*) es un crustáceo decápodo, de tamaño y color variable. Su cuerpo es algo encorvado y está dividido en dos partes: cefalotórax y abdomen, comercialmente conocidos como *cabeza* y *cola*, respectivamente. El cefalotórax está cubierto por un caparazón que contiene la cabeza, órganos vitales del animal, tres pares de patas prensoras y dos caminadoras. El abdomen está dividido en seis segmentos, el último de ellos termina en una punta fina llamada *telson* (Cañipa Morales y Durán de Bazúa, 1997). Aunque el camarón es excepcionalmente nutritivo (Rui y Nunes, 2003; Cañipa Morales y Durán de Bazúa, 1997) solamente 55% del animal es comestible (Armenta López *et al.*, 2002; Cira *et al.*, 2002a); el resto constituye al cefalotórax. Este residuo es descartado como basura después de la captura del camarón, convirtiéndose en una fuente de contaminación y ocasionando serios problemas ecológicos debido a su fácil descomposición. Por tanto, la industria camaronera se enfrenta a un creciente dilema debido a la reciente imposición de leyes sobre contaminación, que ahora prohíben la disposición de esta basura en el océano o en los sitios destinados como vertederos (Mandeville *et al.*, 1992). El uso práctico de esta basura minimizaría el problema de contaminación y al mismo tiempo maximizaría las ganancias del productor acuícola.

En la búsqueda de alternativas para su uso en alimentación animal, se han investigado diversos parámetros de secado en los residuos de camarón, encontrándose que el secado solar seguido de trituración son técnicas económicas y de fácil realización (Kumar y Bandyopadhyay, 1998). Además, para la elaboración de productos destinados a alimentación animal, se ha propuesto el proceso de fermentación con *Lactobacillus plantarum* seguido de secado solar, a fin de obtener concentrados proteínicos que pueden ser incorporados a las dietas acuícolas (Fagbenro y Bello Olusoji, 1997). Actualmente, la conservación mediante fermentación láctica es una técnica barata que estabiliza y retiene la calidad nutricional e incrementa la explotación de este recurso al facilitar la recuperación de diversos componentes para su utilización como productos comerciables.

En los últimos años se ha demostrado que la basura de camarón es una excelente fuente de quitina, la cual se encuentra asociada con proteínas, minerales, lípidos y pigmentos (No *et al.*, 1989). Todos ellos pueden ser extraídos cuantitativamente y destinados a diversas aplicaciones biológicas, tales como alimentos, colorantes y productos farmacéuticos (Li *et al.*, 1992; Rao *et al.*, 2000). Tradicionalmente la quitina se aísla de la basura de camarón por medio de la desmineralización con ácido diluido y es desproteinizada en una solución básica caliente, pero estos reactivos causan una parcial diacetilación de la quitina e hidrólisis del polímero (Lin Teng *et al.*, 2001; Synowiecki y Al-Khateeb, 2003). Una alternativa al tratamiento químico es el uso de enzimas proteolíticas (Gagné y Simpson, 1993; Chakrabarti, 2002; Gopalakrishnan *et al.*, 2000). Otros investigadores han reportado que la fermentación de la basura de camarón con bacterias ácido lácticas disminuye el pH del medio hasta aproximadamente 4, facilitando la hidrólisis de las proteínas asociadas a la quitina (Cira *et al.*, 2002a; Rao *et al.*, 2000; Guerrero Legarreta *et al.*, 1996). La basura fermentada forma un ensilaje que contiene un licor rico en proteínas y quitina insoluble (Nair y Prabhu, 1989). También se ha estudiado la estabilización de los pigmentos, especialmente astaxantina, en ensilados con bacterias lácticas (Guillou *et al.*, 1995; Armenta López *et al.*, 2002).

La quitina es un homopolisacárido lineal que se encuentra en el exoesqueleto de insectos y crustáceos, que consiste en residuos de N-acetilglucosamina con enlaces β -(1 \rightarrow 4). Como los residuos de N-acetilglucosamina están cargados negativamente, las fibras de quitina son polianiónicas y pueden formar complejos con varios cationes (Horton *et al.*, 1993). Este compuesto tiene una variada aplicación en diferentes ramas de la medicina, la industria y la biotecnología (Ramírez *et al.*, 2000).

Los pigmentos carotenoides que se encuentran en el cefalotórax del camarón presentan estructuras muy parecidas entre sí, y globalmente se conocen como astaxantinas. Tres estructuras corresponden a los estereoisómeros de la astaxantina (3D, 3'S astaxantina; 3R, 3'S astaxantina; 3R, 3'R astaxantina) y, la restante, a la

cantaxantina (Cañipa Morales y Durán de Bazúa, 1997). Considerando que las astaxantinas son los principales carotenoides en muchas especies acuáticas y que no pueden ser sintetizadas de *novo* por truchas, salmones y otros animales, es necesario incluir en su dieta este tipo de pigmentos.

De acuerdo con Gildberg y Stenberg (2001), la basura de camarón contiene 26.5% de materia seca y cerca de 74% de materia orgánica (principalmente proteína y quitina), 0.4% son lípidos y el resto son minerales. De los tejidos proteínicos se ha obtenido un hidrolizado que puede convertirse en una herramienta valiosa en farmacología o como agente estimulante del crecimiento en alimentación animal.

El objetivo de este estudio fue establecer la factibilidad de la fermentación láctica utilizando un probiótico comercial con el propósito de darle un valor agregado a la basura de camarón mediante la extracción de sus constituyentes principales, tales como quitina, pigmentos y proteínas.

Material y métodos

Muestras

La basura de camarón (*Penaeus sp*) cultivada en las granjas acuícolas del sur de Sonora, México, fue facilitada por la planta procesadora Mar Abierto (Ciudad Obregón, Sonora, México). Las muestras se almacenaron a -20°C en bolsas de polietileno de 500 g, posteriormente la muestra congelada fue triturada en molino con cedazo de 0.3 cm de diámetro interno, y la pasta obtenida se almacenó a -20°C en recipientes de polietileno de 200 g hasta el momento de su utilización.

Procedimientos analíticos generales

Los valores de pH fueron medidos usando un potenciómetro digital, y la acidez titulable (TTA) fue determinada con NaOH 0.1 N hasta un pH final de 8.4 expresada como % de ácido láctico (Armenta López *et al.*, 2002). Humedad, determinación gravimétrica mediante secado de la muestra a 105°C hasta peso constante (AOAC, 1995). Cenizas, método gravimétrico por incineración de la muestra en un horno mufla a 525°C por 5 horas (AOAC, 1995). Las proteínas fueron calculadas multiplicando el contenido de nitrógeno, determinado por el método Kjeldahl (AOAC, 1995) por 6.25. El color fue medido por medio de un colorímetro (Minolta, modelo CR-300). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Cuantificación de aminoácidos libres

En un matraz volumétrico fueron disueltos 25 mg del liofilizado proteínico obtenido de la fermentación en solución *buffer* de boratos; las muestras se sonifican durante 2 minutos para favorecer la disolución. El contenido de aminoácidos libres en la solución fue determinado con un equipo HPLC, utilizando una columna de fase reversa y detección por fluorescencia de los derivados obtenidos por reacción con FMOC (Sánchez Machado *et al.*, 2003).

Fermentación láctica de la basura de camarón

Preparación del inóculo. Como inóculo se utilizó un producto probiótico comercial de células inmovilizadas, el cual se diluye en agua para su activación (1:10) y es incubado a 37°C por 5 días. La densidad óptica final de la suspensión de células se estableció entre 1.7 a 2.0, medidos a una longitud de onda de 535 nm (Guerrero *et al.*, 1996).

Fermentación. La fermentación de 500 g de basura de camarón molido y descongelado se realizó en frascos de vidrio de 1 litro cubiertos con papel aluminio a temperatura controlada (30°C), hasta alcanzar valores de pH 4.5. Para ajustar el pH inicial de las muestras a 6.0, se realizaron ensayos con diferentes ácidos: ácido cítrico 2 M, ácido láctico 5 M y ácido acético 5 M. A continuación se adicionó el probiótico previamente activado (5% v/p). El pH y acidez titulable total (ATT) se monitorearon cada 3 horas, tanto en muestras agitadas como sin agitar.

Separación de las fracciones del ensilado. Las fracciones del producto de la fermentación fueron separadas en una centrifuga refrigerada (6 000 rpm, 5°C, 15 min), identificándose un licor y una fracción insoluble. En la fracción líquida fueron separadas por decantación dos fases, una acuosa y otra lipídica, las cuales se almacenaron para la extracción de proteínas y pigmentos, respectivamente. La fracción sólida corresponde a la quitina cruda o fresca. El proceso global está presentado en la figura 1.

Purificación de quitina

La secuencia de procesos utilizada para la purificación de quitina cruda fue: despigmentación (Cañipa Morales y Durán de Bazúa, 1997; Armenta López *et al.*, 2002), desproteínización enzimática (Escobedo, 1994), y desmineralización (Cañipa Morales y Durán de Bazúa, 1997); entre cada una de estas etapas la quitina fue secada 16

horas a 60°C. Los pigmentos fueron extraídos de la quitina cruda con una mezcla de solventes constituida de acetona, éter de petróleo y agua (7.5:1.5:1) en una relación 1:20 muestra a solvente, mediante agitación (300 rpm) durante 3 horas a temperatura ambiente; posteriormente el residuo fue lavado con acetona hasta su decoloración. Para la desproteización se mezclaron 10 g de muestra despigmentada en 160 ml de *buffer* carbonatos (pH 9.5) con 5 ml de solución de proteasa alcalina comercial (Takabate 380) preparada para que la relación enzima-proteína en la quitina fuera de 10% (55°C/3 horas/agitación). Después de enfriar a temperatura ambiente, el residuo fue lavado con agua destilada para remover la proteína hidrolizada. La desmineralización del residuo de quitina se llevó a cabo con HCl 1 N (1:2, muestra:ácido) en agitación constante a temperatura ambiente durante 3 horas.

Extracción de pigmentos

Durante fase lipídica del sobrenadante se le añadió antioxidante (catecol, 0.02%), posteriormente fue secada a vacío (40°C/4 horas), y se almacenó en atmósfera de nitrógeno a 5°C en frascos de vidrio con tapa cubiertos con papel aluminio, para su caracterización posterior.

Extracción del hidrolizado proteínico

De acuerdo a la figura 1, el hidrolizado proteínico de la basura de camarón corresponde a la fase acuosa obtenida después de la centrifugación en condiciones de refrigeración. El licor tomado de la centrifugación fue congelado y liofilizado (-40°C/ presión inferior a 133×10^{-3} mBar) para obtener un producto homogéneo en polvo que permitiera el fácil manejo de la muestra. El polvo liofilizado fue almacenado en bolsas de plástico herméticas y protegidas de la luz dentro de un desecador.

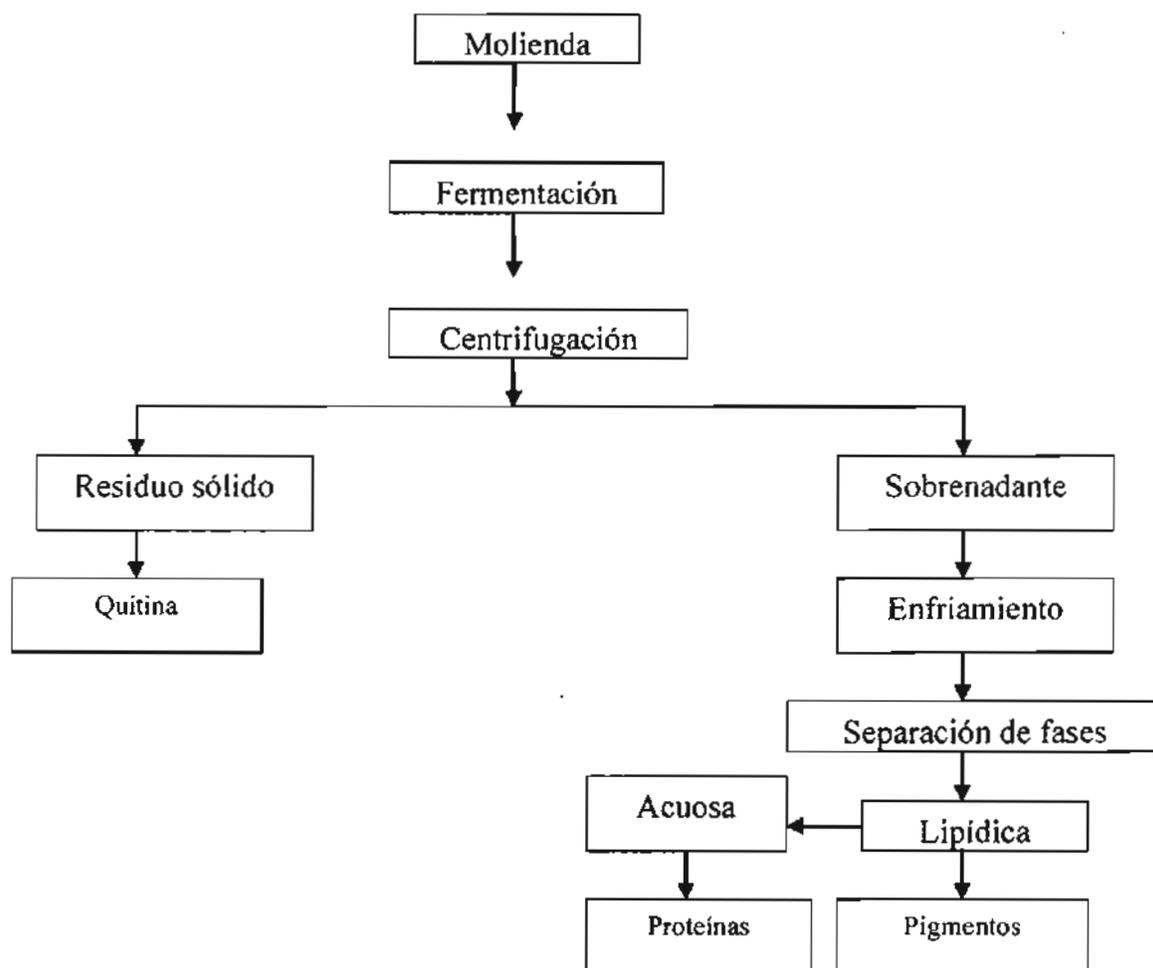
Resultados y discusión

Optimización de la fermentación láctica de la basura de camarón

Ajuste del pH inicial de la basura de camarón

Debido a la proteólisis y liberación de amonio se produce un incremento del pH durante las primeras horas de la fermentación (Rao *et al.*, 2000). Con el objetivo de

Figura 1. Proceso global del aprovechamiento integral de la cabeza de camarón



estudiar el perfil de variación del pH, la fermentación de la basura de camarón se realizó utilizando una cantidad fija del probiótico activado (5%) y como fuente de carbono azúcar comercial (10%). El pH inicial fue ajustado a 6.0 por adición de diversos ácidos (láctico, acético o cítrico). En la figuras 2 y 3 se muestra la tendencia del pH y ATT, respectivamente, durante la fermentación en función del ácido utilizado para el ajuste de pH. Se observó que los fermentados obtenidos con los diversos ácidos diferían en características físicas, tales como granulosidad, color y viscosidad. Al no existir diferencia significativa para la reducción de pH entre los tres ácidos estudiados, tanto con agitación como sin ésta, se propone la utilización de ácido cítrico debido a que es un producto de calidad comercial de fácil adquisición.

Figura 2. Tendencias del pH durante la fermentación de la basura de camarón con diferentes ácidos. • Ácido acético 5M, ■ ácido láctico 5M y ▲ ácido cítrico 2M

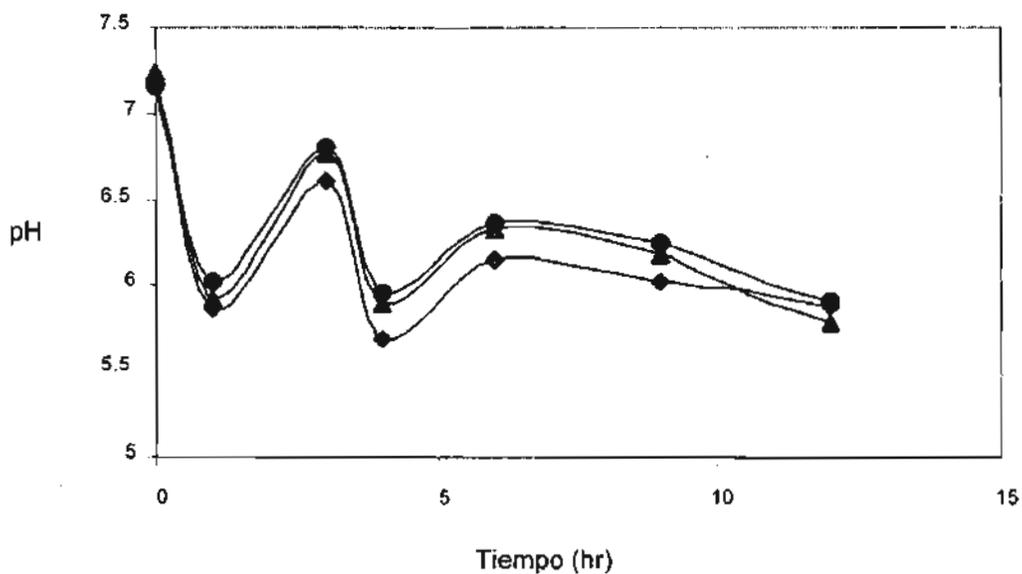
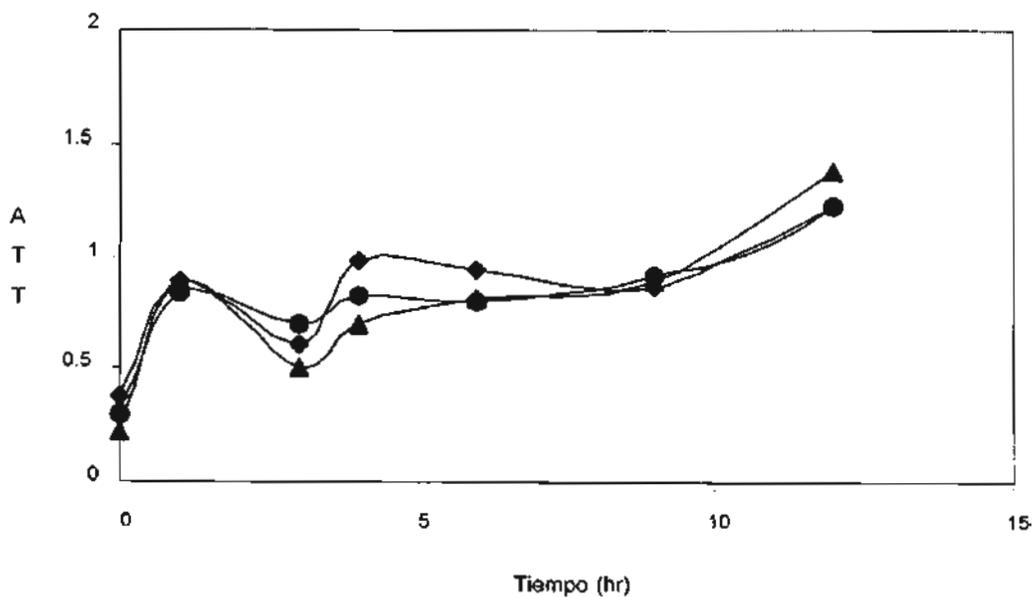


Figura 3. Tendencias de la acidez total titulable (ATT) durante la fermentación de la basura de camarón. • Ácido acético 5M, ■ ácido láctico 5M y ▲ ácido cítrico 2M



Selección de la fuente de carbono

La fermentación se realizó utilizando una cantidad fija del probiótico activado (5%) y diferentes fuentes de carbono (sacarosa, glucosa comercial al 40%, y jarabe de maíz) a una cantidad fija (10%). El pH inicial fue ajustado a 6.0 por adición de ácido cítrico 2 M. En la tabla 1 se muestra la tendencia del pH y ATT durante la fermentación para cada una de las fuentes de carbono. En presencia de sacarosa, el pH fue de 4.6 en 24 horas, lo cual se ha reportado como deseable para evitar la descomposición del desecho y mantener la calidad de sus componentes (Cira *et al.*, 2002b); los valores de ATT reflejan el pH. La basura de camarón fue exitosamente fermentada con el inóculo utilizado y al final del proceso el ensilado presentó color anaranjado intenso debido a la estabilización del pigmento astaxantina, lo que facilita su recuperación (Armenta López *et al.*, 2002).

Composición de los productos de la fermentación

Al centrifugar el fermentado se pudieron separar tres fases. Es decir, un residuo sólido y una fracción líquida constituida de una fracción acuosa y otra lipídica. En la figura 4 se muestra la proporción recuperada de cada fase en base húmeda. Con la

Tabla 1. Valores promedio de pH y acidez total titulable (ATT) durante la fermentación láctica de cabeza de camarón con diferentes fuentes de carbono

Tiempo de fermentación (horas)	Fuentes de carbono					
	Jarabe de glucosa		Sacarosa		Jarabe de maíz	
	pH	ATT (%)	pH	ATT (%)	pH	ATT (%)
0	7.28	0.198	7.30	0.204	7.24	0.198
24	4.80	2.418	4.61	3.012	5.58	2.07
48	4.52	3.234	4.33	4.368	4.76	2.838
72	4.48	3.624	4.19	4.68*	4.76	3.096
96	4.47	3.816	4.20	4.670	4.82	3.288
120	4.60	3.762	4.32	4.369	5.03	3.168
144	4.70	3.798	4.37	4.301	5.025	3.096

centrifugación se favorece la recuperación de la mayoría de las proteínas y de los pigmentos contenidos en la fracción líquida, quedando un residuo sólido constituido principalmente de quitina cruda con escaso contenido de proteínas y pigmentos, lo cual facilita los procesos posteriores de purificación. Al obtener cerca de 36% de residuo sólido para ser procesado y separar la quitina, se obtienen beneficios económicos y ambientales, puesto que la cantidad de reactivos químicos utilizados en los tratamientos de purificación se ven reducidos considerablemente debido a la menor cantidad de material a procesar.

Figura 4. Proporción recuperada de cada fase obtenida de la fermentación



Evaluación de la quitina

El residuo sólido obtenido del fermentado constituye la quitina cruda, la cual es despigmentada, desproteínizada enzimáticamente y desmineralizada con el objetivo de obtener quitina pura. Los parámetros de calidad evaluados en la quitina purificada fueron: proteína, 6.1%; cenizas, 0.4%; humedad, 7.0%. El contenido residual de proteínas y cenizas en la quitina obtenida indican que estos eventos ocurren en forma paralela durante la fermentación. De acuerdo a Cira *et al.* (2002a), el ácido láctico producido durante la fermentación reacciona con el carbonato y fosfato de calcio presentes en la basura de camarón provocando una desmineralización del residuo que se hace visible por la liberación de CO_2 . Además, la desproteínización de los residuos ha sido reportada por varios autores como consecuencia de la aplicación de bacterias lácticas (Cira *et al.*, 2002a) o de diversos procesos enzimáticos

(Chakrabarti, 2002). En general, la fermentación láctica facilita la desmineralización y desproteización de la quitina (Guerrero *et al.*, 1996). Otra característica que revela la calidad de la quitina se ve reflejada en el color de la misma, el cual es blanco nácar; esto se debe a la despigmentación que se lleva a cabo durante la fermentación.

Extracción de pigmentos

De acuerdo con Guerrero *et al.* (1996), las condiciones reductoras obtenidas por la acidificación del medio son posiblemente el motivo de la estabilización de la estructura del pigmento durante la fermentación láctica; además se facilita su liberación del exoesqueleto, lo cual permite que la astaxantina sea más disponible para su extracción por solventes. El ensilado obtenido de la fermentación fue centrifugado en condiciones de refrigeración, y debido a ello se separó una fracción de lípidos, la cual fue recuperada por decantación, para realizar posteriormente ensayos con solventes (éter de petróleo:acetona:agua, 15:75:10) con el fin de realizar estudios futuros que permitan evaluar su pureza por cromatografía de alta resolución (HPLC). Según Gilberg y Stenberg (2001), gran parte de la astaxantina puede ser aislada de esta gran fracción. También la astaxantina puede ser aislada del residuo de quitina fresca mediante el empleo de enzimas comerciales que promueven la separación del pigmento y la proteína.

Análisis de aminoácidos

En los análisis por HPLC de las muestras de concentrado proteínico liofilizado se identificaron 16 aminoácidos libres. Las muestras analizadas exhiben un esquema muy similar de aminoácidos esenciales y no esenciales. De acuerdo a su abundancia relativa los aminoácidos predominantes fueron: alanina y glicina, que en total constituyen 25%; el de menor abundancia fue la metionina, con 3.1 por ciento.

Conclusión

El proceso de fermentación láctica utilizado para la biotransformación de la basura de camarón produce resultados muy deseables: se utiliza un probiótico comercial como inóculo que permite obtener quitina, un concentrado proteínico y una pasta de pigmentos, sin recurrir a la utilización de agentes químicos agresivos con el medio

ambiente, lo que permite que esta técnica sea una opción fácil y económica de dar un valor agregado a los residuos generados por la industria acuícola del camarón.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Sistema de Investigadores del Mar de Cortés (Simac), y a la empresa La Pilarica S.P.R. de R.L., por el financiamiento para este proyecto, clave: 980101020.

Bibliografía

- AOAC (1995), *Official methods of analysis*, Washington, D.C., EU, Association of Official Analytical Chemists.
- Armenta R.E. (1998), "Estudio sobre carotenoproteínas extraídas de residuos de carón fermentado y no fermentado", tesis de maestría, México, UAM Iztapalapa.
- Armenta López, R.; Guerrero L., I. y Huerta, S. (2002), "Astaxanthin extraction from shrimp waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of carotenoprotein complex", *Journal of Food Science*, 67: 1002-1006.
- Armenta R.E.; Guerreo Legarreta, I.; Huerta S. (2002), "Extracción de carotenoproteínas a partir de residuos de camarón fermentados", *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 1: 49-55.
- Cañipa Morales, A.J. y Duran de Bazúa, C. (1997), "Reaprovechamiento del cefalotórax de camarón, un proyecto exitoso", *Industria Alimentaria*, mayo-junio: 10-17.
- Chakrabarti, R. (2002), "Carotenoprotein from tropical brown shrimp shell waste by enzymatic process", *Food Biotechnology*, 16(1): 81-90.
- Cira L.A.; Huerta, S.; Shirai, K. (2002a), "Fermentación Láctica de cabeza de camarón (*Penaeus sp*) en un reactor de fermentación sólida", *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 1: 45-48.
- _____; Huerta, S.; Hall, G.M.; Shirai, K. (2002b), "Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery", *Process Biochemistry*, 37: 1359-1366.
- Escobedo, O.G. (1994), "Obtención de quitina por métodos enzimáticos a partir de cefalotórax de camarón", tesis para obtener el título de Química en Alimentos, México, UNAM.

- Fagbenro, A.O. y Bello Olusoji, A.O. (1997), "Preparation, nutrient composition and digestibility of fermented shrimp head silage", *Food Chemistry*, 60: 489-493.
- Gagne, N. y Simpson, B.K. (1993), "Use of proteolytic enzymes to facilitate the recovery of chitin from shrimp waste", *Food Biotechnol.*, 7: 253-263.
- Gildberg, A. y Stenberg, E. (2001), "A new process for advanced utilization of shrimp waste", *Process Biochemistry*, 36: 809-812.
- Gopalakrishnan, A.; Jasmine, G.I.; Shanmugam, S.A. y Sugumar, G. (2000), "Application of proteolytic enzyme, papain for the production of chitin and chitosan from shrimp waste", *Journal of the Marine Biological Association of India*, 42(1-2): 167-172.
- Guerrero, I.; Zakarias, Z.; May, G.M. (1996), "Lactic fermentation of prawn waste: comparison of commercial and isolated cultures", en A. Domard; A. Jeuniaux; E., Muzzarelli; R. Roberts, G. (eds.), *Advances in Chitin Science*, Francia, Jacques André, pp. 399-406.
- Guillou, A.; Khalil, M.; Adambounou, L. (1995), "Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acid profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste", *Aquaculture*, 130(4): 351-360.
- Horton, H.; Moran, L.; Ochs, R.; Rawn, J.; Scrimgeour, K. (1993), *Bioquímica*, México, Prentice-Hall Hispanoamericana.
- Kumar, P. y Bandyopadhyay, S. (1998), "Drying characteristics of shrimp head waste", *Fisher Technology. Society of Fisch. Technol.*, India, 1: 26-29.
- Li, Q.; Dunn E.T.; Grandmaison, E.W.; Goosen, M.F.A. (1992), "Application and properties of chitosan", *J. Bioactive Comp. Polym.*, 7: 370-397.
- Mandeville, S.; Yaylayan, V.; Simpson, B.K. (1992), "Proximate analysis, isolation and identification of amino acids and sugars from raw and caged commercial shrimp waste", *Food Biotechnology*, 6(1): 51-54.
- _____; Yaylayan, V.; Simpson, B. (1992), "GC/MS analysis of flavor-active compounds in cooked commercial shrimp waste", *J. Agric. Food Chem.*, 40: 1275-1279.
- Nair, A. y Prabhu, P.V. (1989), "Studies on the chemical and nutritional quality of protein powders isolated from shrimp waste", *Fish. Technol.*, 26(1): 56-59.
- No, H.K.; Meyers, S.P. y Lee, K.S. (1989), "Isolation and Characterization of Chitin from Crawfish Shell Waste", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(3): 575-579.
- Ramírez, M.A.; Cabrera, G.; Gutiérrez, A.; Rodríguez, T. (2000), "Metodología de obtención de quitosana a bajas temperaturas a partir de quitina de langosta", *Cultivos Tropicales*, 21(1): 81-84.

- Rao, M.S.; Muñoz, J.; Stevens, W.F. (2000), "Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste", *Appl Microbiol Biotechnol.*, 54: 803-813.
- Rui, R. y Nunes, M.L. (2003), "Nutritional quality of red shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso), pink shrimp, *Parapenaeus longirostris* (Lucas), and Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (Linnaeus)", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 89-94.
- Sánchez Machado, D.I.; López Cervantes, J.; López Hernández, J.; Paseiro Losada P. y Simal Lozano, J. (2003), "High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Amino Acids in Edible Seaweeds after Derivatization with Phenyl Isothiocyanate", *Chromatographia*, 58(3-4): 159-164.
- Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (Semarnap) (2004), *Anuario estadístico de pesca*, México, 214 págs.
- Synowiecki, J. y Al-Khateeb, Naaq. (2003), "The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp Crangon crangon processing discards", *Food Chemistry*, 2: 147-152.
- Wee Ling Teng; Eugene Khor; Teck Koon Tan; Lee Yong Lim; Su Ching Tan (2001), "Concurrent production of chitin from shrimps shells and fungi", *Carbohydrate Research*, 332: 305-316.

Evaluación biológica del efecto de extractos polifenólicos de *Quercus resinosa* sobre células transformadas
Biological Evaluation of the Effect of Poliphenolic Extracts of *Quercus Resinosa* on Transformed Cells

Rocha Guzmán, N.E.¹; González Laredo, R.F.¹; Gallegos Infante, J.A.¹; Lares Assef, I.²; Coria, M.¹; Ochoa Martínez, A.¹; Seade Bechelani, M.G.¹.

Resumen

Durango es un estado forestal por excelencia, sin embargo, existen plantas que no son aprovechadas industrialmente pero sí empíricamente, como las de tipo medicinal; ejemplo de lo anterior son las hojas de *Quercus resinosa*. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de extractos polifenólicos de *Quercus resinosa* (roble resinoso) sobre células transformadas. Así, se determinó el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante; se realizó una caracterización parcial mediante cromatografía en capa fina bidimensional y se realizaron ensayos biológicos sobre células transformadas HeLa. Como estándares se emplearon ácido gálico, epigallocatequina y catequina. Los resultados se analizaron con ANDEVA a una $p \leq 0.05$. Los extractos polifenólicos presentaron una actividad prooxidante a 5000 y 500 $\mu\text{g/mL}$, y una actividad antioxidante en aumento a 50 y 5 $\mu\text{g/mL}$ en función del tiempo. Se encontró efecto citotóxico hacia células HeLa en los ensayos de proliferación celular a diferentes concentraciones.

¹ Instituto Tecnológico de Durango, Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, posgrado en Ingeniería Bioquímica. Blvd. Felipe Pescador 1830 ote., col. Nueva Vizcaya, C.P. 34080, Durango, México.

² CIIDIR-IPN, Unidad Durango.

Abstract

Durango, Mexico, has important forestry resources that are not always totally exploited. Such is the case of *Quercus resinosa* leaves which according to traditional medicine shows anticancer benefits. In this study polyphenolic extracts from *Quercus resinosa* leaves and their activity on transformed cells (HeLa) were evaluated. Total phenols content and antioxidant activity (DPPH* method) were measured. Active extracts were characterized partially by two-dimensional thin layer chromatography. As standards gallic acid, epigallocatechin and catechin were used. Extracts at 5000 and 500 µg/mL showed prooxidant activity, while at 50 and 5 µg/mL showed increasing antioxidant activity with time. Citotoxic effects were detected in HeLa proliferation cells assays at different concentrations.

Introducción

Las plantas medicinales han sido empleadas en México desde tiempos ancestrales por curanderos (Guzmán Maldonado y Paredes López, 1998). De hecho, México posee una rica tradición en el empleo de plantas medicinales entre sus variadas prácticas curativas tradicionales o populares.

Las principales etapas para aprovechar los principios activos de las plantas medicinales incluyen la recolección, identificación botánica y secado de material; la preparación y análisis de extractos crudos por cromatografía de capa fina y de papel; el estudio biológico y farmacológico de extractos crudos y la separación cromatográfica, donde cada fracción obtenida es sometida a bioensayos, entre otras etapas, que incluyen la purificación y la caracterización de los extractos (Hamburger y Hostettmann, 1991). Estas etapas son consideradas como obligatorias y necesarias para la purificación de compuestos fitoquímicos con potencial benéfico para la salud a partir de fuentes biológicas.

Los polifenoles son considerados como fitoquímicos. Estos compuestos son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas (Hernández y Prieto, 1999). Los polifenoles, al exhibir una gama de cualidades benéficas para la salud, pueden incluirse entre los productos de origen natural con aplicaciones valiosas en la medicina tradicional (Guzmán Maldonado y Paredes López, 1998).

Los polifenoles causan una gran variedad de efectos biológicos en numerosos sistemas de células de mamífero, tanto *in vitro* como *in vivo*. Poseen propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, antimutagénicas, antialérgicas,

antivirales, antiasmáticas y anticarcinogénicas (Hollman y Katan, 1997; Saura-Calixto, 1998; Middleton, 1998; De Bruyne *et al.*, 1999; Yildirim *et al.*, 2000; Chao *et al.*, 2000; Steele *et al.*, 2000; Pellegrini *et al.*, 2000; Monti *et al.*, 2001; Cartron *et al.*, 2001; Kinjo *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2002; Pérez, 2003; Ma *et al.*, 2003; D'Alessandro *et al.*, 2003), las cuales están siendo ampliamente explotadas por la industria alimenticia.

El término polifenoles vegetales es sinónimo de taninos. Mabry y Markham (1970) dividen los extractos fenólicos en taninos hidrolizables y taninos condensables. Los taninos son compuestos polifenólicos, más o menos complejos, de origen vegetal, masa molecular relativamente elevada y sabor astringente; conocidos y empleados desde hace muchos siglos por su propiedad para curtir pieles, es decir, convertir la piel en cuero. Esto se debe a su capacidad para unirse a macromoléculas como hidratos de carbono y proteínas (Haslam, 1989). Los taninos vegetales y los compuestos fenólicos solubles tienen un peso molecular entre 500 y 3000 Da. Estos polifenoles tienen un número grande de grupos hidroxilo y otros grupos funcionales (1 a 2 por 100 Da) capaces de formar enlaces con proteínas, metales y otras macromoléculas (Bate-Smith, 1975); y debido a estas características son ampliamente conocidos como agentes antioxidantes.

En 1998 el Consejo de la Nutrición del Instituto de Medicina (Academia Nacional de Ciencias, Estados Unidos), definió al antioxidante dietario como una sustancia que disminuye significativamente los efectos adversos de las especies reactivas de oxígeno, de las reactivas de nitrógeno o ambas, sobre las funciones fisiológicas normales en humanos (Wildman, 2001). Uno de los principales grupos de polifenoles dietarios son los flavonoides, los cuales comprenden catequinas y flavonoles en primer lugar (Naasani *et al.*, 2003).

La actividad antioxidante de los polifenoles causa gran interés, y ha sido objeto de un sinnúmero de estudios; este efecto se debe a que en su estructura química contienen un número variable de grupos hidroxilo fenólicos, los cuales estabilizan radicales libres por varios mecanismos: atrapamiento directo de radicales, desregularización de producción de radicales, eliminación de precursores de radicales, quelación de metales, inhibición de enzimas, elevación de antioxidantes endógenos, etcétera (Huang y Ferraro, 1992; Moure *et al.*, 2000; Yildirim *et al.*, 2000; Duh *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2001; Yokozawa *et al.*, 2002; Kumazawa *et al.*, 2002; Pérez, 2003; Ganguly, 2003; Lee *et al.*, 2004). Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a fenómenos de daño oxidativo y presentan efectos terapéuticos en cáncer.

Actualmente existe un gran interés sobre las plantas medicinales y, en especial, sobre sus compuestos polifenólicos, los cuales presentan una actividad antioxidante y anticarcinogénica. Existen muchas plantas medicinales, aún no estudiadas química-

mente, que son usadas en algunas poblaciones como medicina tradicional para el manejo terapéutico de las enfermedades; *Quercus resinosa* es una de ellas. Por eso resulta interesante la investigación de sus extractos polifenólicos, con el fin de detectar si existe algún efecto sobre células transformadas lo que permite considerarlo como una fuente natural importante en la industria químico-farmacéutica para la creación de nuevos fármacos con aplicación quimioprotectora. De ahí el interés en este estudio por evaluar el efecto de extractos polifenólicos de *Quercus resinosa* sobre células transformadas.

Materiales y métodos

Material biológico: cultivos de células HeLa derivadas de un carcinoma epidermoide de cérvix donadas por el doctor Fikrat Abdullaev Jafarova, jefe de Laboratorio de Oncología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría (LOE-INP).

Material de prueba: hojas de *Quercus resinosa*, fueron recolectadas en el km 10 de la carretera Mezquital-Charcos, en el estado de Durango. Se preparó una muestra botánica y se depositó en el Herbario CUIDIR, del CUIDIR, Unidad Durango, del Instituto Politécnico Nacional, con el número 6682, identificándose como *Quercus resinosa* Liebm. Se realizó una caracterización física de las hojas de *Quercus resinosa*.

Obtención de extractos crudos: las hojas se sometieron a un secado a temperatura ambiente durante 30 días; posteriormente se molieron en una procesadora de alimentos (marca Moulinex, 460 w) por espacio de 1.5 minutos en cada carga. La harina se sometió a extracciones sucesivas con soluciones acuosas de acetona (70%), metanol (50%) y agua en una agitadora New Brunswick (modelo G-53 08618, Edson) por 24 horas, 70 rpm y a temperatura ambiente. Los extractos fueron concentrados en rotaevaporador (Büchi R-200/250) a 60-90 rpm, y una temperatura de 44-48°C. Posteriormente, los extractos seleccionados fueron liofilizados (Labconco, modelo 77510) y almacenados a -20°C hasta su uso.

Evaluación química de los extractos polifenólicos de Quercus resinosa: Se realizaron análisis cuantitativo y cualitativo en extractos polifenólicos de *Quercus resinosa* probando un rango de concentraciones de 5-5000 µg/mL mediante la determinación del contenido de fenoles totales en una concentración (150 µg/mL) por la técnica de Folin y Ciocalteu, citado por Waterman y Mole (1994). Se determinó la actividad atrapadora de radicales libres por el método de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) (Brand-Williams *et al.*, 1995; Pekkarinen, 1999). Se evaluó la inhibición de la oxidación lipídica por el método del tiocianato férrico en sistema de ácido linoléico

según Sánchez-Moreno (1999). Se realizó la detección de la presencia de flavonoides y taninos hidrolizables en los extractos crudos por cromatografía en capa fina con soporte de celulosa en dos dimensiones con *ter*-butanol-ácido acético-agua (TBA 3:1:1) y ácido acético acuoso (HOAc 6%) (Markham, 1982; Karchesy *et al.*, 1989).

Evaluación biológica de los extractos polifenólicos de Quercus resinosa: en placas de 124 pozos se sembró una densidad de 5000 células/mL en Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) marca Gibco, suplementado con 5% de suero de ternera (ST) marca Hyclone y antibióticos. Se incubaron en una atmósfera humidificada de CO₂ durante 48 horas, tiempo suficiente para que los cultivos entraran en la fase de proliferación. Transcurrido este tiempo, se aplicaron los tratamientos, empleando concentraciones de 0.5, 5, 50, 500 y 5000 µg/mL en medio libre de suero (MLS), se incubó durante 2 horas; posteriormente se lavaron los cultivos y se volvió a adicionar DMEM suplementado con 5% de ST, incubando durante 48 horas adicionales antes de evaluar el número de células al final del experimento. Se utilizaron como controles positivos el ácido gálico y la epigallocatequina-3-galato (EGCG) y como control negativo MLS.

Análisis estadístico: el análisis estadístico se realizó mediante un diseño factorial con aleatorización restringida. Cada corrida experimental se efectuó por duplicado. Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) y la comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico de Estadística para Windows, versión 4.3.

Resultados y discusión

La tabla 1 muestra las características de las hojas de *Quercus resinosa*, en donde se observa la diferencia que existe entre las características físicas entre las hojas jóvenes (*Qrj*) y maduras (*Qrm*) de árboles de *Quercus resinosa*; sin embargo, en lo referente a las dimensiones (largo y ancho), los datos coinciden con lo que indica García (1989). Las hojas de *Qrj*, mostraron un color verde pálido en la cara superior, mientras que en el envés las características observadas fueron la presencia de vellosidades rojas y una textura fibrosa. En lo referente a las hojas de *Qrm* la característica principal observada fue un color verde lustroso en la cara superior con las mismas características en el envés que las mostradas por las hojas jóvenes.

Al evaluar los rendimientos obtenidos al extraer con la solución acuosa de acetona al 70%, se encontró que ésta fue más eficiente que la empleada con el solvente alcohólico para la extracción de compuestos fenólicos, dado que es más selectiva e inhibe la interacción tanino-carbohidrato y tanino-proteína por el efecto de la polaridad del sol-

vente sobre dichos compuestos, como lo indican Karchesy *et al.*, (1989). La tabla 2 muestra los rendimientos obtenidos tanto para *Qrj* (16.05%) como para *Qrm* (17.95%).

En lo referente a la extracción con metanol al 50%, se presume que en ésta se obtienen principalmente glicósidos de flavonoides y ácidos fenólicos, como lo indica Waterman y Mole (1994), sin embargo, hay que considerar que con este tipo de extracción se arrastran compuestos adicionales, como clorofilas, proteínas, carbohidratos y compuestos polares afines al metanol, los cuales pueden formar complejos con polifenoles o formar parte de su estructura, causando interferencia en el momento de su evaluación (Harborne *et al.*, 1975). En este caso, al tratarse de una extracción sucesiva en la cual, el metanol al 50% es el segundo solvente utilizado, la presencia de una alta concentración de agliconas se puede descartar. Los rendimientos observados para la extracción con metanol fue de 8.51% para hojas de *Qrj* y 9.35%, para hojas de *Qrm*. En lo referente a la extracción con agua, los rendimientos obtenidos fueron muy bajos. Es posible que los glicósidos de flavonoides y las agliconas más polares como flavonas hidroxiladas, flavonoles, biflavonoles, auronas y chalconas son extraídas con la acetona y el alcohol, de acuerdo a Markham (1982).

La determinación de fenoles totales, tanto en *Quercus resinosa* joven o maduro (figura 1), no refleja diferencia significativa empleando como solventes acetona al 70% o agua, mientras que los valores de fenoles totales obtenidos empleando metanol al 50% son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Esta diferencia se atribuye al amplio espectro que el metanol acuoso presenta al arrastrar tanto polifenoles de bajo y medio peso molecular, como proteínas, carbohidratos y otros compuestos afines, aunado a que algunas sustancias son susceptibles de ser oxidadas por el reactivo de folin para la prueba de fenoles totales y contribuir al contenido fenólico total aparente, como es el caso del ácido ascórbico (vitamina C) (Kähkönen *et al.*, 1999). Waterman y Mole (1994) mencionan que a pesar de ser un método simple, el método de Folin-Ciocalteu, tiene limitaciones, ya que varios grupos de fenoles responden de diferente forma al reactivo de Folin-Ciocalteu usado en la prueba experimental.

Tabla 1. Caracterización de las hojas de *Quercus resinosa*

Hoja	Peso fresco	Peso seco	Longitud cm	Ancho cm	Características
<i>Qrj</i> ^a	3.435	3.386	19.2	12.9	Cara superior: 1° Envés: 2°, 3°
<i>Qrm</i> ^b	3.974	3.854	21.4	14.3	Cara superior: 4° Envés: 2°, 3°

a: Estado joven.

b: Estado maduro.

c: 1. Verde pálido; 2. Velloidades rojas; 3. Fibrosa; 4. Lustrosa verde.

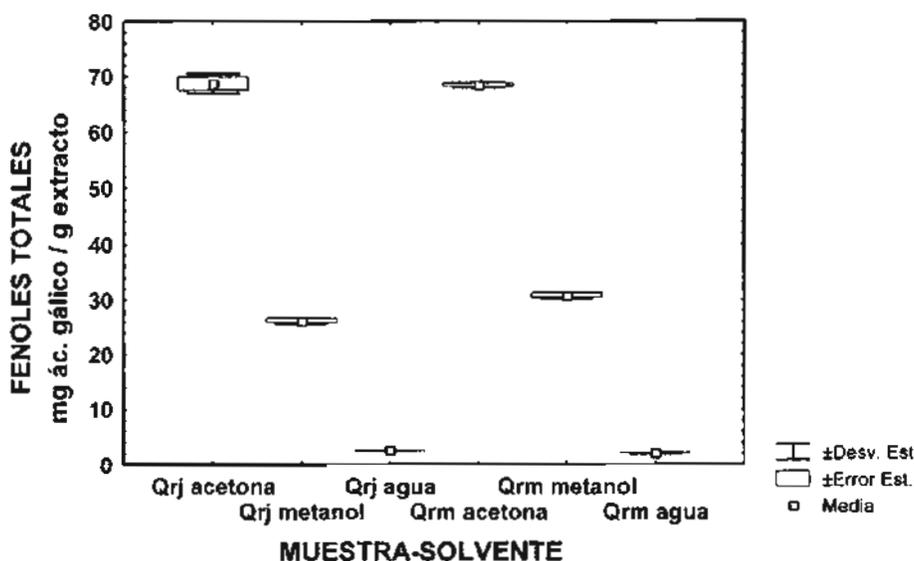
Tabla 2. Rendimientos de extracción

Muestra	Extracto Acetona al 70% %	Extracto Metanol al 50% %	Extracto Agua %
<i>Qrj</i> ^a	16.05	8.51	1.19
<i>Qrm</i> ^b	17.95	9.35	0.82

a: Estado joven.

b: Estado maduro.

Figura 1. Contenido de fenoles totales en extractos crudos de polifenoles. *Qrj* (*Quercus resinosa* joven). *Qrm* (*Quercus resinosa* maduro). Cada punto representa el promedio de dos experimentos realizados por duplicado (Tukey, $p \leq 0.05$)



Al evaluar el porcentaje de la capacidad atrapadora de radicales libres, para la concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de *Qrj*, tanto para el experimento 1 y 2 planteados en el diseño experimental, resultó similar (figura 2), mientras que el porcentaje encontrado en *Qrm* fue similar para acetona al 70% y agua, pero diferente para el metanol al 50%. En el caso de la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$, tanto para *Qrj* como para *Qrm* fue similar en los solventes de acetona al 70% y agua en ambos experi-

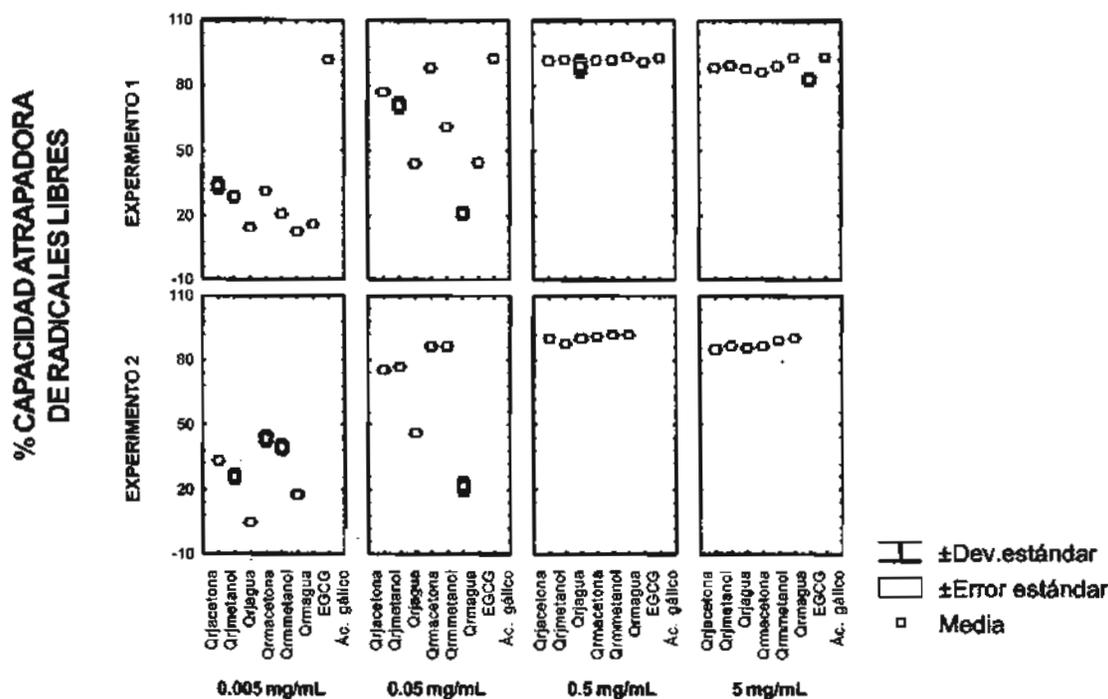
mentos; sin embargo, para el solvente de metanol al 50% ambos extractos mostraron diferencias entre el experimento 1 y el experimento 2.

Cabe mencionar que a una concentración de 50 mg/mL, el extracto de *Qrm* obtenido con acetona y *Qrm* obtenido con metanol en el experimento 2 mostraron una tendencia prooxidante; en el experimento 1 el *Qrm* obtenido con acetona mostró dicha actividad mientras que el extracto de *Qrm* obtenido con metanol mostró una actividad antioxidante. Lo anterior nos indica la posible presencia de compuestos de origen no polifenólico que influye en la variación de estos resultados.

De acuerdo con la literatura sobre el tema, la glicosilación de los polifenoles le confiere a los flavonoides mayor solubilidad y una menor reactividad hacia radicales libres (Urquiaga y Leighton, 1999).

Otro mecanismo que podría afectar los resultados de los extractos obtenidos con metanol al 50%, es el relacionado con los compuestos fenólicos, que pueden interactuar con proteínas y polisacáridos presentes, provocando la aparición de coloides de alto peso molecular, las cuales permanecen en suspensión ocasionando

Figura 2. Capacidad atrapadora de radicales libre a un tiempo de 30 minutos. Cada punto representa el promedio de dos experimentos realizados por duplicado (Tukey, $p \leq 0.05$)

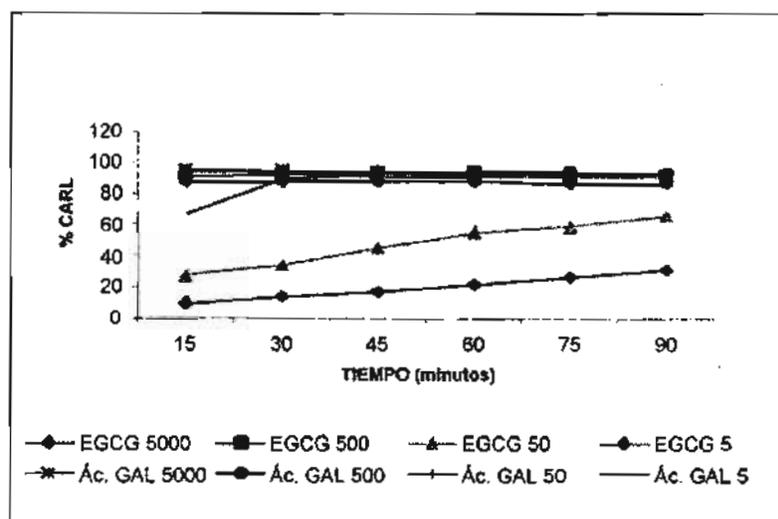


que la solución se torne turbia, lo que da lugar a una dispersión de la luz hasta que precipitan los compuestos (González San José *et al.*, 2001).

Para las concentraciones de 500 y 5000 $\mu\text{g/mL}$ tanto de *Qrj* como de *Qrm*, se observó una actividad prooxidante; debido, posiblemente, a que se está utilizando una concentración alta o se está dando una autooxidación ocasionada por la presencia en la muestra de iones metálicos, como el hierro o el cobre, incluso de tocoferoles (Yurtas *et al.*, 2000). La EGCC a 5 y 50 $\mu\text{g/mL}$ presentó una actividad antioxidante, y a 500 como a 5000 $\mu\text{g/mL}$ una actividad prooxidante (figura 3). El ácido gálico mostró una actividad prooxidante a concentraciones de 5-5000 $\mu\text{g/mL}$. Comparando los dos tipos de *Quercus* se observó que el *Qrm* presentó más actividad antioxidante, en comparación con el *Qrj*.

En 1995, Brand Williams *et al.* hicieron estudios sobre el comportamiento de ciertos compuestos polifenólicos y el DPPH, encontrando que hay tres tipos de comportamiento: primero, un comportamiento rápido donde los compuestos reaccionan rápidamente con el DPPH alcanzando su estado estacionario estable en menos de un minuto. El segundo tipo de comportamiento es intermedio, donde el estado estable se alcanza aproximadamente entre los 5 y 30 minutos. Y por último, el comportamiento lento, donde el estado estable se alcanza de 1 a 6 horas, pasando por un comportamiento hiperbólico. De acuerdo a estos comportamientos, los extractos

Figura 3. Actividad atrapadora de radicales libres (CARL) para estándares de epigallocatequina galato y ácido gálico. Cada punto representa el promedio de dos experimentos realizados por duplicado



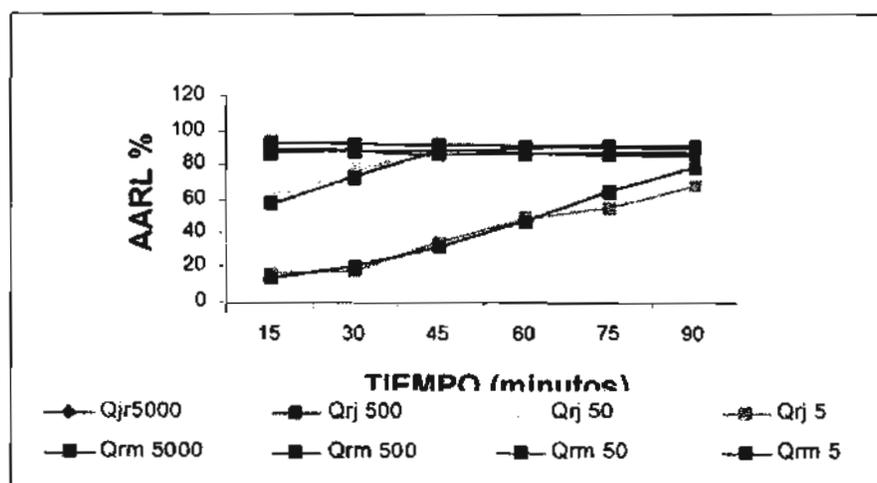
polifenólicos de *Quercus resinosa* (figura 4) tendrían un comportamiento lento, ya que a partir de 45 minutos a 1 hora, presenta el comportamiento estable en la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y en la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a los 90 minutos todavía no alcanzaba el estado estable para ambos tipos de *Quercus*. En relación con el estándar del ácido gálico utilizado en el experimento Brand Williams *et al.* (1995), demuestra que tiene un comportamiento lento, pero en la figura 3 este comportamiento no se observó, posiblemente porque se está produciendo prooxidación por la alta concentración de dicho ácido, sin embargo la EGCG sí presenta este comportamiento lento.

De acuerdo a estos resultados y buscando una actividad antioxidante, se presume que la dosis recomendada se encuentra por debajo de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto de *Qrm* o *Qrj*, con acetona pues el o los compuestos que probablemente tienen el mayor efecto antioxidante, se obtienen en esta fracción.

Se encontró que existe una correlación entre el contenido de fenoles totales para una concentración de 5 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ determinado por el método de Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante determinada por el método del DPPH. Esta misma correlación ha sido demostrada por Skrede y Wrolstad (2002).

El objetivo del estudio de la actividad antioxidante de los extractos polifenólicos de *Quercus resinosa* fue de tipo exploratorio, es decir, resultaba importante determinar si los extractos crudos de polifenoles del *Quercus resinosa* indicaban alguna activi-

Figura 4. Actividad atrapadora de radicales libres de extractos polifenólicos de *Quercus resinosa* obtenidos con acetona al 70%



dad antioxidante. Es por ello que se desarrollaron dos métodos, uno de tipo hidrosoluble y otro de tipo liposoluble, con el fin de saber qué tan alta o baja actividad antioxidante se presentaba; dichos métodos fueron el de DPPH y el del tiocianato férrico (datos no mostrados).

Se encontró que a concentraciones de 5-5000 $\mu\text{g/mL}$ los extractos presentaron una actividad antioxidante/prooxidante, sin embargo estos dos métodos no permiten elucidar completamente un mecanismo de acción. Por tanto, el siguiente paso sería aplicar otros métodos de actividad antioxidante para encontrar el posible mecanismo de acción de los tipos de flavonoides involucrados en los extractos polifenólicos del *Quercus resinosa*.

El cuadro 3 muestra los resultados de los Rf y los colores de las manchas de las muestras en el solvente del sistema orgánico *ter*-butanol-ácido acético-agua (TBA); al ser revelada de forma no destructiva con UV, el *Qrj* acetona presentó manchas a un $R_f = 0.36 \pm 0.01$ violeta oscuro a 254 nm y a un $R_f = 1 \pm 0$ rojo a 365 nm, en tanto que en el revelado de forma destructiva con vainillina se apreciaron unas manchas a un $R_f = 0.65 \pm 0$ amarillo y a un $R_f = 1 \pm 0$ verde. Para *Qrm* acetona se presentaron manchas similares tanto para UV a 254 nm y vainillina-HCL, sin embargo no se detectó mancha en UV a 254 nm. Para *Qrj* metanol se presentaron manchas con un $R_f = 0.36 \pm 0.01$ violeta oscuro a 254 nm y a un $R_f = 1 \pm 0$ rojo en 365 nm; reveladas de forma destructiva con vainillina-HCL se apreciaron manchas a un $R_f = 0.65 \pm 0$ amarillo. Para *Qrm* metanol presentó únicamente una mancha con un $R_f = 0.353 \pm$ violeta oscuro en UV a 254 nm. Para los extractos *Qrj* agua y *Qrm* agua no se detectó ninguna mancha en ambos revelados.

El cuadro 4 nos muestra los resultados de los Rf y los colores de las manchas de las muestras en el solvente del sistema acuoso ácido acético al 6%; al ser revelada con UV el *Qrj* acetona presentó manchas a $R_f = 0.71 \pm 0.02$ y $R_f = 1 \pm 0$ violeta oscuro, a 254 nm y a un $R_f = 0.71 \pm 0.02$ violeta oscuro, y a un $R_f = 1 \pm 0$ amarillo en 365 nm. En el revelado con vainillina-HCL se apreciaron manchas a un $R_f = 0.440.01$ rojo. Estas mismas manchas se presentaron en *Qrm* acetona, *Qrj* metanol y *Qrm* metanol tanto para UV a 254 nm y 365 nm así como para el revelado con vainillina-HCL. Para los extractos *Qrj* agua y *Qrm* agua no se detectó ninguna mancha en ambos revelados.

De acuerdo con la interpretación del color de las manchas y su ubicación en los cromatofolios propuesto por Markham (1982), en TBA (fase lipídica), en los extractos de *Qrj* y *Qrm*, tanto en acetona como en metanol, posiblemente existan grupos de flavonas y flavonoles, 7-O-diglicósidos y 3-O-mono y diglicósidos, y diglicósidos, catequina, epicatequina y agliconas de flavonas y flavonoles. Dicho perfil se confirma en el sistema hidrofílico (HOAC).

Tabla 3. Valores de R_f y color de las manchas utilizando TBA como fase móvil

<i>Fase móvil TBA (3:1:1)</i>						
<i>Muestra</i>	<i>Vainillina HCL</i>		<i>UV 254 nm</i>		<i>UV 365 nm</i>	
	<i>R_f</i>	<i>Color</i>	<i>R_f</i>	<i>Color</i>	<i>R_f</i>	<i>Color</i>
<i>Qrj</i> acetona	0.65±0.01±0	AmarilloVerde	0.36±0.01	Violeta oscuro	1±0	Rojo
<i>Qrm</i> acetona	1±0	Verde	0.36±0.01	Violeta oscuro		ND
<i>Qrj</i> metanol	0.65±0.02	Amarillo	0.36±0.01	Violeta oscuro	1±0	Rojo
<i>Qrm</i> metanol		ND	0.36±0.01	Violeta oscuro		ND
<i>Qrj</i> agua		ND		ND		ND
<i>Qrm</i> agua		ND		ND		ND

ND = No detectado.

Se corrió como control el estándar de catequina, la cual produce una mancha en TBA a un $R_f = 0.64 \pm 0.01$ rojo; el mismo R_f y color se presentaron en las muestras de *Quercus*, por lo que se puede presumir la existencia de este tipo de flavonoide aunado al hecho de que se ha reportado que las catequinas presentan una coloración roja o rojo-violeta inmediatamente al ser reveladas con Vainillina-HCL, presentándose dicho efecto en las muestras (Markham, 1982).

Es importante tomar en cuenta la relación adsorbente-solvente para el tipo de flavonoide que se busca. La detección de la presencia de flavonoides en los extractos crudos se realizó en placas de celulosa como adsorbente y se utilizó la combinación de los solventes TBA / HOAc 15%, ya que son ideales para la separación de glicósidos y agliconas polares de flavonoides (Karchesy *et al.*, 1989).

Recapitulando, se observó que los extractos polifenólicos de *Qrj* y *Qrm* muestran actividad antioxidante, siendo mayor en los extractos obtenidos con acetona al 70%, posiblemente por la característica química de los taninos hidrolizables. Sin embargo, los extractos con metanol y agua también mostraron características químicas interesantes, en las cuales no se puede concluir que los efectos observados se deban a la acción de los polifenoles, ya que estos solventes arrastran otros tipos de compuestos.

Tabla 4. Valores de R_f y color de las manchas utilizando HOAc 6% como fase móvil

<i>Fase móvil HOAc 6%</i>						
<i>Muestra</i>	<i>Vainillina HCL</i>		<i>UV 254 nm</i>		<i>UV 365 nm</i>	
	<i>R_f</i>	<i>Color</i>	<i>R_f</i>	<i>Color</i>	<i>R_f</i>	<i>Color</i>
<i>Qrj acetona</i>	0.44±0.01	Rojo	0.71±0.021±0	Violeta oscuro	0.71±0.021±0	Violeta oscuro Amarillo
<i>Qrm acetona</i>	0.44±0.01	Rojo	0.71±0.021±0	Violeta oscuro	0.71±0.021±0	Violeta oscuro Amarillo
<i>Qrj metanol</i>	0.44±0.01	Rojo	0.71±0.021±0	Violeta oscuro	0.71±0.021±0	Violeta oscuro Amarillo
<i>Qrm metanol</i>	0.44±0.01	Rojo	0.71±0.021±0	Violeta oscuro	0.71±0.021±0	Violeta oscuro Amarillo
<i>Qrj agua</i>		ND		ND		ND
<i>Qrm agua</i>		ND		ND		ND

ND = No detectado.

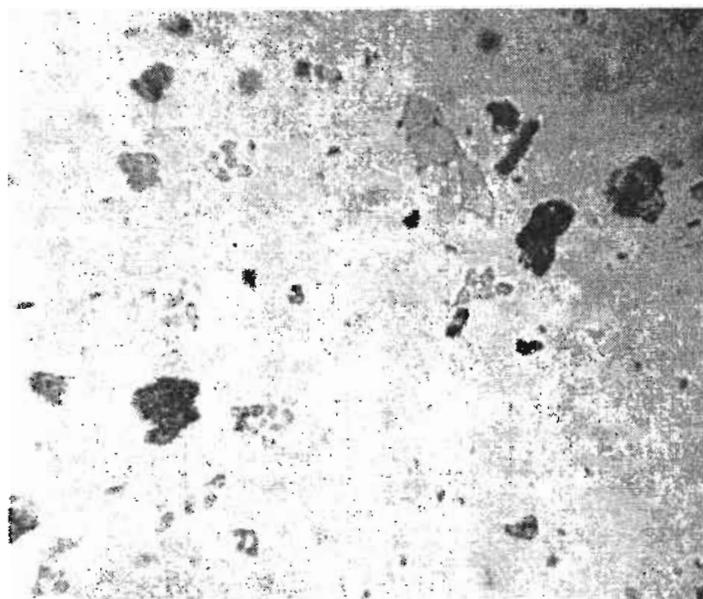
Al evaluar el efecto de los extractos crudos sobre la proliferación de células HeLa se observó un cambio en la morfología de las células, las cuales tomaron una forma compacta y redondeada, indicativo de daño celular.

La destrucción de células en las concentraciones de 500 y 5000 µg/mL se presentó en el momento de agregar las muestras de dichas concentraciones al cultivo celular. En los ensayos en donde se evaluaron las concentraciones de 0.5, 5 y 50 µg/mL, la destrucción de las células y los cambios observados en éstas, se presentaron después de dos horas del tratamiento.

Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento proporcionado a las células para su recuperación, se observó que la mayoría formaba cúmulos de células muertas y despegadas de la caja Petri, independientemente de las concentraciones y del tipo de *Quercus* utilizado (figura 5).

Las células que se mantenían adheridas a la caja presentaban una morfología redondeada y no guardaban unión una célula con otra, lo que no se presentaba en el control negativo, el cual mantenía un crecimiento normal de la monocapa. En los estándares utilizados, de ácido gálico y epigallocatequina galato, se observó una des-

Figura 5. Efecto de los extractos de *Quercus resinosa* en las células HeLa



trucción de las células en las concentraciones de 50, 500 y 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Al agregar los tratamientos a los cultivos, a las concentraciones de 0.5 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se observó la destrucción de las células al transcurrir las dos horas después de aplicar las muestras al cultivo. Algunas células lograron sobrevivir a los tratamientos pero mostraron cambios en su morfología (figura 6) al igual que en las muestras tratadas con extractos de *Quercus resinosa* a las mismas concentraciones.

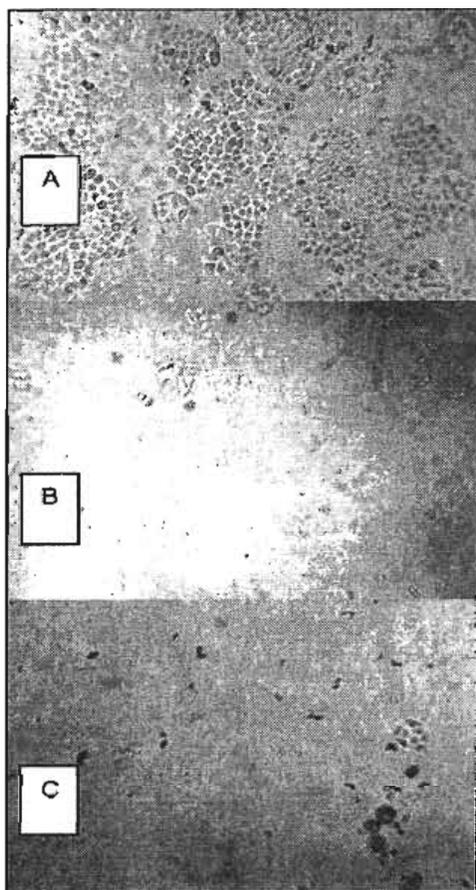
Después de pasar 48 horas de recuperación de las células se observó un efecto citotóxico para todas las concentraciones (0.5-5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tanto en los tratamientos con *Quercus* como con los estándares.

Sin embargo, este efecto es importante, ya que se está trabajando con extractos crudos y con concentraciones que aun siendo pequeñas provocan un efecto prooxidante en las células.

Conclusiones

Las hojas de *Quercus resinosa* presentaron un contenido importante de taninos con actividad antioxidante/prooxidante, así como un efecto citotóxico en células HeLa a un rango de concentración de 0.5-5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Figura 6. Efecto del control negativo y del control positivo en la morfología de las células HeLa. (A) Efecto del control negativo, DMEM libre de suero y antibióticos. (B) Efecto al momento de agregar la EGCG a 5 ppm. (C) Efecto de la EGCG a 5 ppm después de 2 horas de tratamiento



Los extractos polifenólicos de *Quercus resinosa* maduro presenta una mayor actividad antioxidante/prooxidante que los extractos polifenólicos de *Quercus resinosa* joven, lo que sugiere que el estado de madurez influye en dicha actividad.

Bibliografía

- Bate Smith, E.C. (1975). "Phytochemistry of proanthocyanidins", *Phytochemistry*, 14: 1107-1113.
- Brand Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995), "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 28: 25-30.

- Cartron, E.; Carbonneau, M.A.; Fouret, G.; Descomps, B.; Léger, C.L. (2001), "Specific antioxidant activity of caffeoyl derivatives and other natural phenolic compounds: LDL Protection against oxidation and decrease in the proinflammatory lysophosphatidylcholine production", *J. Nat. Prod.*, 64: 480-486.
- Chao, S-H.; Fujinaga, K.; Marion, J.E.; Taube, R.; Sausville, E.A.; Senderowicz, A.M.; Peterlin, M.B.; Price, D.H. (2000), "Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication", *Journal of Biological Chemistry*, 37: 275.
- Chu, Y.F.; Sun, J.; Wu, X.; Liu, R.H. (2002), "Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables", *J. Agric. Food Chem.*, 50: 6910-6916.
- D'Alessandro, T.; Prasain, J.; Benton, M.R.; Botting, N.; Moore, R.; Darley Usmar, V.; Patel, R.; Barnes, S. (2003), "Polyphenols, inflammatory response and cancer prevention: chlorination of isoflavones by human neutrophils", *J. Nutr.*, 133: 3773S-3777S.
- De Bruyne, T.D.; Pieters, L.; Witvrouw, M.; De Clerq, E.; Berghe, D.V.; Vlietinck, A.J. (1999), "Biological evaluation of proanthocyanidin dimers and related polyphenols", *J. Nat. Prod.*, 62: 954-958.
- Duh, P.D.; Yen, G.Ch.; Yen, W.J.; Chang, L.W. (2001), "Antioxidant effects of water extracts from Barley (*Hordeum vulgare* L.) prepared under different roasting temperatura", *J. Agric. Food Chem.*, 49: 1455-1463.
- Ganguly, D.K. (2003), "Tea Consumption on oxidative damage and cancer", en Medappa, N. (ed.), *Boletín ICMR*, 33(4-5), Nueva Delhi, abril-mayo.
- González San José, M.L.; Muñiz Rodríguez, P.; Valls Bellés, V. (2001), Actividad antioxidantes de la cerveza: estudios *in vivo* e *in vitro* e *in vivo*, Centro de información Cerveza y Salud, Universidad de Valencia, pp. 7-15.
- Guzmán Maldonado, S.H.; Paredes López, O. (1998), "Functional Products of Plant Indigenous to Latin America: amaranth, quinoa, common beans, and botanicals", en Mazza, G., *Functional Foods. Biochemical & Processing Aspects*, EU, Technomic Publishing.
- Hamburger, M.; Hostettmann, K. (1991), "Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine", *Phytochemistry*, 30(12): 3864-3874.
- Harborne, J.B.; Mabry, T.J.; Mabry, H. (1975), *The flavonoides. Part 1*, Nueva York, Academic Press, pp 2-4.
- Haslam, E. (1989), *Plant polyphenols*, Cambridge University Press.
- Hernández, M.; Prieto, E. (1999), "Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida", *Rev. Cubana Invest. Biomed.*, 18(1): 12-4.
- Hollman, P.C.; Katan, M.B. (1997), "Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man", *Biomed Pharmacother.*, 51(8): 305-10.

- Hong, J.; Lu, H.; Meng, X.; Ryu, J-H.; Hara, Y.; Yang, Ch. (2002), "Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells", *Cancer research*, 62: 7241-7246.
- Huang, M.T.; Ferraro, T. (1992), "Phenolic compounds in food and cancer prevention. Phenolic compounds in food and their effects on health II. antioxidants and cancer prevention. Chapter 2", en Huang, M.T., Ho, C.T. y Lee, C.Y. (eds.) *ACS Symposium Series 507*, Washington D.C., American Chemical Society.
- Kähkönen, M.P.; Hopia, A.I.; Vuorela, H.J., Rauha, J.-P.; Pihlaja, K.; Kujala, T.S.; Heinonen, M. (1999), "Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds", *J. Agric. Food Chem.*, 47(10): 3954-3962.
- Karchesy, J.J.; Bae, Y.; Chalker-Scott, L.; Helm, R.F.; Foo, L.Y. (1989), "Chromatography of proanthocyanidins", en Karchesy, J.J.; Hemingway, R.W. Plenum, *Chemistry and significance of condensed tannins*, Oregon State University, pp. 139-151.
- Kinjo, J.; Nagao, T.; Tanaka, Takashi, Nonaka, G.; Okawa, M.; Nohara, T.; Okabe, H. (2002), "Activity-guided fractionation of green tea extract with antiproliferative activity against human stomach cancer cells", *Biol. Pharm. Bull.*, 25(9): 1238-1240.
- Kumazawa, S.; Taniguchi, M.; Suzuki, Y.; Shimura, M.; Kwon, M.S.; Nakayama, T. (2002), "Antioxidant activity of polyphenols in carob pods", *J. Agric. Chem.*, 50: 373-377.
- Lai, L.S.; Chou S.T.; Chao, W.W. (2001), "Studies on the antioxidative activities of Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl) leaf gum", *J. Agric. Food Chem.*, 49: 963-968.
- Lee, J.; Koo, N.; Min, D.B., (2004), "Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3: 21-33.
- Liu, Z.L.; Wang, L.J. y Liu, Y.C. (1991), "Studies on bio-antioxidants-prooxidation of Vitamin E on the autooxidation of linoleic acid in sodium dodecyl sulfate micelles", *Sci. China B.*, 34: 787-795.
- Ma, J.; Luo, X.D.; Protiva, P.; Yang, H.; Ma, C.; Basile, M.J.; Weinstein, I.B.; Kenelly, J. (2003), "Bioactive Novel Polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota* (sapodilla)", *J. Nat. Prod.*, 66: 983-986.
- Mabry, T.J.; Markham, K.R. (1970), *The systematic identification of flavonoids*, Nueva York, Springer-Verlag.
- Markham, K.R. (1982), *Biological Techniques series: techniques of flavonoid identification*, Academic press.

- Middleton, E. Jr., (1998), "Effect of plant flavanoids on immune and inflammatory cell function", *Adv Exp Med Biol.*, 439: 175-82.
- Monti, S.M.; Ritieni, A.; Sacchi R.; Skog, K.; Borgen, E.; Fogliano V. (2001), "Characterization of phenolic compounds in virgin olive oil and their effect on the formation of carcinogenic/mutagenic heterocyclic amines in a model system", *J. Agric. Chem.*, 49: 3969-3975.
- Moure, A.; Franco, D.; Sineiro, J.; Domínguez, H.; Nuñez, M.J.; Lema, J.M. (2000), "Evaluation of extract from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants", *J. Agric. Food Chem.*, 48: 3890-3897.
- Naasani, I.; Oh-hashii, F.; Oh-hara, T.; Feng, W.Y.; Johnston, J.; Chan, K.; Tsuruo, T. (2003), "Blocking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells *in vitro* and *in vivo*", *Cancer research*, 63: 824-830.
- Pekkarinen, S.S.; Stöckmann, H.; Schawrz, K.; Heinonen, I.M.; Hopia, A.I. (1999), "Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate", *J. Agric. Food Chem.*, 47: 3036-3043.
- Pellegrini, N.; Simonetti, P., Gardana, C.; Brena, O.; Brighenti, F.; Pietta, P. (2000), "Polyphenol content and total antioxidant activity of Vini Novelli (young red wines)", *J. Agric Food.*, 48: 732-735.
- Pérez, T.G. (2003), "Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes", *Rev. Cubana Invest. Biomed.*, 22(1): 48-57.
- Saura Calixto, F. (1998), "Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient", *J. Agric. Food Chem.*, 46: 4303-4306.
- Sánchez Moreno, C.; Larrauri, J.A. y Saura Calixto, F. (1999), "Free radical scavenging capacity of selected red, rose and white wines", *J. Sci. Food and Agric.* 79: 1301-1304.
- Skrede, G.; Wrolstad, R.E. (2002), "Flavonoids from berries and grapes", en Shi, J.; Mazza, G.; Le Maguer, M. (ed.), *Functional Foods.*, vol. 2, CRC Press. pp 71-135.
- Steele, V.E.; Kelloff, G.J.; Balentine, D.; Boone, W.Ch.; Mehta, R.; Bagheri, D.; Sigman, C.C.; Zhu, S.; Sharman, S. (2000), "Comparative chemopreventive mechanisms of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measured by *in vitro* bioassays", *Carcinogenesis*, 21(1): 63-67.
- Urquiaga, I.; Leighton, F. (1999), "Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. International Symposium: Biology and pathology of free radicals: plant and wine polyphenol antioxidants", Santiago, Chile, Universidad Católica.

- Waterman, P.G.; Mole, S. (1994), *Methods in ecology*, primera edición, Gran Bretaña, Blackwell Scientific Publications, pp 66-91.
- Wildman, R.E.C. (2001), "Nutraceuticals: a brief review of historical and teleological aspects", en Wildman R.E. (ed.), *Handbook of Nutraceuticals and functional foods*, EU, CRC Press Series, pp 1-12.
- Yildirim, A.; Mavi, A.; Oktay, M.; Kara, A.A.; Algur, O.F.; Bilaloglu V. (2000), "Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea* Desf ex DC), sage (*Salvia triloba* L.) and black tea (*Camellia sinensis*) extracts", *J. Agric Chem.*, 48: 5030-5034.
- Yokozawa, T.; Nakagawa, T.; Kitani, K. (2002), "Antioxidant activity of tea polyphenol in cholesterol-fed rats", *J. Agric. Food Chem.*, 50: 3549-3552.

**Producción de xilitol en hidrolizados de paja
de sorgo detoxificados utilizando *Candida parapsilosis***
**Xylitol Production in Detoxified Hydrolysates
of Sorghum Straw by *Candida Parapsilosis***

*Sepúlveda-Huerta, E. *; Herrera Guajardo, A. *;
Ramírez de León, J. A. *; Vázquez Vázquez, M. **

Resumen

En este trabajo se ha estudiado la producción biotecnológica de xilitol por *Candida parapsilosis* en hidrolizados de paja de sorgo. Los hidrolizados se concentraron hasta tener 60 g/L de xilosa. Después se detoxificaron con carbón activado, se neutralizaron y se suplementaron con nutrientes (extracto de levadura, 6 g/L; extracto de malta, 6 g/L; peptona, 5 g/L) para realizar las fermentaciones. Con fines comparativos se realizaron también fermentaciones con xilosa comercial. Los resultados muestran que los hidrolizados de paja de sorgo permiten obtener xilitol aunque con una productividad menor que la xilosa comercial, seguramente debido a la presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento microbiano. Las fermentaciones realizadas en los hidrolizados mostraron una productividad de xilitol de 0.118 g/Lh, un rendimiento en xilitol de 0.27 g/g y un rendimiento en biomasa de 0.12 g/g, lo que demuestra que esta aplicación es viable para la paja de sorgo.

Abstract

In this work, the biotechnological production of xylitol by *Candida parapsilosis* on hydrolysates of sorghum straw was studied. The hydrolysates were

*Departamento de Ciencia y Tecnología, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa Aztlán, Universidad Autónoma de Tamaulipas. Calle 16 y Lago de Chapala, s/n, col. Aztlán, Ciudad Reynosa, Tamaulipas, México. 88740. Teléfono: (899)-921-3340. E-mail: amesire@hotmail.com

concentrated up to 60 g xylose/L. Then, they was detoxified using activated charcoal, neutralized and supplemented with nutrients (yeast extract, 6 g/L; malt extrat, 6 g/L; peptone, 5 g/L) to perform fermentations. With comparative purposes, fermentations with commercial xylose were also performed. The results showed that xylitol is obtained although the productivity is lower than using commercial xylose, maybe due to the presence of microbial growth inhibitors. The fermentations performed in hydrolysates showed a xylitol productivity of 0.118 g/Lh, a xylitol yield of 0.27 g/g and a biomass yield of 0.12 g/g, showing that it is feasible this application for the sorghum straw.

Introducción

Actualmente la principal aplicación industrial del material lignocelulósico es la fabricación de papel y de cartón corrugado. Entre los procesos alternativos para su aprovechamiento destacan los que se basan en la obtención de soluciones de azúcares y su posterior transformación biotecnológica a una gran variedad de productos de alto valor agregado, como por ejemplo el xilitol (Barrera Guillén, 2002; Téllez Luis *et al.*, 2002a, b).

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

El xilitol es un edulcorante valioso con características anticarcinogénicas que puede ser un buen sustituto para el azúcar convencional. Este edulcorante previene tanto la osteoporosis como la formación de ácidos que atacan el esmalte dental y puede sustituir a los antibióticos en el tratamiento de la otitis media aguda. Por todas estas ventajas, el xilitol ha llamado la atención de la industria alimentaria (Canilha *et al.*, 2003).

Material y métodos

Preparación de hidrolizado de paja de sorgo

La paja de sorgo fue molida, tamizada y seleccionada con un tamaño de partícula menor a 0.5 mm. Se determinó el contenido de humedad para la preparación de los

hidrolizados con el fin de ajustar la cantidad de agua a la que se adicionaron para la preparación de los hidrolizados. Se sometió a una hidrólisis ácida con ácido sulfúrico en una concentración de 2%, temperatura de autoclave de 122°C y tiempo 1 hora. La relación sólido/ líquido fue de 1/10. Después se filtró para obtener un líquido compuesto principalmente por xilosa, manosa, galactosa, glucosa, así como ácido acético y furfural (Téllez Luis, 2001).

Reactivación y mantenimiento de la cepa

Se utilizó la levadura *Cándida parapsilosis* NRRL Y-2315, proporcionada en forma liofilizada por National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service, USD (Peoria, Illinois, EU). Para su activación, la cepa fue transferida en condiciones asépticas a matraces con un medio líquido que contenía 10 g/L de xilosa, 5 g/L de peptona y 3 g/L de extracto de levadura. Se incubó a 26°C y 125 rpm por 48 horas. Posteriormente fue transferida a placas petri que contenían el mismo medio líquido además de 20 g/L de agar. La levadura fue sembrada en estrías e incubada a 26°C y se transfirió de forma periódica a placas petri con medio nuevo para su mantenimiento. La levadura fue también sembrada en placas petri conteniendo hidrolizado de paja de sorgo neutralizado e hidrolizado neutralizado, y clarificado con carbón activado para adaptarla al medio.

Preparación del inóculo

Para los estudios de fermentación en azúcares comerciales se preparó un inóculo en matraces de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo sintético, junto con una composición de 60 g/L de xilosa, 5 g/L de peptona, 6 g/L de extracto de levadura y 6 g/L de extracto de malta. Se tomó una colonia de la levadura de una placa petri utilizando un asa microbiológica y se transfirió al matraz. Fue incubado por 48 horas a 26°C a 125 rpm en un agitador orbital Innova 4900 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EU) con control de temperatura y agitación. Para los estudios de fermentación en medios basados en hidrolizados de paja de sorgo se procedió de forma similar, omitiendo la adición de xilosa.

Medios de cultivo basados en hidrolizado de paja de sorgo

Los hidrolizados de paja de sorgo se prepararon de acuerdo a las condiciones citadas en la literatura sobre el tema (Téllez-Luis, 2001). Una vez preparados los hidrolizados se filtraron y concentraron en un rotavapor hasta alcanzar una concentración de 60 g/L de xilosa. Se ajustó el pH a un valor de 1 con carbonato de calcio (CaCO_3). Se pesaron 100 g de hidrolizado con pH 1 en una balanza analítica y se colocaron en un matraz para adicionarles carbón activado para su detoxificación.

El proceso de detoxificación se realizó en un agitador orbital Innova 4900, temperatura 45°C, agitación 150 rpm, tiempo 30 minutos y una carga de carbón de 1/50 g/g. El carbón activado fue separado del líquido filtrando con una bomba de vacío a través de un papel filtro Whatman núm. 2.

El pH se ajustó a 6.5-7, con carbonato de calcio (CaCO_3) y el sulfato cálcico producido durante la neutralización fue eliminado por filtración del líquido con una bomba de vacío y un filtro de papel Whatman núm. 2. Una vez neutralizado y clarificado el hidrolizado, se tomaron alícuotas de 100 mL que se colocaron en matraces de 250 mL y se adicionaron los nutrientes (peptona 5 g/L, extracto de levadura 6 g/L y extracto de malta 6 g/L). Posteriormente se esterilizaron para realizar el estudio correspondiente con la cepa, inoculando cada matraz con 9ml de inóculo. Los matraces se incubaron a 26°C a 126 rpm en un agitador orbital Innova 4900 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EU) con control de temperatura y agitación: se analizaron cada 24 horas durante un total de 144 horas.

Determinación de biomasa

Se tomaron 9 mL del medio del inóculo y se colocaron en el medio en donde se desarrolló la fermentación; se tomó una muestra de 3 mL para determinar la concentración inicial de biomasa, posteriormente se tomaron muestras cada 24 horas del mismo matraz para observar el crecimiento de la biomasa y la concentración de xilitol. Se determinó la biomasa por peso seco, pesando 3 ml de cada matraz de estudio y colocándolo en un tubo de ensayo previamente pesado. Se centrifugó en una centrífuga refrigerada a 3 000 rpm durante 15 minutos a 21°C. Al sobrenadante se le determinó su composición por HPLC. La biomasa se lavó 3 veces con agua destilada para eliminar los restos del medio, y en cada lavado la biomasa fue homogeneizada y centrifugada. Al término del tercer lavado se eliminó el agua destilada y se colocó en una estufa para llevarlo a peso constante. Después de 24 horas, los tubos se pasaron a un desecador para conservarlos a temperatura ambiente y determinar el peso final.

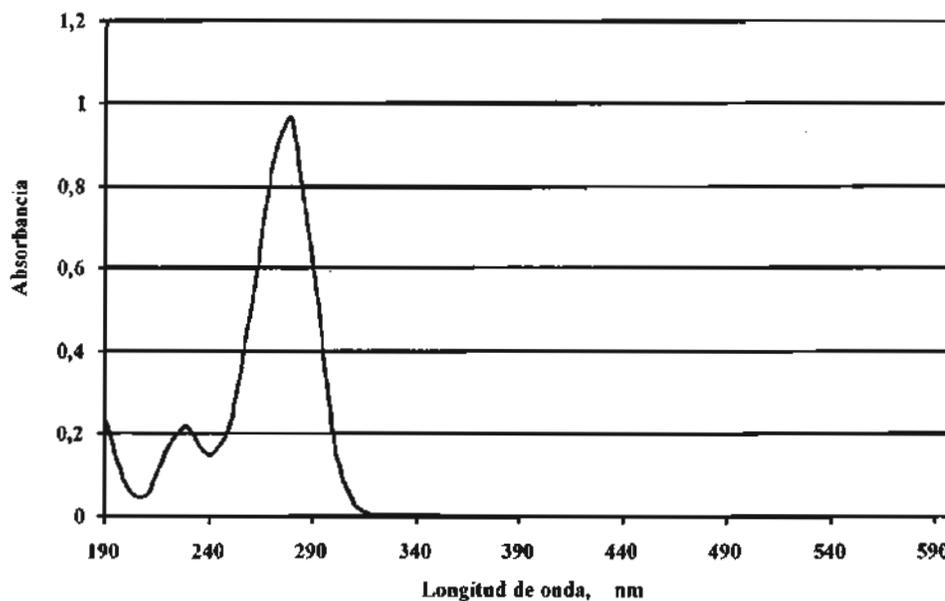
Determinación de monosacáridos, ácidos orgánicos y etanol por HPLC

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

Determinación de furfural por espectrofotometría UV-Vis

La determinación de furfural se realizó en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1601 a 280 nm. El espectro de absorción en el UV-visible del furfural se muestra en la figura 1, donde se observa un máximo de absorción a los 280 nm. Esta longitud de onda fue seleccionada para analizar el contenido en furfural de los hidrolizados.

Figura 1. Espectro de absorción UV-Vis del furfural



Resultados y discusión

La tabla 1 muestra los resultados de la fermentación en medios con xilosa comercial. Se observa cómo, a partir de 56.81 g/L de xilosa, se obtienen 38.3 g de xilitol/L. La productividad media P fue 0.266 g/L h; el rendimiento en producto $Y_{p/s}$, de 0.65 g/g y el rendimiento en biomasa $Y_{x/s}$, de 0.17 g/g. Comparativamente, los resultados obtenidos en hidrolizados de paja de sorgo fueron ligeramente inferiores, como se muestra en la tabla 2. La productividad en xilitol disminuyó a 0.118 g/Lh, el rendimiento en xilitol a 0.27 g/g y el rendimiento en biomasa a 0.12 g/g. La disminución, tanto del rendimiento en biomasa como del producto, sugiere que el crecimiento de la levadura *Candida parapsilosis* necesita más energía de mantenimiento en los hidrolizados que en el medio sintético; esto podría deberse a la presencia de algunos compuestos tóxicos para el microorganismo. Un efecto similar se ha comprobado en estudios realizados con *Candida guilliermondii* en hidrolizados de paja de arroz, donde la productividad fue 47% más baja que en medios sintéticos (Mussatto y Roberto, 2004).

En estudios anteriores sobre producción de xilitol con hidrolizados de paja de sorgo sin un proceso optimizado de clarificación, se han reportado concentraciones de xilitol de 5.3 g/L, por lo que los resultados mostrados en el presente trabajo se encontraron satisfactorios. Esto permite considerar como viable la producción de xilitol a partir de hidrolizados de paja de sorgo (Barrera Guillén, 2002).

Tabla 1. Resultados de la cinética de crecimiento de *Candida parapsilosis* en medios sintéticos conteniendo xilosa comercial

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	Xilosa (g/L)	Xilitol (g/L)
0	0.88±0.12	56.81±2.34	1.33±0.13
24	2.87±0.11	52.56±0.78	4.54±0.19
48	4.26±0.04	40.44±1.19	13.71±0.41
72	5.34±0.20	25.04±0.07	25.35±0.28
96	6.69±0.29	8.47±0.26	34.65±0.46
120	9.09±0.20	0.20±0.03	40.26±1.77
144	10.69±0.50	0.30±0.21	38.32±0.44

Tabla 2. Resultados de la cinética de crecimiento de *Candida parapsilosis* crecida en medios hidrolizados de paja de sorgo con el tratamiento de detoxificación

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	Xilosa (g/L)	Xilitol (g/L)
0	5.27±1.48	55.24±3.13	2.44±0.20
24	8.51±1.35	48.92±1.14	3.08±0.08
48	6.05±0.28	37.08±0.56	6.52±0.16
72	6.29±0.11	28.17±0.36	10.00±0.30
96	7.30±0.09	18.35±0.22	13.79±0.59
120	8.84±0.91	8.76±0.06	16.36±0.55
144	11.70±0.24	1.81±0.05	17.01±0.26

Conclusiones

Se ha mejorado la obtención de xilitol por medio de *Candida parapsilosis* en hidrolizados clarificados por el procedimiento propuesto, obteniéndose concentraciones de 17 g/L de xilitol, con una productividad en xilitol de 0.118 g/L h y un rendimiento de 0.27 g/g. Sin embargo, necesitan nuevos tratamientos de los hidrolizados para conseguir mayores productividades de xilitol.

Referencias

- Barrera Guillén, A.M. (2002), "Estudio de la producción de xilitol por *Debaryomyces hansenii* a partir de hidrolizados de paja de sorgo", tesis de Maestría, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Reynosa, Tamaulipas, México.
- Canilha, L.; De Almeida e Silva, J.B.; Nápoles Solenzal, A.I. (2003), "Eucalyptus hydrolysate detoxification with activated charcoal adsorption or ion-exchange resins for xylitol production", La Habana: ICIDCA.
- Téllez Luis, S.J.; Ramírez, J.A.; Vázquez, M. (2002a), "Mathematical modelling of hemicellulosic sugar production from sorghum straw", *Journal of Food Engineering*, 52: 285-291.

- Téllez Luis, S.J.; Ramírez, J.A.; Vázquez M. (2002b), "Modelling of the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 505-512.
- _____ (2001), "Estudio de la hidrólisis de paja de sorgo con ácido sulfúrico", tesis doctoral, Universidad Autónoma de Tamaulipas, UAM-Reynosa-Aztlán.
- Mussatto, S.I.; Roberto, I.C. (2004), "Kinetic behavior of *Candida guilliermondii* yeast during xilitol production from highly concentrated hydrolysate", *Process biochemistry*, 39(11): 1433-1439.

**Estudio de la eliminación de inhibidores
microbianos en hidrolizados de bagazo de caña
y de la producción de xilitol por *Candida parapsilosis*
en medios de xilosa comercial en presencia
de elevadas concentraciones de sales**

**Study of the Microbial Inhibitor Removal in Hydrolysates of
Cane Bagasse and the Production of Xylitol by *Candida*
parapsilosis in Commercial Xylose Media in Presence
of High Concentration of Salts**

Rodríguez Durán, N.A.¹; Ramírez de León, J.A.¹; Vázquez Vázquez, M.²

Resumen

El bagazo de caña de azúcar, subproducto del proceso de producción de sacarosa, es un material muy abundante, de bajo costo y considerado como desecho. El xilitol, aditivo alimentario de alto costo, puede ser sintetizado por levaduras a partir de xilosa, por lo que es factible su producción a partir de bagazo de caña. Los licores ricos en xilosa, obtenidos por hidrólisis ácida de BCA a altas temperaturas, contienen inhibidores, lo que hace necesaria una

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

²Departamento de Química Analítica, Área de Tecnología de Alimentos, Universidad de Santiago de Compostela, Escuela Politécnica Superior, Lugo, España.

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

etapa de detoxificación previa a su utilización como medio de fermentación. El objetivo de este estudio fue optimizar la etapa de detoxificación para utilizar el HBC como un sustrato para la producción de xilitol. El hidrolizado obtenido empleando ácido fosfórico al 2% a 121°C durante 60 minutos y concentrado a 53.5 g xilosa/L, fue tratado con carbón activado (3.3, 2.5, 2%), tiempo de tratamiento (20, 40, 60 min) y pH inicial (1, 3 y 5) para estudiar el efecto sobre el porcentaje de eliminación de furfural (RF) a 45°C y 150 rpm. Las condiciones óptimas en las que el valor de RF fue de 99.95% fueron: pH 3.8, 58.4 minutos y 3.3% de carbón activado, obteniéndose licores con 48.3, 3.6, 6.9 y 3.9 g/L de xilosa, glucosa, arabinosa y ácido acético, respectivamente. Otro objetivo fue estudiar el efecto de sales de fosfato sobre el rendimiento en producto ($Y_{p/S}$), el rendimiento en biomasa ($Y_{x/S}$) y la productividad (Q_p) en medios de xilosa comercial inoculados con *Candida parapsilosis*. El experimento consistió en cuatro medios preparados a partir de soluciones de 0, 2, 4 y 6% de H_3PO_4 neutralizadas con KOH 5 molar hasta pH 5, conteniendo cada uno de ellos 45, 5, 6 y 6 g/L de xilosa comercial, peptona, extracto de malta y extracto de levadura, respectivamente, incubando a 26°C y 126 rpm durante 144 horas, las muestras fueron tomadas cada 24 horas. Los resultados obtenidos indican que el $Y_{p/S}$, el $Y_{x/S}$ y la Q_p son afectados por la concentración de sales disueltas en el medio, siendo mayores los valores calculados (0.26 +/- 0.01, 0.23 +/- 0.02 y 0.067 +/- 0.002, respectivamente) en el tratamiento que no las contenía. Se confirmó la posibilidad del KOH como álcali.

Abstract

Sugar Cane Bagasse, a by-product of the sucrose production, is a material of low-cost considered a waste when is in excess. The xylitol, food additive of high value, can be synthesized by yeasts starting from xylose, for what is feasible its production starting from scb. The rich liquors in xylose, obtained by hydrolysis with dilute acids from scb at high temperatures, contain inhibitors that which makes necessary a step of detoxification to can use them like fermentation media. The objective of this study was to optimize the detoxification step to use scb hydrolyzates as substrate for production of xylitol. The hydrolyzate, obtained using 2% of phosphoric acid at 121°C during 60 min and concentrated at 53.5 g xylose/L, was treated with activated charcoal (3.3, 2.5, 2%), treatment time (20, 40, 60 min) and initial pH (1, 3 and 5) to study the effect on the percent of furfural elimination (FE) at 45°C and 150 rpm. The optimal parameters for detoxification (99.95% FE) in this study were pH 3.8, 58.4 min and 3.3% of activated charcoal, obtaining liquors with 48.3, 3.6, 6.9 and 3.9 g/L of xylose, glucose, arabinose and acetic acid, respectively. A second objective was to study the effect of phosphate salts on the product yield ($Y_{p/S}$), the biomass yield ($Y_{x/S}$) and the productivity (Q_p) in media with commercial xylose

inoculated with *Candida parapsilosis*. The experiment consisted on four media starting from solutions of 0, 2, 4 and 6% of H_3PO_4 neutralized with KOH 5 M until pH 5, containing each one of them 45, 5, 6 and 6 g/L of commercial xylose, peptone, malt extract and extract yeast, respectively. They were incubating at 26°C and 126 rpm during 144 h. The samples were taken every 24 hours. The obtained results indicate that the $Y_{P/S}$, the $Y_{X/S}$ and the Q_p were affected by the concentration of salts dissolved in the media, being higher the calculated values (0.26 +/- 0.01, 0.23 +/- 0.02 and 0.067 +/- 0.002, respectively) in the treatment that didn't contain them. It was confirmed the possibility of the use of KOH like alkali.

Introducción

El bagazo de caña es un subproducto del proceso de producción de sacarosa que se emplea para la fabricación de tableros, alimento para ganado y como combustible en los mismos ingenios (James y Chen, 1999). La utilización de los excedentes de este material en la producción biotecnológica de aditivos lo convierte en un sustrato barato y además abundante, ya que en Tamaulipas existe una elevada producción de caña de azúcar.

Se han realizado estudios en los que al tratar al bagazo de caña con ácidos diluidos y elevadas temperaturas, se produce la hidrólisis de la hemicelulosa que contiene, obteniéndose licores ricos en xilosa, arabinosa, glucosa, ácido acético y furfural. Estos dos últimos actúan como inhibidores del crecimiento microbiano.

Por ser xilosa el carbohidrato en mayor concentración, se pensó en emplear estos hidrolizados como medio de cultivo para *Candida parapsilosis* (NRRL Y-2315) ya que esta levadura sintetiza xilitol a partir de este azúcar. El xilitol es un edulcorante cotizado por tener unas propiedades muy particulares, como son las de un dulzor similar al de la sacarosa pero con las ventajas de provocar una sensación de frescura; la posibilidad de ser consumido por diabéticos; así como regular y disminuir la placa dentobacteriana, no participar en la reacción de Maillard, lo que le permite ser empleado en la elaboración de alimentos que no requieran esta característica, además de utilizarse en fármacos y pastas dentríficas, entre otros (Cubero *et al.*, 2002).

Al concentrar estos licores, además de los azúcares también se concentran los inhibidores, lo cual es un problema que se puede solucionar optimizando la etapa de detoxificación, por lo que en el presente estudio se decidió experimentar sobre este proceso.

Otro aspecto a tratar en este trabajo de investigación es el del álcali que se va a emplear en la neutralización; para ello se emplearon medios de xilosa comercial con

elevadas concentraciones de sales de fosfato inoculados con *C. parapsilosis*, pretendiendo determinar cuál es la tolerancia del microorganismo.

Materiales y métodos

Hidrolizado de Bagazo de Caña (HBC)

El bagazo se obtuvo de la molienda de caña de azúcar de diferentes variedades y fue proporcionado por el Ingenio Mante, el cual se encuentra localizado en el municipio de Mante, Tamaulipas, México. El bagazo de caña, deshidratado y molido, fue hidrolizado con H_3PO_4 al 2% a 121°C durante 60 minutos y concentrado en un equipo rotavapor hasta perder tres cuartas partes del líquido (Gámez, 2003).

Detoxificación del hidrolizado de bagazo de caña

Tres niveles de pH (1, 3 y 5), tiempo (20, 40 y 60 minutos) y carga (1 g de carbón activado/ 50, 40 y 30 g de hidrolizado) fueron probados en HBC de 53 g de xilosa/L (véase tabla 1). El álcali empleado fue el $CaCO_3$. Masas de 100g de HBC fueron colocados en matraces de 250 ml de capacidad, a 150 rpm y 45°C en una incubadora marca Innova 4900 New Brunswick Scientific (Edison, Nueva Jersey, EU). En estas condiciones fue adicionado el carbón activado en el nivel de carga correspondiente y se procedió a una filtración al vacío. Muestras para analizar concentración de xilosa, glucosa, arabinosa, ácido acético (por cromatografía de líquidos de alta eficacia con detector de Índice de Refracción) y furfural (por espectrofotometría a 280 nm) fueron tomadas antes y después de la adición de carbón activado.

Reactivación y mantenimiento de la cepa

La cepa liofilizada de *Candida parapsilosis* NRRL Y-2315 fue empleada en los presentes estudios; ésta fue proporcionada por el United States Department of Agricultura Northern National Research Laboratory, en Peoria, IL., EU. Este microorganismo fue inoculado en un medio con un contenido de 10 g de xilosa comercial/L, 5 g de peptona/L y 3 g de extracto de levadura/L; fue mantenido en agar, en un tubo inclinado conteniendo un medio con los mismos componentes y concentraciones que lo previamente descrito más 20 g de agar/L. Los microorganismos que crecieron en

este medio fueron transferidos a un medio compuesto por 60 g de xilosa comercial/L, 5 g de peptona/L, 6 g de extracto de malta/L, 6 g de extracto de levadura/L, con un pH de 6 e incubado a 126 rpm y 26°C; estas condiciones de crecimiento son las descritas en un estudio realizado por Ramírez *et al.* (2003). El equipo empleado fue la incubadora antes mencionada; a las 144 horas de incubación le fue adicionado en condiciones asépticas 20% de glicerol y se mantuvo congelado.

Preparación del inóculo

El inóculo fue preparado a partir del medio congelado antes mencionado; 25 ml de este medio fueron tomados con pipeta estéril en condiciones asépticas y adicionados a 250 ml de medio de pH 5 y un contenido de 15 g de xilosa comercial/L, 5 g de peptona/L, 6 g de extracto de levadura/L, 6 g de extracto de malta/L, 5 g de KH_2PO_4 /L, 2 g de NH_4HSO_4 /L. Este medio fue incubado a 126 rpm y 26°C durante 144 horas. La adición de KH_2PO_4 y NH_4HSO_4 se hizo con base en nutrientes empleados por Furlan *et al.* (2001).

Preparación de medios de cultivo

Los medios fueron preparados a partir de soluciones de 100 ml al 0, 2, 4 y 6% de H_3PO_4 ; éstas fueron neutralizadas con una solución de KOH 5 molar hasta un pH de 5, de acuerdo con lo mostrado en la tabla 3. Fueron medidos el volumen gastado de álcali y el volumen final de la solución. Todos los tratamientos se realizaron por duplicado y tuvieron un mismo contenido de los siguientes nutrientes: 45 g de xilosa comercial/L, 5 g de peptona/L, 6 g de extracto de malta/L, 6 g de extracto de levadura/L. A éstos les fueron adicionados 10 ml del inóculo correspondiente, por cada 100 ml de medio. Las condiciones de incubación fueron 26°C, 126 rpm durante 144 horas, para lo cual se utilizó el equipo antes empleado. Se tomaron dos muestras de cada matraz cada 24 horas desde las 0 hasta las 144 horas para ser analizado su contenido de xilosa, xilitol y biomasa.

Análisis estadístico

Los programas empleados fueron Excel y Statgraphics, versión 4.0. En el estudio de eliminación de inhibidores del crecimiento microbiano en HBC ricos en xilosa se realizó

un análisis multifactorial fraccionado con tendencia centrada. Se realizó un análisis de varianza unifactorial en el estudio del efecto de la presencia de sales de fosfato sobre el rendimiento en producto, rendimiento en biomasa y productividad en medios de xilosa comercial.

Resultados y discusión

Las variables manejadas experimentalmente son las fijas y las independientes; las obtenidas como resultado son las dependientes (tabla 1). Lo obtenido experimentalmente se muestra en la tabla 2.

En el análisis multifactorial fraccionado se emplea el siguiente modelo estadístico:

$$Y = a + bX_1 + cX_2 + dX_3 + eX_1X_2 + fX_2X_3 + gX_1X_3 + hX_1X_2X_3 + iX_1X_2 + jX_2X_3$$

Donde: $X_1 = pH$; $X_2 =$ tiempo; y $X_3 =$ carga. Los coeficientes de determinación entre lo estimado con el modelo estadístico y lo obtenido experimentalmente, se muestran en la tabla 3, los cuales nos indican que el modelo es adecuado para las variables dependientes Y_1 y Y_2 . En la figura 1 se pueden observar los factores estadísticamente significativos para estas dos variables dependientes.

Empleando el diseño de superficie de respuesta en Statgraphics se realizó una optimización del proceso fijando la respuesta en un punto máximo de porcentaje de Eliminación de Furfural (EF), estimando de esta manera la combinación de variables operacionales que nos darán este valor de respuesta. Lo obtenido en esta optimización se muestra en la tabla 4, en la que también se incluye la concentración en g/L de todas las variables dependientes y el porcentaje de recuperación. Esto se pudo calcular ya que se tomaron muestras antes y después de la etapa de detoxificación, lo cual nos muestra que a pH 3.8, 58.4 minutos y 3.3% de carbón activado, se recupera 90.38% de xilosa y una concentración de 0.0033 g/L de furfural, lo cual hace al HBC tratado en estas condiciones un medio adecuado para el crecimiento de microorganismos, ya que la concentración de furfural se encuentra por debajo de lo reportado como tóxico (0.03-0.05%).

Por otra parte, para conocer la tolerancia de la levadura *Candida parapsilosis* para crecer y producir xilitol en presencia de sales de fosfato, se decidió emplear como medio de cultivo soluciones de 0, 2, 4 y 6% de ácido fosfórico neutralizadas hasta pH 5 con hidróxido de potasio 5 molar (tabla 8) con una concentración similar

de nutrientes y condiciones de incubación para observar únicamente el efecto de la concentración de sales en el medio sobre el rendimiento en producto, rendimiento en biomasa, productividad, consumo de xilosa, producción de xilitol y formación de biomasa, los resultados se muestran en la tabla 6. Para determinar si el efecto es estadísticamente significativo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés), el cual resultó positivo para todas las mediciones antes mencionadas, ya que el valor *P* fue menor a 0.05 en todos los casos (tabla 7).

Tabla 1. Variables empleadas en el estudio de optimización del proceso de detoxificación de hidrolizados de bagazo de caña de azúcar ricos en xilosa

<i>Variables fijadas</i>	<i>Valores</i>	<i>Unidades</i>	
Temperatura de tratamiento	45	°C	
Volumen de cada experimento	100	ml	
Xilosa inicial	53	g/L	
Agitación durante el tratamiento con el carbón	150	rpm	
<i>Variables independientes dimensionales</i>	<i>Nomenclatura</i>	<i>Unidades</i>	<i>Rango</i>
PH inicial	pH		1-5
Tiempo tratamiento carbón activo	t	min	20-60
Carga de carbón	C	*g/g	1/50-1/30
<i>Variables independientes adimensionales</i>	<i>Nomenclatura</i>	<i>Definición</i>	<i>Rango</i>
PH inicial	X ₁	(pH-3)/2	-1 a 1
Tiempo tratamiento carbón activo	X ₂	(t-40)/20	-1 a 1
Carga de carbón	X ₃	(C-40)/-10	-1 a 1
<i>Variables dependientes</i>	<i>Nomenclatura</i>	<i>Unidades</i>	
Concentración de xilosa después del tratamiento	Y ₁	g/L	
Concentración de glucosa después del tratamiento	Y ₂	g/L	
Concentración de arabinosa después del tratamiento	Y ₃	g/L	
Porcentaje de Eliminación de Ácido Acético después del tratamiento (EAA)	Y ₄	%	
Porcentaje de Eliminación de Furfural después del tratamiento (EA)	Y ₅	%	

* g de carbón activado por g de hidrolizado

Tabla 2. Condiciones utilizadas y resultados obtenidos en el estudio de optimización del proceso de detoxificación de hidrolizados de bagazo de caña de azúcar ricos en xilosa

Experimento	Variable independiente						Variable dependiente				
	Dimensionales			Adimensionales							
	pH	<i>t</i>	<i>C</i>	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5
1	3	20	1/50	0	-1	-1	52.9	4.4	6.8	15.70	90.3
2	1	20	1/40	-1	-1	0	46.8	4.3	6.1	1.71	91.9
3	5	20	1/40	1	-1	0	50.8	4.1	6.4	2.42	95.6
4	3	20	1/30	0	-1	1	47.9	3.9	6.1	26.62	98.6
5	1	40	1/50	-1	0	-1	47.6	4.4	6.2	4.62	88.3
6	5	40	1/50	1	0	-1	50.0	4.1	6.7	3.32	92.4
7 _a	3	40	1/40	0	0	0	51.3	4.3	6.8	7.07	95.4
7 _b	3	40	1/40	0	0	0	50.8	4.2	6.6	19.46	95.2
7 _c	3	40	1/40	0	0	0	51.8	4.3	6.9	9.27	95.0
8	1	40	1/30	-1	0	1	46.5	4.3	6.2	11.27	96.6
9	5	40	1/30	1	0	1	50.6	4.0	6.8	7.61	99.9
10	3	60	1/50	0	1	-1	49.3	4.0	6.5	14.18	91.4
11	1	60	1/40	-1	1	0	47.6	4.4	6.3	6.03	91.9
12	5	60	1/40	1	1	0	48.3	3.9	6.6	4.86	97.3
13	3	60	1/30	0	1	1	50.2	3.4	6.6	30.64	99.2
14	3	40	1/30	0	0	1	52.0	3.8	6.9	19.36	98.9

Tabla 3. Parámetros estadísticos de correlación entre lo estimado por el modelo estadístico y lo obtenido experimentalmente

Variable dependiente	R^2	R^2 ajustada
Y_1 (Xilosa)	0.9237	0.8093
Y_2 (Glucosa)	0.8091	0.5227
Y_3 (Arabinosa)	0.8583	0.6458
Y_4 (EAA)	0.8821	0.7053
Y_5 (EF)	0.9977	0.9943

Figura 1. Diagramas de Pareto que muestran los factores o interacciones que tienen una significación mayor de 95%

a) sobre lo obtenido de PEF y b) sobre xilosa

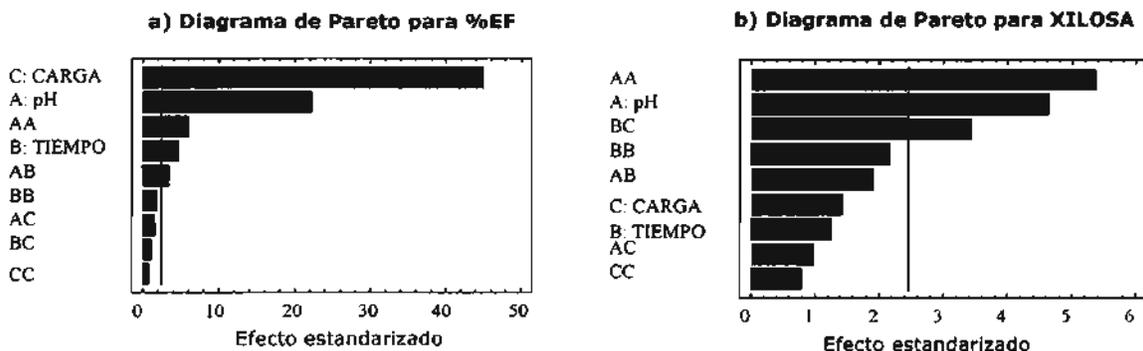


Tabla 4. Valores, porcentaje de recuperación y concentración residual de las variables dependientes estimados por el modelo estadístico en las condiciones de valor de PEF mantenido en 100

Variables dependientes	Codificadas			No codificadas			Valor estimado	% Recuperado	Concentración (g/L)
	X_1	X_2	X_3	pH	t	C			
Y_1 (Xilosa)	0.40	0.92	0.99	3.8	58.4	1/30.1	* 48.38	90.38	48.38
Y_2 (Glucosa)	0.40	0.92	0.99	3.8	58.4	1/30.1	* 3.60	76.92	3.60
Y_3 (Arabinosa)	0.40	0.92	0.99	3.8	58.4	1/30.1	* 6.90	97.60	6.90
Y_4 (EAA)	0.40	0.92	0.99	3.8	58.4	1/30.1	25.01%	74.99	3.90
Y_5 (EF)	0.40	0.92	0.99	3.8	58.4	1/30.1	99.95%	0.50	0.0033

*g/L.

Tabla 5. Tratamientos realizados

Tratamiento	%H ₃ PO ₄	Inicial		ml KOH 5M	Final		g de KH ₂ PO ₄ /L estimado
		Volumen (ml)	pH		Volumen (ml)	pH	
Control	0	100	5.02	0.00	100.00	5.02	0.0
T1	2	100	1.49	8.25	108.25	5.01	51.8
T2	4	100	1.13	15.85	115.85	5.02	93.0
T3	6	100	1.00	23.55	123.55	5.07	129.6

Tabla 6. Promedios de los resultados obtenidos en cada tratamiento (+/- desviación estándar)

<i>Tratamiento</i>	Y_{PS}	Y_{XS}	Q_p	<i>Xilosa consumida</i>	<i>Xilitol producido</i>	<i>Biomasa formada</i>
Control	0.26+/-0.01	0.23+/-0.02	0.067+/-0.002	32.38+/-3.11	8.51+/-0.45	7.69+/-0.14
T1	0.21+/-0.01	0.19+/-0.03	0.040+/-0.010	22.98+/-4.79	5.10+/-1.54	4.33+/-0.12
T2	0.06+/-0.02	0.17+/-0.05	0.010+/-0.001	16.02+/-5.26	1.09+/-0.51	2.51+/-0.14
T3	0.02+/-0.00	0.14+/-0.04	0.005+/-0.000	12.3+/-4.06	0.32+/-0.19	1.63+/-0.01

Tabla 7. Valor-P obtenido de ANOVA para rendimiento en producto

<i>Fuente</i>	<i>Relación-F</i>	<i>Valor-P</i>
Rendimiento en producto	128.410	0.000
Rendimiento en biomasa	3.830	0.039
Productividad	106.520	0.000
Xilosa consumida	16.210	0.000
Xilitol producido	68.000	0.000
Biomasa formada	1964.420	0.000

En la figura 2a se muestra claramente el efecto de la concentración de sales presentes; éste fue más drástico en cuanto al rendimiento en producto y productividad; además, descendieron los valores conforme se aumentó el nivel de sal. La concentración máxima de xilosa consumida fue de 32.38 (+/-3.11) g/L transformándose a solamente 8.51 (+/-0.45). Estos valores se obtuvieron en el control (tabla 6, figura 2).

De los medios que contenían sal de fosfato, el T1 fue el que tuvo un mayor porcentaje de rendimiento en producto, rendimiento en biomasa, productividad, consumo de xilosa, producción de xilitol y formación de biomasa, considerando lo obtenido en el control como 100% (tabla 8). Pero debe hacerse notar que el rendimiento en producto está ligeramente por debajo del reportado (0.314) en otros estudios para la producción de xilitol por *C. Parasilopsis* (Ramírez *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos fueron los esperados, ya que a elevadas concentraciones de solutos se inhibe el crecimiento y producción de los microorganismos, por eso debe reconsiderarse el uso

Figura 2. Diagramas de barras en los que se comparan los valores promedio con error estándar de (a) rendimiento en producto, rendimiento en biomasa y productividad; y de (b) la xilosa consumida, el xilitol producido y la biomasa formada durante 144 horas de incubación

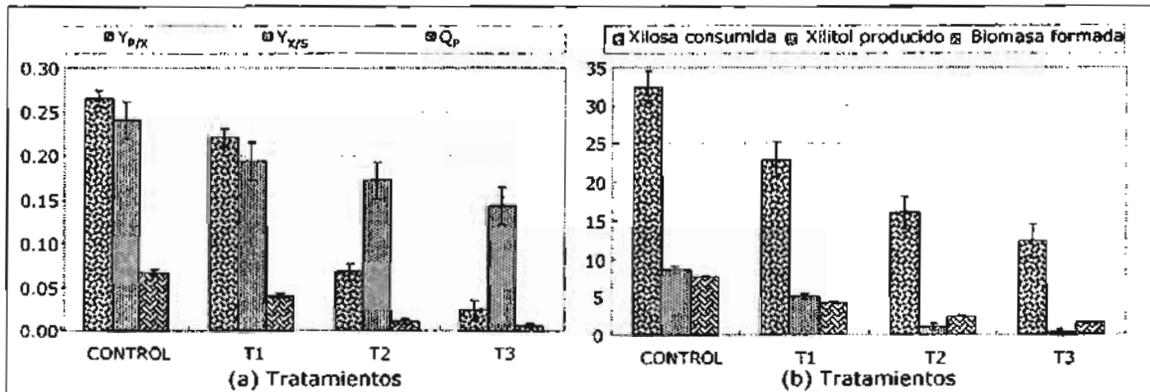


Tabla 8. Porcentajes obtenidos en los T1, T2 y T3, considerando lo obtenido en control como 100%

Tratamiento	$Y_{p/s}$	$Y_{x/s}$	Q_p	Xilosa consumida	Xilitol producido	Biomasa formada
Control	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
T1	83.13	80.78	60.38	70.98	59.99	56.39
T2	25.75	71.73	16.04	49.48	12.85	32.74
T3	8.98	59.55	8.52	38.03	3.86	21.20

de un microorganismo halófilo productor de xilitol, como la levadura *Debaryomyces hansenii* o la búsqueda de otro álcali para la etapa de neutralización.

Conclusiones

El modelo estadístico puede predecir adecuadamente lo obtenido en xilosa y furfural dentro de los rangos estudiados. Esto permite que se pueda emplear la herramienta de Statgraphics de optimización para buscar condiciones más rentables o convenientes para esta etapa a nivel industrial.

En los resultados obtenidos se observó claramente que una mayor concentración de sal de fosfato ocasionó una disminución de consumo de xilosa, producción de xilitol y formación de biomasa. Éste es, por tanto, el control en donde se obtuvo una mayor cantidad de lo antes mencionado; lo mínimo se encontró en los T2 y T3, en los que estuvo presente la mayor cantidad de sal. Observando la tabla 8 podemos sugerir la concentración de sal de fosfato formada en el T1 como tolerable para el crecimiento de la *C. Parasilopsis*.

Bibliografía

- Cubero, N.; Monferrer, A. y Villalta, J. (2002), *Aditivos alimentarios*, Ediciones Mundi-Prensa.
- Furlan, S.A. y De Castro, H.F. (2001), "Xylitol production by *Candida parapsilosis* under fed-batch culture", *Brazilian archives of biology and technology* (44) 2.
- Gámez, S. (2003), "Evaluación del ácido fosfórico como catalizador de la hidrólisis del bagazo de la caña de azúcar", tesis de maestría, Universidad Autónoma de Tamaulipas.
- González-Hernández, J.C. y Peña, A. (2002), "Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (levadura halófila)", *Revista latinoamericana de microbiología*, (44) 3-4.
- James, C.P. y Chen (1999), *Manual del azúcar de caña*, Editorial Limusa.
- Ramírez, J.A.; Santos, I.A.; Cruz, J.M. y Vázquez, M. (2003), "Optimisation of culture media for *Candida parapsilosis* NRRL Y-2315".

Producción de xilitol a partir de una cepa autóctona obtenida de bagazo de caña de azúcar en presencia de inhibidores
Xylitol Production from a Wild Strain of Sugar Cane Bagasse in Presence of Inhibitors

*Rangel L. E.; Livas L. D.; Escudero A. B.; Gómez R. J.; Aguilar U. M. G.**

Resumen

El xilitol es un edulcorante que tiene propiedades terapéuticas muy importantes. Éste es producido por vía físicoquímica mediante la hidrogenación de la xilosa. Una vía alternativa a este proceso es la fermentativa, la cual utiliza como catalizador un microorganismo bajo condiciones moderadas de presión, temperatura y concentración. Las levaduras son las mejores productoras de xilitol, especialmente aquellas del género *Candida*. La cantidad de xilitol y la productividad del mismo dependerán de las condiciones de cultivo y del tipo de cepa que se utilice. Veracruz es un gran productor de caña de azúcar, por lo que la cantidad generada de bagazo de caña es muy elevada (aproximadamente, 1 millón 890 mil toneladas en el estado) y es considerado como un subproducto de la industria cañera, el cual se quema para generar energía eléctrica. Los hidrolizados de bagazo de caña constituyen una materia prima de bajo costo, rica en xilosa. Sin embargo, presenta en su composición productos que actúan como inhibidores del crecimiento celular, por lo que, para su empleo como medio de cultivo, se requiere evaluar el efecto de dichos inhibidores sobre el crecimiento celular y la producción de xilitol en diversas cepas. El objetivo de

* Instituto Tecnológico de Veracruz-UNIDA, Av. Miguel A. de Quevedo # 2779, Veracruz, México, C. P. 91897. E-mail: gaguilar@itver.edu.mx

este trabajo fue evaluar la producción de xilitol considerando el empleo de una cepa autóctona aislada a partir de bagazo de caña de los ingenios de la región así como el efecto de inhibición de los compuestos tóxicos del proceso de hidrólisis del bagazo de caña (furfural, ácido acético y 5-hidroximetilfurfural) en la cepa autóctona seleccionada. Se aislaron 56 cepas de levaduras productoras de xilitol, de las cuales la codificada como IEC5 fue la que presentó un mayor rendimiento (0.6 g/g bajo condiciones controladas de pH y temperatura, y medio sintético) que las otras cepas autóctonas obtenidas bajo las mismas condiciones de cultivo y un rendimiento similar o mayor a las cepas de colección: *Candida shehatae*, *Candida parapsilosis* y *Pihia stipitis* (0.73, 0.37, y 0.04 g/g, respectivamente), por lo que se decidió continuar los estudios con la cepa IEC5. En lo que respecta a los efectos de inhibición por la presencia de los compuestos presentes en el hidrolizado de bagazo de caña, los resultados arrojaron que el furfural tiene un efecto de activación en el crecimiento celular a concentraciones de 0.5 y 1 g/l. Al incrementar el crecimiento celular el rendimiento en producción de xilitol disminuye, sin embargo, en concentraciones de 2 g/L de furfural existe un efecto negativo sobre la producción de xilitol, así como una reducción en el crecimiento celular de aproximadamente 50%. Con ácido acético entre 1 y 2 g/l no se observó una variación significativa en el crecimiento y en la producción de xilitol, pero por arriba de 3 g/L se encontró un efecto negativo en ambos productos. Con 5-hidroximetil-furfural, de igual manera que para el furfural, se observó un efecto de activación sobre el crecimiento celular a 0.05, 0.25 y 0.4 g/l; no se presentó ningún efecto significativo sobre el crecimiento a concentraciones de 0.25 y 0.4 g/L. En los tres casos se observó cambio en la morfología de la levadura, esto indicó que la cepa, según las condiciones de cultivo en las que se encontraba, modificó su metabolismo y fisiología celular. No existe inhibición total en ninguno de los casos probados, lo que nos indica que la cepa IEC5 es resistente a la presencia de los inhibidores que existen en el hidrolizado de bagazo. Esta cepa presenta características interesantes para su uso a nivel industrial.

Abstract

Xylitol is an edulcorant which has very important therapeutic properties. It is produced by physicochemical way through the hydrogenation of xylose. An alternative to this process is the fermentation of xylose, using microorganisms as catalyze and moderate conditions of pressure, and temperature. It has been shown that yeast of *Candida*. The amount of xylitol and the productivity are dependent of the culture conditions and of the kind of strain used. State of Veracruz is big producer of sugar cane bagasse (around 1890000 ton/year). This substrate is considered a sub-product of the sugar cane industry, which mostly is burned to generate energy for the industry. Hydrolysates from sugar

cane bagasse are raw material of low cost, enriched of xylose. However, as part of their composition, they have inhibitor substance of cellular growth. In order for using them as culture media is necessary to evaluate their effect on the cellular growth and production of xylitol in several strains. The objective of this work was to evaluate the ability of production of xylitol using a wild strain isolated from sugar cane bagasse and to evaluate the effect of inhibitors from the hydrolysis of this raw material (furfural, acetic acid and 5-hydroxymetilfurfural) on their cell growth. It were isolated 56 strains producers of xylitol, from which, strain IEC5 had the highest yield (0.6g/g under controlled conditions of pH, temperature and synthetic medium) compared with the others isolated and was similar or higher to the strain from culture collection: *Candida shehatae*, *Candida parapsilosis* y *Pihia stipitis* (0.73, 0.37, y 0.04 g/g respectively), so the next studies were done with strain IEC5. Respects to the effect of inhibitory substances from sugar cane bagasse, results were that furfural stimulated the cellular growth at concentrations of 0.5 and 1 g/l, but when this is occurred the yield of xylitol is reduced. Concentration of 2g/L showed a negative effect on xylitol production and cellular growth until 50%. Acetic acid at concentrations of 1 and 2 g/L it was not showed any significant effect neither on growth and xylitol production, up to 3 g/L it was a negative effect in both parameters. 5-hidroximetil-furfural had similar effect than furfural, presented an activation of the cellar growth at 0.05, 0.25 and 0.4 g/l and it did not have a significant effect at 0.25 and 0.4 g/L. In three cases it was observed changes in the cell morphology of the yeast; this indicates that under such conditions the yeast modified its metabolism and cellular physiology. It was not total inhibition in any of the cases, which means that strain IEC5 is resistant to the presence of inhibitors from the sugar cane bagasse. This strain presents interesting characteristics for future use at industrial level using hydrolysates from this substrate as a medium fermentation.

Introducción

El xilitol es un azúcar alcohol de cinco carbonos, un intermediario metabólico normal y producto del metabolismo de los carbohidratos en seres humanos y animales, el cual actualmente ha incrementado su uso como edulcorante. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, en frutas y vegetales; sin embargo, la extracción de xilitol de estas fuentes resulta ser poco rentable debido a que la concentración de xilitol en plantas es relativamente baja comparada con la concentración de sacarosa en caña de azúcar o en el bagazo de caña. Este producto se obtiene de manera comercial de la pulpa de madera, plantas de algodón, bagazo de

caña, arroz, cáscara de coco y otros subproductos agrícolas; éstos constituyen materias primas que contienen de 20 a 35% de xilano (polímero de xilosa). La xilosa obtenida de la hidrólisis del xilano puede ser convertida a xilitol por hidrogenación química para ser posteriormente purificado y cristalizado con fines industriales. El xilitol también puede producirse por la fermentación biológica de una cepa de levadura o por el tratamiento con ácido oxálico de vegetales.

Dentro de sus propiedades más importantes podemos citar: *solubilidad y estabilidad*. Es soluble en agua en una proporción de 62.4g/100ml (se disuelve más rápido que el sorbitol y es menos higroscópico); la solución acuosa es estable aun cuando se expone a tiempos prolongados de calentamiento y almacenamiento. De los sustitutos del azúcar, solamente la fructosa y la dextrosa producen la reacción de Maillard, el xilitol, el sorbitol y el manitol no lo hacen. El ligero color amarillo que se presenta cuando un azúcar alcohol es calentado por arriba de los 150°C se debe a la presencia de pequeñas impurezas. El xilitol no es utilizado por la mayoría de los microorganismos, por lo que los productos hechos con xilitol tienen menor riesgo de sufrir una descomposición. *Sabor*. Imparte una sensación de frescura similar a la del mentol, esto se debe al calor específico de solución negativo (-34.8 cal/g). La sustancia en forma amorfa o en solución no presenta este efecto; por lo que el xilitol debe ser usado en su forma cristalina para su uso en alimentos, ya que se requiere de esta propiedad. *Poder edulcorante*. Es generalmente aceptado al igual que el azúcar ordinario. El xilitol es 2.5 veces más dulce que el manitol y 2 veces más dulce que el sorbitol; su dulzura es comparada con la sacarosa y varía de 0.85 a 1.25 dependiendo del pH, concentración, temperatura y otros factores. Una concentración de 10% de xilitol tiene una dulzura igual a 10% de sacarosa. *Valor calórico*. El xilitol es una excelente fuente de calorías, pues un gramo de xilitol contiene 4.06 kcal, cantidad similar a otros carbohidratos similarmente metabolizados. *Propiedad anticaries*. El xilitol no es metabolizado por ciertos microorganismos, tales como *Streptococcus mutans*, normalmente presente en la cavidad bucal. *Streptococcus mutans* no produce ácidos a partir de xilitol como lo hace con la glucosa, y el pH evaluado en la superficie de los dientes no baja de 5.7 al utilizarlo. Estudios realizados demostraron una reducción de 30% de la caries dental en dietas con sorbitol y manitol al ser probado en ratas, y virtualmente la eliminación de caries fue completa con las dietas de xilitol consumidas por éstas. Resultados similares se han obtenido en estudios con seres humanos.

Microorganismos productores de xilitol. Los microorganismos asimilan y fermentan más eficientemente la glucosa que la xilosa. Sin embargo, existen bacterias, levaduras y hongos capaces de asimilar y fermentar xilosa a xilitol. Se ha reportado un grupo reducido de bacterias como *Corynebacterium*, *Enterobacter* y

Mycobacterium que producen xilitol. Las dos primeras bacterias utilizan D-xilosa como sustrato mientras que la última asimila D-xilulosa o D-xilosa isomerizada por enzimas inmovilizados de D-xilosa-isomerasa. Sin embargo, debido a que las cantidades de xilitol producido son muy bajas, las bacterias no son atractivas para el proceso de investigación. Respecto a los hongos, la literatura especializada reporta que *Petromyces albertensis* produce 39.8 g/L de Xilitol en una fermentación de 10 días con una concentración de sustrato (D-xilosa) de 100 g/L.

Las levaduras, por otro lado, son consideradas como los microorganismos que producen xilitol en proporciones considerables; por esta razón se cuenta con una amplia fuente de publicaciones referidas a sus productividades. Sin embargo, se sabe que los mejores productores de xilitol son los microorganismos pertenecientes al género *Candida spp* (Wilkenhausen *et al.* 1998).

En la tabla 1 son mostrados algunos parámetros cinéticos reportados en la literatura de algunas levaduras comerciales productoras de xilitol.

Metabolismo del xilitol por levaduras: la formación de cetopentosas en *Candida utilis*, una cepa aerobia, ejemplifica una reacción general de la que se pueden formar los polioles. Según investigadores, la reducción de L-xilulosa a xilitol es ocasionado por un sistema unido a NADP en el hígado de mamíferos (Winkelhausen *et al.*, 1998). En la figura 1 se muestra el mecanismo de producción de xilitol y cada una de las conversiones que sufre D-xilosa.

Las pentosas son producidas en la vía de las pentosas fosfato a partir de glucosa-6P o de fructosa 6P. La formación de ribulosa-5P y CO₂ a partir de glucosa 6P es una reacción *oxidativa*, mientras que a partir de fructosa 6P es una reacción *no oxidativa* (Winkelhausen *et al.*, 1998).

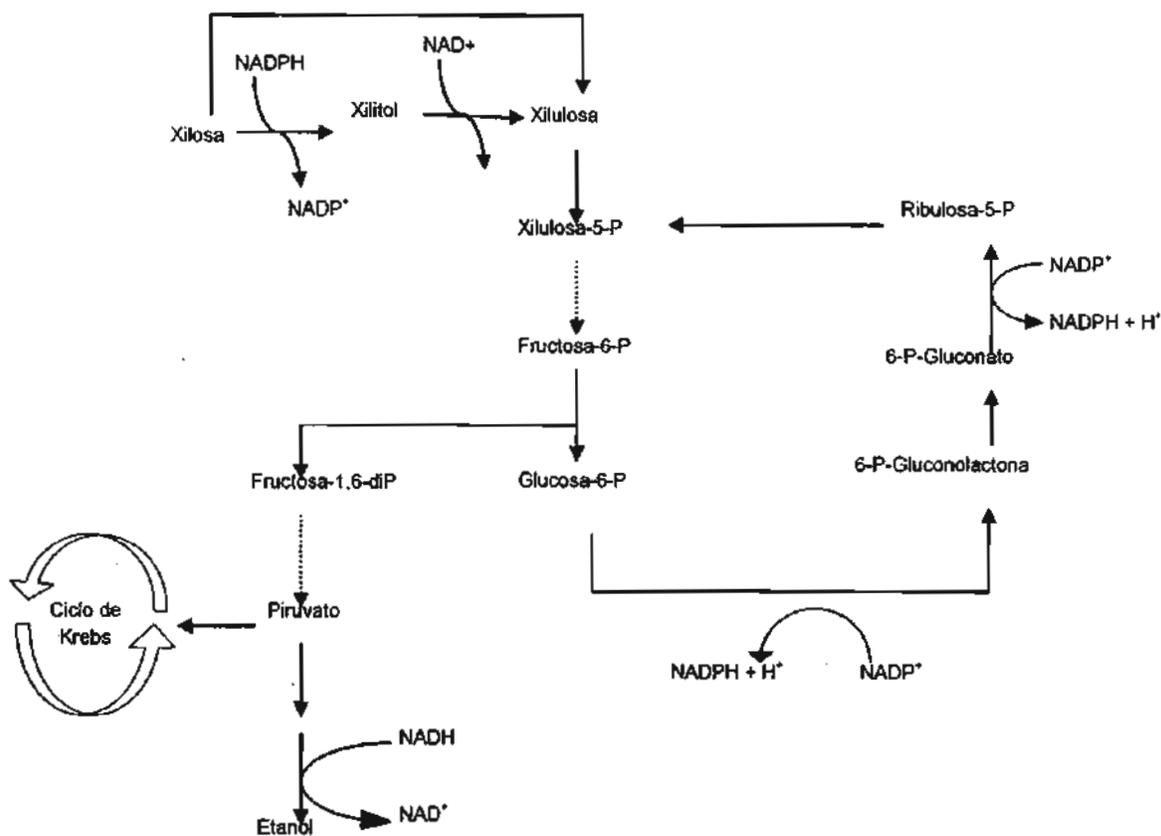
En la mayoría de las células las pentosas fosfato son producidas por ambas reacciones, cuando la vía oxidativa es insuficiente para satisfacer las necesidades de la síntesis de nucleótidos. Sin embargo, en las células de mamíferos muchas de las pentosas fosfato para la síntesis de ácidos nucleicos son producidos en el paso de la pseudoheptulosa 7P a partir de glucosa 6P. La vía de las pentosas fosfato está unida a la vía de Embden Meyerhoff en tres puntos: a nivel de glucosa 6P, fructosa 6P y gliceraldehído 3P.

Otro postulado de la vía metabólica es la conversión de L-xilulosa a D-xilulosa vía xilitol; donde la ruta del ácido glucurónico conecta la ruta metabólica de las pentosas fosfato con la fosforilación. El xilitol es convertido a D-xilulosa e introducido a la ruta de las pentosas fosfato a través de la D-xilulosa 5P. La ruta del ácido glucurónico se presenta en el hígado y al administrar xilitol, éste puede ser metabolizado en el tejido como una fuente de energía. Dicho metabolismo de xilitol, en contraste con la glucosa, requiere de cantidades muy pequeñas de insulina.

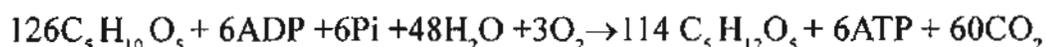
Tabla 1. Parámetros de producción de xilitol de cepas comerciales

Referencia	Cepa	Concentración (g/L)	Rendimiento $Y_{\mu x}$ (g/g)
Barbosa (1988)	<i>Candida guilliermondii</i>	104	0.74
Horitsu (1992)	<i>Debaryomyces hansenii</i>	100	0.64
Ojamo (1994)	<i>C. guilliermondii</i>	100	0.74
Kim (1999)	<i>C. tropicales</i>	100	0.81
Santos (2003)	<i>C. guilliermondii</i>	57.3	0.54

Figura 1. Metabolismo de la xilosa



En el caso de una fermentación aeróbica, el NADPH y el NADH son utilizados como cofactores, el rendimiento teórico es modificado en un valor (0.905 mol/mol o 0.917 g/g) y la reacción global es la siguiente:



En anaerobiosis, el NADH producido no pasa a la cadena respiratoria como en aerobiosis, con la formación de ATP. En este caso, una parte de la glucosa 6-fosfato es transformada en gliceraldehído-3-fosfato, que en la glicólisis forma el etanol y el ATP necesario para la fosforilación de la D-xilulosa. El rendimiento teórico 0.875 mol/mol o 0.877 g/g, la reacción es la siguiente:



El bagazo de caña es un residuo del proceso de fabricación de azúcar a partir de la caña. En la actualidad, en países como Brasil, India, Cuba y México se utiliza como materia prima en la industria papelera y como combustible en la industria azucarera, alcoholera y química. Como la mayoría de los residuos agroindustriales lignocelulósicos, tiene entre sus componentes principales a la hemicelulosa (tabla 2), que es un polímero compuesto por unidades de xilosa. Las unidades de xilosa pueden ser hidrolizadas en condiciones ácidas, dando como resultado una parte sólida en donde se encuentra la celulosa y lignina, y una parte líquida en donde se encuentra disuelta la xilosa, la cual es utilizada por algunos microorganismos (como es el caso de las levaduras) para la producción de xilitol.

Tabla 2. Composición del bagazo de caña

<i>Compuesto</i>	<i>%</i>
Celulosa	40
Hemicelulosa	30
Lignina	20

En la hidrólisis ácida de materiales lignocelulósicos se forman, además de xilosa, otros productos como son: glucosa, ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural y fenoles, los cuales son compuestos que actúan como inhibidores en el crecimiento de ciertas levaduras (Parajó, 1998). El efecto de estos inhibidores es variable, ocasio-

nando una disminución en la síntesis de metabolitos primarios, lo que constituye un efecto sinérgico entre ambos efectos.

El efecto del ácido acético: El ácido acético es producido durante la hidrólisis ácida del bagazo de caña por la liberación de los grupos acetil unidos a la materia prima. Ha sido estudiado para *Sacharomyces cerevisiae*; por ejemplo, la adición de 1 g/L de ácido acético al medio induce a una disminución de la biomasa de 20% (Strehaiano, 1995), mientras que la presencia de 7.5 g/L ocasiona una disminución de 80% en el crecimiento. La inhibición del ácido acético sobre el crecimiento, según Pampulha y Loureiro (1989), no se debe al bajo pH ocasionado por la presencia del ácido en el medio, sino que se debe a la acción de la forma no disociada del ácido; fenómeno que puede estar ligado a la permeabilidad de la membrana plasmática de la levadura. La disociación ocurre dentro de la célula, lo que ocasiona que el pH interno disminuya (Strehaiano, 1995), es decir, que bajo pH la forma no disociada del ácido puede difundirse dentro de la célula, disociándose en su interior y disminuyendo el pH intracelular (Parajó *et al.*, 1998).

Efecto de furfural y 5-hidroximetilfurfural (5-HMF). La presencia de furfural en hidrolizados es el resultado de la de la degradación de azúcares. El furfural es metabolizado por las levaduras, éste se reduce a furfural-alcohol utilizando el enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) (Demain, 1986; Martínez *et al.*, 2002). El furfural interfiere con el transporte de electrones e inhibe los enzimas glicolíticos que son indispensables para el crecimiento de la célula. En presencia de furfural, la producción de glicerol disminuye, lo que ocasiona que también disminuya la generación de NADH, la cual está relacionada a la producción de glicerol. Esta regeneración del NADH es útil a su vez para mantener el balance redox intracelular (Meyía *et al.*, 1991). El efecto que tiene el furfural sobre la producción de xilitol está relacionado directamente con la activación e inhibición de enzimas. Este efecto consiste en que el xilitol es degradado a xilulosa mediante el enzima xilitol reductasa dependiente de NAD⁺; como en la síntesis del furfural alcohol, se está produciendo un exceso de este cofactor, la levadura activa el enzima y comienza a degradar el xilitol con la finalidad de generar el crecimiento, el cual a su vez se encuentra detenido debido a una inhibición sobre los enzimas glicolíticos. De esta manera, la única fuente de carbono disponible para el crecimiento será el xilitol, lo que ocasiona que los rendimientos de éste se vean disminuidos y la biomasa se vea incrementada. Parajó *et al.* (1998) reportaron que existe una activación del crecimiento celular a concentraciones de 0.5 g/L de furfural e inhibición casi completa a más de 2 g/L; también se reporta un consumo total de 5-HMF, así como poca inhibición de crecimiento a concentraciones menores a 0.08 g/L de 5-HMF (tabla 3).

En la tabla 3 se resumen algunos estudios sobre inhibición del crecimiento celular en hidrolizados de bagazo de caña.

En el presente trabajo se evaluará el efecto sobre el crecimiento y producción de xilitol en diversas concentraciones de inhibidores presentes en el material ligno-celulósico, empleando una cepa aislada previamente en el laboratorio de Genética de la Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos (UNIDA) de este instituto. Esta cepa ha demostrado ser una productora potencial de xilitol en comparación con cepas comerciales como *Candida sheatae* y *C. parasilopsis*, cuyas productividades son de 0.191 g/L-h y 0.091 g/L-h, respectivamente. Esta cepa se encuentra clasificada a nivel de laboratorio bajo el nombre de IEC5 y su productividad reportada es de 0.208 g/L-h. Los resultados serán presentados y discutidos en este trabajo; éstos serán de utilidad para otros proyectos de investigación que se están realizando actualmente en dicho laboratorio.

Tabla 3. Inhibición del crecimiento celular en hidrolizados de bagazo de caña

<i>Cepa</i>	<i>Concentración de inhibidor (g/L)</i>	<i>Reducción de crecimiento (%)</i>	<i>Referencia</i>
<i>Candida spp.</i>	Fenoles: <2	<20%	Clark y Mackie (1984)
<i>S. cerevisiae</i>	Ácido acético: 4	60%	Parajó <i>et al.</i> (1998)
<i>C. shehatae</i> <i>S. cerevisiae</i>	Furfural: 2	90%	Parajó <i>et al.</i> (1998)

Materiales y métodos

Microorganismo: se utilizaron cepas asiladas a partir de muestras de bagazo de caña y 3 cepas de colección (*Candida sheatae*, *Candida parapsilosis* y *Pichia stipitis*) como marco comparativo seleccionadas por bibliografía (Strehaiano, 1995; Winkelhausen, 1998; De Figueroa, 2000; Parajó, 1998).

Medios de cultivo: 1) Conservación: 2% de xilosa, 0.1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% de agar bacteriológico. 2) Fermentación: 2% de xilosa, 0.2% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% extracto de levadura, 0.04 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 % KH_2PO_4 , e inhibidores a diferentes concentraciones: furfural (0.05, 0.1, y 0.2%), 5-hidroximetil-furfural (0.005, 0.025, 0.04%), ácido acético (0.1, 0.2, 0.3%).

Métodos analíticos: el crecimiento celular fue medido por densidad óptica a 620 nm, efectuando una curva de correlación DO-Peso seco; el inóculo fue controlado a 3×10^6 células vivas/mL; la viabilidad celular fue obtenida por la técnica utilizada por Demain (1986), usando una cámara de Thoma. La determinación de los productos y sustratos

fueron medidos por HPLC utilizando una columna BioRad aminex HPx-87H, fase móvil H_2SO_4 0.1 M a un flujo de 0.4 mL/min. En el caso del análisis de furfural, se utilizó un flujo de 0.6 mL/min. Se prepararon los estándares a concentración conocida de 20 y 10 g/L, respectivamente.

Resultados y discusión

Aislamiento y selección de cepas autóctonas

A partir de las muestras de bagazo obtenidas en tres ingenios diferentes de la región, se aislaron 56 cepas de levaduras con capacidad para producir xilitol, de las cuales la cepa 2JC2 y la cepa IEC5 fueron las que presentaron mayor rendimiento, en comparación con las otras cepas aisladas (tabla 4).

Cabe señalar que no se presentaron los resultados de las otras cepas aisladas debido a que éstas tuvieron rendimientos de xilitol por debajo de 0.012 g/g. De aquí se

Tabla 4. Rendimientos obtenidos de las cepas aisladas a partir de bagazo de caña de 3 ingenios de la región

<i>Cepas aisladas de bagazo de caña</i>	<i>Y p/s (g /g)</i>
M3BC1	0.066
M3BC20	0.237
M3BC3	0.012
IEC3	0.020
2JC2	0.261
IEC4	0.051
IEC10	0.078
IDC2	0.154
IDC4	0.018
M4BC1	0.149
IEC8	0.021
2JC2	0.018
IEC5	0.241
IEC2*	0.025

procedió a efectuar cinéticas en fermentador de las cepas 2JC2 y IEC5, comparando su actividad fermentativa con 3 cepas de colección, *Candida shehatae*, *Candida parapsilosis* y *Pichia stipitis*, reportadas como productoras de xilitol en la bibliografía (Parajó, 1998). Según las condiciones probadas, los resultados mostraron que la cepa IEC5 tienen un rendimiento mayor, en comparación con las cepas *C. parapsilosis*, *Pichia stipitis* y 2JC2, y muy cercano al obtenido por la cepa *C. sheatae* (tabla 5). También fue la cepa que mayor productividad obtuvo.

Tabla 5. Rendimientos y productividades obtenidas por diferentes cepas a pH 5.0, T 30°C y 250 rpm

<i>Cepa</i>	<i>Xilitol (g/L)</i>	<i>Rendimiento (g/g)</i>	<i>Productividad (g/L-h)</i>
<i>C. shehatae</i>	11.47	0.73	0.19
<i>C. parapsilosis</i>	5.45	0.37	0.09
<i>Pichia stipitis</i>	0.68	0.04	0.02
IEC5	6.57	0.61	0.21
2JC2	3.2	0.23	0.09

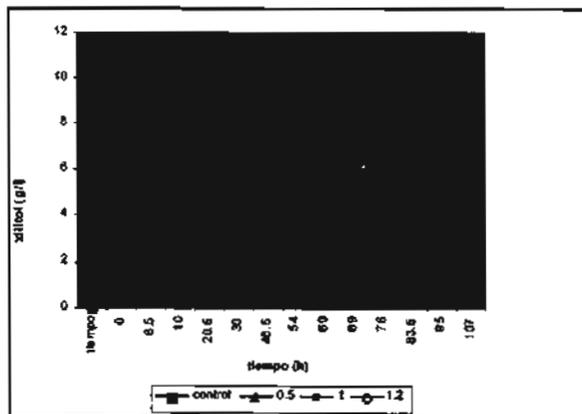
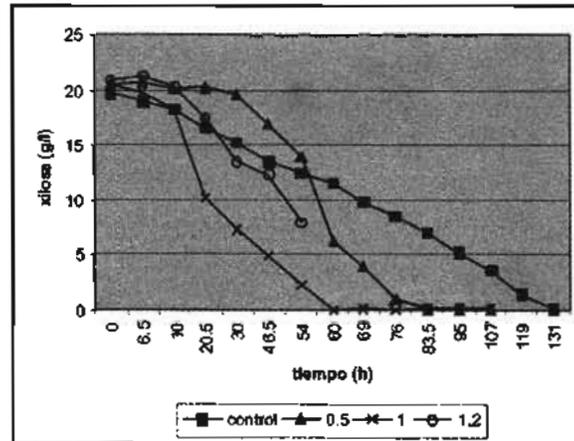
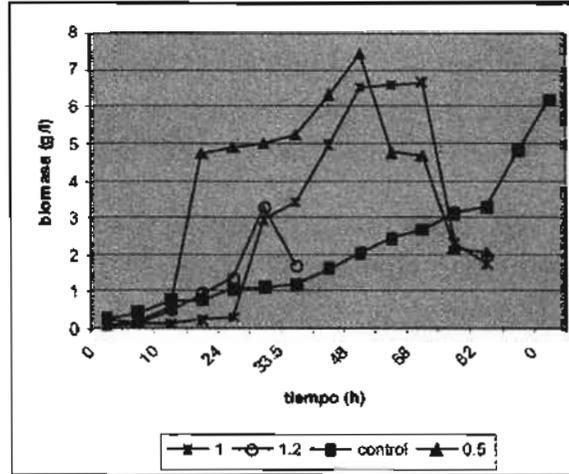
Con base en estos resultados, se decidió continuar los estudios en relación al efecto de la presencia de inhibidores con la cepa IEC5, por ser una levadura que presenta un rendimiento y un tiempo de producción de xilitol comparativamente similar a las cepas de referencia, además de ser reportada como una de las mejores productoras de xilitol.

Efecto de la presencia de inhibidores en el medio de cultivo sobre el metabolismo fermentativo de la cepa IEC5

Efecto del furfural. En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de xilitol a través de las diferentes concentraciones probadas de furfural.

En la figura 2 se puede observar que, por un lado, el crecimiento es afectado a medida que aumenta la concentración de inhibidor; para la concentración de 0.5 g/l de furfural se observa un incremento en el crecimiento con respecto a la concentración de 1 y 2 g/l, debido a que la levadura, como mecanismo de protección, consume el furfural. Esto hace que se estimule el metabolismo, lo que conlleva a la producción de biomasa; sin embargo, al aumentar la concentración de furfural se observa una

Figura 2. Cinéticas de crecimiento, consumo de xilosa y producción de xilitol de cepa 1EC5 en varias concentraciones de furfural



inhibición en el crecimiento, ya que el furfural presenta fuertes represiones a nivel enzimático, principalmente, enzimas glicolíticos, obteniendo como resultado una disminución en el crecimiento.

En cuanto a la producción de xilitol, se observa una disminución debido a que al presentarse un estímulo en el crecimiento, el metabolismo de la cepa cambia y el consumo de xilosa se dirige más hacia producción de biomasa que de producto, lo que ocasiona bajos rendimientos de xilitol, como se observa en la tabla 4.

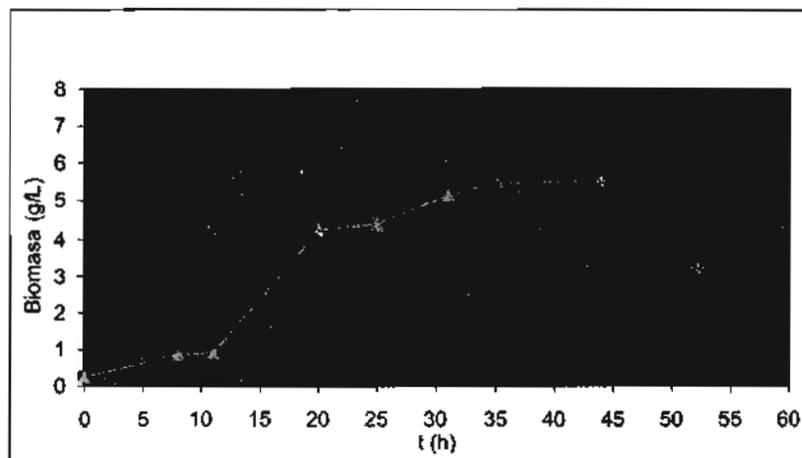
Tabla 6. Parámetros cinéticos de la cepa 1EC5 con furfural

Concentración	$Y_{p/s}$	P
0.5	0.30	0.074
1	0.33	0.082
1.2	0.22	0.099

Todo lo anterior concuerda con lo reportado por Parajó (1998), pero con la diferencia de que la cepa 1EC5 es más resistente a la concentración reportada de 2 g/l de furfural, la cual para *Candida tropicalis* presenta crecimiento nulo y para la cepa de estudio reduce el crecimiento sólo un 50 por ciento.

Efecto del ácido acético: como se observa en la figura 3, no existe una variación entre las concentraciones de ácido acético de 1 y 2 g/L; sin embargo, a 3 g/L se observa una fase lag prolongada y una disminución del crecimiento de 79% con respecto a las otras dos concentraciones.

Figura 3. Crecimiento de IEC5 en diferentes concentraciones de ácido acético



Este resultado concuerda con lo reportado por Roberto (1986), quien observó que en concentraciones mayores de 2 g/L se presenta una fase *lag* prolongada, mientras que en bajas, la fase *lag* se ve disminuida y su crecimiento activado.

En la tabla 5 se resumen los parámetros cinéticos obtenidos para el ácido acético en el medio de cultivo a diferentes concentraciones.

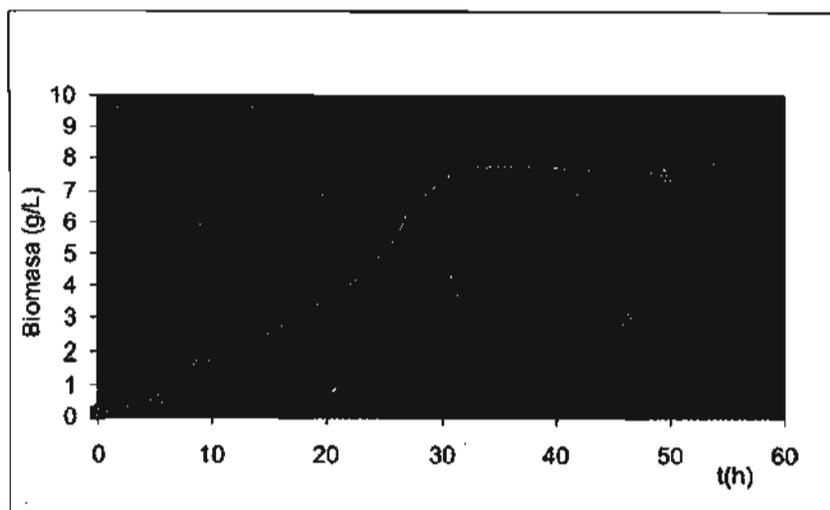
Tabla 7. Parámetros cinéticos de la cepa 1EC5 con furfural

	<i>Furfural</i> (g/L)	<i>Y_{x/s}</i>	<i>Y_{p/s}</i>	<i>P</i>
1	0.22	0.35	0.38	0.16
2	0.22	0.33	0.37	0.16
3	0.17	0.25	0.33	0.16

Efecto del 5-hidroximetilfurfural. Para este estudio, en la figura 4 se observa que aparentemente no existe un efecto inhibitorio total, sin embargo, para las dos concentraciones altas se observa una reducción importante en el crecimiento, mas no total.

De lo anterior podemos mencionar que, según lo reportado por Parajó (1998), la cepa de estudio soporta concentraciones más altas de 5-HMF que las reportadas.

Figura 4. Cinética de crecimiento cepa 1EC5 en concentraciones de HMF variables



Conclusiones

Es importante mencionar que esta cepa autóctona es capaz de producir buenos rendimientos de xilitol en comparación con otras cepas ya probadas; además, no produce otros productos intermediarios como el etanol y presenta una buena resistencia al efecto de los inhibidores presentes en el hidrolizado de bagazo de caña. En cuanto al efecto de los inhibidores podemos concluir que para:

Furfural se presentó un efecto de activación en el crecimiento celular por mayor degradación de xilitol a xilulosa; al incrementar el crecimiento celular, el rendimiento en producción de xilitol es disminuido. En concentraciones de 2 g/L de furfural existe efecto sobre la producción de xilitol, así como una reducción en el crecimiento celular de casi 50 por ciento.

para *ácido acético* existe un efecto de activación en el crecimiento celular. La variación del crecimiento en concentraciones de 1 y 2 g/L de ácido acético no es significativa. Se observó un ligero efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular en 3g/L, el cual no provocó una disminución del crecimiento de 100%. Al incrementar el crecimiento celular, el rendimiento en producción de xilitol disminuyó. Entre sí, no existe efecto en producción de xilitol por la variación de concentración de ácido acético.

para *5-hidroximetilfurfural* se observó un efecto de activación en el crecimiento celular al igual que con los otros dos inhibidores. No se presentó ningún efecto significativo sobre el crecimiento en concentraciones de 0.25 y 0.4 g/L. No hubo inhibición total pero sí cambio de morfología de la cepa en presencia de los inhibidores

Bibliografía

- Clark, T.A. y Mackie, K.L. (1984) "Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 34B: 101-110.
- De Figueroa, L.I.C. (2000), "Isolation and Identification of Xylitol-Producing Yeasts from Agricultural Residues", *Revista de Microbiología, Argentina*, 46.
- Demain, A.L. (1986), *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Washington, D.C.
- Martínez, E.A.; Villarreal, M.L.M. y Almeida e Silva, J.B., (2002), "Uso de diferentes materias primas para la producción biotecnológica de xilitol", *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 3(5): 295-301.

- Meyia V.; Delgenes J.P.; Moletta R. y Navarro J.M. (1991), "Production of Xylitol by *Candida guilliermondii*", *Biotechnology Letters*, 13(4): 281-286.
- Pampulha, M.E. y Loureiro-Dias, M.C. (1989), "Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31: 547-550.
- Parajó J.C. (1998), "Biotechnological Production of Xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose Hydrolisates", *Bioresource Technology*, Gran Bretaña, 66.
- ; Domínguez, H. y Domínguez, J.M. (1998), "Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis", *Biores. Sci.*, 65: 191-201.
- Strehaiano, P. (1995), "Effects of acetic acid on growth and fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae*", *Biotechnology Letters*, Francia, 17(2): 237-247.
- Walker, G.M. (1998), *Yeast physiology and biotechnology*, Londres, RU, Wiley.
- Winkelhausen, E. (1998), "Microbial Conversión of D-Xylose to Xylitol", *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Skopje, Macedonia, 86: 1-14.

Estudio de la hidrólisis de la paja de sorgo con ácido fosfórico

Study of Sorghum Straw Hydrolysis Using Phosphoric Acid

Oliva Álvarez, M.A.^{1}; Téllez Luis, S.J.¹; Ramírez de León, J.A.¹;
Vázquez Vázquez, M.²*

Resumen

La paja de sorgo es una fuente renovable, barata y ampliamente disponible, la cual se utiliza comúnmente como alimento de ganado (Ortiz y Trueba, 1998; SAGAR, 2000). Por medio de la hidrólisis de la paja de sorgo se pueden producir soluciones de xilosa. La xilosa es un azúcar hemicelulósico que puede usarse como fuente de carbón y de energía para el crecimiento de microorganismos. El uso principal de la xilosa es su bioconversión a xilitol, un edulcorante alimenticio con propiedades tecnológicas muy importantes, como la capacidad anticancerígena, además de poseer un valor calórico bajo y un calor de disolución negativo. Se estudió la hidrólisis de la paja de sorgo con ácido fosfórico, determinando el efecto de la concentración de ácido, temperatura y tiempo de hidrólisis con el fin de establecer las condiciones óptimas de obtención de xilosa en los hidrolizados; para ello se seleccionaron las condiciones consideradas como las más favorables: ésta ha sido la utilización de ácido fosfórico al 6% como catali-

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

² Departamento de Química Analítica, Área de Tecnología de Alimentos, Universidad de Santiago de Compostela, Escuela Politécnica Superior, Lugo, España.

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

zador; una temperatura de 126°C y un tiempo de 3 horas. Utilizando estas condiciones se obtuvieron hidrolizados con un rendimiento de 15.7g/L de xilosa.

Abstract

Sorghum straw is renewable, cheap and widely available resource, which is commonly used as feedstuffs. The hydrolysis of sorghum straw to produce xylose solutions could be a good alternative use for this abundant resource. Xylose is a hemicellulosic sugar that can be used as a carbon and energy source for the growth of microorganisms. The main use of xylose is its bioconversion to xylitol, a functional sweetener with important technological properties like anticarcinogenicity, low caloric value and negative heat of dissolution. The objective in the present work was to study xylose production by hydrolysis of sorghum straw with phosphoric acid. Several concentrations of phosphoric acid, temperature and reaction time were evaluated. Optimal conditions found for hydrolysis were 6% phosphoric acid, at 126°C by 3 hours, which yielded a solution with 15.7 g/L of xilose.

Introducción

La actual situación mundial se caracteriza por un incremento de la población y por el agotamiento de muchas materias primas. En esta situación resulta de gran interés el estudio de procesos no convencionales para el aprovechamiento de los recursos naturales.

Los microorganismos se han utilizado desde la antigüedad para la producción de alimentos. En la actualidad, la biotecnología alimentaria estudia el uso de otros microorganismos para la producción de aditivos alimentarios de gran interés para la industria, por ejemplo: la astaxantina, producida por la levadura *Phaffia rhodozyma*, utilizada en la alimentación animal para dar el color rosado-anaranjado, característico de salmones, pollos y huevos; el xilitol (Emodi, 1978), producido por varias levaduras, usado en la actualidad como edulcorante con la ventaja de que no provoca caries; y el ácido láctico, producido por bacterias lácticas, usado como acidulante y como conservador superficial de las canales de reses.

La obtención de estos aditivos y muchos otros, requiere la generación de medios de cultivo ricos en glucosa, xilosa u otros azúcares monoméricos. La paja de sorgo es un residuo agrícola (Holtzapfle, 1993; Blanch y Wilke, 1983) que puede ser utilizado para la obtención de azúcares por medio de procesos de hidrólisis, debido a su alto contenido en celulosa y hemicelulosas. De esta forma se podría obtener un valor agregado, procesando la paja de sorgo para obtener los azúcares fermentables.

El objetivo de este estudio es desarrollar y optimizar un proceso para la producción de xilosa a partir de paja de sorgo, usando ácido fosfórico.

Material y métodos

Las muestras de paja de sorgo se obtuvieron de una empresa agrícola de Río Bravo, Tamaulipas. Se trabajó con paja de sorgo entera, lo que incluye tallo, espiga y hojas. Se cortó en trozos y se molió en un molino para cereales. La muestra molida se tamizó y se seleccionó un tamaño de partícula menor a 0.5mm. Posteriormente se secó a 40°C durante 3 horas en una estufa de aire forzado. La muestra deshidratada se almacenó en recipientes de plástico, cerrados herméticamente para evitar las fluctuaciones de humedad.

Para establecer las condiciones óptimas de obtención de hidrolizados, se estudiaron las variables: concentración de ácido, temperatura y tiempo de hidrólisis. Se utilizó ácido fosfórico en concentraciones de 2, 4 y 6%. También se estimó la hidrólisis en ausencia de ácido. Se utilizaron temperaturas de 122, 126 y 134°C.

Los componentes de la materia se pesaron dentro de frascos de vidrio esterilizados, con tapa de rosca. La hidrólisis de la paja de sorgo a 122, 126 y 134°C en diferentes tiempos y concentraciones se realizó en autoclave. Los frascos se sumergieron inmediatamente en agua a 20°C para su enfriamiento y los hidrolizados se filtraron.

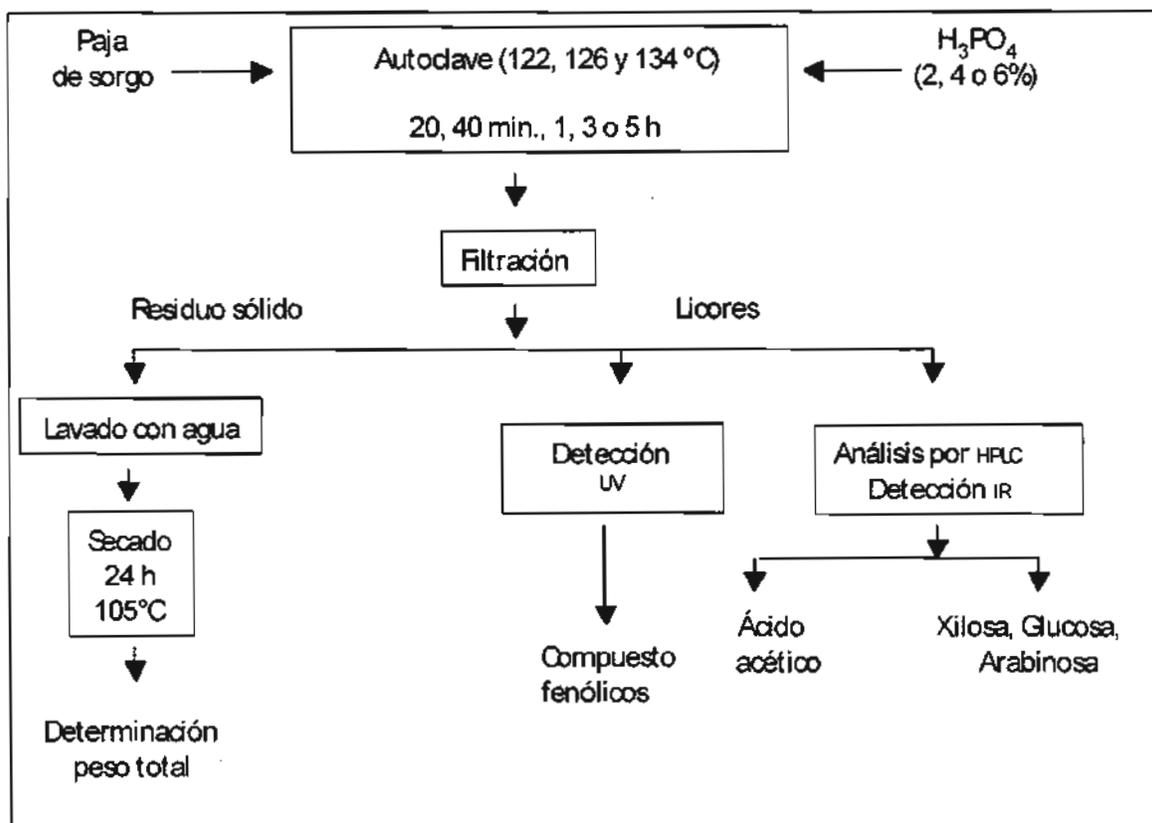
Para cuantificar el total de sólidos, se enjuagaron los frascos con agua destilada y se filtró a través de papel filtro. Las muestras se secaron a 105°C por 24 horas. Se tomaron alícuotas del volumen inicial filtrado de cada hidrolizado. Estas muestras se utilizaron para determinar carbohidratos y ácido acético por CLAE, así como furfural por espectrofotometría. En la figura 1 se muestra el diagrama de flujo del proceso.

Se parte de 50 mL de hidrolizados obtenidos en las condiciones expuestas anteriormente. Una alícuota del neutralizado se filtra a través de membranas de 0.45 mm de diámetro de poro. El filtrado se diluye y se analiza por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) (Robyt y White, 1987). Otra alícuota se usó para la determinación de compuestos fenólicos en UV a 280 nm.

Para nuestro estudio se ha utilizado una columna de intercambio iónico ION-300 con precolumna recomendada para separación de alcoholes, ácidos orgánicos y carbohidratos, capaz de resolver como picos separados el ácido acético, la glucosa, la xilosa y la arabinosa (Fallon *et al.*, 1993). Todos estos compuestos son de interés en nuestro estudio.

Se realizó un calibrado con patrones externos para poder relacionar el área de los picos con la concentración. Se comprobó que el área de pico era proporcional a la

Figura 1. Diagrama de flujo del estudio de la hidrólisis de la paja de sorgo



concentración de la muestra, que era una mezcla de varios azúcares comerciales y ácido acético.

Resultados y discusiones

La paja de sorgo se sometió a hidrólisis ácida bajo diferentes condiciones. Se estudiaron tres condiciones de ácido fosfórico (2, 4 y 6%), seis tiempos de reacción (0, 20, 40, 60, 180 y 300 min) y tres temperaturas (122, 126 y 134°C). Los azúcares investigados fueron xilosa, glucosa y arabinosa. Los productos de degradación analizados fueron ácido acético y compuestos fenólicos.

En las tablas 1, 2 y 3 se observan los rendimientos de xilosa obtenidos en las diferentes condiciones experimentales que se utilizaron en este estudio.

Tabla 1. Concentración de xilosa (g/L), obtenida en hidrólisis de paja de sorgo a 122°C

<i>Tiempo (min)</i>	2% H_3PO_4	4% H_3PO_4	6% H_3PO_4
20	1.96±1.19	2.86±0.19	4.73±0.37
40	2.06±1.81	6.94±0.05	4.60±0.28
60	2.56±0.05	7.06±0.28	7.08±0.26
180	10.08±2.93	11.40±2.33	14.72±0.25
300	9.24±0.26	14.02±0.44	14.43±0.71

Tabla 2. Concentración de xilosa (g/L), obtenida en hidrólisis de paja de sorgo a 126°C

<i>Tiempo (min)</i>	2% H_3PO_4	4% H_3PO_4	6% H_3PO_4
20	1.97±0.48	4.15±0.60	6.86±0.85
40	2.86±0.06	7.48±0.36	11.49±0.10
60	2.57±0.43	7.57±1.83	11.59±1.55
180	11.90±2.23	12.70±2.44	15.70±1.01
300	12.34±0.94	14.42±1.16	15.00±0.49

Tabla 3. Concentración de xilosa (g/L), obtenida en hidrólisis de paja de sorgo a 134°C

<i>Tiempo (min)</i>	2% H_3PO_4	4% H_3PO_4	6% H_3PO_4
20	1.30±0.23	4.41±0.47	5.20±0.12
40	1.53±0.04	4.51±0.24	5.58±0.33
60	3.69±0.45	5.33±0.29	6.63±0.33
180	3.92±0.49	5.00±0.51	5.21±0.42
300	3.64±0.33	4.42±0.65	4.42±0.08

Los resultados obtenidos muestran que la paja de sorgo es una buena materia prima para la obtención de xilosa, que a su vez puede ser utilizada en la formulación de medios de cultivo para el crecimiento microbiano con el fin de obtener xilitol, un edulcorante de gran interés industrial.

Las concentraciones de ácido acético y furfural obtenidas en esta investigación se muestran en las tablas 4, 5, 6, 7, 8 y 9 respectivamente. Determinadas en las condiciones de operación conducentes a máximos de concentración de xilosa, están por debajo de los máximos permitidos experimentalmente para el crecimiento microbiano estudiados en todos los casos, por lo que las disoluciones de azúcares obtenidas por la hidrólisis ácida pueden ser utilizables como fuentes de carbono para procesos fermentativos (Parajó *et al.*, 1994, 1993, 1995c, d; Shah *et al.*, 1984; Clausen y Gaddy, 1982).

Tabla 4. Concentración de ácido acético (g/L), obtenido en hidrólisis de paja de sorgo a 122°C

<i>Tiempo (min)</i>	2% H_3PO_4	4% H_3PO_4	6% H_3PO_4
20	0.005±0.005	0.33±0.4	0.70±0.46
40	0.052±0.06	0.34±0.01	0.75±0.03
60	0.24±0.04	0.69±0.02	0.76±0.12
180	1.04±0.22	1.21±0.21	1.69±0.17
300	0.01±0.01	0.94±0.04	0.95±0.03

Tabla 5. Concentración de ácido acético (g/L), obtenido en hidrólisis de paja de sorgo a 126°C

<i>Tiempo (min)</i>	2% H_3PO_4	4% H_3PO_4	6% H_3PO_4
20	0.04±0.06	0.39±0.14	0.86±0.14
40	0.39±0.01	0.93±0.06	1.27±0.14
60	1.45±0.44	1.03±0.17	1.38±0.10
180	1.31±0.26	1.53±0.28	2.22±0.50
300	1.43±0.21	1.80±0.31	2.06±0.40

Tabla 6. Concentración de ácido acético (g/L), obtenido en hidrólisis de paja de sorgo a 134°C

<i>Tiempo (min)</i>	<i>2% H₃PO₄</i>	<i>4% H₃PO₄</i>	<i>6% H₃PO₄</i>
20	0.15±0.09	0.96±0.55	0.51±0.46
40	0.24±0.14	0.90±0.29	1.22±0.18
60	0.39±0.04	0.87±0.62	1.10±0.69
180	0.39±0.27	0.56±0.41	0.80±0.05
300	0.49±0.28	0.38±0.50	0.57±0.08

Tabla 7. Concentración de furfural (g/L), obtenida en hidrólisis de paja de sorgo a 122°C

<i>Tiempo (min)</i>	<i>2% H₃PO₄</i>	<i>4% H₃PO₄</i>	<i>6% H₃PO₄</i>
20	0.54±0.03	0.63±0.04	0.46±0.04
40	0.59±0.06	0.67±0.01	0.80±0.15
60	0.59±0.04	0.66±0.005	0.72±0.06
180	1.15±0.42	1.23±0.19	1.59±0.06
300	0.96±0.07	1.31±0.04	1.46±0.08

Tabla 8. Concentración de furfural (g/L), obtenida en hidrólisis de paja de sorgo a 126°C

<i>Tiempo (min)</i>	<i>2% H₃PO₄</i>	<i>4% H₃PO₄</i>	<i>6% H₃PO₄</i>
20	0.60±0.06	0.68±0.05	0.63±0.02
40	0.47±0.02	0.55±0.04	0.59±0.03
60	0.59±0.06	0.67±0.05	0.77±0.01
180	0.95±0.27	1.06±0.14	1.26±0.01
300	0.84±0.06	1.33±0.17	1.52±0.01

Tabla 9. Concentración de furfural (g/L), obtenida en hidrólisis de paja de sorgo a 134°C

<i>Tiempo (min.)</i>	<i>2% H₃PO₄</i>	<i>4% H₃PO₄</i>	<i>6% H₃PO₄</i>
20	2.87±0.33	4.27±0.03	4.81±0.22
40	2.23±0.08	4.05±0.28	4.86±0.16
60	3.09±0.23	4.78±0.64	6.42±0.84
180	4.57±0.24	8.24±0.32	10.43±0.82
300	8.41±2.00	11.36±0.80	13.74±0.64

Teniendo en cuenta que los hidrolizados de paja de sorgo obtenidos con ácido fosfórico, si se quieren usar como medios de cultivo para microorganismos, se ajustan con una base para lograr el pH óptimo para el metabolismo bacteriano deseado, obteniéndose fosfatos como sales a partir de ácido fosfórico. Al ser estas sales necesarias para el desarrollo microbiano, estamos disminuyendo los costos derivados de la suplementación de los medios de cultivo con fosfatos, al no ser necesario por encontrarse en los propios hidrolizados neutralizados.

Bibliografía

- Blanch, H.W.; Wilke, C.R. (1983), "Sugars and Chemicals from cellulose", *Rev. Chem. Eng.*, 1: 72-119.
- Brennan, A.H.; Hoagland, W.; Schell, S.L. (1986), "High temperature acid hydrolysis for biomass using an engineering-scale plug flow reactor: results of low solids testing", *Biotechnol. Bioeng.*, 17: 53-70.
- Clausen, E.C.; Gaddy, J.L. (1982), "Production of ethanol from cellulosic residues by chemical/biochemical methods", *Liquid Fuel Systems*, 6: 87-103.
- Emodi, A. (1978), *Food Technology*, 32: 28-32
- Fallon, A.; Booth, R.F.G.; Bell, L.D. (1993), "Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Applications of HPLC in biochemistry", *Elsevier*, 46-64: 213-229.
- Holtzapple, M.T. (1993), *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*, R. Macrae, R.K. Robinson, M.J. Sadler (eds.), Londres, Academic Press.

- Ortíz, U.; Trueba, C. (1998), "La comercialización del sorgo en México", *Primer Simposio Internacional de Sorgo*, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.
- Parajó, J.C.; Vázquez, D.; Alonso, J.L.; Santos, V.; Domínguez, H. (1993), "Prehydrolysis of Eucaliptus wood with dilute sulphuric acid: operation at atmospheric pressure", *Holz Roh Werk*, 51: 357-363.
- _____; Vázquez, D.; Alonso, J.L.; Santos, V.; Domínguez, H. (1994), "Prehydrolysis of Eucaliptus wood with dilute sulphuric acid: operation in autoclave", *Holz Roh Werk*, 52: 102-108.
- _____; Santos, V. (1995c), "Preliminary evaluation of acetic acid-based processes for wood utilization", *Holz als Roh-und Werkst*, 53: 347-353.
- _____; Santos, V.; Del Río, F. (1995d), "Hidrólisis de la fracción hemicelulósica de la madera de pino. I. Cinética y distribución de productos en operación a presión atmosférica", *Afinidad*, LII: 162-170.
- SAGAR (2000), *Situación actual y perspectiva de la producción de sorgo en México, 1990-1999*, 9-13.
- Robyt, J.F.; White, B.J. (1987), *Biochemical Techniques. Theory and Practice*, Illinois, Waveland.
- Shah, R.B.; Clausen, E.C.; Gaddy, J.L. (1984), "Production of chemical feedstocks from biomass", *Chem. Eng. Prog.*, 1: 76-80.
- Vázquez, M. (1998), "Obtención de productos de interés alimentario a partir de materiales lignocelulósicos", tesis doctoral, Universidad de Vigo.

Uso de transgenes en el mejoramiento de la producción de alimentos

Use of Transgenes to Improve Food Production

*Bocanegra García, V.¹; Cruz Pulido, W. L.;¹ Leal Ayala, H. F.;²
Flores Gutiérrez, G. H.;¹ Rivera Sanchez, G.³*

Resumen

La tecnología de transferencia génica o ADN recombinante ha tenido un gran impacto en la modificación de organismos para mejorar la producción de alimentos o darles valor agregado, además de su valor nutricional. También se han diseñado métodos de modificación de microorganismos para la producción de aditivos y suplementos proteínicos que mejoren las propiedades nutricionales de otros alimentos.

Los métodos de ingeniería genética para la transferencia de genes utilizados varían en animales, vegetales o microorganismos. En animales y microorganismos se emplean determinadas construcciones genéticas dependiendo del efecto que se quiere tener y se introducen a la célula mediante métodos fisicoquímicos o mecánicos. En los vegetales la transferencia génica se hace mediante el uso de vectores a través de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* o de métodos mecánicos, como la biolística.

En animales se busca incrementar el ritmo de crecimiento, así como la producción de carne en mayor cantidad y calidad. En los vegetales los efectos pueden ser más variados, como resistencia a herbicidas e insecticidas, o bien, a patóge-

Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán.

¹ Departamento de Biología Molecular y Bioingeniería.

² Departamento de Bioquímica.

³ Departamento de Farmacia y Química Medicinal.

nos; maduración controlada de frutos y flores; resistencia a condiciones de estrés como salinidad, bajas temperaturas o aridez.

En cuanto a la búsqueda de un valor agregado, se buscan vegetales que puedan incorporar genes para la producción de vacunas o la producción de plásticos biodegradables. En los animales se busca que puedan producir cantidades considerables de fármacos en la leche para hacer mas barata su producción. En microorganismos se pueden obtener una gran variedad de aditivos o proteína unicelular, que sirven para mejorar la calidad nutricional de otros alimentos.

Abstract

The technology of gene transfer or recombinant DNA technology has had a great impact in the modification of organisms in order to improve the foods production, or increase their nutritional value; methods for microorganism modification have been designed also to produce additives and protein supplements to improve the nutritional properties of other type of foods.

The methods of genetic engineering for gene transfer are different depending on the organisms to be modified. In animals and microorganisms some genetic constructions are used depending on the desired effect and they are introduced in the cell through mechanic or physicochemical methods. In plants, the genetic transfer is done with vector using the bacteria *Agrobacterium tumefaciens* or mechanical methods.

The aim in animals is to increase the growing rate and meat production in quantity and quality. The effects on plants are wider, like making them herbicides, pesticides and pathogens resistant. These effects can also control the maturation of fruits and flowers, and to increase resistance to stressfull conditions like high salts concentrations, low temperatures and dryness.

In order to provide an added value to foods, the efforts are focused to generate plants with genes for vaccines production, or biodegradable plastics production. In animals the goal is the production of drugs in milk in big quantities in order to make the production cheaper. The genetic modifications of microorganisms allow obtaining a lot of food additives, or unicellular protein, which can be used to improve the nutritional quality of other foods.

Introducción

A lo largo de la historia la producción de alimentos ha sido una prioridad, ya que a medida que aumenta la tecnología y la calidad de vida, la población también ha aumentado considerablemente. Todas las sociedades tienen siempre como meta primaria garantizar el abasto de alimentos para su población.

Los animales y vegetales utilizados en la generación de alimentos han sido manipulados a lo largo de los siglos mediante cruza y selección de las razas animales y variedades vegetales que tuvieran ventajas nutricionales o de crecimiento. Sin embargo, por la misma naturaleza de los organismos, estas cruza y selección tienen limitaciones, lo que significa que la producción de alimentos sólo es eficaz si se tienen las condiciones necesarias para el crecimiento del organismo que provee determinado producto. Así, algunas regiones son adecuadas por su clima para la cosecha de algún producto vegetal en particular o para la producción de determinadas razas animales.

La ingeniería genética actualmente nos permite llevar a un extremo la cruza entre especies. Ahora es posible aislar determinados genes que le dan características deseables a un producto alimenticio o un tipo de proteína determinada (con propiedades insecticidas o nutricionales), y podemos inducir su producción en el tipo de organismos que deseamos. Cuando un gen es obtenido de una especie determinada y es insertado en otra, se le denomina *transgen*. A los organismos que contienen transgenes, se les denomina transgénicos, y pueden contener el transgen de manera temporal o de forma permanente.

Con esta tecnología, actualmente es posible manipular la calidad y cantidad de carne producida en un cerdo o en un pez; podemos obtener proteínas de interés farmacológico o industrial de origen animal en bacterias, asimismo podemos tener vegetales que producen proteínas animales, o que tienen propiedades extraordinarias en cuanto a resistencia a plagas, pesticidas o situaciones de estrés. Con la ingeniería genética se pueden realizar los experimentos de cruce y selección a un nivel extraordinario, limitado sólo por ciertas reglas básicas de genética molecular, cuyos mecanismos finos pueden variar de un organismo a otro.

Sin embargo, junto con esta posibilidad de manipulación genética, también han surgido preocupaciones sobre el efecto a mediano y largo plazo que el uso de organismos transgénicos puede provocar sobre la salud humana y sobre los ecosistemas donde estos organismos transgénicos son introducidos. En este tema se describen las principales estrategias para la introducción de transgenes en microorganismos, células eucariotas, animales completos y vegetales, así como algunos ejemplos de las aplicaciones que han tenido.

Transferencia de transgenes

Para generar un organismo transgénico se requieren diversas herramientas de la biología molecular. Sin embargo, lo que se necesita básicamente es el transgen de

interés, un vector, que es una molécula que permite introducir el transgen en la célula adecuada; una manera de detectar a las células que adquirieron el transgen, y finalmente, darle a esa célula ahora transgénica, las condiciones adecuadas para la producción del producto de interés. En todos los casos, lo que se busca es que el gen se exprese, pues la expresión produce un ARN mensajero que dicta las instrucciones a los ribosomas celulares para generar una proteína. Lo que controla la expresión de un gen es un fragmento de ADN denominado promotor.¹ En general, todos los genes están controlados por un promotor, aunque los mecanismos particulares varían de procariotes a eucariotes. Los promotores responden a estímulos químicos o físicos que la célula recibe, de modo que cuando una célula desea “encender” o “apagar” un gen, lo hace estimulando positiva o negativamente al promotor respectivo.

Mediante técnicas de ingeniería genética se pueden hacer construcciones que constan de, por lo menos, tres partes: un fragmento de ADN denominado promotor, que controla la expresión del transgen; el transgen, que es el gen que codifica para la característica que se desea transferir, y el vector, que es una molécula de ADN generalmente circular.² Siempre se busca que el transgen esté controlado por el promotor más conveniente; ambos, el promotor y el transgen, se “ensamblan” dentro de un vector, que sirve como acarreador; sin el uso de un vector es muy difícil poder introducir un transgen en cualquier tipo de organismo.

El tipo de promotor, el tipo de transgen y el tipo de vector que se deben utilizar están determinados por el organismo que se desea hacer transgénico. Si es una bacteria o una levadura, se usan determinadas técnicas; si es una célula eucariota, se usan otras técnicas, las cuales varían incluso entre células animales y células vegetales. Los mecanismos generales de cada caso se describen a continuación.

Ingeniería genética de microorganismos

Los microorganismos son útiles para la producción de proteínas modificadas o proteínas exógenas, que luego pueden ser agregadas a determinados alimentos para aumentar su valor nutritivo. Debido a que la mayor parte de las veces sus requerimientos de crecimiento así como el control y regulación de su crecimiento son sencillos, representan el sistema más económico de producción de proteínas y/o aditivos de alimentos.

Básicamente se usan dos grupos, los sistemas bacterianos y los basados en levaduras, ya que ambos son unicelulares y se comportan en forma similar. Sin embargo, las levaduras presentan ventajas operativas adicionales ya que son capa-

ces de realizar modificaciones postraduccionales sobre proteínas eucariotas, que muchas veces las bacterias no pueden completar. Cuando se le introduce material genético exógeno a un microorganismo, se dice que se ha *transformado*, es decir, ahora posee características que no tendría de manera natural. La transformación, de hecho, sucede también de forma natural, pero de formas un tanto más limitadas, en especies de microorganismos muy relacionadas y sólo bajo condiciones de presión selectiva rigurosa.

Las bacterias y levaduras tienen la ventaja de poder aceptar plásmidos.³ El plásmido es una molécula de ADN circular, generalmente mucho más pequeña que el ADN cromosomal y sólo posee unos cuantos genes. Los plásmidos primero fueron identificados en bacterias, como portadores de genes de resistencia a antibióticos o de genes codificantes para toxinas. Sin embargo, gracias a la ingeniería genética, estos plásmidos pueden obtenerse de una bacteria determinada y ser modificados para utilizarse como vectores, integrándoles el transgen de interés para ser introducidos posteriormente a otra bacteria. La bacteria ahora transformada no tiene forma de saber si el plásmido es natural o si contiene genes adicionales, así que sólo lee las instrucciones contenidas en él y las sigue, haciendo el producto del transgen, siempre y cuando se le den las condiciones apropiadas de crecimiento.

No todas las bacterias toman plásmidos, de hecho sólo unas pocas tienen la capacidad de hacerlo y únicamente bajo condiciones muy específicas. Cuando una bacteria puede tomar un plásmido, se dice que es *competente*. Por tanto, después de tener la construcción genética determinada en un plásmido, el siguiente paso es hacer que la célula que se quiere transformar sea competente. La competencia se logra dando tratamientos fisicoquímicos a las células, como por ejemplo, sometimiento a algunas sales de calcio, aunque no se conocen las causas por las que el tratamiento con estas sales, como el cloruro o fosfato, predispone a las células a tomar ADN extraño. Por sus resultados positivos, la bacteria *E. coli* es la que más se utiliza en este tipo de experimentos. Después de ser tratadas con sales de calcio y con choque de calor, como puede ser una exposición a 42°C por 90 segundos, las moléculas del vector están preparadas para entrar en la célula.

Otro método es el llamado electroporación,⁴ que consiste en someter por medio de descargas eléctricas breves a las células que se quiere transformar, lo cual, al parecer, forma poros en la célula, lo que permite que se incorporen moléculas del vector. Después se les da un tratamiento en un medio de cultivo para que reparen sus membranas y se les pone en un medio selectivo, que únicamente permita el crecimiento de las bacterias que tomaron el vector; en la mayoría de los casos, el vector que lleva el gen de interés también posee un gen de resistencia a un antibiótico determinado.

Una vez introducido el plásmido o vector a la célula, ésta multiplica el vector dentro de ella, fenómeno que sucede con los llamados vectores de clonación. Si este vector tiene las instrucciones adecuadas, entonces empieza a producir la proteína de interés. A este tipo de vectores se les denomina vectores de expresión. La condición necesaria es que el transgen de interés tenga incorporado un promotor que puede ser reconocido por el sistema de la bacteria. El promotor es un fragmento de ADN que dirige la expresión del gen de interés, como ya se mencionó. Muchas veces es necesario inducir la producción de la proteína de interés debido a que el promotor debe recibir una señal que le indique que el gen debe encenderse. Para lograrlo, se agregan determinados metabolitos al medio, ya que cada promotor responde a un tipo específico de metabolito.

En las levaduras se siguen procedimientos similares, pero para lograr que una levadura sea competente por tratamiento químico se usa el cloruro de litio.⁵ Las levaduras son transformadas posteriormente por electroporación. Una vez transformada una levadura también debe ser seleccionada para identificar las que adquirieron el vector de las que no lo hicieron. En este caso sí hay diferencias, ya que los sistemas de selección de levaduras se basan en mutaciones para alguna característica. Es decir, la levadura sin transformar tendrá una mutación que no le permitirá sintetizar un aminoácido o la hará sensible a determinados antibióticos. El vector, además de tener el gen de interés, deberá contar con el gen que le permita a la levadura solucionar este problema.

Los vectores utilizados en levaduras son también más complejos que los de bacterias. A veces se usan plásmidos propios de levaduras o vectores combinados, es decir, que contienen partes de vectores de levaduras y partes de vectores de bacterias.⁶ Al igual que en las bacterias, los vectores de levaduras deben contener los promotores adecuados en las posiciones adecuadas para que se pueda expresar el gen de interés. También, al igual que en las bacterias, el promotor debe ser inducido por algún metabolito en particular.

Como ya se mencionó, las levaduras comparten con las bacterias la ventaja de ser sistemas biológicos fáciles de cultivar y mantener, pero además, tienen la ventaja adicional de poder realizar modificaciones postraduccionales a las proteínas expresadas, como acetilaciones *N*-terminales, *N*-glicosilaciones, fosforilaciones, eliminaciones de la metionina inicial en la proteína madura, secreción y unión y ensamblaje de macromoléculas, aunque en estos tres últimos procesos la eficiencia a veces es limitada. Los sistemas más utilizados son los basados en *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Pichia pastoris*. La aplicación de todas ellas se ha relacionado con la producción de fármacos, pero son muy promisorias para la producción de proteínas de interés en las ciencias relacionadas con los alimentos.⁷

Ingeniería genética celular en mamíferos

Las células eucariotas de mamíferos presentan diferencias considerables en cuanto a requerimientos y condiciones de crecimiento respecto a las levaduras, que también son eucariotas. Sin embargo, presentan la ventaja de que pueden completar no sólo las modificaciones postraduccionales sino también el transporte intracelular de forma correcta, algo que se dificulta en las levaduras. La transferencia de genes en células de mamífero persigue varios objetivos: que el transgen llegue al mayor número posible de células y que éste sea expresado exclusiva y eficientemente en un determinado grupo de ellas.

Respecto a los vectores, se requiere que éstos sean más complejos que los plásmidos para que se consiga una expresión estable y adecuada. En algunos casos puede introducirse el ADN desnudo, es decir, sin estar incorporado en ningún tipo de vector, pero este ADN desnudo sólo sería funcional por unas horas. Los vectores utilizados en células de mamíferos son los derivados de virus como el SV40, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, derivados del herpes, de la vacuna y cromosomas artificiales. El uso de un determinado tipo de vector dependerá del tipo de línea celular que se quiere transformar, así como del grado y amplitud de la expresión del transgen que se quiere lograr.^{8,9,10}

Cuando se introduce un vector en una célula eucariota, no se dice que se transforma, como en el caso de las bacterias y levaduras, ya que el término *transformar* se usa para denominar la conversión de una celular normal en una célula cancerosa. Debido a esto, cuando se introduce un vector en una célula eucariota se dice que se transfecta, si se usan ADNs desnudos o ADN basado en un plásmido procarionte o mixto; y que se transducen, si el medio de introducción del ADN se logra mediante la acción de un virus. A diferencia de las bacterias, a las células eucariotas no es necesario hacerlas "competentes", sólo se les deben dar las condiciones adecuadas para que tomen al vector. Estas condiciones pueden obtenerse mediante la combinación del vector con sustancias liposolubles para que le permitan atravesar la membrana plasmática;¹¹ someter la célula a electroporación; incorporar el ADN en liposomas^{12,13} (que son vesículas artificiales de lípidos catiónicos y le permiten atravesar la membrana) o bien mediante microinyección.¹⁴ En todos los casos el objetivo es el mismo: la introducción del transgen a la célula. Cuando se usan virus, las condiciones varían dependiendo del tipo de virus, del tipo de célula y si el experimento es hecho *in vivo* o *in vitro*.¹⁵

Para la selección de las células que adquirieron efectivamente al vector, ya sea plasmídico o viral, existen dos métodos. El método de selección propiamente dicho, como por ejemplo, dotar a la célula de la resistencia ante algún antibiótico, o bien,

métodos de señalamiento o reporteros,¹⁶ donde la célula que sí ha adquirido el transgen emite algún tipo de señal detectable que permite identificar el número de células transfectadas o transducidas.¹⁷

Finalmente, ya que se ha introducido el transgen, hay que darle al sistema las condiciones adecuadas para que lo exprese; esto varía dependiendo de si se trata de un cultivo celular o un organismo completo. Ambas estrategias han sido usadas, sin embargo, producir una proteína en un sistema eucariota es costoso, debido a que los medios de cultivo con complejos son caros y delicados, asimismo las condiciones de cultivo y mantenimiento de los cultivos,¹⁸ por lo que su aplicación ha sido limitada.

Debido a eso se exploró la posibilidad de que un organismo completo produjera la proteína de interés, como por ejemplo, un ratón o una oveja. Para lograr esto se microinyecta el ADN desnudo o en algún tipo de vector específico. El transgen se puede microinyectar en células germinales o en células embrionarias, y mediante el uso de un promotor específico, se dirige la expresión del transgen sólo a determinados tejidos.¹⁹ A diferencia de lo que pasa con los promotores procariotes, que responden a metabolitos, los promotores eucariotes responden a proteínas llamadas factores transcripcionales,²⁰ algunos de los cuales son específicos de grupos celulares determinados.

Esta situación se aprovecha para dirigir la expresión del transgen, por ejemplo, si se desea que el transgen se exprese en tejido mamario, se usan promotores que sólo se activen en tejido mamario, de este modo, aunque el transgen esté presente en todos los tejidos, sólo se expresará en el tejido mamario, y por tanto el producto se excretará en la leche.^{21,22} En estos casos se busca, por ejemplo, la producción de una hormona o alguna proteína que mejore las propiedades comerciales del animal, o bien, que determinado animal, como una oveja o una vaca, produzca la proteína de interés en la leche para luego purificarla mejorando el costo de producción, ya que sólo se requeriría mantener al animal, puesto que éste sería el biorreactor.²³

Las aplicaciones de los animales transgénicos han sido variadas. El primer experimento exitoso fue realizado en ratones a los que se les introdujo el gen de la hormona del crecimiento. En los ratones transformados el nivel de hormona del crecimiento llegó a ser 800 veces mayor que los niveles normales y el tamaño de los ratones aumentó hasta el doble en comparación con los ratones no transgénicos.²⁴ Se quiso repetir la experiencia en cerdos, pero en este caso no se obtuvieron los mismos resultados con respecto al aumento de tamaño; sin embargo la calidad de los jamones fue muy buena, al presentar poca grasa y mucho magro, pero los cerdos transgénicos empezaron a desarrollar diabetes, esterilidad y otras patologías. En salmones, una estrategia similar ha permitido obtener ejemplares entre 2 y 10 veces más grandes

que los salmones no transgénicos. En estos casos, el promotor utilizado no era tejido específico, sino un llamado promotor fuerte, que es un promotor que permite la expresión del gen en todo momento, generando una expresión constitutiva, es decir, no dependiente de factores transcripcionales específicos.²⁵

Ingeniería genética de vegetales

Los vegetales tienen un gran potencial para aplicaciones de ingeniería genética, como pueden ser la mejora en la producción de frutos y semillas o bien, la creación de nuevas variedades de flores y plantas ornamentales. En el sentido práctico, la aplicación de la ingeniería genética en vegetales ha sido la más útil, ya que ha permitido obtener resultados comerciales importantes. La manipulación genética se facilita ya que una sola célula vegetal permite generar una planta completa. Las plantas pueden expresar transgenes de mamíferos y actuar como biorreactores, aunque en algunos casos, por características propias de la genética molecular del vegetal, no son funcionales.

Para la transformación de vegetales se usan tres métodos. Uno es la introducción del vector con el transgen, mediante una bacteria llamada *Agrobacterium tumefaciens*. La otra forma es introduciendo el vector mecánicamente, disparando con una pistola, técnica denominada biolística. Un tercer método es utilizando virus de vegetales como vectores.

La estrategia basada en *Agrobacterium* tiene la ventaja de ser un método natural: la *Agrobacterium* tiene una relación simbiótica con muchos vegetales. Esta bacteria tiene un plásmido llamado plásmido Ti. Cuando *Agrobacterium tumefaciens* infecta a un vegetal, le introduce a sus células el plásmido Ti, es decir, las transforma de manera natural. El plásmido Ti puede ser extraído del *Agrobacterium tumefaciens*, ser modificado por ingeniería genética para eliminar los genes patógenos que contiene, e introducirle el transgen de interés para ser reintroducido en la *Agrobacterium tumefaciens*. Si las alteraciones se hacen correctamente la bacteria no tiene forma de saber que el plásmido Ti ahora está modificado. El plásmido modificado debe contener el transgen, dirigido por un promotor adecuado, y un gen de selección que permita luego reconocer qué células vegetales han tomado el transgen y cuáles no.²⁶

El sistema es muy eficaz y el vector Ti es de uso común para introducir los transgenes a los vegetales, sin embargo, el sistema sólo funciona con las dicotiledóneas, como las legumbres, y ha tenido éxito limitado en las monocotiledóneas, que son los vegetales de mayor interés agrícola, como arroz, trigo y maíz.

El método de biolística es relativamente sencillo. El vector o ADN de interés se combina con partículas microscópicas de oro o tungsteno y éstas se disparan a grandes velocidad hacia la célula vegetal. El metal atraviesa la pared celular y deposita el ADN en el interior de la célula, donde luego es procesado de acuerdo al tipo de construcción genética que corresponda y produce, en su caso, el producto de interés, una proteína determinada, o un enzima.²⁷ Una gran variedad de tejidos vegetales se han bombardeado exitosamente: soya, chícharo, cacahuete, papa, arroz y algodón. En algunos casos el bombardeo de partículas se usa para generar heridas microscópicas en el vegetal que luego hacen más eficiente la infección por *Agrobacterium* y la posterior inserción del plásmido Ti modificado.

En cuanto al uso de virus, éste tiene muchas ventajas, ya que son muy eficientes en su multiplicación, generando un gran número de copias del transgen y expresándolo adecuadamente; también se extienden por toda la planta, e incluso, a otras plantas y otras especies. Casi todos los virus vegetales tienen genoma de ARN. Entre los virus que se utilizan están caulimovirus, geminivirus, begomovirus, mastrevirus, curtovirus y el virus del mosaico del tabaco.²⁸ Desafortunadamente, a pesar a todas estas ventajas, los virus no han podido ser manipulados para poder convertirlos en el vector ideal, pues sus aplicaciones han sido limitadas.

Aplicaciones de los transgenes en vegetales

Bioinsecticidas

Uno de los principales problemas en el cultivo de vegetales de interés agrícola es el constante daño por plagas, especialmente gusanos e insectos, aunque también hay daños por bacterias, virus y hongos. Una de las primeras estrategias de uso de transgenes aplicadas fue dirigida precisamente al control de insectos.

La bacteria *Bacillus thuringiensis* produce una toxina que daña únicamente al sistema digestivo de los gusanos. Esta toxina es de naturaleza proteínica, de modo que su producción depende de un gen. Este gen fue aislado y luego introducido en el plásmido Ti; a su vez, el plásmido fue introducido a *Agrobacterium*, con la que se infectaron vegetales. Los experimentos se desarrollaron inicialmente con plantas de tabaco, y luego de algodón y maíz; en ambos casos la transferencia del transgen fue exitosa. Los vegetales produjeron la toxina contra el gusano en todos sus tejidos, y con esto, cuando la plaga llegaba, prácticamente se envenenaba sola al comenzar a ingerir las hojas de las plantas transgénicas.

Los transgenes ya se han comenzado a emplear con este objetivo en papas, tomate, cacahuete y caña de azúcar, entre otras especies. Entre las ventajas de este sistema podemos mencionar que protege a la planta contra la plaga como se describió, pero también permite disminuir el uso de pesticidas, además de que la protección no depende de las condiciones climáticas, un factor que afecta la eficiencia de los pesticidas. En general permite bajar los costos de producción y brinda una mejor protección al medio ambiente.^{29,30}

Maduración controlada

En ciertos vegetales el periodo de maduración desde que la fruta está lista para cortarse hasta la llegada a los mercados, su distribución y su vida en anaquel, representa un problema, ya que hay que enfrentar la pérdida de producto por maduración. Debido a esto se ha buscado la manera de poder generar vegetales transgénicos en los cuales se pueda controlar hasta cierto grado el nivel de maduración. Actualmente, se sabe que el principal mediador de la maduración es el etileno, que funciona como hormona vegetal. Uno de los genes que se activa durante el proceso de maduración y está relacionado con la producción de etileno es el del enzima aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (ACCS). Las estrategias para bloquear la función de este enzima consisten en generar un transgen que produce ARN antisentido, el cual bloquea el ARN mensajero que produce el enzima; de este modo disminuyen las cantidades de ACCS y por tanto, de etileno producido.³¹ Otra estrategia consiste en introducir el transgen bacteriano de la ACCS deaminasa, que degrada el aminociclopropano-1-carboxilato, sustrato de la ACCS. En ambos casos, el efecto neto es reducir la cantidad de etileno generado y por tanto, reducir el grado de maduración del producto del vegetal. Esta estrategia ha sido utilizada extensamente en tomates. Los tomates transgénicos se recogen del vegetal en el momento deseado, son transportados y se someten a tratamientos externos con etileno para favorecer la maduración cuando se requiere.

Resistencia a herbicidas

Otro de los problemas fundamentales en la agricultura consiste en mantener el crecimiento adecuado del vegetal de interés manteniéndolo libre del crecimiento de plantas parásitas o malas hierbas. El uso de herbicidas es una opción, pero en general los

herbicidas no distinguen a un vegetal de interés agrícola de una mala hierba, sino que matan a ambos. Una opción es usar herbicidas específicos para una determinada familia de vegetales que incluya las malas hierbas, pero esto es costoso y generalmente el herbicida genera problemas adicionales de persistencia en los vegetales de interés.

El glifosato y el fosfinotricin, bajo los nombres comerciales de *Round up* y *Basta* respectivamente, son herbicidas de amplio espectro. En este caso, la estrategia consistió en que las plantas de interés agrícola tuvieran transgenes que les dieran resistencia a estos herbicidas; en el caso del glifosato, éste actúa inhibiendo la síntesis del ácido corísmico y aminoácidos aromáticos, inhibiendo competitivamente a la enolpiruvato shiquimato 3 fosfato sintetasa (EPSP). Para hacer vegetales transgénicos resistentes al glifosato se les introdujo un transgen que generaba un enzima EPSP con baja afinidad al glifosato, obtenido de la bacteria *Salmonella typhimurium*, por lo que no se vería completamente afectada por éste.³² Dicha estrategia ha funcionado en soya y tabaco.

El fosfinotricin, por otro lado, actúa como inhibidor de la glutamina sintasa, lo que provoca una acumulación letal de amonio en el vegetal. La estrategia para hacer resistente al vegetal fue introducir un transgen obtenido del *Streptomyces hygrosopicus*, que genera una fosfinotricin acetil transferasa que acetila e inactiva al fosfinotricin. Esta estrategia ha sido exitosa en trigo. La ventaja de cultivar vegetales resistentes a estos herbicidas es que se pueden utilizar los productos generales para eliminar malas hierbas y no es necesario usar herbicidas especializados, lo cual reduce costos, además de que los herbicidas de amplio espectro son más susceptibles a la biodegradación.³³

Resistencia a estrés

Los principales fenómenos de estrés a los que un vegetal está sometido son: salinidad, bajas o altas temperaturas, e inundaciones y sequías. Muchos vegetales tienen mecanismos que les permiten soportar algunos de estos cambios, pero como todos los demás organismos, sólo están adaptados para resistir un tipo determinado de estrés, por ejemplo, hay vegetales especialmente resistentes a condiciones salinas, como las espinacas, o a condiciones de inundación, como el arroz; pero no hay vegetales que sean resistentes a todos los casos. Esto limita en parte la producción de determinado producto agrícola en una región específica, porque se requiere un clima adecuado para su desarrollo óptimo.

Se han explorado diversas opciones de generación de transgénicos con capacidades de resistencia o adaptabilidad a varias condiciones de estrés al mismo tiempo. El primer caso se relaciona con los cambios de salinidad, lo que genera estrés osmótico en los tejidos vegetales. Se ha observado que la acumulación de glicina-betaína protege al vegetal con cambios osmóticos y le permite resistir cambios de salinidad o deshidrataciones en el suelo. El transgen *betA*, que codifica para la colina deshidrogenada en la *E coli*, cataliza la conversión de colina en glicina betaína. Otro transgen es el de la colina oxidasa de *Arthrobacter globiformis*, que cataliza los pasos de conversión de la colina a glicina betaína. La estrategia de inserción de estos transgenes ha sido exitosa en plantas de *Arabidopsis*, un organismo modelo de experimentación en vegetales, haciéndola resistente a heladas y salinidad. Para dar resistencia adicional a heladas, se han usado genes de enzimas que cambian los enlaces *cis* en los ácidos grasos de las membranas, lo que permite una mayor adaptabilidad a bajas temperaturas.

Se han explorado genes como los que codifican para superóxido dismutasas, peroxidasas y catalasas, para tratar de generar una resistencia adicional al estrés oxidativo. Además, al igual que en los ejemplos anteriores, se ha realizado un gran esfuerzo para lograr obtener promotores que controlen la acción de estos genes, de modo que sus productos se generen única y exclusivamente cuando sean necesarios con el fin de evitar una expresión constante, la cual, en un determinado momento, podría dañar al vegetal o producir efectos indeseados.³⁴

Vegetales con valor agregado

Se ha considerado a los vegetales como biorreactores potenciales para la producción de productos diversos, como proteínas de interés terapéutico para humanos o la generación de plásticos biodegradables. Uno de los objetivos es lograr generar vegetales que expresen proteínas útiles como vacunas contra determinadas enfermedades como el cólera, por ejemplo, y cuyo consumo nos brinde protección.³⁵ Un objetivo ya no tan ambicioso es, en todo caso, generar vegetales que produzcan anticuerpos necesarios para determinadas terapias en humanos a gran escala, lo que bajaría los costos de producción considerablemente, con el consecuente impacto directo sobre salud pública, en particular, respecto a los tratamientos costosos y/o escasos, pues los haría más disponibles para la población en general.

Desde el punto de vista industrial, siempre ha sido atractiva la idea de producir plásticos biodegradables a partir de fuentes naturales. El polihidroxibutirato es un

ejemplo de este tipo de plásticos. Es generado por la acción de tres enzimas denominados PhbA, PhbB y PhbC, y aunque hacer que tres transgenes funcionen correctamente de manera concertada en un vegetal es complejo, ya se han logrado obtener plantas de *Arabidopsis*, capaces de sintetizar el polímero.³⁶ Con todo esto, ahora podríamos contar con vegetales potencialmente útiles para generar productos de naturaleza industrial, lo que permitiría aumentar el valor comercial de éstos.

Consideraciones ecológicas y éticas

En el consumidor común existe la preocupación constante acerca de la seguridad en el consumo de organismos transgénicos, especialmente los que son utilizados directamente como alimentos o si alguno de sus productos sirve como alimento. Sin embargo, los científicos concuerdan en tres aspectos que, si no son completamente preocupantes, sí requieren de un estudio minucioso.

El primer aspecto es saber si la introducción de un organismo modificado, por ejemplo un vegetal transgénico, en un ecosistema puede alterar el equilibrio ecológico de las diferentes especies que ahí conviven, debido a que las especies no sólo reaccionan al ambiente para adaptarse, sino que, en menor o mayor grado también reaccionan a los cambios relacionados con las otras especies, es decir, el factor condicionante de adaptación depende del ambiente y de las otras especies del entorno.³⁷ Considerando la complejidad de las relaciones ecológicas, es extraordinariamente difícil predecir el impacto a largo plazo que tendrá la introducción de especies transgénicas en el ambiente. Algunos investigadores consideran esto como algo realmente preocupante, mientras que otros sólo aconsejan cautela. Debido a la naturaleza de este problema no es posible obtener evidencias que nos indiquen la inocuidad o peligrosidad de la introducción de especies transgénicas en los ecosistemas a corto plazo.³⁸

Otro aspecto preocupante es la posible transferencia de genes entre las especies transgénicas y las no transgénicas una vez que están en el ambiente. Aunque se sabe que hay mecanismos que previenen una transferencia indiscriminada de genes entre especies, hay aspectos, como el flujo de infecciones virales o de otras plagas, que pudieran potenciar este fenómeno. Existen dos tipos de consecuencias posibles: una es la transferencia de genes de especies transgénicas a especies iguales pero no transgénicas, como puede ser al sembrar maíz transgénico derivado de maíz no transgénico, lo que provoca que por cruce genético se pierdan las variedades naturales. Los científicos concuerdan con que sólo hay que tener cuidado de cultivar ambos tipos de vegetales en lugares separados o evitar sembrarlos en regiones ricas en variedades naturales, para evitar este riesgo.

La otra posibilidad es que la resistencia a herbicidas pueda transferirse a las malas hierbas, generando una especie de "super hierbas", lo que nos obligaría a utilizar herbicidas más tóxicos y más especializados. O bien, que los insectos desarrollen sistemas capaces de resistir las toxinas transgénicas de vegetales de interés agrícola, generando plagas cada vez más resistentes y mucho más difíciles de controlar.³⁹

Una última preocupación es la que siempre está presente cuando una serie de tecnologías nuevas ofrecen mejores alternativas: ¿y si de pronto detectamos un defecto que nos impida utilizar los organismos transgénicos? Aunque no hay evidencias que indiquen un riesgo de este tipo, siempre es una preocupación latente, por lo que se aconseja cautela antes de condicionar completamente la producción de alimentos al uso de organismos transgénicos.

En cuanto al conocimiento de los alimentos modificados genéticamente por los consumidores mediante su indicación en las etiquetas, las empresas están conscientes de que los alimentos transgénicos generan desconfianza, así que se resisten a poner indicaciones en las etiquetas que adviertan de la presencia de transgénicos por temor a una baja en las ventas. Esta controversia sólo puede ser arreglada mediante una regularización que, tomando en cuenta tanto los intereses del consumidor como los de las empresas, especifique detalladamente cómo y en qué hay que indicar la presencia de un producto transgénico.

Finalmente, desde el punto de vista de la seguridad para los humanos, existen tres preocupaciones: el efecto de consumir transgenes, la posibilidad de que éstos provoquen alergias y el efecto de consumir genes con resistencia a antibióticos en los productos transgénicos. La preocupación de que la ingestión de los transgenes en dichos productos genere algún tipo de anomalía no ha tenido sustento, ya que se ha demostrado por diversos métodos que el consumo de ADN transgénico no es diferente al consumo de ADN normal, el cual se ingiere cotidianamente en los alimentos.⁴⁰ Respecto a las alergias, sí es un problema real, pero no es exclusivo de los productos transgénicos, sino que cualquier alimento en un momento dado puede provocar reacciones alérgicas. En este caso es importante que determinado producto transgénico se someta a las pruebas correspondientes y se indique claramente el riesgo que existe en las etiquetas de los productos finales.⁴¹ Por último, respecto a los genes de selección que necesariamente se deben utilizar para poder generar al transgénico, tampoco se ha demostrado que éstos representen un peligro; incluso hay metodologías para eliminarlos de los productos finales.⁴²

Con todo esto, de acuerdo con los datos obtenidos hasta el momento, no hay evidencias que sugieran que los productos transgénicos usados como alimentos representen un riesgo especial.

Perspectivas

La demanda hacia la producción de alimentos sigue en aumento, las tecnologías agrícolas actuales están bajo una presión considerable para satisfacerla. El uso de transgenes en microorganismos, animales o vegetales, ofrece una posibilidad de aumentar considerablemente el rendimiento de las operaciones, e incluso, bajar los costos en muchos casos. Actualmente, vegetales resistentes a herbicidas, a insectos, con modificaciones que permiten la maduración controlada, están siendo ya cultivados en varios países y sus productos son comercializados. Por tanto, es importante establecer normatividades integrales que tomen en cuenta todos los intereses sobre la investigación, cultivo, uso y comercialización de los productos con transgenes con el fin de aumentar los rangos de seguridad en cuanto a ecosistemas, producción y consumidores finales.

Bibliografía

1. Maniatis, T.; Goodbourn S. y FIscher J.A. (1987), "Regulation of inducible and tissue-specific gene expression", *Science*, 236: 1237-1245.
2. Lobban, P. y Kaiser A.D. (1973), "Enzymatic end to end joining of DNA molecules", *J. Mol. Biol.*, 79: 453-471.
3. Cohen, S., Chang, A., Boyer, H. y Helling, R. (1973), "Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EU, 70: 3240-3244.
4. Shigekawa, K., y Doler, W.J. (1988), "Electroporation of eucariotes and procariotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells", *Biotechniques*, 6: 742-751.
5. Hinnen, A., Hicks, J.B. y Fink, G.R. (1978), "Transformation of yeast", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EU, 75: 1929-1923.
6. Beggs, J.D. (1978), "Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid", *Nature*, 275: 104-109.
7. Buckholz, R.G., y Gleeson M.A.G. (1991), "Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins", *Biotechnology*, 9: 1067-1072.
8. Gluzman, Y. (1981), "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants", *Cell*, 23: 175-182.
9. Berkner, K.L. (1988), "Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes", *BioTechniques*, 6: 616-629.

10. Eglitis, M.A., y W.F. Anderson (1988), "Retroviral vectors for introduction of genes into mammalian cells", *BioTechniques*, 6: 608-614.
11. Felger, P.L.; Gadek, T.R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H.W.; Wenz, M.; Northrop, J.P.; Ringold, G.M. y Danielson, M. (1987), "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EU, 84: 7413-7417.
12. Mannino, R.J. y Gould-Fogerite, S. (1988), "Liposome mediated gene transfer", *Biotechniques*, 6: 682-690.
13. Lasic, D.D. (1998), "Novel applications of liposomes", *Trends in Biotechnology*. 16: 307-321.
14. Capecchi, M. (1980), "High efficiency transformation by direct microinjection into cultured mammalian cells", *Cell*, 22: 479-488.
15. Moss, B.; Elroy-Stein, O.; Mizukami, T.; Alexander, W.A. y Fuerst, T.R. (1990), "New mammalian expression vectors", *Nature*, 348: 91-92.
16. Welsh, S. y Kay, S.A. (1997), "Reporter gene expression for monitoring gene transfer", *Current opinion in Biotechnology*, 8: 617-622.
17. Gossler A.; Joyner, A.L.; Rossant, J.; y Skarnes, W.C. (1989), "Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes", *Science*, 244: 463-465.
18. Wigler, M., Sweet, R.; Sim, G.K.; Wold, B.; Pelliccer, A.; Lacy, E.; Maniatis, T.; Silvertein, S. y Axel, R. (1979), "Transformation of mammalian cells with genes from procariotes and eucariotes", *Cell*, 16: 777-785.
19. Hammer, R.E.; Pursel, V.G.; Rexroad, C.E.; Wall, R.J.; Bolt, D.J.; Ebert, K.M.; Palmiter, R.D. y Brinster, R.L. (1985), "Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection", *Nature*, 315: 680-683.
20. Ptashne, M. (1988), "How eukaryotic transcriptional activator work", *Nature*, 335: 683-689.
21. Pittius, C.W.; Hennighausen, L.; Lee, E.; Wesphal, H.; Nicols, E.; Vitale, J. y Gordon, K. (1988), "A milk protein gene promoter directs the expression of human tissue plasminogen activator cDNA to the mammary gland in transgenic mice", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EU, 85: 5874-5887.
22. Wright, G., Carver, A.; Cottom, D.; Reeves, D.; Scott, A.; Simons, P.; Wilmut, I.; Garner, I. y Colman, A. (1991), "High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep", *Bio / Tech.*, 9: 830-834.
23. Henninghausen, L.; Ruiz L. y Wall, R. (1990), "Transgenic animals-production of foreign proteins in milk", *Curr. Opin. Biotech.*, 1: 7478.
24. Palmiter, R.D.; Brinster, R.L.; Hammer, R.E.; Trumbauer, M.E.; Rosenfeld, M. G.; Birnberg, N.C. y Evans, R.M. (s.f.), "Dramatic growth of mice that develop

- from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes”, *Nature*, 300: 611-615.
25. Devlin., R.; Yesaki, T.Y.; Biagi., C.A.; Donaldson, E.M.; Swanson, P. y Chan, W.K. (1994), “Extraordinary salmon growth”, *Nature*, 371: 209-210.
 26. Zambryski, P.; Tempe, J. y Schell, J. (1989), “Transfer and function de T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants”, *Cell*, 56: 193-201.
 27. Klein, T.M.; Wolff, E.D.; Wu, R. y Sanford, J.C. (1987), “High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells”, *Nature*, 327: 70-73.
 28. Hayes, R.J.; Petty, I.T.D.; Coutts, R.H.A. y Buck, K.W. (1988), “Gene amplification and expression in plants by a replicating geminivirus vector”, *Nature*, 334: 179-182.
 29. Estruch, J.J. (s.f.), “Transgenic plants: an emerging approach to pest control”, *Nature Biotechnology*, 15: 137-141.
 30. Hilder, V.A.; Gatehouse, A.M.R.; Sheerman, S.E.; Barker, R.F. y Bouter, D. (1987), “A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco”, *Nature*, 330: 160-163.
 31. Seller, P.W.; Min-Wong, L.; Taylor, L.P.; Pike D.A. y Theologis, A. (1991), “Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA”, *Science*, 254: 437-439.
 32. Comai, L.; Facciotti, D.; Hiatt, W.R.; Thompson, G.; Rose, R.E. y Stalker, D.M. (1985), “Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate”, *Nature*, 317: 741-744.
 33. Oxtoby, E. y Hughes, M.A. (1990), “Engineering herbicide tolerance into crops”, *Trends biotech.*, 8: 61-65.
 34. Holmberg, N., Bülw, L. (1998), “Improving stress tolerance in plants by gene transfer”, *Trends in plant science*, 3: 61-66.
 35. Hiatt, A.; Cafferkey, R. y Bosdish, K. (1989), “Production of antibodies in transgenic plants”, *Nature*, 342: 76-78.
 36. Poirier, Y.; Nawrath, C. y Somerville, C. (1995), “Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants”, *Biotechnology*, 13: 142-150.
 37. Wolfenbarger L.L. y Phifer. P.R. (2000), “The Ecological Risks and Benefits of Genetically Engineered Plants”, *Science*, 290: 2088-2093.
 38. Crawley M.J. y Chails R.S. (2001), “Transgenic Crops in Natural Habitats”, *Nature*, 409: 682-683.
 39. Brown, K. (2001), “Seeds of Concern”, *Scientific American*, 4: 52-57.

40. Hohlweg, U. y Doeffler, W. (2001), "On the fate of plant or other foreign genes upon the uptake in food or after intramuscular injection in mice", *Mol. Genet. Genomics.*, 265: 225-233.
41. Taylor, S.L. (s.f.), "Food from genetically modified organism and potential for food allergy", *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 4: 121-126.
42. Palmeros, B.; Wild, J.; Szybalski, W.; Le Borgne, S.; Hernández, Ch. G.; Gosset, G.; Valle, F. y Bolivar, F. (2000), "A family of removable cassettes designed to obtain antibiotic-resistance-free genomic modifications of *E. coli* and other bacteria", *Gene*, 247: 255-264.

Producción de biosurfactantes a partir de residuos agrícolas

Biosurfactants Production from Agricultural Residues

Moldes, A.B.^{1,2}

Resumen

Gran cantidad de sustratos fermentables se generan como residuos agrícolas o alimentarios a través del procesado de alimentos. Dependiendo de su origen, estos sustratos podrían ser susceptibles de utilizarse directamente o tras tratamientos químicos como fuentes de carbono para la producción biotecnológica de biosurfactantes. Los biosurfactantes son sustancias surfactantes obtenidas de forma extracelular o a partir de la membrana de bacterias, levaduras u hongos. Se han encontrado diversos microorganismos a través de los cuales se pueden obtener biosurfactantes. Varias cepas de *Lactobacillus* pueden producir un tipo de biosurfactantes denominados colectivamente *surlactin*, los cuales se caracterizan por su capacidad para reducir la tensión superficial de los líquidos y por su habilidad para inhibir la adhesión de ciertos *Enterococcus* y otras bacterias patógenas en determinadas superficies. Otros ejemplos incluyen a *Pseudomonas aeruginosa*, la cual produce un rhamnolípido constituido por rhamnosa y glicolípidos; *Candida bombicola* que produce soforolípidos, con buenos rendimientos, a partir de aceites vegetales y azúcar; y *Bacillus subtilis* el cual produce un lipopéptido denominado surfactin. Los biosurfactantes presentan un gran potencial de aplicaciones en diversos campos. En la industria alimentaria, los biosurfac-

¹Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias de Orense, Universidad de Vigo.

²Departamento de Química Agrícola y Edafología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela. E-mail: amoldes@usc.es

tantes son utilizados como agentes emulsionantes, principalmente en la industria panadera, para mejorar las características reológicas de la harina y en la industria cárnica. Además los biosurfactantes son utilizados en procesos de bioremediación por su biodegradabilidad, baja toxicidad y efectividad en el tratamiento de residuos. Los biosurfactantes también se utilizan como agentes terapéuticos.

Abstract

A lot of fermenting substrates arise from agriculture residues and industrial food processing. Depending on their origin, these substrates could be employed directly or after chemical treatment as carbon source for the biotechnological production of biosurfactants. Biosurfactants are surfactants that are produced extracellularly or as part of the cell membrane by bacteria, yeasts and fungi. Different microorganisms have been found biosurfactants producers. Strains of *Lactobacilli* were found to produce a biosurfactants collectively termed surlactin, characterized by the ability to reduce liquid surface tension and by the ability to inhibit the adhesion of *Enterococci* and other uropathogens to polymer surfaces. Others examples include *Pseudomonas aeruginosa* which produces rhamnose-containing glycolipids named rhamnolipids, *Candida bombicola*, which produces high yields of sophorolipids from vegetable oils and sugars and *Bacillus subtilis* which produces a lipopeptide called surfactin. Biosurfactants present considerable potential in commercial applications industries. So, in food industry, biosurfactants are used as emulsifiers mainly in bakery where play an important role in the rheological characteristics of flour and meat products. Besides, biosurfactants are employed in the environmental industries due to their biodegradability, low toxicity and effectiveness for bioremediation or therapeutic agents.

Introducción

Los surfactantes en general son moléculas anfipáticas constituidas por una parte hidrofóbica y una parte hidrofílica. La parte apolar con frecuencia es una cadena hidrocarbonada en tanto que la parte polar puede presentar una naturaleza muy variada, pudiendo ser una sustancia iónica, aniónica o anfótera. Debido a la presencia de estos grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, los surfactantes suelen colocarse en las interfases formando una película y reduciendo la tensión superficial del medio. Muchas de estas sustancias surfactantes son sintetizadas por microorganismos denominados biosurfactantes, los cuales presentan un origen natural frente a los

surfactantes sintéticos, obtenidos por vía química. La mayoría de los biosurfactantes presentan propiedades comunes y son más efectivos que los surfactantes convencionales. Los biosurfactantes obtenidos de forma natural presentan las siguientes ventajas: 1) se necesita menor concentración de biosurfactante para reducir la tensión superficial; 2) toleran mejor cambios de pH, temperatura y fuerza iónica pudiendo ser utilizados en un amplio rango de condiciones; 3) son biodegradables, por lo que no causan problemas medioambientales, y 4) presentan toxicidad muy baja, por lo que pueden utilizarse con toda tranquilidad en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria (Banat *et al.*, 2000; Desai y Banat, 1997).

Por otro lado, los biosurfactantes también pueden ser sintetizados a partir de sustratos renovables (Mercade *et al.*, 1994; Makkar y Cameotra, 1999; Deleu y Paquot, 2004), bastaría con poner en contacto los microorganismos productores de biosurfactantes con la fuente de carbono y nutrientes adecuados (Sheppard *et al.*, 1987; Koch *et al.*, 1988; Mercade *et al.*, 1993; Mercade *et al.*, 1994; Makkar y Cameotra, 1997; Daniel *et al.*, 1998; Fox y Bala, 2000; Haba *et al.*, 2000; Abalos *et al.*, 2001).

Existe gran variedad de microorganismos que pueden producir biosurfactantes; en la bibliografía se hace referencia a levaduras, bacterias y hongos (Klaenhammer, 1988; Cooper *et al.*, 1989; Martine *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2000). Con base en su estructura química se pueden distinguir distintos tipos de biosurfactantes. Los más comunes y que mayoritariamente han sido objeto de estudio son los glicolípidos, entre los que se encuentran los rhamnolípidos producidos por *Pseudomona aeruginosa* y *Pseudomona fluorescens*. Otros grupos de biosurfactantes son los lipopéptidos, fosfolípidos y lipopolisacáridos. Como ejemplo de lipopéptido se encuentra el aislado por Lin y colaboradores (1994) a partir de *Bacillus licheniformis* JF-3. Debido a su naturaleza variada, los biosurfactantes pueden presentar pesos moleculares muy diversos que condicionarán su posterior etapa de purificación; así *Lactobacillus helveticus* LP27 produce un lipopolisacárido complejo formado también por grupos proteínicos con un peso molecular muy elevado (Klaenhammer, 1988), al igual que *Rhodococcus erythropolis* EK-1, el cual da lugar a un lípido complejo constituido por uniones de polisacárido-proteína cuando crece sobre etanol, incluyendo glicolípidos como la trealosa, además de lípidos comunes como el ácido palmítico (Pirog *et al.*, 2004).

En función del metabolismo de estos microorganismos, los biosurfactantes se pueden obtener de forma extracelular, o bien, pueden estar asociados a la membrana plasmática de diferentes microorganismos. En este caso se necesita llevar a cabo un proceso de extracción, normalmente con PBS (tampón fosfato y ClNa). Por otro lado, los biosurfactantes pueden producirse en distintas fases del crecimiento celular, así,

pueden estar asociados a la fase exponencial de crecimiento o a la fase estacionaria, una vez que ha cesado el crecimiento celular.

Existen numerosos factores que pueden condicionar la producción de biosurfactantes, como pH y aireación. Sin embargo, en la mayoría de los trabajos se hace hincapié en la composición del medio de fermentación referida, tanto a la fuente de carbono como a los minerales y fuente de nitrógeno (Guerra-Santos *et al.*, 1986; Desai y Banat, 1997; Cameotra y Makkar, 1998). En este sentido, Pirog, y colaboradores (2004) encontraron que la habilidad de *Rhodococcus erythropolis* EK-1 para producir biosurfactantes, tanto sobre sustratos hidrofílicos como sustratos hidrofóbicos, depende de la composición nutritiva del medio, naturaleza de la fuente de carbono y nitrógeno, y duración del tiempo de cultivo. Asimismo, algunos autores, con el fin de aumentar la capacidad biosurfactante de algunos microorganismos, han propuesto la producción de biosurfactantes utilizando cepas mutadas. Así, Abbas y colaboradores (2004), utilizando una cepa mutada de *Pseudomonas aeruginosa*, lograron aumentar la producción de biosurfactantes por un factor de 10.

Los biosurfactantes y los residuos agrícolas

Apenas existen trabajos en los que se comente la obtención de biosurfactantes utilizando como sustratos o nutrientes residuos agrícolas, mientras que en la bibliografía se encuentran recogidos multitud de trabajos en los que se propone la producción de aditivos alimentarios, como el ácido láctico, utilizando todo tipo de residuos agrícolas (Hofvendalh y Hahn-Hägerdal, 1997; Hofvendalh y Hahn-Hägerdal, 1999; Moldes *et al.*, 2001; Sreenath *et al.*, 2001; Bustos *et al.*, 2004; Bustos *et al.*, 2005).

Los residuos agrícolas evaluados para la producción de biosurfactantes se basan principalmente en residuos oleaginosos, consistentes en corrientes procedentes del refinado del aceite de soya (Abalos *et al.*, 2001) o del proceso de extracción del aceite de oliva (Mercade *et al.*, 1993). También existen trabajos donde se pone de manifiesto la posibilidad de obtener biosurfactantes a partir del agua de lavado de las patatas (Fox y Bala, 2000) o de suero de leche desproteinizado (Daniel *et al.*, 1998). En esta misma línea, Mahnaz y colaboradores (2004) estudiaron la producción de biosurfactantes por parte de *Pseudomonas aeruginosa* MM1011, aislada a partir de aceite crudo, sobre 2% de melaza de remolacha procedente del proceso de extracción del azúcar. Encontraron que cuando *Pseudomonas aeruginosa* crece sobre este medio, produce un rhamnolípido capaz de reducir la tensión superficial del medio hasta 20 mN/m.

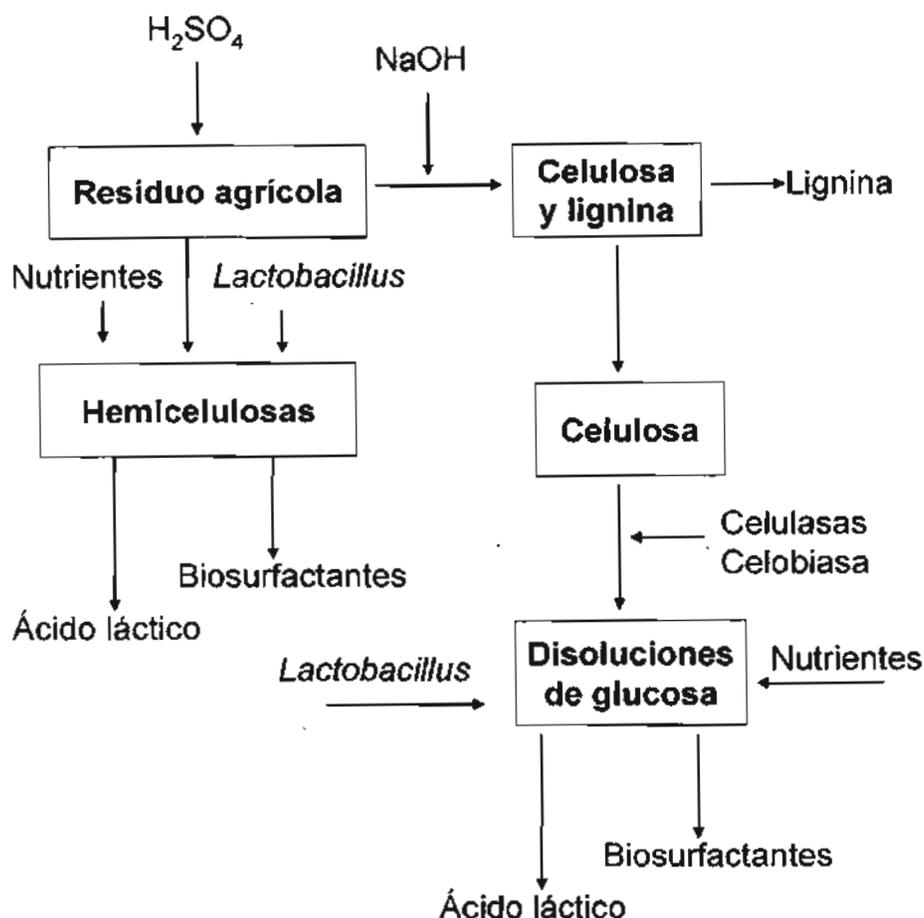
Existe poca información sobre la obtención de biosurfactantes a partir de residuos agroindustriales de naturaleza lignocelulósica. Desde el punto de vista del aprovechamiento de residuos, utilizando sustratos económicos y renovables que pudieran sustituir al petróleo o gas natural, sería interesante utilizar estos residuos agrícolas para la obtención de biosurfactantes, a la vez que se pueden obtener otros aditivos alimentarios, como puede ser el ácido láctico. Así, por ejemplo, varias cepas de *Lactobacillus* han sido utilizadas en la bibliografía para la producción de ácido láctico a partir de residuos agrícolas, ya sea en procesos en continuo o en discontinuo (Hofvendalh y Hahn-Hägerdal, 1999), obteniéndose biomasa residual que podría someterse a un proceso de extracción para la obtención de biosurfactantes (Velraeds *et al.*, 1996).

Con base en trabajos recogidos en la bibliografía (Moldes *et al.*, 2001; Sreenath *et al.*, 2001; Bustos *et al.*, 2004), en la figura 1 se recoge de forma muy simple una posibilidad para la obtención de ácido láctico y biosurfactantes a partir de residuos agrícolas. En primer lugar, el sustrato elegido se somete a un proceso de fraccionamiento con H_2SO_4 , que permite obtener una fracción sólida constituida por celulosa y lignina, así como una fracción líquida formada por hemicelulosas. Tras neutralizar la fracción hemicelulósica, ésta se suplementa con nutrientes y a continuación se esteriliza para ponerla en contacto con el microorganismo adecuado, capaz de metabolizar las hemicelulosas, por ejemplo *Lactobacillus pentosus*, produciendo ácido láctico y biosurfactantes. A su vez, la fracción celulósica se trata con NaOH para separar la lignina de la celulosa, de esta forma la lignina queda como un residuo que puede ser evaluado para su posterior aprovechamiento. La fracción celulosita se sacarifica con enzimas (celulasas), que permiten romper la celulosa en moléculas más sencillas de glucosa y celobiosa. Una vez obtenidas las disoluciones de glucosa y celobiosa, éstas, al igual que ocurría con las hemicelulosas, tienen que ser esterilizadas, suplementadas con nutrientes y puestas en contacto con el microorganismo adecuado (por ejemplo *Lactobacillus rhamnosus*), consiguiendo de este modo ácido láctico y, posiblemente, biosurfactantes.

Características de los biosurfactantes

La función principal de los biosurfactantes en el medio es facilitar que determinadas sustancias que no son miscibles en el disolvente en el que se encuentran, formen una emulsión y puedan ser accesibles, principalmente a los microorganismos productores de esos biosurfactantes.

Figura 1. Esquema simple para la obtención simultánea de aditivos alimentarios y biosurfactantes a partir de residuos agrícolas



Velraeds y colaboradores (1996) encontraron 15 cepas de *Lactobacillus*, entre los que se encuentran *L. acidophilus* RC14, *L. casei* Subsp. *Rhamnosus*, *L. fermentum* B54, y *L. acidophilus* T13, los cuales producen biosurfactantes, tanto en la fase exponencial de crecimiento como en la fase estacionaria. Muchas de estas cepas producen un tipo de biosurfactantes que inhibe la adhesión de *Enterococcus faecalis* a determinadas superficies, aunque no todas las cepas de *Lactobacillus* tienen el mismo poder de inhibición, seguramente debido a diferencias en la composición química del biosurfactante.

La forma más rápida de saber si determinado microorganismo produce biosurfactantes, consiste en medir la tensión superficial del medio de fermentación (en el caso

de que el biosurfactante sea extracelular) o hacer una extracción de los biosurfactantes con PBS (tampón fosfato y cloruro sódico), y medir la tensión superficial. La tensión superficial del agua destilada oscila alrededor de 72 mN/m y la adición de biosurfactantes puede bajar la tensión superficial hasta valores de 26 mN/m. Así, *Pseudomona aeruginosa* es productora de un rhamnolípido que disminuye la tensión superficial del agua a valores de 29 mN/m, en tanto que *Pseudomona fluorescens* disminuye este valor hasta 26.5 mN/m con la producción de un lipopéptido (viscosin). En general, una sustancia se considera biosurfactante cuando es capaz de reducir la tensión superficial del medio en el que se encuentra en más de 8 mN/m (Van der Vegt *et al.* 1991).

Cada biosurfactante presenta un valor mínimo hasta el cual es capaz de disminuir la tensión superficial, independientemente del aumento de su concentración. La concentración mínima de biosurfactante que nos permite obtener el valor más bajo de tensión superficial se denomina concentración micelar crítica (CMC), la cual va a variar en función del microorganismo y del tipo de biosurfactante. Para conocer el valor de CMC de un biosurfactante generalmente se realizan diluciones seriadas de la muestra problema.

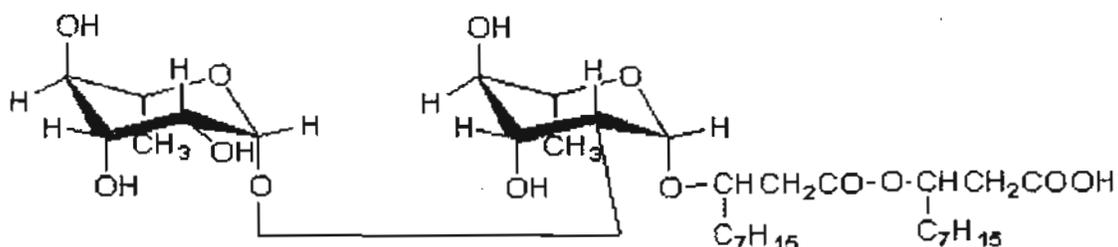
Clasificación de los biosurfactantes

Los biosurfactantes son un grupo muy heterogéneo de sustancias que se pueden dividir en cinco grandes grupos: 1) glicolípidos; 2) lipopéptidos y lipoproteínas; 3) ácidos grasos, fosfolípidos y lípidos neutros; 4) biosurfactantes poliméricos y 5) biosurfactantes en forma de agregados (Desai y Banat, 1997). Cabe destacar que existen muchas cepas de microorganismos recogidos en la bibliografía, con capacidad biosurfactante, de las que se desconoce el tipo de biosurfactante que produce, esto se debe a los complicados procesos de separación y análisis que hay que desarrollar para identificar la estructura química de un biosurfactante (Haiyan *et al.*, 2003).

1) *Glicolípidos*. Son los más abundantes y conocidos, constituidos por carbohidratos combinados con cadenas muy largas de ácidos alifáticos y ácidos hidroxialifáticos. Los más conocidos son los rhamnolípidos, trehalolípidos y soforolípidos.

Los rhamnolípidos están formados por una o dos moléculas de rhamnosa unidas a una o dos moléculas de ácido β -hidroxidecanoico. Uno de los principales microorganismos productores de rhamnolípidos es *Pseudomonas aeruginosa* (Maier y Soberón-Chavez, 2000). En la figura 2 se puede observar la estructura química de un rhamnolípido producido por *Pseudomonas aeruginosa*.

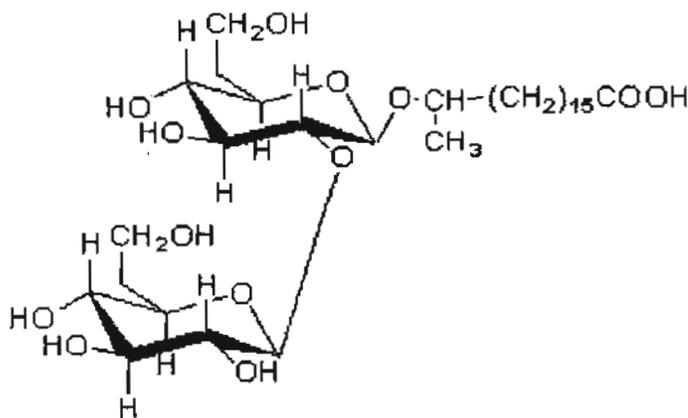
Figura 2. Estructura química de un rhamnolípido



Los trehalolípidos, están constituidos por el disacárido trehalosa, unido a diferentes ácidos grasos producidos por especies de *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Corynebacterium* (Desai y Banat, 1997). El tamaño, estructura y el número de átomos de carbono del ácido graso unido al disacárido varían en función del tipo de microorganismo.

En cuanto a los soforolípidos, éstos son producidos principalmente por levaduras tales como: *Torulopsis bombicola* y *Torulopsis apicola*. Por lo general, son mezclas de diferentes soforolípidos, constituidos por un carbohidrato dimérico, la soforosa, unido a cadenas muy largas de ácidos grasos. Los sustratos de los que se pueden obtener estos glicolípidos son variados; así, Otto y colaboradores (1999) obtuvieron soforolípidos a partir de suero de leche. En la figura 3 se muestra la estructura química de un soforolípidido.

Figura 3. Estructura química de un soforolípidido



2) *Lipopéptidos y Lipoproteínas*. Muchos de ellos son lipopéptidos cíclicos, principalmente formados por decapeptidos. Uno de los ejemplos más típicos es la surfactina, producida por *Bacillus subtilis*, con enorme capacidad biosurfactante; disminuye la tensión superficial del agua hasta 27.9 mN/m con una concentración micelar crítica menor de 0.0005 g/L (Arima *et al.*, 1968).

3) *Ácidos grasos, fosfolípidos y lípidos neutros*. Existen numerosas bacterias y levaduras que producen biosurfactantes formados por este tipo de compuestos. Por ejemplo, cuando *Acinetobacter* crece sobre hexadecano produce un biosurfactante muy potente, la fosfatidiletanolamina, formada por dos cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos (Kappeli y Finnerty, 1979).

4) *Biosurfactantes poliméricos*. Entre los más conocidos se encuentran el biodispersan, liposan y el emulsan. El biodispersan es un heteropolisacárido producido extracelularmente por *Acinetobacter calcoaceticus*, constituido por glucosamina, galactosamina, 6-metil aminohexosa, y ácidos urónicos (Rosenberg *et al.*, 1988). Este mismo microorganismo también produce otro potente biosurfactante, el emulsan, constituido por N-acetil-D-galactosamina, así como por otros N-acetil amino azúcares no identificados. Por otra parte, el liposan se puede obtener a partir de *Candida lipolyptica* (Cirigliano y Carman, 1985); está formado por 83% de carbohidratos y 17% de proteínas. Además, existen otros biosurfactantes poliméricos en forma de manoproteínas, constituidas por 44% de manosa y 17% de proteínas.

5) *Biosurfactantes en forma de partículas*. Algunos microorganismos producen una serie de agregados, formando vesículas que contienen cinco veces más fosfolípidos, y 350 veces más polisacáridos que otras membranas del propio microorganismo (Desai y Banat, 1997). La bacteria *Acinetobacter* se encuentra dentro de las productoras de este tipo de vesículas compuestas por proteínas, fosfolípidos y lipopolisacáridos (Kappeli y Finnerty, 1979).

En la tabla 1 se muestran algunos biosurfactantes típicos, así como los microorganismos que los producen.

Aplicaciones

Los biosurfactantes presentan numerosas aplicaciones (Banat *et al.*, 2000; Kourkoutas *et al.*, 2004), pueden utilizarse en la industria alimentaria para mejorar la reología de los productos de panadería y pastelería, ya que facilitan la formación de emulsiones, además pueden ser empleados con estos mismos fines en la industria cárnica. Los biosurfactantes son considerados de origen natural, por lo que su utilización en la

Tabla 1. Microorganismos productores de biosurfactantes y tipos de biosurfactantes

<i>Biosurfactante</i>	<i>Microorganismo</i>	<i>Referencias</i>
<i>Glicolípidos</i>		
-Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mercade <i>et al.</i> , 1993; Abalos <i>et al.</i> , 2001; Mahnaz y <i>et al.</i> , 2004; Benincasa <i>et al.</i> , 2004.
-Soforolípidos	<i>Candida bombicola</i> <i>Candida apicola</i>	Daniel <i>et al.</i> , 1998; García-Ochoa y Casas, 1997a y b.
-Trehalolípidos	<i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 1969; Kim <i>et al.</i> , 1990.
<i>Lipopéptidos y lipoproteínas</i>		
-Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Neu <i>et al.</i> , 1990.
-Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>	Bernheimer y Avigad, 1970.
-Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	Cooper <i>et al.</i> , 1981; Ahimou <i>et al.</i> , 2000.
<i>Ácidos grasos y fosfolípidos</i>		
-Ácidos grasos	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Robert <i>et al.</i> , 1989.
-Fosfolípidos	<i>Acinetobacter</i>	Kappeli y Finnerty, 1979.
<i>Surfactantes poliméricos</i>		
-Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Zukerberg <i>et al.</i> , 1979.
-Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Rosenberg <i>et al.</i> , 1988.
-Liposan	<i>Candida lipolytica</i>	Cirigliano y Carman, 1985.

industria alimentaria tiene mayor aceptación frente a los biosurfactantes de origen sintético. Otro campo en el que los biosurfactantes podrían desempeñar un papel importante es en la elaboración de envases activos para impedir la adhesión a éstos de microorganismos patógenos y así aumentar la vida útil de los alimentos. Existen algunos trabajos que evidencian la propiedad de algunos biosurfactantes para evitar la adhesión de bacterias patógenas a determinadas superficies. Así, Reid *et al.* (1988) encontraron que ciertas bacterias lácticas tienen la capacidad de inhibir a *E-coli*, mientras que Martine *et al.* (1996) encontraron que algunos biosurfactantes producidos por bacterias lácticas inhiben la adhesión de *Enterococcus faecalis* a superficies de cristal.

Además, los biosurfactantes pueden utilizarse en otro tipo de industrias, como la farmacéutica (Rodrigues *et al.*, 2004; Singh y Cameotra, 2004), cosmética y medioambiental, siendo en esta última donde se hace muy importante (Desai y Banat, 1997): los biosurfactantes permiten reducir el impacto ambiental causado por diversos residuos liberados al medio ambiente, como por ejemplo, los hidrocarburos.

Existen numerosos microorganismos que son capaces de degradar hidrocarburos de cadena larga como el petróleo, aunque para ello estos hidrocarburos tienen que estar biodisponibles. La mayoría de los hidrocarburos causantes de la contaminación ambiental son altamente insolubles en agua, lo que genera muchas veces uniones hidrofóbicas en determinadas superficies, como las rocas, por lo que se hace muy difícil su eliminación, esto se debe a que los microorganismos que pueden degradarlos no son capaces de acceder a ellos por no estar biodisponibles. Es por esto que en el campo de la biorremediación se están buscando microorganismos productores de sustancias biosurfactantes que favorezcan la biodisponibilidad de estos hidrocarburos.

Conclusiones

Con base en datos recogidos en la bibliografía sobre la producción de biosurfactantes a partir de suero lácteo o aceites residuales procedentes de la fritura de ciertos alimentos, se llegó a la conclusión de que residuos agroindustriales pueden ser también una fuente de nutrientes o sustratos para la producción biotecnológica de surfactantes. Para ello sólo es necesario poner en contacto un microorganismo productor de biosurfactantes (levaduras, hongo o bacteria) con capacidad para metabolizar el sustrato elegido en las condiciones adecuadas. La producción de biosurfactantes varía mucho en función de la composición del medio de fermentación, por lo que éste es un aspecto al que hay que prestar una atención especial. Existen muchas bacterias lácticas productoras de biosurfactantes, así que una opción interesante podría ser la obtención simultánea de ácido láctico y biosurfactantes a partir de residuos agroindustriales.

Bibliografía

Abalos, A.; Pinazo, A.; Infante, M.R.; Casals, M.; Garcia, F.; Manresa, A. (2001), "Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by

- Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes”, *Langmuir*, 17: 1367-1371.
- Abbas, T.; Fatemeh, K.Y.; Mahnaz, A. (2004), “Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant”, *Iranian Biomedical Journal*, 8(1): 25-31.
- Ahimou F.; Jacques P.; Deleu, M. (2000), “Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity”, *Enzyme Microbiol. Technol.*, 27: 749-754.
- Arima, K.A.; Kakinuma, A.; Tamura, G. (1968), “Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 31: 488-494.
- Banat, I.; Makkar, S.; Cameotra, S. (2000), “Potential commercial application of microbial surfactants-A review article”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53: 495-508.
- Benincasa, M.; Abalos, A.; Oliveira, I.; Manresa, A. (2004), “Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soap stock”, *Antonie van Leeuwenhoek*, 85(1): 1-8.
- Bernheimer, A.W.; Avigad, L.S. (1970), “Nature and properties of a cytological agent produced by *Bacillus subtilis*”, *J. Gen. Microbiol.*, 61: 361-369.
- Bustos, G.; Moldes, A.B.; Cruz, J.M.; Domínguez, J.M. (2004), “Production of fermentable media from trimming wastes and bioconversion into lactic acid by *Lactobacillus pentosus*”, *J. Sci. Food Agric.*, 84: 2105-2112.
- _____; Moldes, A.B.; Cruz, J.M.; Domínguez, J.M. (2005), “Production of lactic acid from vine-trimming wastes and viticulture lees using a simultaneous saccharification fermentation method”, *J. Sci. Food Agric.*, 85: 466-472.
- Cameotra, S.S.; Makkar, R.S. (1998), “Synthesis of biosurfactants in extreme conditions”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50: 520-529.
- Cirigliano, M.C.; Carman, M.G. (1985), “Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 846-850.
- Cooper, D.G.; Liss, N.S.; Longay, R.; Zajic, J.E. (1989), “Surface activities of *Mycobacterium* and *Pseudomonas*”, *J. Ferment. Technol.*, 59: 97-101.
- _____; MacDonald, C.R.; Duff, S.J.B.; Kosaric, N. (1981), “Enhanced production of surfactin from *B. subtilis* by continuous product removal and metal cation additions”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 42: 408-412.
- Daniel, H.J.; Reuss, M.; Sylđatk, C. (1998), “Production of sophorolipids in high concentration from deprotenized whey and rapeseed oil in a two stage fed bat-

- ch process using *Candida bombicola* ATCC 22214 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509”, *Biotechnol. Lett.*, 20: 1153-1156.
- Deleu, M.; Paquot, M. (2004), “From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants”, *Comptes Rendus Chimie.*, 7(6-7): 641-646.
- Desai, J.; Banat, I. (1997), “Microbial production of surfactants and their commercial potential”, *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 61: 47-64.
- Fox, S.L.; Bala, G.A. (2000), “Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates”, *Biores. Technol.*, 75: 235-240.
- García-Ochoa, J.A.; Casas, J.A. (1997a), “Procedimiento para la obtención de soforolípidos a partir de glucosa y aceite utilizando células desenergetizadas de *Candida Bombicola*”, N° Patente: ES 2103687 A1, España.
- _____; Casas, J.A. (1997b) “Procedimiento para la obtención de soforosa por *Candida Bombicola*”, N° Patente: ES 2103688, España.
- Guerra-Santos, L.H.; Kappeli, O.; Flechter, A. (1986), “Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 443-448.
- Haba, E.; Espuny, M.J.; Busquets, M.; Manresa, A. (2000), “Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI40044 from waste frying oils”, *Appl. Microbiol.*, 88: 379-387.
- Haiyan; F.; Guangming, Z.; Xingzhong, Y.; Guohe; H.; Jingang, S.; Hua, Z. (2003), “Isolation and purification of biosurfactant”, *Shengwuxue Zazhi*, 20(6): 1-4.
- Hofvendahl, K.; Hahn-Hagerdal, B. (1997), “L (+) lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *lactobacilli* and *lactococci*”, *Enzyme Microbiol. Biotechnol.*, 20: 301-307.
- _____; Hahn-Hagerdal, B. (1999), “Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources”, *Enzyme Microbiol. Biotechnol.*, 26: 87-107.
- Kappeli, O. y Finnerty, W.R. (1979), “Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane grown *Acinetobacter*”, *J. Bacteriol.*, 140: 707-712.
- Kim, J.S.; Powalla, M.; Lang, S.; Wagner, F.; Lunsdorf, M.; Wray, V. (1990), “Microbial glycolipid production under nitrogen limitation and resting cell conditions”, *J. Biotechnol.*, 13: 257-266.
- _____; Lim, E.; Lee, S.; Lee, J.; Lee, T. (2000), “Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia sp.* L-417”, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 31: 249-253.
- Klaenhammer, T.R. (1988), “Bacteriocins of lactic acid bacteria”, *Biochimie.*, 70: 337-349.

- Koch, A.; Reiser, K.J.; Kapelli, O.; Fiechter, A. (1988), "Genetic construction of lactose-utilizing strains of *P. aeruginosa* and their application in biosurfactant production", *Biotechnology*, 6: 1335-1339.
- Kourkoutas, Y.; Banat, M. (2004), "Biosurfactant production and application", ed. Pandey, Ashok Concise, *Encyclopedia of Bioresource Technology*.
- Lin, S.C.; Carswell, K.S.; Sharma, M.M.; Georgiou, G. (1994), "Continuous production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41: 281-285.
- Mahnaz, A.; Mahsa, R.; Ashraful, N.; Moorie, L.; Manoochehr, S. (2004), "Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* MM1011 from sugar beet molasses", *Asian J. of Microbiol. Biotechnol. & Environm. Sc.*, 6(2): 203-207.
- Maier, R.M.; Soberon-Chavez, G. (2000), "*Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosíntesis and potencial applications", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54: 625-633.
- Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. (1997), "Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions", *J. American Oil Chemist's Society*, 74(7): 887-889.
- _____; Cameotra, S.S. (1999), "Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources", *J. Surfactants and Detergents*, 2: 237-241.
- Martine, M.C.; Velraeds, H.C.; Van der Mei, G.; Reid, H.J.; Busscher (1996), "Inhibition of inicial adhesión of Uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates", *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(6): 1958-1963.
- Mercade, M.E.; Manresa, M.A. (1994), "The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production", *J. American Oil Chemist's Society*, 71: 1 61-64.
- _____; Manresa, M.A.; Robert, M.; Espuny, M.J.; Andres, C.; Guinea, J. (1993), "Olive oil mill effluent. New substrates for biosurfactant production", *Biores. Technol.*, 43: 1-6.
- Moldes, A.B.; Alonso, J.L.; Parajó, J.C. (2001), "Strategies to improve the bioconversion of processed Wood into lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 76(3): 279-284.
- Neu, T.R.; Hartner, T.; Poralla, K. (1990), "Surface active properties of viscosin a peptidolipid antibiotic", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32: 518-520.
- Otto, R.; Daniel, H.; Pekin, G.; Muller-Decker, K. (1999), "Production of sophorolipids from whey II Product composition, surface active properties, cytotoxicity and stability against hydrolases by enzymatic treatment", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 495-501.
- Pirog, T.P.; Shevchuk, T.A.; Voloshina, I.N.; Karpenko, E.V. (2004), "Production of surfactants by *Rhodococcus erythropolis* strain EK-1, grown on hydrophilic and hydrophobic substrates", *Appl. Biochemistry Microbiol.*, 40(5): 470-475.

- Reid, G.; McGroarty, J.A.; Angotti, R.; Cook, R.L. (1988) "Lactobacillus inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens", *Can. J. Microbiol.*, 34: 344-351.
- Robert, M.; Mercade, M.E.; Bosch, M.P.; Parra, J.L.; Espuny, M.J.; Manresa, M. A.; Guinea, J. (1989), "Effect on the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T", *Biotechnol. Lett.*, 11: 871-874.
- Rodrigues, L.; Van der Mei, H.; Teixeira, J.; Oliveira, R. (2004), "Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prosthesis", *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 4408-4410.
- Rosenberg, E.; Rubinovitz, C.; Gottlieb, A.; Rosenhak, S.; Ron, E.Z. (1988), "Production of biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2", *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 317-322.
- Sheppard, J.D.; Mulligan, C.N. (1987), "The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate", *Appl. Microb. Biotechnol.*, 27: 110-116.
- Singh, P.; Cameotra, S. (2004), "Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences", *Trends Biotechnol.*, 22: 142-146.
- Sreenath, H.K.; Moldes, A.B.; Koegel, R.G.; Straub, R.J. (2001), "Lactic acid from agriculture residues", *Biotechnol Letters.*, 23: 179-184.
- Suzuki, T.; Tanaka, K.; Matsubara, J.; Kimoshita, S. (1969), "Trehalose lipid and branched-b-hydroxy acids formed by bacteria grown on n-alkanes", *Agric. Biol. Chem.*, 33: 1619-1625.
- Van der Vegt, W.; Van der Mei, H.C.; Noordmans, J. y Busscher. H.J. (1991), "Assessment of bacterial biosurfactant production through axisymmetric drop shape analysis by profile", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 766-770.
- Velraeds, M.; Van der Mei, H.; Reid, G.; Bussche, H. (1996), "Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates", *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 1958-1963.
- Zukerberg, A.; Diver, A.; Peeri, Z.; Gutnick, D.L.; Rosenberg, E. (1979), "Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: chemical and physical properties", *Appl. Environ. Microbiol.*, 37: 414-420.

Uso y aprovechamiento de subproductos vegetales y animales en la prevención de insectos, hongos y algunas enfermedades

Use and Advantage of Vegetal by-Products and Animals in the Prevention of Insects, Fungi and Some Diseases

Plascencia Jatomea, M.^{1}; Cortez Rocha, M. O.¹; Aldana Madrid, M.L.¹; Shirai, K.²; Robles, R.M.¹; Canett, R.¹; Parra Vergara, N.V.¹*

Resumen

En el estado de Sonora existe una gran diversidad de especies vegetales con propiedades antagónicas para el crecimiento de insectos. Por esta razón, en la Universidad de Sonora se han probado con éxito más de 40 especies de plantas regionales para el control de insectos en granos almacenados de trigo, frijol y maíz. Sonora también se destaca por su producción vitivinícola, pues más de 50% de la uva cosechada se destina para la producción de destilados, proceso que genera de 5 a 10% de orujo. Este residuo es rico en fibra, por lo que en esta institución se han evaluado las propiedades hipocolesterolémicas e hipoglicémicas de la fibra de orujo en ratas. Por otro lado, la rápida proliferación de granjas camaronícolas en el estado ocasiona problemas ambientales debido a la producción de grandes cantidades de desecho (30 a 35% del peso total). El desecho contiene aproximadamente 50% de quitina, la cual puede ser transformada en quitosano, un biopolímero natural, biodegradable y no tóxico, con

¹ Universidad de Sonora, Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Blvd. Luis Encinas y Rosales, s/n. col. Centro, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México.

² UAM-Iztapalapa.

* e-mail: mplascencia@guayacan.uson.mx

propiedades antimicrobianas e insecticidas. Siendo otro subproducto importante en la región, el uso del desecho de camarón para la obtención de quitosano, así como la evaluación de sus propiedades biológicas y filmogénicas, puede proporcionar información útil sobre la acción inhibitoria del biopolímero para la conservación de alimentos, ya sea solo o en combinación con otros subproductos potenciales naturales.

Abstract

In the state of Sonora exist a great vegetal species diversity with antagonistic properties for the insects growth. For that reason, in the University of Sonora, more than 40 species of regional plants has been successfully tested to the control of insects in wheat, bean and corn stored grains. Also, Sonora draw ahead by its vine grower production and more than 50% of grape is used for liquor production, process that generate from 5 to 10% of "orujo". This residue is rich in fiber and for that reason, in this Institution, the hypocholesterolemic and hypoglycemic properties of the orujo fiber has been evaluated in rats. For other side, the rapid shrimp farms proliferation in Sonora is causing environmental problems due to the production of large amounts of wastes (30-35% of total weight). The waste contains about 50% of chitin and this product can be transformed to chitosan, which is a natural biopolymer, biodegradable and non toxic, with antimicrobial and insecticide properties. Being another important by-product generated in the region, the use of shrimp wastes for chitosan production and the evaluation of its biological and filmogenic properties can to proportionate valuable information about the inhibitory action of the biopolymer, alone or in combination with other natural potential by-products, for the food conservation.

Introducción

Las implicaciones ambientales relacionadas con el uso de compuestos químicos para inhibir el desarrollo de microorganismos e insectos, así como la resistencia de éstos, han propiciado la búsqueda de fuentes naturales alternativas para la conservación de alimentos. En este sentido, el aprovechamiento de los subproductos agroindustriales vegetales o animales generados por la industria de alimentos, o de *malezas* con propiedades importantes para la conservación de alimentos, ha despertado un gran interés debido a que, además de ser ricos en productos de alto valor agregado, poseen un elevado potencial de aplicación en diversos campos.

El orujo de uva, el desecho de camarón y una gran diversidad de especies vegetales son ejemplo de subproductos generados en el estado de Sonora, cuya reutilización representa una alternativa natural al empleo de sustancias químicas. Con base en lo anterior, el estudio sobre el uso de los recursos generados en el estado permitirá el desarrollo de procesos para su aprovechamiento en la obtención de productos con propiedades biológicas importantes, o bien, en la producción biotecnológica de aditivos alimentarios. El objetivo de este trabajo es hacer un resumen de algunos estudios sobre el aprovechamiento de subproductos importantes generados en el estado de Sonora.

Utilización de plantas (malezas) para el control de insectos que dañan granos almacenados

El uso de productos químicos para combatir las principales plagas de los granos almacenados es una práctica popular a nivel mundial. Sin embargo, en la actualidad, la solución rápida y eficiente lograda mediante la aplicación adecuada de plaguicidas se ha convertido en un problema debido a la detección de resistencia en los insectos hacia los productos aplicados y a la contaminación del medio ambiente por la presencia de residuos tóxicos (FAO, 1976; Ríos, 1992).

Las plantas representan una alternativa natural para control de insectos en granos almacenados, tal como lo han demostrado la rotenona, la sabadilla y los piretros (Cremlyn, 1985). En el estado de Sonora existe una gran diversidad de especies vegetales, y algunas de ellas poseen propiedades antagónicas para el desarrollo de los insectos, razón por la cual, en la Universidad de Sonora se han realizado varios experimentos enfocados principalmente al control de insectos considerados plagas primarias, como *Rhyzopertha dominica*, *Zabrotes subfasciatus*, *Acanthoscelides obtectus*, *Sitophilus zeamais* y *Sitotroga cerealella*, en granos de trigo, frijol y maíz, respectivamente. Hasta la fecha se han estudiado más de 40 especies de plantas (hojas y tallos secundarios) de diversas regiones del estado (Río de Sonora, Río Yaqui y Costa de Hermosillo).

Cortez-Rocha (1990) recolectaron 36 plantas de las regiones del Río de Sonora, Río Yaqui y sur del estado de Sonora. Las plantas se secaron al sol y se molieron, probándose contra *R. dominica*. Los resultados indicaron que ninguno de los extractos acuosos probados causó mortalidad al insecto. En otro estudio, Cortez-Rocha *et al.* (1993) aplicaron polvos y extractos vegetales de 10 plantas para evaluar su efecto sobre *Zabrotes subfasciatus* y *Acanthoscelides obtectus*, en frijol pinto

almacenado a 27°C y humedad relativa de 65-70%. Los resultados indicaron que la aplicación de polvos y extractos de *Argemone mexicana* y *Datura stramonium* tuvieron un gran efecto repelente para ambas especies de insectos, además de los tratamientos con *Argemone platyceras* y *Larrea tridentata* en *Acanthoscelides obtectus*. Al evaluar el efecto sobre la oviposición de *Z. subfasciatus* en el grano, se encontró que *D. strumarium* y *A. mexicana* presentaron bajo número de huevecillos ovipositados y por consiguiente, un bajo número de insectos adultos de nueva emergencia. En *A. obtectus*, estas mismas plantas y *R. communis* causaron un bajo número de insectos adultos de nueva emergencia.

Por otro lado, Cortez-Rocha y Celaya (1992) evaluaron plantas para control de *Sitophilus zeamais* en grano de maíz; sus resultados indican que los polvos de *Encelia farinosa* y *R. communis* provocaron una mortalidad de 100 y 66% respectivamente, mientras que la aplicación de *D. strumarium* causó la mayor repelencia para este insecto. Pruebas fitoquímicas, cromatografía de capa fina y análisis infrarrojo han permitido determinar la presencia de alcaloides, esteroides, saponinas y glicósidos cardiotónicos (Parra Vergara, 1992).

En estudios posteriores, purificaron compuestos aislados (alcaloides) de extractos de *Nicotiana glauca*, evaluando su efecto toxicológico en el insecto *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) mediante índice de mortalidad, índice de oviposición, índice de emergencia, porcentaje de grano dañado y porcentaje de pérdida de peso. Los resultados del análisis cromatográfico arrojan que los compuestos encontrados en mayor proporción en la planta son alcaloides y esteroides, siendo los primeros los de mayor toxicidad.

Aprovechamiento de la fibra de orujo de uva y su efecto en el perfil lipídico de ratas hipercolesterolémicas

Junto con la gran diversidad de plantas silvestres, Sonora destaca también por su producción vitivinícola. Se estima que aproximadamente 50% de la producción de vid se destina a la producción de aguardiente, generando de este modo una gran cantidad de subproducto proveniente del prensado de la uva (5-10%), proceso conocido comúnmente como orujo de uva. La cascarilla de orujo contiene un alto porcentaje de fibra total (aproximadamente 70%), por lo que puede ser utilizado como una fuente de fibra dietaria para consumo humano.

Los beneficios a la salud asociados con el aumento en el consumo de fibra dietaria se han estudiado continuamente, ya que entre algunas enfermedades relacionadas

con deficiencias de fibra se encuentran el cáncer de colon, hipercolesterolemia, arterioesclerosis, diabetes, diverticulitis, constipación, hipertensión, obesidad y cálculos biliares (Gordon, 1989). Por tal motivo, en la Universidad de Sonora se han realizado estudios para evaluar el efecto hipocolesterolémico e hipoglucémico de la fibra contenida en la cascarilla del orujo, valorando indicadores bioquímicos y fisiológicos en ratas.

Los resultados obtenidos indicaron que la cascarilla presentó un alto contenido de fibra total dietaria, siendo la fracción insoluble la de mayor proporción. La composición química de la cascarilla mostró además contenidos importantes de proteína, cenizas y taninos, lo cual es de consideración al momento de diseñar dietas para consumo humano o animal. Asimismo, las ratas alimentadas con las dietas elaboradas con cascarilla de uva presentaron niveles significativamente más bajos de colesterol y triglicéridos con respecto a la dieta con hipercolesterolemia inducida, encontrando un mayor efecto en la disminución de triglicéridos (Cannet-Romero *et al.*, 2003).

Con respecto al efecto hipoglucémico, se encontró que ratas hiperglicémicas alimentadas con dietas a base de orujo reportaron valores finales de glucosa en suero estadísticamente iguales a los obtenidos en ratas alimentadas con dietas a base de fibras que ya han sido probadas por su efecto hipoglucémico. Lo anterior ha permitido el establecimiento de modelos biológicos para la evaluación del efecto de fuentes no convencionales de fibra dietaria sobre el metabolismo de lípidos y carbohidratos.

Aprovechamiento de desechos de camarón para la obtención de quitosano

Otra de las actividades importantes en el estado es el cultivo de camarón, producto de alto valor económico en el mercado internacional que ha convertido a la camaronicultura en el centro de la actividad pesquera de exportación en el país. Desafortunadamente, la rápida proliferación de las granjas de camarón está afectando ecosistemas costeros y comunidades rurales, causando problemas ambientales debido a la producción de cantidades considerables de desechos (30-35% del peso total del animal). El desecho contiene alrededor de 50% de quitina; ésta es una molécula análoga a la celulosa y ocupa el segundo lugar en abundancia después de la misma, con una producción anual de 10^{10} a 10^{11} toneladas (Agulló *et al.*, 2003). Los desechos de crustáceos constituyen la principal fuente comercial de quitina y quitosano, el cual es el principal producto derivado de la primera.

El quitosano es un biopolímero natural y no tóxico, con propiedades específicas como biodegradabilidad, efecto antimicrobiano (Plascencia-Jatomea *et al.*, 2001; 2003), potencial insecticida (Zhang *et al.*, 2003) y actividad inductora de moléculas de defensa en tejidos vegetales, criterios que lo hacen ser un agente conservador prometedo. Reddy y colaboradores (1999) reportaron una mejora significativa en la germinación y resistencia de granos de trigo recubiertos con soluciones de quitosano, además de reducir el desarrollo de *Fusarium graminearum* y estimular la síntesis de compuestos fenólicos y lignina en las hojas.

Estudios recientes han permitido demostrar que el quitosano es un agente con propiedades fungistáticas efectivas para controlar el crecimiento de hongos filamentosos contaminantes de alimentos tales como *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum*, tanto en cultivo superficial como en medio líquido y en películas compuestas (Plascencia-Jatomea, 2004). En cultivos superficiales se demostró que, a 30°C, 3.5 mg/cm³ de quitosano previenen 50% la germinación de esporas de *Aspergillus niger* (CQ₅₀), además de actuar sinérgicamente al combinarse con baja temperatura, mientras que en medio de cultivo líquido se encontró que la presencia de 3.5 g/L de quitosano altera completamente el proceso septación de las hifas de *A. niger*, impidiendo su crecimiento a 30°C.

La evidente deformación, distorsión e hichamiento observados en las hifas del hongo sugieren que el quitosano afectó la turgencia y la presión de la célula causando estrés fisiológico, lo cual fue más notorio durante la etapa de polarización de las esporas ya que durante dicha etapa la pared celular de la espora es más delgada con respecto al resto del ciclo de crecimiento vegetativo. Asimismo, el biopolímero fue capaz de reducir la relación área/volumen de las hifas por aumento relativo de los diámetros, disminuyendo la superficie en contacto directo con el medio. Esto parece ser una respuesta a la toxicidad del quitosano presente en el agar (Plascencia-Jatomea, 2004; Plascencia-Jatomea *et al.*, 2003).

Con respecto al estudio de las propiedades biológicas de películas compuestas de quitosano, se ha reportado que éstas resultan efectivas para impedir el desarrollo de *Penicillium chrysogenum* en queso, a temperaturas de refrigeración (<10°C) (Plascencia-Jatomea, 2004). Esto indica que las propiedades biológicas del biopolímero pueden ser aprovechadas en la elaboración de empaques naturales activos, los cuales presentan la propiedad adicional de ser biodegradables.

En adición, tomando en cuenta que el principal resultado fue el fuerte efecto inhibitorio que resulta al combinar el biopolímero con baja temperatura (<18°C) (Plascencia-Jatomea *et al.*, 2003), se considera que la elaboración de nuevos productos biotecnológicos en donde se exploten las propiedades antimicrobianas del

quitosano constituye una alternativa potencial al empleo de agentes químicos para preservar alimentos contaminados, retardando satisfactoriamente el crecimiento de hongos filamentosos durante su almacenamiento.

Por tal motivo, en esta institución se han realizado estudios sobre el aprovechamiento de desechos de camarón para la obtención de quitosano mediante procesos que han permitido un ahorro substancial del agua, reduciendo los volúmenes requeridos para el procesamiento. Asimismo, se están realizando estudios para determinar el efecto antifúngico del quitosano sobre la germinación de esporas, crecimiento apical y producción de toxinas de hongos filamentosos como *Fusarium verticillioides*, aislados de granos de maíz cosechado. Lo anterior permitirá conocer a detalle la acción inhibitoria del biopolímero sobre las diferentes etapas de crecimiento, ya sea solo o en combinación con otros subproductos naturales potenciales para la conservación de alimentos.

Bibliografía

- Agulló, E.; Rodríguez, M.S.; Ramos, V. y Albertengo, L. (2003), "Present and future role of chitin and chitosan in food", *Macromolecular Bioscience*, 3(10): 521-530.
- Cannet Romero, R.; Aldana Madrid, M.L.; Ledesma Osuna, A.I.; Robles Sanchez R.M.; Morales Castro, R.; Romero Baranzini, A.L. y Olivares Mendivil, S.E. (2003), "Fiebra dietaria en la cascarilla de uva y su efecto en el perfil de ratas hipercolesterolémicas", *Biotecnia*, V (3): 3-10.
- Cortez Rocha, M.O. y J.L. Celaya. (1992), "Utilización de polvos vegetales como alternativa para control del gorgojo *Sitophilus zeamais* (Coleóptera:Curculionidae)", en *Resúmenes del XXVII Congreso Nacional de Entomología*, San Luis Potosí, pág. 449.
- _____; Wong-Corral, F.J.; Borboa-Flores, J.; Sánchez Mariñez, R.I. y Cinco-Moroyoqui, F.J. (1993), "Plant powders as stored grain protectants against *Zabrotes subfasciatus* Boheman", *Southwestern Entomologist*, 18(1): 73-75.
- _____; Wong, F.J.; Borboa, J.; Hoyos, O.M. y González, M.M. (1990), "Utilización de plantas silvestres del estado de Sonora como alternativa para control del insecto *Rhyzopertha dominica* F. (Coleóptera: Bostrichidae) en trigo", en *Memorias del II Simposio Nacional sobre Sustancias Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas*, Oaxaca, pp. 20-32.
- Cremlyn, R. (1985), *Plaguicidas modernos y su acción bioquímica*, LIMUSA, pp. 63-75.

- FAO (1976), *Informe de la prospección mundial de FAO sobre susceptibilidad a los insecticidas de las plagas de granos almacenados*, Roma, Italia, FAO, pp. 311-336.
- Gordon, D.T. (1989), "Functional properties as physiological action of dietary fiber", *Cereal Foods World*, 34(7): 517-525.
- Parra Vergara, N.V. (1992), "Caracterización parcial de los principales grupos químicos presentes en los extractos acuosos de palo loco (*Nicotiana glauca*) y Tabaquillo del coyote (*Nicotiana trigonophylla*)", tesis profesional, Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora.
- Plascencia Jatomea, M.; Viniegra, G.; Olayo, R.; Castillo Ortega, M.M.; Larralde, P. y Shirai, K. (2001), "Effect of chitosan on fungal growth using morphometric evaluation", en Uragami, T.; Kurita, K. y Fukamizo, T. (eds.), *Chitin and chitosan in life science. Kodansha Scientific*, Japón, pp: 256-259.
- _____; Viniegra, G.; Olayo, R.; Castillo Ortega, M.M. y Shirai, K. (2003), "Effect of chitosan and temperature on the spore germination of *Aspergillus niger*", *Macromolecular Bioscience*, 3(10): 582-586.
- _____(2004), "Estudio de la actividad antifúngica del quitosano en solución y en películas", tesis doctoral, México, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- Reddy, B.; Arul, J.; Angers, P. y Couture, L. (1999), "Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality", *J. Agric. & Food Chem.*, 47(3): 1208-1216.
- Ríos, I.R.M. (1992), "Una perspectiva ecológica para el manejo de los problemas entomológicos de los granos almacenados en México", en *Memorias del IV Simposio Nacional sobre Problemas Entomológicos de Granos Almacenados*, San Luis Potosí, pp 6-11.
- Zhang, M.; Tan, T.; Yuan, H. y Rui, C. (2003), "Insecticidal and fungicidal activities of chitosan and oligo-chitosan", *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 18: 391-400.

Aprovechamiento integral de residuos agrícolas mediante compostaje

Whole Recycling of Agriculture Residues Through Composting

Moldes A. B.;^{1} Vázquez-Vázquez, M.;² Barral, M. T.;¹ Díaz-Fierros, F.¹*

Resumen

La cantidad de residuos generados por el hombre va en aumento de forma paralela al incremento de la población. Muchos autores han propuesto diferentes biorresiduos, como materiales lignocelulósicos y residuos agrícolas, para la producción de xilitol, ácido láctico y ácido cítrico o para la obtención de biocombustibles. En la mayoría de los casos sólo se utilizan fracciones específicas de estos biorresiduos como fuente de carbono para la producción biotecnológica de aditivos alimentarios o biocombustibles, permaneciendo otras fracciones como residuo. Además, tras la producción biotecnológica de estos aditivos se genera una gran cantidad de biomasa, así como medio de cultivo, con un elevado contenido en nitrógeno. Por otra parte, en gran cantidad de casos la competencia con otros sustratos impiden la utilización de muchos residuos agroindustriales como materia prima para estos fines. Con el fin de llevar a cabo un aprovechamiento integral de estos residuos sería interesante utilizar todas sus fracciones. El compostaje es la descomposición biológica y

¹ Departamento de Edafología y Química Agrícola, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela (España).

² Área de Tecnología de los Alimentos, Departamento de Química Analítica, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Santiago de Compostela-Campus de Lugo, 27002-Lugo (España).

* e-mail: amoldes@usc.es

la estabilización de compuestos biodegradables bajo condiciones controladas. El compostaje es un proceso aeróbico (requiere oxígeno) y es realizado por microorganismos, los cuales utilizan los componentes orgánicos de estos residuos como fuente de energía. Para conseguir las condiciones idóneas que nos permitan completar el proceso de compostaje, puede ser conveniente la mezcla de residuos de distintas características, siendo especialmente relevante la relación C/N de los materiales compostables. El compost puede ser utilizado como acondicionador del suelo o fertilizante orgánico. Los principales factores que se deben controlar durante el proceso de compostaje incluyen parámetros medio ambientales como: temperatura, humedad, pH, aireación y parámetros intrínsecos del sustrato, como relación C/N, tamaño de partícula y contenido en nutrientes.

Abstract

The amount of waste increases day by day in parallel to the increasing of population. Many authors have proposed the biotechnological production of food additives such as xylitol, lactic acid and citric acid or biofuels like ethanol from different biowaste like lignocellulosic materials or agriculture residues. In most of the cases, only specific fractions are employed as carbon source for food additives or biofuels remaining other fractions. Moreover, after the biotechnological production of food additives the fermentation broth supposes an additional residue with a high content in nitrogen. On the other hand, sometimes the competition with other substrates prevents the immediate use of agriculture residues for these purposes. For, the whole use of these residues, it would be interesting to utilize all the biowaste fractions. Composting could be a successful strategy for the sustainable complete recycling of biowaste. Composting is the biological decomposition and stabilisation of the biodegradable components under controlled conditions that can be used as soil conditioners and/or organic fertilizers. It is an aerobic process (requires oxygen) and it is carried out by microorganisms which metabolize organic waste as an energy source. In order to get the best conditions for composting can be interesting to mix different biowaste being especially important the relation C/N. The compost elaboration depends on several basic conditions. The main factors in the control of composting include environmental parameters as temperature, moisture content, pH, aeration and substrate nature parameters like C/N ratio, particle size and nutrient content.

Introducción

Dariamente se genera gran cantidad de residuos agroalimentarios que son cada vez más difíciles de recoger y tratar. Algunos autores han propuesto la utilización de estos residuos para la producción de determinados aditivos alimentarios o para la obtención de etanol como alternativa al uso de sustratos no renovables (Linko y Javanainen, 1996; Hofvendalh y Hahn-Hägerdal, 1997; Hofvendalh y Hahn-Hägerdal, 1999; Sreenath *et al.*, 2001; Bustos *et al.*, 2004; Bustos *et al.*, 2005).

Generalmente estos residuos tienen que sufrir una serie de etapas de fraccionamiento que permitan obtener la fracción adecuada en cada caso y con las características idóneas para realizar los procesos sacarificativos y fermentativos correspondientes (Moldes *et al.*, 1999; Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 1999; Moldes *et al.*, 2002; Bustos *et al.*, 2005). Tras las etapas de fraccionamiento, las fracciones a aprovechar se suplementan con nutrientes y se ponen en contacto con el microorganismo adecuado para la obtención del producto que interese en cada caso. Generalmente durante estos procesos se generan determinadas fracciones que no son utilizadas y que podrían emplearse como materia prima para procesos de compostaje. Además, durante la producción biotecnológica de los aditivos alimentarios se obtiene gran cantidad de biomasa microbiana que junto con el medio fermentativo, tras la recuperación del producto, podría ser una buena fuente de nitrógeno para potenciar o acelerar los procesos de compostaje.

El compostaje se puede definir como un proceso controlado y acelerado de descomposición de las partes orgánicas de los residuos, básicamente aerobio, que da lugar a un producto estable llamado *compost*. El *compost* es el resultado de la transformación y estabilización de restos orgánicos por la acción de microorganismos en presencia de oxígeno y agua; sus características dependen de las materias primas y del proceso de compostaje. Durante éste, componentes tales como proteínas, celulosa y hemicelulosas, son utilizados por los microorganismos como fuentes de nitrógeno y carbono, respectivamente. Uno de los parámetros intrínsecos más importantes considerar, en un residuo susceptible de ser compostado, es la relación carbono/nitrógeno (C/N), que debe oscilar entre 25-35. Además, existen otros factores extrínsecos como la humedad y oxigenación que desempeñan un papel fundamental en el proceso de estabilización del *compost*.

En cuanto a sus aplicaciones, la aplicación más interesante del *compost* es como enmienda orgánica en agricultura y restauración de suelos, con el fin de mantener

o incrementar el contenido de materia orgánica del suelo. Otros usos son su utilización como fertilizante, con el objeto de incrementar el rendimiento de las cosechas o como componente de sustratos hortícolas y de jardinería.

Los residuos agrícolas

Cuando se quiere utilizar residuos agroindustriales para la producción biotecnológica de diferentes aditivos alimentarios, se tienen que sortear una serie de etapas de fraccionamiento que varían en función del producto de interés.

La mayoría de los residuos agroindustriales presenta una naturaleza lignocelulósica cuyo fraccionamiento está condicionado por el hecho de que la celulosa, las hemicelulosas y la lignina son de naturaleza polimérica y se hallan interpenetradas, por lo que existe entre ellas uniones físicas y químicas, de tal modo que los procedimientos clásicos de fraccionamiento (cristalización, precipitación, extracción) no son satisfactorios para su separación individual, ya que el aislamiento de uno de los polímeros implica la degradación de la estructura de los otros (Patel *et al.*, 1992; Hofvendal y Hahn-Hägerdal, 1999).

Para el aislamiento de la fracción hemicelulósica se pueden aplicar procesos con ácidos diluidos y temperaturas elevadas que permitan la solubilización casi total de las hemicelulosas y parte de la lignina (lignina soluble en ácido), quedando un residuo sólido compuesto por celulosa y lignina (Ray *et al.*, 1985; Harris *et al.*, 1984; Bustos *et al.*, 2004; Bustos *et al.*, 2005). El ácido más utilizado para desarrollar este proceso es el ácido sulfúrico, pero pueden utilizarse otros suficientemente fuertes como ácido clorhídrico, ácido nítrico o ácido fosfórico. Otros procedimientos alternativos para el aislamiento de la fracción hemicelulósica son los métodos hidrotérmicos, que se basan en la utilización de agua a elevadas temperaturas, lo que permite la liberación de los grupos acetilo de las hemicelulosas y crea un medio ácido que produce la solubilización, parcial o total, de las hemicelulosas. Además, existen otro tipo de tratamientos para la obtención de la fracción hemicelulósica que se basan en la utilización de enzimas, concretamente de xilanasas.

Para el aislamiento de la fracción celulósica de los residuos agroindustriales, se pueden utilizar diferentes procesos de deslignificación entre los que se encuentran los métodos tradicionales, basados en la utilización de NaOH, sulfato o sulfito, así como los métodos basados en la utilización de organosolventes como ácido acético y los métodos realizados con agentes oxidantes como cloro molecular, óxidos de cloro, hipoclorito, ozono o peróxidos de hidrógeno.

En la tabla 1 se recogen algunos residuos agroindustriales, así como los microorganismos utilizados para obtener diferentes aditivos alimentarios. Cada microorganismo condicionará las etapas de fraccionamiento de los diferentes residuos. Así por ejemplo, cuando se utiliza *Aspergillus niger* para la producción biotecnológica de ácido láctico se puede obviar la etapa de sacarificación de la celulosa, ya que el propio hongo, bajo determinadas condiciones, es capaz de producir enzimas de forma endógena. Estos enzimas permiten romper las cadenas de celulosa en monómeros de glucosa. Por el contrario, cuando el ácido láctico se produce utilizando bacterias lácticas se necesitará siempre una etapa de hidrólisis de la celulosa, ya sea vía enzimática o a través de hidrólisis ácida (Parajó *et al.*, 1997; Moldes *et al.*, 1999; Bustos *et al.*, 2005). El uso de un microorganismo u otro depende básicamente del producto que se quiera obtener así como de las condiciones de operación que se pretendan utilizar. En general, para la producción biotecnológica de ácido láctico se emplean bacterias por ser éstas más rápidas que los hongos, mientras que para la producción de xilitol se utilizan levaduras, ya que las bacterias por lo general no tienen la capacidad de fermentar los azúcares a xilitol.

En la mayoría de los procesos biotecnológicos de obtención de aditivos alimentarios recogidos en la tabla 1 se generan una serie de corrientes residuales. Así, la producción biotecnológica de xilitol generalmente se plantea a partir de la fracción hemicelulósica, de tal manera que la fracción celulósica de los respectivos materiales queda como residuo (Cruz *et al.*, 2000a, b). Por otra parte, la producción de ácido láctico normalmente se propone a partir de la fracción celulósica, principalmente porque existen pocas bacterias lácticas que puedan metabolizar las hemicelulosas. Estas fracciones no utilizadas pueden ser usadas, tras una etapa de acondicionamiento en la que se corrija básicamente la acidez o basicidad, como materia prima para procesos de compostaje. Además, aquellos residuos agroalimentarios cuya implantación a nivel industrial para la producción de aditivos alimentarios es lenta o más difícil de lo esperado, pueden ser evaluados de forma integral para la elaboración de compost.

Definición de *compost*

El compost puede ser descrito como la “materia orgánica que ha sido estabilizada hasta transformarse en un producto parecido a las sustancias húmicas del suelo, que está libre de patógenos y de semillas de malas hierbas, que no atrae insectos ni otros vectores de enfermedad, que puede ser manejada y almacenada sin ocasionar molestias y que es beneficiosa para el suelo y el crecimiento de las plantas” (Haug, 1993).

Tabla 1. Producción biotecnológica de aditivos alimentarios a partir de diferentes residuos agroindustriales

<i>Residuo</i>	<i>Microorganismo</i>	<i>Aditivo alimentario</i>	<i>Referencias</i>
Madera de eucalipto	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Ácido láctico	Moldes y col., 2001
Alfalfa	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Ácido láctico	Sreenath y col., 2001
Zuros de maíz	<i>Lactobacillus delbrium</i>	Ácido láctico	Luo y col., 1997
Celulosa pura	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Ácido láctico	Venkatesh, 1997
Celulosa pura	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Ácido láctico	Abe y Takagi, 1991
Papel de periódico	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Ácido láctico	Abe y Takagi, 1991
Residuos de papel	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Ácido láctico	Schmidt y Padukone, 1997
Hierba	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Ácido láctico	Chen y Lee, 1997
Poda de sarmiento	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Ácido láctico	Bustos y col., 2004
Cascarilla de cebada	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Xilitol	Bustos y col., 2005
Hojas de maíz	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Xilitol	Cruzy col., 2000a, b
Zuros de maíz	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Xilitol	Cruzy col., 2000b
Bagazo de caña de azúcar	<i>Candida guilliermondii</i>	Xilitol	Cruzy col., 2000b
Madera de pino	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaxantina	Felipe y col., 1996
Madera de eucalipto	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaxantina	Parajó y col., 1997
Hemicelulosas	<i>Propionobacterium acidipropionici</i>	Ácido propiónico	Cruzy Parajó, 1998
Piña	<i>Aspergillus niger</i>	Ácido cítrico	Ramsay y col., 1998
Maíz	<i>Aspergillus niger</i>	Ácido cítrico	Tran y col., 1998
Suero de queso	<i>Aspergillus niger</i>	Ácido cítrico	Xie y West, 2004
			Samragy y col., 1996

El compostaje es un proceso natural, que realizan hongos, bacterias y actinomicetos existentes en los propios residuos, a los que únicamente hay que proporcionar las condiciones ambientales idóneas (principalmente humedad y aireación) para optimizar este proceso de transformación. El compostaje permite reducir el peso, el volumen y la reactividad del residuo orgánico, al tiempo que se logra que un sustrato muy heterogéneo experimente una transformación de la materia orgánica más biodegradable, liberando CO₂, agua, elementos minerales y energía, hasta quedar finalmente la fracción orgánica más estable e higienizada, que recibe el nombre de compost (Pomares y Canet, 2001).

Siendo el compostaje propiamente dicho un proceso aerobio, se ha desarrollado más recientemente la tecnología de biometanización o tratamiento anaerobio, que conduce a la obtención de biogás junto con un residuo de digestión que puede ser sometido a un proceso de maduración en condiciones de aerobiosis, resultando en un compost de cualidades semejantes a las del obtenido mediante compostaje aerobio.

Características del compost

Las características del compost dependen de las materias primas y del proceso de compostaje, presentando variaciones entre plantas de tratamiento e incluso dentro de la misma planta según la época del año. Aunque en la actualidad se asocia frecuentemente el compostaje con la gestión de la materia orgánica procedente de los residuos sólidos urbanos (RSU), diversas materias orgánicas biodegradables pueden ser compostadas, tales como restos vegetales provenientes de poda, residuos de la industria agroalimentaria, residuos forestales, etcétera (Guerra-Rodriguez *et al.*, 2001a y b; Díaz *et al.*, 2000a y b; Paredes *et al.*, 2002; Ioanna *et al.*, 2003., Guerra-Rodriguez *et al.*, 2003; Meunchang *et al.* 2005). En ocasiones las materias brutas no presentan separadamente las características idóneas, pero pueden combinarse para obtener mezclas adecuadas para el compostaje. Una cuestión primordial para conseguir un compost de elevada calidad es reducir la contaminación en origen de las materias brutas. Si bien la contaminación biológica se elimina durante el proceso, otros contaminantes, como los metales pesados, pueden aumentar su concentración relativa durante el compostaje.

El establecimiento de parámetros de calidad pretende fundamentalmente que el compostaje no resulte ser un proceso de transferencia de contaminación de los residuos al medio agrícola o natural. Pero además, la calidad del compost es fundamental

para conseguir una buena aceptación por parte de sus potenciales consumidores y condiciona también su precio de venta y posibilidades de uso.

Los requerimientos de calidad van dirigidos a conseguir un aspecto y olor aceptables, una higienización correcta, un bajo nivel de impurezas y contaminantes, un buen nivel de componentes agrónomicamente útiles y cierta constancia de características (Soliva, 2002). Resulta difícil proponer determinados valores concretos como deseables para el compost. Los principales parámetros utilizados para valorar la calidad del compost se recogen en la tabla 2.

En la bibliografía, los principales parámetros a controlar durante el proceso de compostaje se pueden dividir en dos grupos: por una parte, aquellos que dependen del medio como son pH, temperatura, humedad y aireación; y por otro, aquellos que son propios de cada material como relación C/N, tamaño de partícula y contenido en nutrientes.

La temperatura es fundamental en el proceso de compostaje, ya que pequeñas variaciones pueden cambiar por completo la actividad microbiana, mucho más que las variaciones en otros parámetros. Respecto al contenido en humedad, ésta influye principalmente en la velocidad de descomposición de la materia orgánica, encontrándose el valor óptimo entre 50 y 70%. Por otra parte, la aireación está considerada como el factor más importante a la hora de compostar, siendo imprescindible un estado de aerobiosis que permita obtener un compost con una relación C/N adecuada. En cuanto a la relación C/N, ésta también juega un papel relevante en el proceso de compostaje (Huang *et al.*, 2004), encontrándose el óptimo entre 25-35. Relaciones C/N mayores que las mencionadas ralentizan enormemente el proceso de compostaje y relaciones, en tanto que C/N menores provocan pérdidas de nitrógeno en forma de nitrógeno amoniacal, lo que daría lugar a la generación de malos olores.

Los análisis físico-químicos más frecuentemente realizados a las materias primas, susceptibles de compostar, tanto al principio como al final del proceso de compostaje son: pH, conductividad eléctrica, sólidos volátiles, carbono, nitrógeno, $\text{HH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, densidad, capacidad de retención de agua y elementos minerales (K, Ca, Mg, P y metales pesados) (Manios, 2004).

Materias primas para la elaboración de compost

En principio, cualquier bioresiduo, ya sea solo o en compañía de otros, puede ser susceptible de utilizarse para el proceso de compostaje, aunque nos concentraremos principalmente en el compostaje de residuos agrícolas y alimentarios. En la tabla 3 se

Tabla 2. Parámetros que pueden ser empleados para valorar la calidad del compost, según Soliva (2002)

<i>Categoría</i>	<i>Parámetros</i>	<i>Informa sobre...</i>
Físicos	Densidad aparente Coloración Olor Humedad Tamaño de partículas Capacidad de retención de agua Contaminantes inertes	Transporte, manejo, aplicación. Aceptación. Aceptación, higiene, impacto ambiental. Transporte, manejo, riqueza efectiva en nutrientes y contaminantes. Manejo, aceptación, efectos sobre el suelo. Efectos sobre el suelo, capacidad de almacenamiento de agua. Aceptación, impacto ambiental, seguridad.
Químicos	Contenido y estabilidad de materia orgánica Nutrientes Contaminantes Sales solubles	Efectos sobre el suelo, efectos sobre los vegetales, aceptación. Efectos sobre el suelo, efectos sobre los vegetales. Salud humana, efectos sobre el suelo, efectos sobre los vegetales, impacto ambiental. Efectos sobre el suelo, efectos sobre los vegetales, impacto ambiental.
Biológicos	Patógenos Semillas de malas hierbas	Salud humana, impacto ambiental. Efectos sobre el suelo, efectos sobre la producción.

repasan algunos residuos de este tipo propuestos en la bibliografía para compostar, así como su contenido en C y N. Como se puede observar, la mayoría de los materiales de naturaleza lignocelulósica presentan un elevado contenido de carbono pero una composición muy pobre en nitrógeno, dando lugar a relaciones C/N más altas de las consideradas como óptimas (25-35). De ahí que en muchos casos se proponga mezclar estos residuos agrícolas con otros que presentan un mayor contenido en nitrógeno, permitiendo equilibrar la relación C/N para una adecuada estabilización de estos residuos. Así, Koriki (1990) propuso compostar estiércol de cerdo, hojas de olivo y poda de sarmiento; Manios y colaboradores (2002) propusieron compostar sedimentos de aguas residuales con restos vegetales; Iranzo y colaboradores (2004) compostaron sedimentos de aguas residuales con paja de arroz, y Guerra y colaboradores (2001a, b y 2003) propusieron, por un lado, compostar residuos de cebada, de la industria cervecera, con estiércol de gallina y por otro, erizos de castaña con hojas de castaño y estiércol de gallina. Aunque el proceso de compostaje se conoce bastante bien, cada vez que se quieren combinar diferentes residuos varía el tiempo de compostaje (Meunchang *et al.*, 2005).

Una vez transcurrido el periodo de compostaje, el cual puede ser muy variable dependiendo del tipo de biorresiduo que estemos compostando, tiene lugar el proceso de estabilización y formación del compost. En la tabla 4 se recogen las composiciones en cuanto a N y C de diferentes compost elaborados a partir de distintos residuos agrícolas. En algunas ocasiones, estos residuos se han mezclado, antes de ser compostados, con otros de distinta naturaleza como pueden ser lodos de depuración o estiércol. La relación C/N, en la mayoría de los casos, varía entre 10 y 13, siendo éste un valor óptimo, aunque una relación C/N menor de 20, en muchos casos permite obtener buenas condiciones de estabilización.

Aplicaciones del compost

La principal aplicación del compost es como enmienda orgánica en agricultura, es decir, como material destinado a mantener o incrementar el contenido de materia orgánica del suelo. La utilización del compost como enmienda es interesante porque muchas propiedades del suelo dependen del contenido de materia orgánica, principalmente la capacidad de almacenamiento y filtración, suministro de nutrientes y capacidad degradativa. El carbono del suelo desempeña también un papel esencial en el ciclo global del carbono y, por tanto, en la contaminación atmosférica por CO₂ y en el efecto invernadero. La emisión del CO₂ del suelo hacia la atmósfera es acelerada

Tabla 3. Contenido en C y N de diversos residuos agroindustriales propuestos para compostar

<i>Materia prima</i>	<i>Carbono (%)</i>	<i>Nitrógeno (%)</i>	<i>Relación C/N</i>	<i>Referencias</i>
Torta (extracción del aceite de oliva)	53.26	1.06	50	Manios y Balis, 1983
Hojas de olivo	50.50	1.67	30	Manios y col., 1996
Sarmiento	46.09	0.92	50	Manios y col., 1985
Bagazo	52.90	1.99	27	Koriki, 1990
Hojas de olivo, planta de pepino	31.96	1.98	16	Maniadakis y Manios, 2001
Estiércol de cerdo, hojas de olivo, sarmiento	41.17	2.13	19	Manousakis, 2001
Sedimentos de aguas residuales, hojas de olivo	41.71	3.24	13	Manios y col., 1997
Sedimentos de aguas residuales, restos vegetales	40.37	2.42	17	Manios y col., 2002
Residuos de comida, restos vegetales	46.01	1.23	37	Manios y Siminis, 1988
Tortas de extracción de caña de azúcar	48.00	1.80	27	Meunchang y col., 2005
Bagazo de caña de azúcar	36.00	0.36	100	Meunchang y col., 2005
Paja de arroz	80.30	0.93	86	Iranzo y col., 2004
Residuo de industria aceitera ¹	46.50	1.37	34	Paredes y col., 2002
Paja de maíz	77.40	7.0	11	Paredes y col., 2002
Torta de remolacha	15.00	2.5	6	Díaz y col., 2002 a y b
Resto de tomate	47.16	1.90	25	Kulcu y Yaldiz, 2004
Berenjena	48.44	1.55	31	Kulcu y Yaldiz, 2004
Pimienta	49.11	1.95	25	Kulcu y Yaldiz, 2004
Hierba	45.67	3.73	12	Kulcu y Yaldiz, 2004
Torta de remolacha	35.00	3.0	12	Madejón y col., 2001; Díaz y col., 2003

¹ Constituido por agua de lavado de las aceitunas, corrientes de los procesos de extracción del aceite, restos de aceituna y aceite.

Tabla 4. Contenido en C y N de diferentes residuos agroindustriales ya compostados

<i>Materia prima</i>	<i>Carbono (%)</i>	<i>Nitrógeno (%)</i>	<i>Relación C/N</i>	<i>Referencias</i>
Residuo de cebada y estiércol de gallina.	40.17	3.07	13	Guerra-Rodríguez y col., 2000, 2003
Erizos de castaña, hojas de castaño y estiércol de gallina.	41.03	3.09	13	Guerra-Rodríguez y col. 2001, a, b
Ramas de olivo y planta de pepino.	30.08	2.43	12	Maniadakis y Manios, 2001
Estiércol de cerdo y hojas de olivo, sarmiento.	35.83	2.85	12	Manousakis, 2001
Lodos de depuración y hojas de olivo.	37.84	3.22	12	Manios y col., 1997
Lodos de depuración y restos vegetales.	30.68	2.92	10	Manios y col., 2002
Residuos de comida y restos vegetales.	20.70	2.47	8	Manios y Siminis, 1988
Residuo industria aceitera ¹ y paja de maíz.	18.7	1.44	13	Paredes y col., 2002

¹ Constituido por agua de lavado de las aceitunas, corrientes de los procesos de extracción del aceite, restos de aceituna y aceite.

por diversos procesos degradativos; por el contrario, la restauración de los suelos degradados por erosión, minería, incendios, contaminación o infraestructuras, así como las buenas prácticas agrícolas encaminadas al mantenimiento de la materia orgánica del suelo pueden contribuir al secuestro del C y a mitigar el efecto invernadero. Los niveles de materia orgánica en los suelos son el resultado del balance entre la incorporación de compuestos orgánicos y su mineralización. En condiciones de equilibrio, los suelos presentan contenidos estacionarios de materia orgánica porque las incorporaciones de nuevos compuestos se compensan con las pérdidas por mineralización. Por el contrario, existe evidencia de que, con frecuencia, la materia orgánica no se repone adecuadamente en suelos de cultivo, pues se tiende a la especialización y al monocultivo, habiéndose producido también la separación del ganado de la producción agrícola (Commission of the European Communities, 2002). Por ello, es frecuente que los suelos sometidos a una explotación más o menos intensa presenten unos contenidos ordinariamente bajos de materia orgánica. Por otra parte, el compost también puede ser utilizado como fertilizante, con el objetivo de incrementar el rendimiento de las cosechas, con beneficios que se manifiestan de forma más clara a mediano y largo plazo. Pero además de estas aplicaciones que podemos considerar tradicionales, el compost puede encontrar aplicación en otros campos más innovadores. Uno de los más prometedores es la elaboración de sustratos, aplicación en la que puede ser utilizado solo o mezclado con otros productos, para sustituir materiales como la turba, un recurso escaso y no renovable.

Para que estas aplicaciones potenciales del compost se transformen en mercados consolidados es necesario informar sobre estas posibilidades al consumidor y ofrecerle un producto de características concretas, estables y definidas, que le confieran la consideración del producto, con el fin de que pueda existir una demanda definida en competencia con otros.

Conclusiones

Cada vez es mayor la cantidad de residuos agroindustriales generados por la actividad normal de cualquier país industrializado. La mayoría de estos residuos presenta un elevado contenido de materia orgánica susceptible de ser degradada por la acción de determinados microorganismos. Es por ello que en muchos casos estos residuos agroindustriales se utilizan para la producción biotecnológica de aditivos alimentarios, generándose la mayoría de las veces fracciones que no son utilizadas y que podrían emplearse como materia prima para la elaboración de compost. Generalmente los

procesos de compostaje tienen lugar a través de etapas fermentativas incontroladas, donde existe gran variedad de flora microbiana. Además del control de la temperatura, humedad y aireación, se necesita realizar, previamente al proceso de compostaje, un análisis exhaustivo de la materia prima que nos permita conocer su composición en cuanto a carbono, nitrógeno y elementos minerales. Generalmente es necesario combinar distintos residuos agroindustriales para obtener un compost con una relación C/N adecuada y una buena estabilización.

Bibliografía

- Abe, S.; Takagi, M. (1991), "Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid", *Biotechnol. Bioeng.*, 37: 93-96.
- Bustos, G.; Moldes, A.B.; Cruz, J.M.; Domínguez, J.M. (2004), "Production of fermentable media from trimming wastes and bioconversion into lactic acid by *Lactobacillus pentosus*", *J. Sci. Food Agric.*, 84: 2105-2112.
- _____; Moldes, A.B.; Cruz, J.M.; Domínguez, J.M. (2005), "Production of lactic acid from vine-trimming wastes and viticulture lees using a simultaneous saccharification fermentation method", *J. Sci. Food Agric.*, 85: 466-472.
- Chen, R.; Lee, Y.Y. (1997), "Membrane-mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 63(65): 435-448.
- Commission of the European Communities (2002), "Towards a thematic strategy for Soil Protection", Communication from the Commission to the Council, the European Parliament, the Economic and Social Committee and the Committee of the Regions.
- Cruz, J.M.; Domínguez, J.M.; Domínguez H.; Parajó, J.C. (2000a), "Xylitol production from barley bran hydrolysates by continuous fermentation with *Debaryomyces hansenii*", *Biotechnol. Letters.*, 22: 1895-1898.
- _____; Domínguez, J.M.; Domínguez H.; Parajó, J.C. (2000b), "Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion into xylitol", *Food Biotechnol.*, 4: 79-97.
- _____; Parajó, J.C. (1998), "Improved astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic wood hydrolysates containing glucose and cellobiose", *Food Chemistry*, 4(63): 479-484.
- Díaz, J.; Eugenio, M.E.; Jiménez, L.; Madejón, E.; Cabrera, F. (2003), "Modelling vinasse/cotton waste ratio incubation for optimum composting", *Chemical Engineering Journal*, 93: 233-240.

- Díaz, J.; Madejón, E.; López, F.; López, R.; Cabrera, F. (2002b), "Optimization of the rate vinasse/grape marc for co-composting process", *Process Biochemistry*, 37: 1143-1150.
- _____; Madejón, E.; López, F.; López, R.; Cabrera, F. (2002a), "Composting of vinasse and cotton gin waste by using two different systems", *Resources, Conservation and Recycling*, 34: 235-248.
- Díaz Fierros Viqueira, F. (2002), "Funciones y necesidades en materia orgánica de los suelos de Galicia", Curso de verano de la USC, *O Compost: avances na produción, calidade e usos*.
- Felipe, M.G.A.; Vitolo, M.; Mancilla, I.M.; Silva, S.S. (1996), "Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hydrolyzate by *Candida guilliermondii*", *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.*, 18: 251-254.
- Guerra Rodriguez, E.; Vázquez, M.; Díaz Raviña, M. (2000), "Co-composting of barley wastes and solid poultry manure", *Biores. Technol.*, 75: 223-225.
- _____; Vázquez, M.; Díaz Raviña, M. (2001a), "Co-composting of chest nut burr and leaf litter with solid poultry manure", *Biores. Technol.*, 78: 107-109.
- _____; Vázquez, M.; Díaz-Raviña, M. (2001b), "Dynamics of physicochemical and biological parameters during the co-composting of chestnut burr/leaf litter with solid poultry manure", *J. Sc. Food Agric.*, 81: 648-652.
- _____; Vázquez, M.; Díaz Raviña, M. (2003), "Dynamics of the co-composting of barley waste with liquid poultry manure", *J. Sc. Food Agric.*, 83: 166-172.
- Harris, J.F.; Baker, A.J.; Zerbe, J.I. (1984), "Two stage dilute acid hydrolysis of hardwood for ethanol production", *Energy from biomass and wastes*, 8: 1151-1170.
- Haug, R.T. (1993), *The practical handbook of compost engineering*, Lewis Publishers.
- Hofvendahl, K.; Hahn-Hagerdal, B. (1997), "L (+) lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of lactobacilli and lactococci", *Enzyme Microbiol. Biotechnol.*, 20: 301-307.
- _____; Hahn-Hagerdal, B. (1999), "Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources", *Enzyme Microbiol. Biotechnol.*, 26: 87-107.
- Huang, G.F.; Wong, J.W.C.; Wu, Q.T.; Nagar, B.B. (2004); "Effect of C/N on composting of pig manure with sawdust", *Waste Management*, 24: 805-813.
- Huang, Y.L.; Wu, Z.; Zhang, L.; Cheung, C.M.; Yang, S.T. (2002), "Production of carboxylic acids from hydrolyzed corn meal by immobilized cell fermentation in a fibrous-bed bioreactor", *Biores. Technol.*, 82(1): 51-59.

- Ioanna, M.; Ehaliotis, C.; Kotsou, M.; Balis, C.; Georgakakis, D. (2003), "Respiration profiles in monitoring the composting of by-products from the olive agro-industry", *Biores. Technol.*, 87: 331-336.
- Iranzo, M.; Cañizares, J.V.; Roca-Pérez, L.; Sainz-Pardo, I.; Mormeneo, S.; Boluda, R. (2004), "Characteristics of rice straw and sewage sludge as composting materials in Valencia (Spain)", *Biores. Technol.*, 95: 107-112.
- Koriki, A. (1990), "Production compost from skin of pressed grapes and its effect as a soil amendment in a greenhouse tomato cultivation", Graduate Thesis, School of Agricultural Technology, Technological and Educational Institute of Crete.
- Kulcu, K.; Yaldiz, O. (2004), "Determination of aeration rate and Kinetics of composting some agricultural wastes", *Biores. Technol.*, 93: 49-57.
- Linko, Y.; Javanainen, Y. (1996), "Simultaneous liquefaction, saccharification, and lactic acid fermentation on barley strach", *Enzyme Microbiol. Biotechnol.*, 19: 118-123.
- Luo, J.; Xia, L.; Lin J.; Cen, P. (1997) "Kinetics of simultaneous saccharification and lactic acid fermentation processes", *Biotechnol Prog.*, 13: 762-767.
- Madejón, E.; Díaz, M.J.; López, R.; Cabrera, F. (2001), "Co-composting of sugar beet vinasse: influence of the organic matter nature of the bulking agents used", *Biores. Technol.*, 76: 275-278.
- Maniadakis, K.; Manios VI. (2001), "Composting vegetables wastes from greenhouses", Research report: School of Agricultural Technology, Technological and Educational Institute of Crete and Municipality of Ierapetra.
- Manios, T. (2004), "The composting potential of different organic solid wastes: experience from the island of Crete", *Environment International*, 29: 1079-1089.
- _____; Kefakis, M.; Syminis, H.; Manios, V.; Dialynas, G. (1996), "Sewage sludge composting with olive trees leaves as a bulking agent", Proceedings of the 6th Panhellenic Conference of the Greek Soil Society, Nauplio, 201-210.
- _____; Laux, D.; Manios, V.; Stentiford, E.I. (2002), "Cattail plants' biomass as a bulking agent in sewage sludge composting and the effect of the produced compost on young cattail plants' growth", *Compost Sci. Util.*
- Manios, V.; Balis, C. (1983), "Respirometry to determine optimum conditions for the biodegradation of extracted olive press.cake", *Soil Biol. Biochem.*, 15: 75-83.
- _____; Tsikalas, P.; Verdonck, O. (1985), "Decomposition of vinecanes in heap and evaluation of produced compost", *Acta Hort.*, 172: 39-53.
- Manios, VI.; Siminis, H.I. (1988), "Town refuse compost of Heraklio", *Biocycle*, 29: 44-47.
- _____; Stentiford, E.I.; Kefakis, M.D.; Syminis, C.I.; Dialynas, G.; Manios, T. (1997), "Development of a methodology for the composting of sludge of Crete",

- en Stentiford, E.I. (ed.), *Proceedings of International conference in "organic recovery and biological treatment"*, Reino Unido, Harrogate University of Leeds, pp. 199-204.
- Manousakis, M. (2001), "Evaluating the possible use of pig manure from Creta farm for composting", Graduate Thesis, School of Agricultural Technology, Technological and Educational Institute of Crete.
- Meunchang, S.; Panichsakpatana, S.; Weaver, R. W. (2005), "Co-composting of filter cake and bagasse; by-products from a sugar mill", *Biores. Technol.*, 96: 437-442.
- Moldes, A.B.; Alonso, J.L.; Parajó, J.C. (1999), "Cogeneration of cellobiose and glucosa from pretreated Wood and bioconversion to lactic acid: a Kinetic study", *J. Biosc. Bioeng.*, 87: 787-792.
- _____; Alonso, J.L.; Parajó, J.C. (2001), "Strategies to improve the bioconversion of processed Wood into lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 76(3): 279-284.
- _____; Cruz, J.M.; Domínguez, J.M.; Parajó, J.C. (2002), "Production of a cellulosic substrate susceptible to enzymatic hydrolysis from prehidrolized barley husks", *Agric. Food Sc. in Finland.*, 11: 151-58.
- Mondini, C.; Fornasier, F.; Cínico, T. (2004), "Enzymatic activity as a parameter for the characterization of the composting process", *Soil Biology & Biochemistry*, 36: 1587-1594.
- Parajó, J.C.; Santos, V.; Vázquez M.; Cruz, J.M. (1997), "Production of carotenoids by *Xanthophyllomyces dendrorhous* on enzymatic hydrolysates of prehydrolysed Wood", *Food Chemistry*, 3(60): 347-355.
- Paredes, C.; Bernal, M.P.; Cegarra, J.; Roig, A. (2002), "Bio-degradation of Rolive mill wastewater slugge by its co-composting with agricultural wastes", *Biores. Technol.*, 85: 1-8.
- Patel, M.M.; Bahatt, R.M. (1992), "Optimisation of the alkaline peroxide pretreatment for the delignification of wheat straw and its aplications", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 53: 253-263.
- Pélaez, C.; Mejía, A.; Planas, A. (2004), "Development of a solid phase kinetic assay for determination of enzyme activities during composting", *Process Biochemistry*, 39: 971-975.
- Pomares, F.; Canet, F. (2001), "Los residuos orgánicos utilizables en Agricultura: Origen, composición y características", en Boixadera, J. y Teira, M.R. (eds.), *Aplicación agrícola de residuos orgánicos*, Universitat de Lleida.
- Ramsay, J.A.; Hassan, M.C.; Ramsay, B.A. (1998), "Biological conversion of hemicellulose to propionic acid", *Enzyme Microbiol. Biotechnol.*, 22(4): 292-295.

- Ray, L.; Mukherjee, G.; Majumdar, S.K. (1985), "Kinetic studies of wheat straw hydrolysis using sulphuric acid", *Can. J. Chem. Eng.*, 63: 840-844.
- Samragy, Y.A.; Khorshid, M.A.; Foda, M.I.; Shihata, A.E. (1996), "Effect of fermentation conditions on the production of citric acid from cheese whey by *Aspergillus niger*", *Int. J. Food Microbiol.*, 29: 411-416
- Schmidt, S.; Padukone, N. (1997), "Production of lactic acid from wastepaper as a cellulosic feedstock", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 18: 10-14.
- Soliva, M. (2002), "Calidades do compost: influencia do tipo de materiais tratados e das condições do proceso", Curso de verano de la usc, *O Compost: avances na produción, calidade e usos*.
- Sreenath, H.K.; Moldes, A.B.; Koegel, R.G.; Straub, R.J. (2001), "Lactic acid from agriculture residues", *Biotechnol Letters*, 23: 179-184.
- _____; Koegel, R.G.; Moldes, A.B.; Jeffries, T.W.; Straub, J. (1999), "Enzymatic saccharification of alfalfa fibre after liquid hot water pre-treatment", *Process Biochemistry*, 35: 33-41.
- Tran, C.T.; Si, L.I.; Mitchel, D.A. (1998), "Selection of a strain of *Aspergillus* for the production of citric acid from pineapple waste in solid-state fermentation", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 14: 399-404.
- Vankatesh, K.V. (1997), "Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid", *Biores. Technol.*, 62: 91-98.
- Xie, G.; West, T.P. (2004) "Fungal citric acid production by *Aspergillus niger* ATCC 26550", Abstract, 39th Midwest Regional Meeting of the American Chemical Society, Manhattan, EU.

**Aprovechamiento del lirio acuático
para la producción de azúcares fermentables**
**Acid Hydrolysis of Water Hyacinth
for Fermentable Sugars Production**

*Saucedo Luna, J.; Serna González, M.; Castro Montoya, A.J. **

Resumen

En este trabajo se realizó la hidrólisis del lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) usando ácido sulfúrico a diferentes concentraciones (2-6%), temperaturas (80-122°C) y tiempos del experimento (0-300 min). Las condiciones óptimas para la hidrólisis fueron: 4% de H₂SO₄ a 100°C para un tiempo de reacción de 60 minutos para las cuales se logra un rendimiento de 15.3 g glucosa/L, 15.0 g xilosa/L, 10.0 g arabinosa/L, 3.5 g ácido acético /L y 0.45 g furfural/L.

Abstract

In this work, water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) was hydrolysed using sulfuric acid at variable concentration (2-6%), temperature (80-122°C) and time (0-300 min). Optimal conditions for hydrolysis were 4% H₂SO₄ at 100 °C for 60 min, wich yield a solution with 15.3 g glucose/L, 15.0 g xylose/L, 10.0 g arabinose/L, 3.5 g acetic acid/L and 0.45 g furfural/L.

* Facultad de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. M, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán. Tel: 01 (443)3253584, e-mail: ajcastro@zeus.umich.mx

Introducción

El lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) es una planta flotante, originaria del Amazonas. Por la hermosura de sus flores su cultivo se ha extendido hacia la mayoría de las zonas tropicales y subtropicales del mundo. Sin embargo, debido a su alta velocidad de reproducción, principalmente asexual, así como la falta de enemigos naturales en los lugares donde se reproduce, ha ocasionado su reproducción acelerada en grandes extensiones, trayendo como resultado que importantes actividades económicas como la transportación a través de ríos y lagos, la pesca y la irrigación de los cultivos hayan sido fuertemente afectadas. Además, cuando grandes extensiones de agua están cubiertas por el lirio acuático, la evatranspiración se vuelve de tres a cuatro veces mayor, con la consecuente pérdida de agua, principalmente en temporadas de sequía. No menos dañino es el efecto que causa cuando esta proliferación afecta a las estaciones hidroeléctricas de generación de energía. A nivel mundial se ha tratado de erradicar el lirio acuático o de encontrar alternativas comercialmente factibles, pero todas ellas han fracasado.^{1,2,3} Es una planta que crece tan rápido, que bajo ciertas condiciones climatológicas puede reproducirse a un ritmo de 150 toneladas/hectárea-año.⁴

El aprovechamiento de los materiales lignocelulósicos tales como el lirio acuático para la obtención de soluciones azucaradas tiene un doble impacto: por un lado su utilización, lo que implicaría la eliminación de todos los males que provoca, y por otro, la generación de un producto con un valor agregado que mejore la economía de un proceso.⁵

Ácidos minerales diluidos pueden ser utilizados para realizar una hidrólisis preliminar también llamada prehidrólisis. Ésta consiste en la hidrólisis del material hemicelulósico, dejando sin alteraciones el material celulósico, así como la lignina. H_2SO_4 ^{6,7}, HCl ⁸, HF ⁹ o CH_3COOH ¹⁰ son los ácidos que comúnmente se han utilizado como catalizadores. Estos ácidos liberan protones que rompen los enlaces heterocíclicos, los cuales unen los monómeros de azúcar de las cadenas poliméricas formados por hemicelulosa, celulosa y lignina. El rompimiento de estos enlaces produce compuestos como xilosa, glucosa y arabinosa. Además son producidos otros oligómeros como el furfural, así como el ácido acético. Se puede realizar una hidrólisis cuantitativa de la hemicelulosa sin afectar a la celulosa, ya que los enlaces de esta última son mucho más fuertes, por lo que siempre se obtendrá un residuo sólido formado por lignina y celulosa cuando se haga una prehidrólisis de los materiales lignocelulósicos del lirio acuático. Los hidrolizados producidos pueden ser utilizados para la obtención de xilitol¹¹ o para la producción de proteínas, debido al alto conteni-

do de xilosa. Con todo esto, el objetivo del presente trabajo es estudiar la prehidrólisis del lirio acuático usando ácido sulfúrico como catalizador.

Materiales y métodos

Las muestras de lirio se obtuvieron del manantial de la Mintzita, ubicado a 20 minutos de la ciudad de Morelia, Michoacán. Se dejaron secar al aire durante una semana; posteriormente, se trituraron y tamizaron, utilizando un tamiz universal núm. 50, separando las partículas con un diámetro promedio de 0.5 mm; la muestra se homogeneizó y se guardó en bolsas cerradas para evitar variación de la humedad durante la investigación.

El análisis de las principales fracciones del lirio acuático (celulosa, hemicelulosas y lignina Klason) se realizó usando una hidrólisis ácida cuantitativa bajo condiciones estándares (Garrote, Dominguez y Parajó, 1999). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Contenido de material lignocelulósico en el lirio acuático

<i>Componentes</i>	<i>Porcentaje en base seca</i>
Celulosa	18.95
Hemicelulosa	39.4
Lignina	4.25

Como podemos observar en la tabla anterior, el contenido en hemicelulosa es muy alto en comparación con otras fuentes de biomasa, indicando que este material puede procesarse mediante hidrólisis de manera relativamente sencilla para obtener disoluciones azucaradas que permitan su posterior proceso de fermentación, o bien, para la producción de xilitol.

Para establecer las condiciones óptimas de obtención de hidrolizados se estudiaron tres variables: concentración de ácido, temperatura y tiempo de hidrólisis. Se utilizó ácido sulfúrico en concentraciones de 2, 4 y 6%, así como temperaturas de 80, 100 y 122°C. Los hidrolizados se obtuvieron con 50 g de materia prima (ácido, agua y lirio), manteniendo constante la relación líquido/sólido a 10/1. La fracción líquida estuvo compuesta por el peso correspondiente al agua y al ácido sulfúrico (densidad 1.634)

y el contenido de humedad del lirio. La fracción de sólido correspondió sólo a los gramos de materia seca que aportó el lirio.

El material se pesó en frascos de vidrio esterilizados, con tapa de rosca. La hidrólisis del lirio a 122°C en diferentes tiempos y concentraciones, se realizó en autoclave Napco (modelo 81100; Winchester, VA) o Tuttnauer (modelo 2340; Ronkonkoma, NY). Las temperaturas 80 y 100°C se obtuvieron en baño de agua PolyScience (modelo 20L-M; Niles, IL) o Presicion Scientific (modelo 66648; Winchester, VA). Los hidrolizados se filtraron en papel Whatman núm. 2 (15 cm de diámetro). Para cuantificar el total de sólidos se enjuagaron los frascos con agua destilada y se filtró a través del papel filtro. Las muestras se secaron a 105°C por 24 horas. Se tomaron alícuotas de 8 ml de volumen inicial filtrado de cada hidrolizado. Estas muestras se utilizaron para determinar carbohidratos y ácido acético por cromatografía de líquidos de alta resolución, así como compuestos fenólicos por espectrofotometría. Para el análisis de los hidrolizados se partió de 50 ml de hidrolizados obtenidos en las condiciones expuestas anteriormente. Una parte se filtró a través de membranas de 0.45 micras de diámetro de poro. El filtrado se diluyó y se analizó por cromatografía líquida de alta resolución. Otra alícuota determinó su absorbencia en el UV a 280 nm para la determinación de furfural.

Para nuestro estudio se utilizó una columna de intercambio iónico ION-300 con precolumna recomendada para separación de alcoholes, ácidos orgánicos y carbohidratos, capaz de resolver como picos separados el ácido acético, la glucosa, la xilosa y la arabinosa. Todos estos compuestos son de interés en nuestro estudio.

Resultados y discusión

En la tabla 1 se muestra que el lirio acuático tiene mayores contenidos de hemicelulosa que otros materiales herbáceos, tales como la paja de sorgo¹³ y el bagazo de caña.¹⁴ El alto contenido de hemicelulosa (39.4%) hace a este material adecuado para la producción de xilosa. Los hidrolizados fueron obtenidos usando 2, 4 y 6% de H₂SO₄ a 80, 100 y 122°C. En las figuras 1 a 5 se muestran los perfiles de concentraciones de algunos de ellos. En las figuras 1, 2 y 3 se observa que la concentración de xilosa permanece constante después de un tiempo de reacción, pero la concentración de glucosa y arabinosa alcanzan un máximo para posteriormente decrecer con el tiempo de reacción. Este comportamiento sugiere que existen reacciones de descomposición en forma simultánea a la sacarificación, conduciendo hacia subproductos tales como el furfural y el ácido acético. Los perfiles de estos subproductos se muestran en las figuras 4 y 5, respectivamente.

Figura 1. Perfil experimental de la concentración de xilosa a 100°C

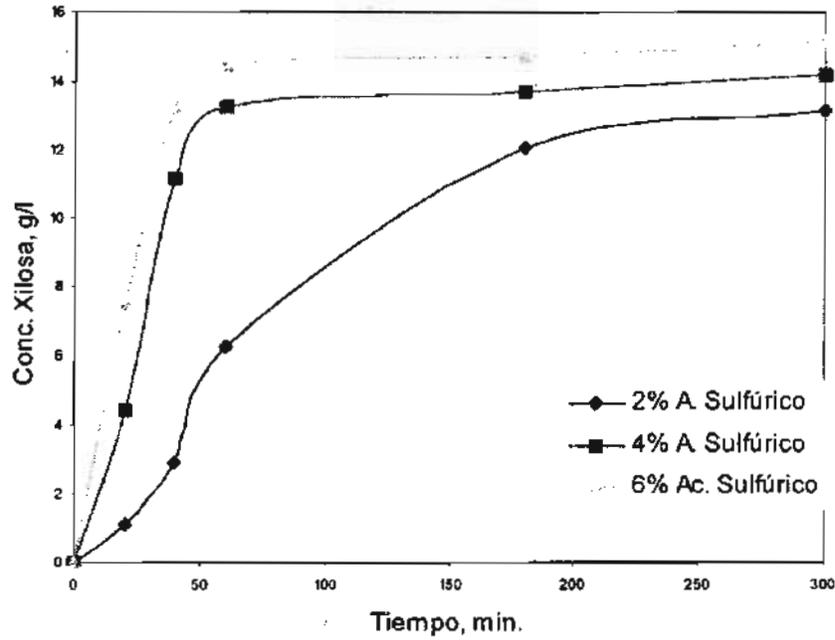


Figura 2. Perfil experimental de la concentración de glucosa a 100°C

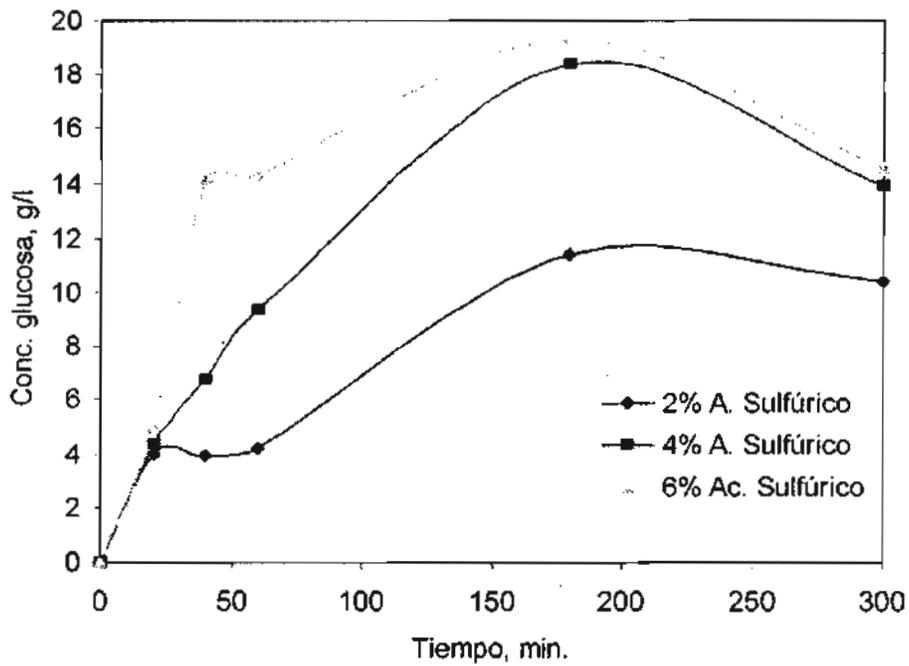


Figura 3. Perfil experimental de la concentración de arabinosa a 100°C

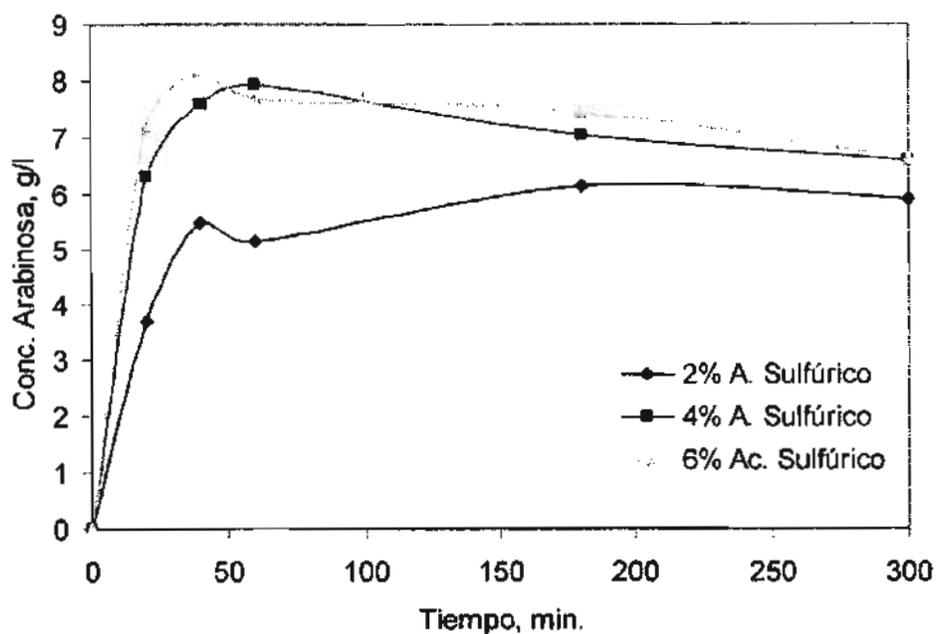


Figura 4. Perfil experimental de la concentración de ácido acético a 100°C

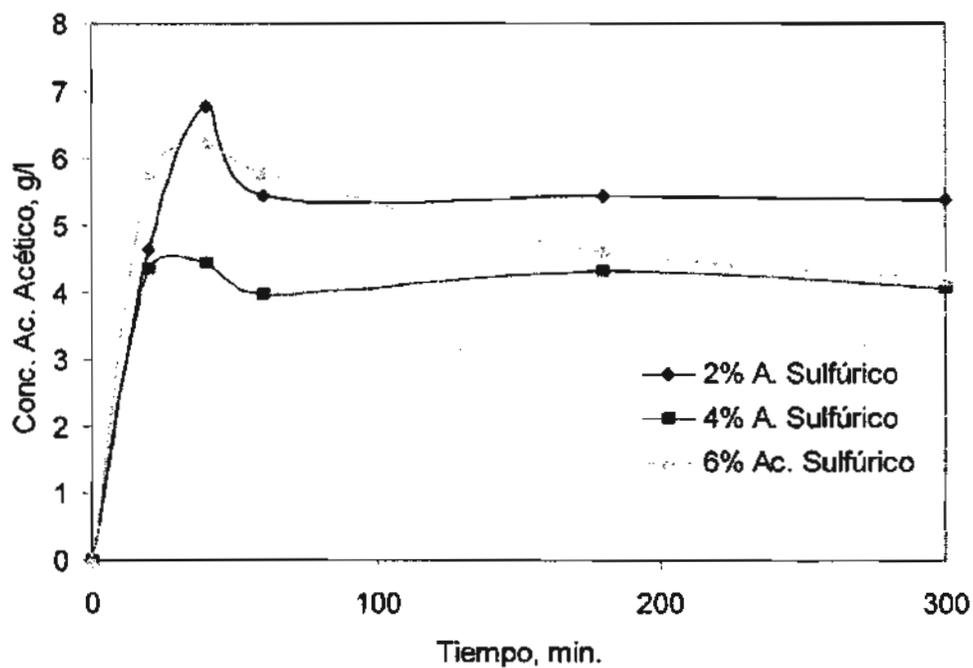
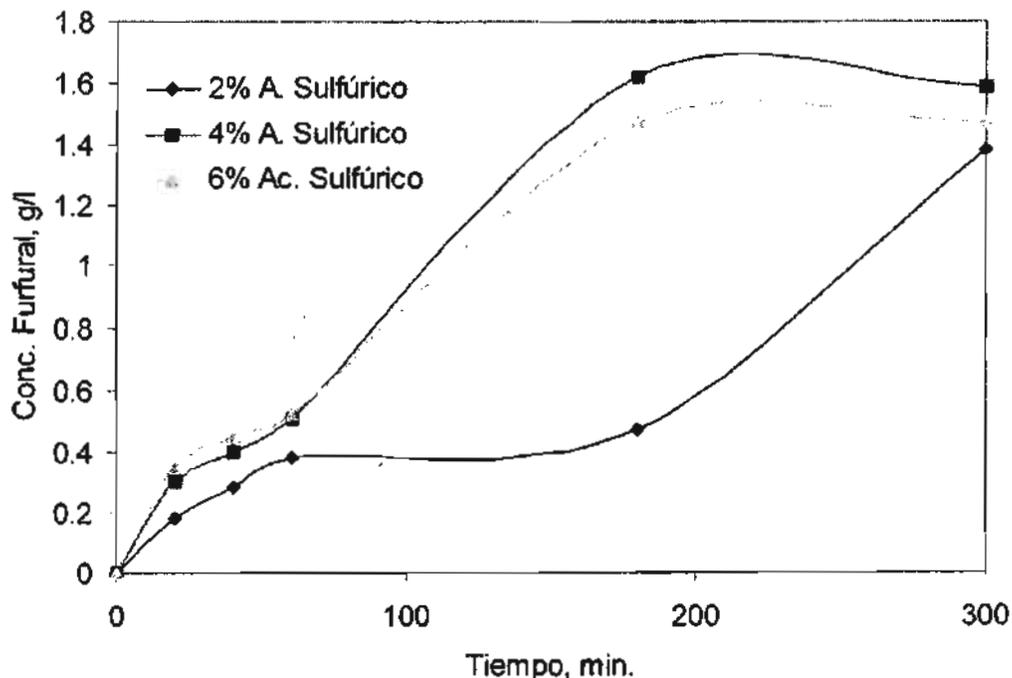


Figura 5. Perfil experimental de la concentración de furfural a 100°C



Conclusiones

Los materiales lignocelulósicos pueden ser utilizados como el inicio de una cadena a la que denomino *celuloquímica*, que permite la producción de azúcares fermentables, los cuales, a su vez, pueden ser usados para la obtención de productos químicos tales como xilitol o etanol, entre otras muchas posibilidades. En este trabajo, el lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) fue hidrolizado usando ácido sulfúrico a diferentes concentraciones (2-6%) y temperaturas (80-122°C). Se determinaron los perfiles de concentraciones de azúcares (glucosa, xilosa y arabinosa), así como los perfiles de concentración de los subproductos de las reacciones de degradación (ácido acético y furfural). Mediante una combinación de regresión lineal y no lineal múltiple se determinaron los parámetros cinéticos para predecir dichos perfiles a través de la modelación matemática. Las condiciones óptimas encontradas para la hidrólisis fueron: 4% H_2SO_4 a 100°C para 60 minutos, las cuales dan un rendimiento de 15.3 g glucosa/L, 15.0 g xilosa/L, 10.0 g arabinosa/L, 3.5 g ácido acético/L y 0.45 g furfural/L. Estos resultados muestran que el lirio acuático (normalmente un problema ecológico y am-

biental) puede ser empleado en la producción de agentes químicos tales como el xilitol y el etanol, entre otros.

Bibliografía

1. Gajalakshmi, S.; Ramasamy, E.V.; Abbasi, S.A. (2001), "Potential of two epigeic and two anecic earthworms species in Vermicomposting water hyacinth", *Bioresource Technology*, 76: 177-181.
2. Abbasi, S.A. y Krishnakumari, P.K. (1996), "Biowaste treatment with anaerobic digester: dual role of heavy metals", en *Proceedings of Twelfth International Conference of Solid Waste Technology and Management*, Philadelphia, EU, noviembre 17-20, 4C9-4C13.
3. Abbasi, S.A. y Ramasamy, E.V. (1999), *Biotechnological Methods of Pollution Control*, Hyderabad, Orient Longman, 168 págs.
4. Nigam, J.M. (2002), "Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast", *J. of Biotechnology*, 97: 107-116.
5. Du Toit, P.J.; Olivier, S.P. y Van Bijon, P.L. (1984), "Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates I. Characterization of bagasse with regard to monosaccharide, hemicellulose, and amino acid composition", *Biotechnology and Bioengineering*. 26: 1071-1078.
6. Nguyen, Q.A.; Tucker, M.P.; Keller, F.A.; Beaty, D.A.; Connors, K.M. y Eddy, F.P. (1999), "Dilute acid hydrolysis of softwoods", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77-79: 133-142.
7. Nguyen, Q.A.; Tucker, M.P.; Keller, F.A. y Eddy, F.P. (2000), "Two-stage dilute-acid pretreatment of softwoods", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86: 561-576.
8. Springer, E.L. (1966), "Hydrolysis of aspenwood xylan with aqueous solutions of hydrochloric acid", *TAPPI*, 49: 102-106.
9. Franz, R.; Erckel, R.; Riehm, T.; Woernle, R. y Deger, H.M. (1982), "Lignocellulose saccharification by HF", *Energy from biomass*, Londres, Applied Science Publishers, pp. 873-878.
10. Conner, A.H. y Lorenz, L.F. (1986), "Kinetic modelling of hardwood prehydrolysis. Part III: Water and dilute acetic acid of southern red oak prehydrolysis", *Wood Fiber Science*, 18: 248-263.

11. Silva, S.S.; Felipe, M.G.A. y Mancilha, I.M. (1998), "Factors that affect the biosynthesis of xylitol by xylose-fermenting yeasts. A review", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70-72: 331-340.
12. Nigam, J.N. (1998), "Single cell protein from pineapple cannery effluent", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(5): 693-696.
13. Tellez Luis, S.J.; Ramirez, J.A. y Vazquez, M. (2002), "Mathematical modeling of hemicellulose sugar production from sorghum straw", *J. of Food Eng.*, 52: 285-291.
14. Aguilar, R.; Ramirez, J.A.; Garrote, G. y Vazquez M. (2002), *J. of Food Eng.*, 55: 309-318.
Garrote, G.; Domínguez, H. y Parajó, J.C. (1999), "Mild Autohydrolysis an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 74: 1101-1109.

**Importancia de la caracterización
genético-molecular de levaduras en bebidas
alcohólicas: el caso del mezcal**
Genetic and Molecular Characterization
of Yeast on Alcoholic Beverages: Mezcal

Oliva Hernández, A. A.; Sifuentes Rincón, A. M.**; Bocanegra García, V.*;
Jacques-Hernández, J.***

Resumen

Por su elaboración rústica y la falta de verificación de los estándares de calidad, el mezcal que se produce en el estado de Tamaulipas sólo tiene aceptación regional. Sin embargo, el mejoramiento en la calidad del mezcal puede fomentar el desarrollo económico y social de las regiones con vocación y tradición mezcalera en los estados que, como Tamaulipas, cuentan con denominación de origen. En el mezcal, la identidad de la microflora y la dinámica del proceso fermentativo del mosto han sido poco estudiadas, a diferencia de otras bebidas como el vino o el tequila mismo. La fermentación es una etapa crítica para la calidad de estos productos; además, la diversidad de levaduras es un factor destacado ya que, según lo observado en otras bebidas fermentadas, ésta puede estar conformada por especies de diferentes géneros que se interrelacionan confiriéndole distingos a los productos. Por esto, el conocimiento

* Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria, Reynosa-Aztlán, Laboratorio de Biología Molecular.

** Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Laboratorio de Biotecnología Animal 1.

de la diversidad genética es elemental para optimizar sistemáticamente la calidad del mezcal, destacando sus características primigenias.

Gracias al extraordinario avance de la biología molecular, es posible estudiar y caracterizar a nivel de especie y cepa los microorganismos desde su unidad molecular más básica, el ADN. Se han descrito una gran cantidad de metodologías moleculares para el análisis de la diversidad genético-molecular. Estos métodos se enfocan al estudio de genes específicos que permiten diferenciar entre especies y/o cepas, o en regiones polimórficas presentes en las diversas levaduras, lo que permite evaluar la diversidad de los microorganismos presentes en un sistema determinado. En este trabajo se discute la aplicación de dichos métodos en la caracterización de levaduras.

Abstract

In Tamaulipas the production of mezcal is still rustic in its elaboration and quality control standards application, therefore it has only regional acceptance. Because Tamaulipas is one of the states with origin denomination in mezcal, a better product quality could improve the economic and social development of the local producers. Unlike other drinks as the wine or tequila, microbial populations acting on the fermentative process have been poorly studied in mezcal. The process of fermentation is a critical step for the product quality and yeast diversity is an important factor to give it specific characteristics, it has been observed that different yeast generous are present in alcoholic drinks, therefore its genetic diversity determination is an important factor for the quality improvement of the originals characteristics.

Molecular Biology advances make possible to study and characterize microorganisms at level of species and/or strain using their DNA information. There are an increasing number of molecular methodologies for the molecular-genetic diversity analysis. Almost all of them are focused on the study of specific genes that allow differentiate between species and/or strains; they also use polymorphic regions present in different yeasts. In this work the applications of these methods in the yeast characterization is discussed.

Introducción

El origen del mezcal en Tamaulipas está ligado a la corta bonanza minera que experimentó la sierra de Tamaholipa Nueva (hoy San Carlos) desde el siglo XVIII, origen de la provincia de Nuevo Santander, hoy estado de Tamaulipas. Al ser fuertemente afectada la economía de la región por la guerra de independencia

y por el abandono de la actividad minera, sus habitantes se vieron obligados a buscar otro medio de subsistencia económica, el cual se enfocó en la producción de mezcal.

Actualmente, la industrialización en la producción de mezcal, el cual se obtiene a partir de la fermentación y destilación del agave, tiene un gran potencial no sólo en ventas nacionales, sino también en la generación de divisas. La optimización de esta tecnología puede fomentar el desarrollo económico y social de los estados que tienen la denominación de origen, como Oaxaca, Durango, Guerrero, San Luis Potosí, Zacatecas y Tamaulipas.¹

Las bebidas alcohólicas elaboradas mediante procesos de fermentación, dentro de las cuales se encuentra el mezcal, se producen con la participación de una microbiota nativa, en muchos casos compleja. Las levaduras, en la etapa de fermentación del mezcal, realizan funciones específicas que tienen que ver no sólo con la biosíntesis de alcohol etílico, sino también con la generación de una serie de productos de fermentación. En algunos casos éstos son perjudiciales, como el alcohol metílico, y en otros casos, le participan características distintivas al producto final, principalmente, en productos añejados, lo que pondera de manera importante el rol de las diversas especies de levaduras. Consecuentemente, el conocimiento de la diversidad genética es importante como un primer paso, tanto para el establecimiento de su identidad como para el desarrollo de estrategias enfocadas a seleccionar aquellas especies productivamente superiores que, adaptadas a los nichos naturales, pueden mejorar la eficiencia de la etapa de fermentación, conservando las particularidades del producto regional.

Métodos de identificación de levaduras

Desde el punto de vista industrial, las levaduras son importantes ya que las especies de diversos géneros forman parte de la microflora natural de alimentos y bebidas fermentadas y también participan en su proceso de fabricación.

El mezcal es esencialmente una bebida alcohólica, producida por fermentación, proceso mediante el cual los azúcares del agave se transforman en etanol y otros productos secundarios debido a la acción de las levaduras. En este proceso está implicada la acción secuencial de diferentes géneros y especies de levaduras. La fermentación del mosto del mezcal se realiza tradicionalmente de manera natural y es desarrollada por levaduras cuyo origen se encuentra en la superficie del agave o en el ambiente alrededor de la pilas de fermentación.

A diferencia del mezcal, la identidad de la flora responsable del proceso fermentativo del mosto de bebidas alcohólicas como el vino ha sido objeto de numerosos estudios,

incluso las levaduras que coexisten en el aguamiel y que lo fermentan para producir el pulque ya han sido sujetas a estudios de caracterización. En el aguamiel y pulque se han realizado estudios donde se describen las levaduras *killer*, las cuales producen exotoxinas con actividad antimicrobiana,² este tipo de levaduras fueron identificadas por métodos tradicionales basados en pruebas morfológicas y bioquímicas. También se aislaron de dos muestras de agave sap (aguamiel) las siguientes cepas de levaduras: *Candida lusitaneae*, *Kluyveromyces marxianus var bulgaricus* y *Saccharomyces cerevisiae (capensis)*. Adicionalmente, en siete muestras de pulque (aguamiel fermentado) las especies de *C. valida* (seis colonias), *S. cerevisiae (chevalieri)*, *S. Cerevisiae (capensis)* y *K. marxianus var. Lactis*.³

En el caso del tequila, se encontró que en agave fresco la microbiota estaba dominada por *Clavispora lusitaniae* y especies endémicas como *Merschnikowia agavaveae*; en *Drosophila spp*, alrededor o dentro de la destilería se identificó *Hanseniaspora spp.*, *Pichiakluyveri* y *Candida krusei*; en melazas *Schizosaccharomyces pombe*, mientras que en agave cocido y mostos se identificó una considerable diversidad de especies, incluida *Saccharomyces cerevisiae*. En mostos fermentados se encontró una baja heterogeneidad de especies; al inicio de la fermentación se logró identificar a *Torulaspora delbrueckii*, *Kluyveromyces marxianus* y *Hanseniaspora spp*, mientras que en etapas posteriores se encontró a *S. cerevisiae*, *Zigosacchaomyces bailii*, *Candida milleri* y *Brettanomyces spp*. Los autores concluyen que la principal fuente de inóculo para el proceso de fermentación son los tanques de fermentación.⁴

La identificación de las especies de levaduras comúnmente se realiza aislando y purificando la especie de su ambiente natural; si ésta se realiza por su morfología y pruebas bioquímicas de asimilación de azúcares y compuestos nitrogenados, es necesario realizar un considerable número de pruebas, lo que resulta laborioso y tardado.^{5,6}

Algunas de las desventajas de los métodos tradicionales de identificación pueden ser solucionadas por las nuevas herramientas moleculares. Estos métodos ofrecen rapidez, precisión y son fáciles de aplicar en todas las etapas de los procesos industriales, especialmente en la optimización de los mismos.

Caracterización molecular

Por el extraordinario avance de la biología molecular, es posible estudiar y caracterizar a nivel de especie y cepa a los microorganismos desde su unidad molecular más básica, el ADN. Se han descrito una gran cantidad de metodologías moleculares para el

análisis de la diversidad genético-molecular. Estos métodos se enfocan al estudio de genes específicos que permiten diferenciar entre especies y/o cepas, o en regiones polimórficas presentes en las diversas levaduras, lo que permite evaluar la diversidad de los microorganismos presentes en un sistema determinado, como por ejemplo, el mosto de mezcal durante la fermentación.

Las relaciones evolutivas entre los organismos (que por lo general no es posible obtener mediante el análisis de las características fenotípicas) constituyen una base más natural para clasificarlos. Se puede medir la distancia evolutiva entre dos organismos por diferencias en la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de macromoléculas homólogas aisladas de ellos.^{7,8,9}

De acuerdo a ello, en los últimos años se han desarrollado múltiples aplicaciones tecnológicas para la biología molecular. Existen diferentes métodos moleculares para la identificación de variantes polimórficas en la secuencia del ADN de un organismo, basadas en la amplificación *in vitro* de segmentos de ADN, tecnología conocida como PCR.^{9,10}

Estos métodos tienen como ventaja su gran capacidad de multiplicación de la porción de ácidos nucleicos y la detección a través de técnicas de ELISA, hibridación, etcétera, lo que le da alta sensibilidad. Además hay que destacar la elevada especificidad que le confiere la utilización de iniciadores capaces de reconocer una secuencia única elegida, propia de cada microorganismo; y su rapidez, comparada con algunas técnicas tradicionales, lo cual es otra ventaja para destacar. Desafortunadamente falta estandarización de técnicas entre los laboratorios que las realizan, además de que existe la probabilidad de resultados falsos positivos por contaminación con productos amplificados anteriores, lo que hace necesaria una cuidadosa evaluación de sus resultados.

Marcadores moleculares usados en caracterización de levaduras

El concepto del marcador molecular considera un sistema de análisis del polimorfismo dado entre individuos de la misma especie, que proporciona las herramientas para inferir qué tan próxima es la relación entre ellos.^{8,11}

Se han reportado estudios utilizando marcadores moleculares en levaduras, con el objetivo de obtener información de variabilidad entre especies. La mayor parte de estos estudios utilizan la PCR-RFLPS (Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplada a Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción) como método asociado a la detección del polimorfismo de diferentes marcadores moleculares. Esta técnica

ca se basa en la digestión del ADN con enzimas de restricción; la diferencia entre ellos está dada por el tamaño de los fragmentos obtenidos, separados y visualizados en geles de agarosa. Estos patrones de bandas generalmente son muy complejos, por lo que es necesario identificar el fragmento de interés realizando una hibridación con sondas marcadas. Con la presencia de patrones similares de bandas es posible establecer relaciones de entre cepas y especies, a diferencia de los patrones únicos que nos permiten la identificación del microorganismo.

Esta técnica ha constituido una herramienta útil en la diferenciación de especies de *Candida*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Zygosaccharomyces*, para el estudio de relaciones anamorfo-teleomorfas entre especies de *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*, así como para verificación de sinonimia, con el fin de diferenciar las especies de los géneros *Candida*, *Cryptococcus* y otras.^{12,13} En investigaciones realizadas en vino, se monitoreó la dinámica de población en levaduras durante el proceso de fermentación en seis variedades de uva, identificándose los géneros de *Candida*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Metschnikowia*, *Pichia* y *Saccharomyces*.¹⁴ El uso más amplio que se le ha dado a la técnica de RFLP ha recaído en estudios de identificación y determinación de la filogenia de levaduras de interés industrial, utilizando la región del RADN 5,8S y los espaciadores transcritos internos ITS 1 e ITS 2 (5,8S – ITS). La región 5.8S es codificadora y conservada, y muestra una baja variabilidad intraespecífica que no permite la delimitación entre cepas de una misma especie; sin embargo, la zona de los ITS, que es una región no codificadora e hipervariable, permite el reconocimiento a nivel interespecífico.¹⁵

Granchi *et al.* (1999), realizaron detecciones y cuantificaciones en 174 especies de levaduras durante la fermentación del vino por PCR-RFLP analizando la región ITS del RADN. A la par de los métodos tradicionales de identificación, se analizó una muestra representativa de las colonias aisladas, obteniéndose idénticos resultados con ambos procedimientos; por tanto, se concluye que el análisis por PCR-RFLP es una metodología rápida y confiable en la identificación de comunidades de levaduras aisladas en el proceso de fermentación.¹²

Otra metodología ampliamente utilizada es el análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). Esta técnica está basada en la amplificación al azar con iniciadores cortos de secuencia arbitraria que reconocen a lo largo del ADN numerosos sitios de apareamiento; de esta forma se obtiene un patrón de fragmentos que posteriormente son visualizados en geles de agarosa o acrilamida, y teñidos en ambos casos con bromuro de etidio. Estos patrones de bandas son específicos al genoma analizado y al de los oligonucleótidos utilizados.

El RAPD posee potencialidades que le permiten ser empleado en estudios de control de calidad de inóculos para fabricación de cerveza y otras bebidas, pues la comparación del cultivo original con el de las líneas subcultivadas, permite que cualquier contaminante sea identificado. La técnica ha sido utilizada para estudios de identificación de cepas a partir del análisis del dominio D1/D2 del rARN 26S, una región altamente variable, con diferencias entre especies de hasta una única base. Esta región ha permitido separar todas las especies de ascomicetes de fase levaduriforme existentes, incluso las altamente relacionadas de la variabilidad genética de los miembros del grupo *Saccharomyces sensu stricto* (*S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* y *S. pastorianus*). Este estudio permitió delimitar estas especies estrechamente relacionadas, así como grupos intraespecíficos como los dos existentes en la especie *S. bayanus*. Adicionalmente, se determinó el origen híbrido de la especie *S. pastorianus*, a partir del análisis de la fracción de bandas mostradas por cada híbrido y las cepas parentales.^{16,17}

Entre las ventajas de utilizar la tecnología de los RAPDS, tenemos que presentan mayor polimorfismo que los RFLPS; es una técnica simple y rápida, además de selectiva; tiene la opción de no usar radioisótopos; diferencia porciones de ADN basadas en mutaciones; es posible obtener buenos resultados con una baja calidad de ADN; se producen un gran número de bandas por primer y éstos son relativamente fáciles de obtener.

Entre las desventajas que presenta la técnica tenemos la inconsistente reproducibilidad entre laboratorios que la aplican; una pobre resolución de las bandas en geles de agarosa, si éstas se presentan en gran cantidad; sólo detecta marcadores dominantes; esta técnica no es confiable si se usa en mejoramiento genético asistido.^{17,18} Otro inconveniente es la necesidad de usar un gran panel de RAPDS, lo que representa un elevado valor económico y un laborioso trabajo analítico. Igualmente, dado que es un marcador genético de tipo dominante, no podemos discriminar la presencia de heterocigotos, subestimando así la cantidad de polimorfismos existentes.¹⁹

Actualmente, metodologías como polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), están siendo ampliamente usadas para estudios de diversidad genética en sistemas microbianos. Esta técnica en particular, consta básicamente de tres pasos: 1) Digestión del ADN genómico por dos enzimas de restricción, uno de ellos de corte frecuente, lo que genera miles de fragmentos cortos. 2) Ligación de adaptadores específicos a los sitios de restricción. 3) Amplificación por PCR con iniciadores específicos, los cuales cuentan con uno o dos nucleótidos extras que imponen una selección, reduciendo el número de fragmentos amplificados. Los

fragmentos polimórficos obtenidos son visualizados por electroforesis en un gel de acrilamida desnaturalizado.

La técnica de AFLPS es usada en la determinación de la identidad taxonómica, determinación de niveles de variabilidad genética a escala geográfica amplia.²⁰ Se ha descrito la aplicación de esta técnica en el análisis de la levadura cervecera, encontrándose que a través de un solo par de iniciadores fue capaz de distinguir diferentes cepas de levadura; igualmente esta técnica proporcionó datos cuantitativos sobre el polimorfismo genético, calculando que para 26 cepas estudiadas, existía un promedio de fragmentos compartidos de 55%, con un índice de similitud mayor entre las cepas de fermentación baja (72%) que en las cepas de levadura de fermentación alta (45%).²¹

El AFLP es una técnica que permite una exploración rápida del genoma entero, ya que genera un gran número de bandas; debido a la naturaleza de los iniciadores empleados, esta técnica es altamente confiable y robusta; posee un alto poder de reproducibilidad entre laboratorios, tiene aplicación en taxonomía, diagnóstico y epidemiología. La desventaja de AFLP es que genera cantidades enormes de información, la cual necesita de sistemas automatizados para su análisis; otro problema es que pueden aparecer sitios polimórficos con peso molecular similar, lo que dificulta algunos estudios como análisis filogenéticos.

Conclusiones

Se ha demostrado que la aplicación de herramientas moleculares proporciona una gran cantidad de información sobre la identidad y diversidad de los organismos que participan en la fermentación de bebidas alcohólicas. Los beneficios derivados del conocimiento de esta diversidad están directamente relacionados con la eficiencia y calidad del producto. Por tanto, y dada la importancia del mezcal, la información derivada de la aplicación de las herramientas moleculares para el análisis de la diversidad genética de organismos fermentativos como las levaduras, permitirá, sin duda, el diseño de estrategias enfocadas a aumentar la calidad, productividad y rentabilidad de los procesos actualmente utilizados en la producción de esta bebida.

Bibliografía

1. Jacques, H.C.; Herrera, P.; Ramírez De León, A. (2004), "El maguey mezcalero y la agroindustria del mezcal en Tamaulipas", *IV Simposium Internacional so-*

- bre Agavaceae y Nolinaceae*, Mérida, Yucatán, AMC-CICY-Conagave-UNAM-Tequila Herradura.
2. Magliani, W.; Conti, S. Gerloni, D.; Polonelli, L. (1997), *Yeast Killer Systems Istituto di Microbiologia, Clinical microbiology reviews*, Parma, Italia, Facolta' di Medicina e Chirurgia, Universita' degli Studi di Parma, pp. 369-400.
 3. Estrada, G.A.; Cruz, G.A.; Lappe, P.; Ulloa, M.; Garcia, G.M.; Gomez, R.L. (2001), "Isolation and identification of killer yeasts from Agave sap (aguamiel) and pulque", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 557-560.
 4. Lachance, M.A (1995), "Yeast communities in a natural tequila fermentation", Department of Plant Sciences University of Western Ontario, Antonie van Leeuwenhoek, 68: 153-160.
 5. Barnett, J.A, Payne, R.W. (2000), *Yeasts: Characteristics and identification*, Cambridge, 17: 18.
 6. Boekhout, T.; Kutzman, C. (1996), "Principles and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera", en Wolf, K. (ed.), *Nonconventional Yeasts in Biotechnology: A Handbook*, Alemania, Berlín, 1-81.
 7. *Tecnología AMPLICOR a PCR*, Última actualización (septiembre 21, 2004), <http://www.roche.cl/diagnostics/tecnologia.htm>
 8. Gillet, E.M., *DNA Markers-Concepts and characteristics*, <http://webdoc.sub.gwdg.de>
 9. *Técnicas moleculares en la práctica diaria*, <http://www.funcei.org.ar/pdf>
 10. Vargas, D.; Vega, V. y González, C.G. (2003), "Aproximación a una caracterización molecular de *Fasciola hepatica* por la técnica RAPDS", *PC Parasitol Latinoam.*, 58: 11-16 FLAP.
 11. *Técnicas moleculares en ecología y biología de la ecología y biología de la conservación*, <http://64.233.179.104/search?q=cache:8wWjGtZf3twJ:ebd10.ebd.csic.es/pdfs/sek.pdf+T%C3%A9cnicas+moleculares+en+marcadores+moleculares&hl=es>
 12. Granchi, L.; Bosco, M.; Messini, A. y Vincenzini, M. (1999), "Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region", Florencia, Italia, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentarie Microbiologiche, Sezione di Microbiologia Applicata, Universita degli Studi di Firenze, 7181/99.
 13. *El microorganismo: Saccharomyces cerevisiae. Los hongos*, <http://www.unavarra.es>

14. Clemente, J.M.; Mingorance, C.L. (2004), "Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must", *Food Microbiology*, 21: 149-155, www.elsevier.nl/locate/jnlabr/yfmic
15. Vanrobays, E.; Gelugne, J.P., Gleizes, P.E. y Caizergues-Ferrer, M. (2002), "Late Cytoplasmic Maturation of the Small Ribosomal Subunit Requires r10 Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*", Toulouse Cedex, Francia, Laboratoire de Biologie Moleculaire Eucaryote du CNRS, 31062. Received 1 August 2002/Returned for modification 13 September 2002/Accepted 19 December 2002.
16. *Molecular Genetics RAPD's*, <http://opbs.okstate.edu>
17. Gillet, E.M. (1999) *DNA Markers-Concepts and characteristics*, <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>
18. Arangueren, M.J.A. (2000), "Caracterización y Relaciones Filogénicas de Cinco Razas Asnales Españolas en Peligro de Extinción Mediante la Utilización de Marcadores Microsatélites: Su importancia en los Programas de Conservación", tesis doctoral, Unidad de Genética y Mejora Animal, Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, http://www.tdx.cesca.es/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-1030103-164439/jaam1de4.pdf
19. AFLP™ Microbial Fingerprinting Protocol (2002), Applied Biosystems, <http://docs.appliedbiosystems.com>
20. Savelkoul, P.M.; Aarts, H.J.; Dijkshoorn, L. (1999), "Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art", *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 3083-3091.
21. Perpète, P.; Cutsem, P. y Boutte, Ch.; Colson-Corbisier, V. y Collin, S. (2001), "Amplified Fragment-Length Polymorphism, a New Method for the Analysis of Brewer's Yeast DNA Polymorphism Neuve", *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, Bélgica, 59(4): 195-200.

*Aprovechamiento biotecnológico
de productos agropecuarios I*
se terminó de imprimir en octubre de 2007.
Tiraje: mil ejemplares.