



Obtención y Evaluación del Extracto de Levadura de *Saccharomyces cerevisiae*

RAISA ZHURBENKO,* CLAUDIO RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, ORESTES DARÍO LÓPEZ HERNÁNDEZ

Centro Nacional de Biopreparados, Apartado Postal 6048, Habana 6, CP 32600, Cuba

*Autora para la correspondencia

ABSTRACT. It was developed a method for the obtainment of baker yeast extract *Saccharomyces cerevisiae* for bacteriology by studying the influence of different process' parameters of the hydrolysis (concentration of the hydrolytic agent, agitation speed and the necessity of the thermal treatment) on the composition of the product. It was obtained a product with the following characteristics: amino nitrogen 2.8 %, total nitrogen 8.8 %, amino/total nitrogen relation 0.318 %, chloride content (as NaCl) 3.9 %, loss on drying 3.1 % and pH 6.9. The results of the composition and growth promoting properties shows that the obtained yeast extract could be successfully employed as nutrient base in different culture media for the clinical diagnostic and quality control of water and food.

Key words: yeast, yeast extract, *Saccharomyces cerevisiae*, hydrolysis, culture media.

RESUMEN. Se desarrolló un método de obtención de extracto de levadura panadera *Saccharomyces cerevisiae* con fines bacteriológicos, sobre la base del estudio de la influencia de diferentes parámetros del proceso de hidrólisis (concentración del agente hidrolizante, velocidad de agitación y necesidad o no de aplicar tratamiento térmico) sobre la composición del producto final. Se alcanzaron los siguientes niveles de los índices estudiados: contenido de nitrógeno amínico 2.8 %, nitrógeno total 8.8 %, relación nitrógeno amínico/nitrógeno total 0.318 %, contenido de cloruros (en forma de cloruro de sodio) 3.9 %, pérdida por desecación 3.1 % y pH 6.9. Se demostró sobre la base del estudio de la composición y propiedades favorecedoras del crecimiento microbiano, que el extracto de levadura obtenido puede ser empleado exitosamente en calidad de base nutritiva en diferentes medios de cultivo, para el diagnóstico clínico y control de la calidad del agua y de los alimentos.

Palabras clave: levadura, extracto de levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, hidrólisis, medios de cultivo

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la obtención de los hidrolizados y extractos proteicos tiene gran importancia para la elaboración de medios de cultivo, con vistas a su utilización en el diagnóstico clínico, veterinario y control de la calidad de aguas, alimentos y medio ambiente. Con estos fines se utilizan las proteínas convencionales y se buscan, a su vez, otras alternativas.

Las proteínas de las levaduras constituyen una fuente de obtención de mezclas de aminoácidos y pequeños péptidos.^{13,14} Además de su valor proteico, son consideradas como una excelente fuente de vitaminas del complejo B como B₁, B₂ y niacina, y una de las mejores fuentes de ergosterol, el cual por irradiación se transforma en vitamina D.^{3,5,15}

Para la obtención de hidrolizados a partir de las levaduras se utilizan, preferiblemente, los métodos bioquímicos de hidrólisis tanto a través de las enzimas propias de las células de las levaduras como de las enzimas proteolíticas exógenas.^{2,8,19}

Para la obtención de los hidrolizados enzimáticos con

alto grado de hidrólisis y el color claro algunos autores recomiendan tratar las levaduras con soluciones acuosas alcalinas débiles y el posterior tratamiento térmico antes del proceso hidrolítico.^{18,23}

La desventaja de los autolizados de levadura radica en muchos casos en su más bajo rendimiento industrial con respecto a la hidrólisis con enzimas exógenas y la necesidad de emplear levadura fresca activa.

El extracto de levadura, continúa siendo un componente indispensable de muchos de los nuevos medios de cultivo que se desarrollan en la actualidad, tanto para la detección y enumeración de contaminantes microbianos en alimentos,^{1,11,12} y muestras clínicas,¹⁶ en las técnicas biotecnológicas,⁶ incluyendo aquellas que comprenden el cultivo de organismos manipulados genéticamente,²⁰ y en los estudios fisiológicos y taxonómicos de diferentes organismos,²² por lo que su demanda crece en volumen de año en año.

El objetivo de este trabajo consistió desarrollar un método para la obtención de extracto de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*; su evaluación organoléptica, fisicoquímica y funcional, incluyendo el escalado industrial.



METODOLOGÍA

En el trabajo se utilizó la levadura panadera *S. cerevisiae* fresca o conservada en refrigeración a temperatura de 8 a 12°C por no más de 13 días, con un contenido de sólidos totales del 28 al 32 % y nitrógeno total del 1.8 al 2.2%.

Como agente hidrolítico se utilizó la enzima papaína de 800 TU de la firma Byocatalysts (Inglaterra).

Se aplicó el diseño experimental completamente aleatorizado según el plan factorial 2³, a fin de evaluar el efecto de las tres variables independientes estudiadas (concentración del agente hidrolizante, velocidad de agitación y la necesidad o no de aplicar el tratamiento térmico) sobre los valores de las variables dependientes: nitrógeno amínico (N_{am}), nitrógeno total (N_t), y relación entre ambos (N_{am}/N_t), expresada en porcentaje. Las determinaciones se realizaron por triplicado. La matriz del plan factorial se muestra en la tabla 1.

Teniendo en cuenta los resultados del diseño experimental se procedió a obtener el producto a escalas piloto (1 lote) e industrial (3 lotes en un reactor de 500 litros de capacidad, Ind. 1-3). Al producto obtenido en estas etapas se le determinaron los principales índices fisico-químicos. Se estudió así el crecimiento microbiano, expresado como el incremento de la absorbancia en el tiempo, empleando *Escherichia coli* ATCC 25922, en un medio especialmente diseñado al efecto, el cual contenía el extracto de levadura al 2% (lote piloto), 0.5 % NaCl y 0.1 % de Na₂HPO₄, pH 7.0 - 7.2, comparándola con las absorbancias de cultivos crecidos en un medio formulado con extracto de levadura de la firma BIOTECNICA (México).

Posteriormente se procedió a estudiar el incremento de la absorbancia en el tiempo para *E. coli* ATCC 25922, para las mezclas de extractos de levadura BioCen y BIOTECNICA, con Peptona Bacteriológica BioCen (lote 7016) (BCPB y BTPB respectivamente). Las mezclas se prepararon en una relación 5:3, al 2 %.

El análisis fisico-químico comprendió la determinación del contenido de N_{am} por el método de valoración potenciométrica en presencia de formaldehído;¹⁷ N_t por el método de Kjeldahl, utilizando el sistema automático Kjeltac System de la Firma TECATOR (Alemania);⁷ la pérdida de agua por desecación (PD) por el método gravimétrico,¹⁷ contenido de cloruros (Cl), en forma de cloruro de sodio, por el método de Volhard,¹⁷ el pH se determinó a una solución del producto al 2% después de esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min, por el método potenciométrico con un pH-metro (PHM 83 AUTOCAL, Radiometer, Dinamarca). La evaluación funcional se realizó utilizando las siguientes cepas de la ATCC: *E. coli* 25922, *Salmonella typhimurium* 14028, *Staphylococcus aureus* 25923, *Enterobacter aerogenes* 13048, *Streptococcus faecalis* 29212, *Streptococcus pyogenes* 19615, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 y *Salmonella typhi* ATCC 19430. Se inocularon las diluciones seriadas y se realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro.²⁰

En calidad de productos de referencia se emplearon el Agar Extracto de Levadura, Agar Violeta Rojo Bilis y Agar Verde Brillante de la firma OXOID (Inglaterra).

El tratamiento estadístico para el diseño experimental (completamente aleatorizado) se realizó según lo descrito por López.⁹ Se aplicó un análisis de varianza y en el caso de existir diferencia entre las medias se aplicó la prueba de Duncan (p < 0.05). Se reportaron, además, los errores estándar de las medias en los métodos de análisis. Con los resultados se procedió a adaptar un polinomio del tipo:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{12} X_1 X_2 + b_{23} X_2 X_3 + b_{13} X_1 X_3 + b_{123} X_1 X_2 X_3$$

Los coeficientes b_n del polinomio fueron hallados mediante la expresión:

$$B = (X'X)^{-1}X'Y, \text{ donde: } Y - \text{matriz de los resultados experimentales; } X - \text{matriz de las variables independientes.}$$

La significancia de los coeficientes para p < 0.05 se demostró mediante la prueba de Student. La adecuación del

Tabla 1. Matriz del plan factorial

Variante	Concentración del agente hidrolizante (X ₁)	Velocidad de agitación (X ₂)	Tratamiento térmico (X ₃)
1	- 1 (0,375 g/kg)	- 1 (200 rpm)	- 1 (no)
2	1 (0,75 g/kg)	-1	- 1
3	- 1	1 (1000 rpm)	- 1
4	1	1	- 1
5	- 1	- 1	1 (sí)
6	1	- 1	1
7	- 1	1	1
8	1	1	1

Tabla 2. Resultados obtenidos en el diseño experimental del extracto de levadura húmeda con papaina 800 TU

Var.	N _t (%)	N _{am} (%)	Relación N _{am} /N _t (%)
1	9,67 ± 0,17	3,41 ± 0,00	35,3
2	10,14 ± 0,02	3,73 ± 0,00	36,8
3	8,41 ± 0,03	3,58 ± 0,08	42,6
4	9,29 ± 0,11	3,73 ± 0,07	40,2
5	10,70 ± 0,02	3,25 ± 0,06	30,4
6	11,04 ± 0,01	3,54 ± 0,05	32,1
7	10,67 ± 0,01	3,07 ± 0,06	28,8
8	10,67 ± 0,05	3,32 ± 0,00	31,1

modelo se detectó mediante la prueba de Fisher. Para todo el tratamiento estadístico se empleó el paquete estadístico "Statistica 6", de StatSoft, Inc. (EU).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El diseño experimental 2³ arrojó los resultados que se observan en la tabla 2.

A estos resultados se les aplicó el tratamiento estadístico para determinar la influencia de las variables estudiadas sobre los principales índices de calidad en el producto y se lograron las siguientes ecuaciones de regresión:

Para el nitrógeno amínico:

$$Y = 3.45 + 0.25X_1 - 0.32X_3$$

Para el nitrógeno total:

$$Y = 10.07 + 1.39X_3$$

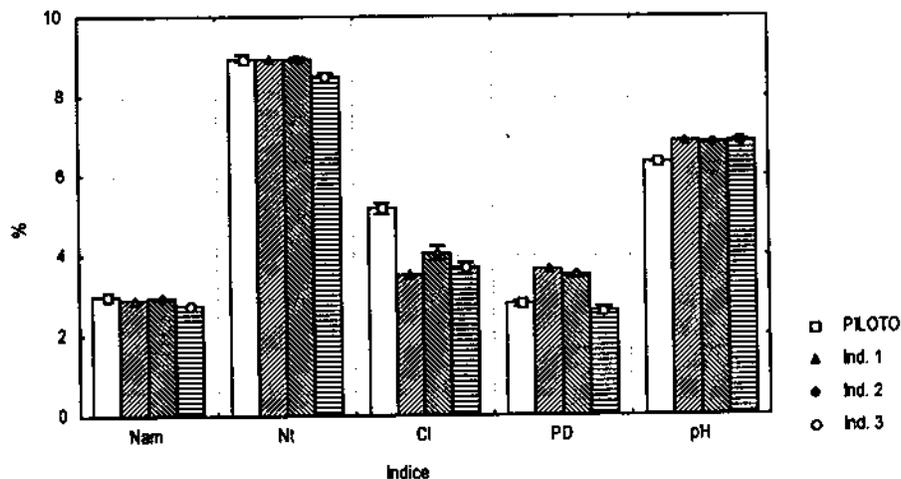
Analizando los resultados obtenidos se llegó a la con-

clusión de que sobre el nitrógeno amínico influyeron dos de las variables estudiadas: cantidad de papaina y tratamiento térmico. A su vez, entre ellas la mayor influencia la ejerce la variable X₃ (sin tratamiento térmico), seguida de X₁ (0.75 g de papaina/kg de sustrato). Sobre el índice de nitrógeno total sólo ejerce influencia la variable X₃ (tratamiento térmico).

Para todas las variantes la relación N_{am}/N_t presentó valores característicos de la mayoría de los extractos, aunque los más elevados correspondieron a las variantes 1-4.

Estos hallazgos, permitieron, conjuntamente con la determinación de otros parámetros del proceso, diseñar el método y la tecnología de producción del extracto de levadura, tanto a escala piloto, como industrial.

La fig. 1 muestra los resultados obtenidos en la evaluación físico-química del extracto de levadura del lote piloto y de los lotes industriales. En ella se puede observar que los resultados del nitrógeno total se encuentran dentro de



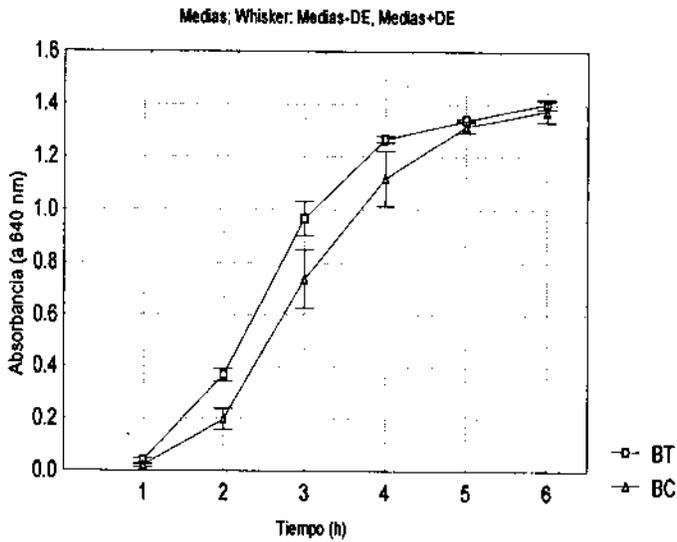


Fig. 2. Crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 en medios con diferentes ex-

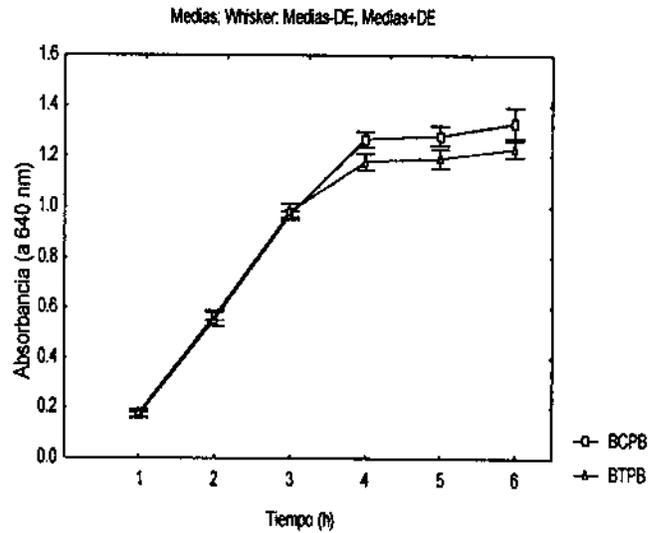


Fig. 3. Crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 en medios de diferentes bases nutri-

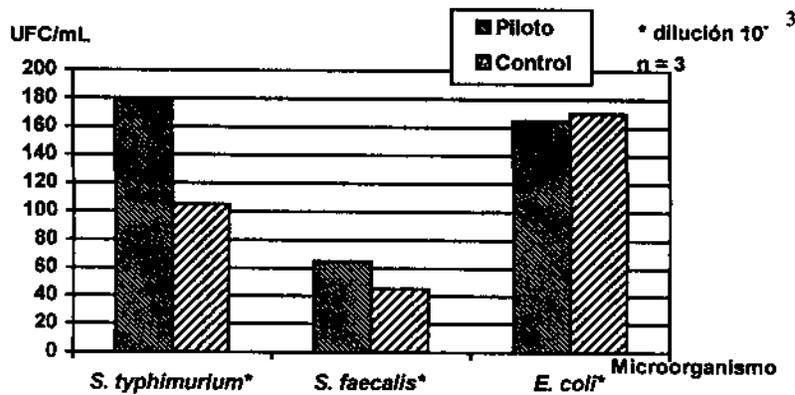


Fig. 4. Evaluación del extracto de levadura en agar extracto de levadura.

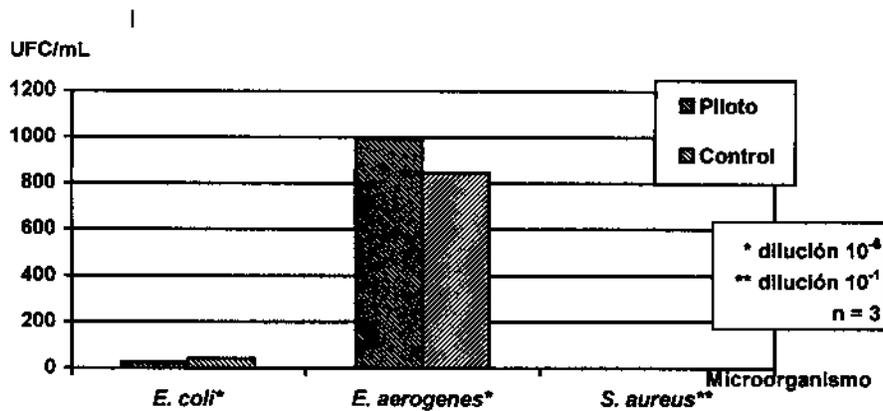


Fig. 5. Evaluación del extracto de levadura en el Agar Violeta Rojo Bilis

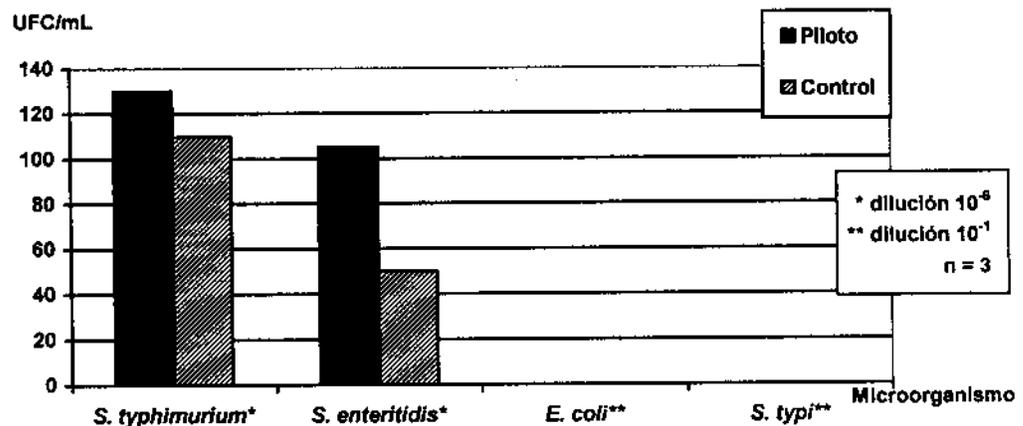


Fig. 6. Evaluación del extracto de levadura en el Agar Verde Brillante

los márgenes que recomienda la USP XXIII.²¹ El nitrógeno amínico en todos los casos es mayor de 2,5 % (especificación de calidad de BioCen). Los valores de cloruros son inferiores al 15 % recomendado por Barrow,⁴ como límite máximo permisible para los extractos de levadura de uso en microbiología. La pérdida de humedad por desecación también presenta valores acordes a lo recomendado por la USP y el pH se acerca a la neutralidad, tal como es común en estos productos.

El crecimiento de *E. coli* (absorbancia a 640 nm) en el medio formulado con extracto de levadura BioCen (lote piloto) (BC) y BIOTECNICA (BT) se muestran en la fig. 2.

Como se puede observar en la fig. 2, el crecimiento de *E. coli* en el Extracto de Levadura BioCen no presenta, en general, diferencias con respecto al crecimiento de este microorganismo en el extracto de referencia, sobre todo en las últimas horas analizadas no se encontró diferencia significativa alguna.

La fig. 3 muestra los resultados de la medición de la absorbancia de un cultivo de *E. coli* en medios de cultivo formulados con diferentes mezclas de extractos de levadura BioCen y BIOTECNICA con la Peptona Bacteriológica Z BioCen.

Se aprecia en la fig. 3, que los mejores resultados del crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 correspondieron a la variante que previó el empleo de la mezcla de Peptona Bacteriológica Z BioCen con el Extracto de Levadura BioCen y es comparable el correspondiente a la mezcla de Peptona Bacteriológica Z y el Extracto de Levadura BIOTECNICA, lo que demuestra que el extracto de levadura obtenido por la tecnología desarrollada en BioCen cumple con los requerimientos de este tipo de suplemento nutricional para el cultivo de microorganismos.

Los resultados de la evaluación del extracto de levadura en los medios de cultivo se muestran en las fig. 4-6.

El Agar Extracto de Levadura es un medio para el cultivo de levaduras y mohos. En la fig. 4 se puede apreciar

como a concentraciones muy bajas (dilución 10^{-6}), los microorganismos inoculados crecieron en el medio. En el caso de *S. typhimurium* y *S. faecalis* se detectó un mayor crecimiento con respecto al medio control y en el caso de *E. coli*, resultó muy semejante al del control, lo que demuestra la efectividad y alta sensibilidad analítica del medio experimental formulado con el extracto de levadura BioCen.

En la fig. 5 se muestra que la selectividad del medio Agar Violeta Rojo Bilis no se ve afectada por el empleo del extracto de levadura BioCen. Se pudo advertir la inhibición de *S. aureus*, que es una especie Gram positiva, a una baja dilución (10^{-1}), tanto para el medio control como para el experimental, mientras que *E. coli* y *E. aerogenes*, organismos Gram negativos que deben crecer en el medio, lo hicieron de forma muy similar, tanto en el medio experimental, como en el control.

En la fig. 6 se observa que el crecimiento de los dos organismos que deben crecer (*S. typhimurium* y *S. enteritidis*) fue similar, tanto para el medio control, como para el piloto, ocurriendo esto a altas diluciones, lo que permite apreciar la elevada capacidad del medio de promover el crecimiento microbiano. En el caso de los controles negativos (*E. coli* y *S. typhi*), éstos fueron inhibidos a diluciones de 10^{-1} , resultados que demuestran la adecuada selectividad del medio.

CONCLUSIONES

Se desarrolló un método de obtención de extracto de levadura *S. cerevisiae*, empleando papaína como agente hidrolizante, permitiendo alcanzar niveles de nitrógeno amínico y total, así como valores del pH, contenido de cloruros y de humedad, característicos de los extractos de levadura empleados en la elaboración de medios de cultivo para el diagnóstico microbiológico.

Se comprobó, que los medios de cultivo formulados



con el extracto de levadura BioCen se comportaron de manera similar a los medios preparados en el laboratorio con extracto de levadura BIOTECNICA, y a los medios obtenidos a escala comercial por otras firmas.

Se demostró la alta capacidad para promover el crecimiento del extracto de levadura BioCen (alta sensibilidad analítica) y su no interferencia en las características selectivas de los medios.

BIBLIOGRAFÍA

1. Andrews, S., H. de Graaf, y H. Stamation. 1997. Optimization of methodology for enumeration of xerophilic yeast from foods. *Int. J. Food Microbiol.* 35:109-116.
2. Arnold, W. N., 1981. Autolysis. Yeast cell envelopment. *Biochem. Biophys. Ultrastruct.* 2:129-137.
3. Atlas, R. M., 1995. *Handbook of Microbiological Media for the Examination of Food.* CRC Press, Inc. USA, p. 290.
4. Barrow, G. I. y R. K. A. Feltham. 1993. *Cowan and Steel's manual for identification of medical bacteria.* 3rd ed. Cambridge University Press, Great Britain, p. 209.
5. Butterworth-Heinemann Ltd., 1992. *In vitro Cultivation of Micro-organisms.* Great Britain, p. 30.
6. Daijy Corporation, 1998. USA Patent Number 5792646. Process for preparing *S. cerevisiae* containing organically bound germanium.
7. Determination of Kjeldahl nitrogen content with Kjeltec System 1026, 1987. Application Note, 10, Teclator.
8. Imperial Biotechnology Limited, 1990. European Patent Number 0223560. Flavour control of protein hydrolysates.
9. López Planes, R., 1988. Diseño estadístico de los experimentos. Editorial Científico-Técnica, La Habana, p. 105-160.
10. Manual of BBL products and Laboratory Procedures, 1988. Becton Dickinson Microbiology Systems, USA, p. 8.
11. Mian, M. A., G. H. Fleet y A. D. Hocking. 1997. Effect of diluent type on viability of yeasts enumerated from foods or pure culture. *Int. J. Food Microbiol.* 35:103-107.
12. Miller Brewing Company. 1990. USA Patent Number 4906573. Culture medium for detection of beer spoilage microorganisms.
13. Nesmeyanov, A. N., Belikov, V. M., Rogozhin, S. V., Slonimskii, G. L., Golovniya, R. V. y Tolstoguzov, V. B., 1969. *Iskusstviennaya y sinteticheskaya pischa.* – *Vestnik AN SSSR.* No. 1, p. 27-32.
14. Niekliyudov, A. D. Y S. M. Navashin. 1985. Poluchenie bielkovikh guidrolizatov s zadannimi svoistvami. *Prikladnaya Biokhimiya y Microbiologiya.* Tomo XXI (1), p. 3-12.
15. Prescott, S. C. y C. G. Dunn, C. G., 1967. *Microbiología industrial.* Edición Revolucionaria, La Habana, p. 28-32.
16. Prince Edward Island Food Technology Center, 1995. USA Patent Number 5447849. Growth media and assay for *Yersinia enterocolitica.*
17. Runova, V. F. et al. 1977. *Mietodicheskie ukazania po primieniyu fiziko-khimicheskikh mietodov kontrolya pitatielnikh sried,* Moscú, p. 5-9.
18. Shvetsh, V. N., E. I. Kogotkova, y E. F. Sazhenkova. 1978. *Osvetlenie drozheii viraschennikh na melassie.* *Ferment. Spirt. Prom-st,* No. 7, p. 23-25.
19. Takeda Chemical Industries, Ltd, 1990. European Patent Number 0249435. Method for producing yeast extract.
20. Tong Yang Confectionery Corp. Bolak Co., Ltd., 1997. USA Patent Number 5686277. Fermentation process for preparing xylitol using mutant cells.
21. US Pharmacopoeia XXIII, 1995. p. 2046.
22. Watanabe, K., C. Ishikawa, I. Ohtsuka, M. Kamata, M. Tomita, K. Yazawa, y H. Muramatsu, H., 1997. Lipid and fatty acid compositions of a novel docosa-hexaenoic acid-producing marine bacterium. *Lipids.* 32:975-978.
23. Yokotsura, T., T. Iwaase, T. Okami, y M. Noda. 1974. Protein hydrolysate for food. Patent of Germany, No. 2314984, K. C12D, A231, C. A., vol. 80, 13840.