



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
APLICADA.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMIOLÍTICA Y
PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GLUCÓNICO DE *Aureobasidium
pullulans* EN CULTIVOS POR LOTE Y SEMILOTE UTILIZANDO
ALMIDÓN EXTRAÍDO DE CEBADA MALTERA DE BAJA
CALIDAD.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
APLICADA

PRESENTA:
IBQ. ANGÉLICA HERNÁNDEZ NAVARRETE

DIRECTORES DE TESIS:
DR. JORGE NOEL GRACIDA RODRÍGUEZ.
DR. VÍCTOR ERIC LÓPEZ Y LÓPEZ



TEPETITLA, TLAX. DICIEMBRE 2011.

COMITÉ TUTORIAL:

DRA. FABIOLA JIMÉNEZ MONTEJO

DRA. SILVIA LUNA SUAREZ

DR. FERNANDO LÓPEZ VALDEZ

DR. JORGE NOEL GRACIDA RODRÍGUEZ (UPP)

DR. VÍCTOR ERIC LÓPEZ Y LÓPEZ



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla siendo las 12 horas del día 04 del mes de noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA-Tlaxcala para examinar la tesis titulada:

Evaluación de la actividad amilolítica y producción de ácido gluconico de Aureobasidium pullulans en cultivos en lote y semilote utilizando almidón extraído de cebada maltera de baja calidad

Presentada por el alumno:

Hernández
Apellido paterno

Navarrete
Apellido materno

Angélica
Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	1	9	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestra en Biotecnología Aplicada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA Directores de tesis

Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez

Dr. Víctor Eric López y López

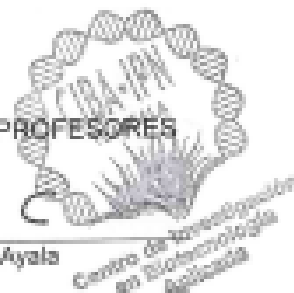
Dra. Silvia Luna Suárez

Dra. Fabiola Eloisa Jiménez Montijo

Dr. Fernando López Valdez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dra. Alma Leticia Martínez Ayala





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla, Tlaxcala el día 30 del mes Noviembre del año 2011, el (la) que suscribe Angélica Hernández Navarrete alumno (a) del Programa de Maestría en Biotecnología Aplicada con número de registro B091192, adscrito a CIBA-IPN Tlaxcala, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Víctor Eric López Y López y cede los derechos del trabajo intitulado Evaluación de la actividad amilolítica y producción de ácido glucónico de *Aureobasidium pullulans* en cultivos por lote y semilote utilizando almidón extraído de cebada maltera de baja calidad, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección vlopezyl@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Angélica Hernández Navarrete

Nombre y firma

El presente trabajo se llevó a efecto en el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, en Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala, bajo la dirección del Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez de la Universidad Politécnica de Pachuca y del Dr. Víctor Eric López Y López del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del I. P. N., con el financiamiento de Fondos Mixtos Hidalgo Clave 97000. Becario CONACYT No 241673 y apoyo de la beca institucional para estudios de posgrado y del Programa Institucional para la Formación de Investigadores del IPN.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor Eric López Y López por su confianza, amistad, por su gran apoyo durante la realización de este trabajo, pero sobre todo por su paciencia.

A los miembros de mi comité tutorial Dra. Fabiola Jiménez Montejo, Dra. Silvia Luna Suarez, Dr. Fernando López Valdez, Dr. Jorge Gracida Rodríguez muchas gracias por todos sus consejos, comentarios y observaciones que me aclararon mucho más la manera de redactar y sobre todo por el tiempo que le dedicaron a esta tesis.

A la Dra. Carmen Cruz y la Dra. Fabiola Jiménez por su amistad, consejos, por las aportaciones realizadas a este trabajo y por el interés de que este trabajo saliera lo mejor posible.

Al Dr. Carlos Gómez Aldapa por su hospitalidad y apoyo en la parte de extracción de almidón.

A los miembros de la Central Analítica del CINVESTAV, M.C. Elvira Ríos Leal, Cirino Rojas y Gustavo, por su paciencia, por los conocimientos compartidos, tiempo y dedicación a la parte de ácidos orgánicos.

CONTENIDO

1.	RESUMEN.....	12
2.	SUMMARY	13
3.	INTRODUCCIÓN.....	14
4.	ANTECEDENTES	16
4.1.	La cebada maltera.	16
4.1.1.	Principales estados productores de cebada.	16
4.1.2.	Características generales.	17
4.2.	Composición química de la cebada.	18
4.2.1.	Almidón de cebada.	18
4.2.2.	Amilosa.	20
4.2.3.	Amilopectina.....	20
4.3.	Cambios hidrotérmicos producidos en el almidón para gelatinización.	21
4.3.1.	Gelatinización.	21
4.4.	Aislamiento del almidón a partir de cereales.	22
4.4.1.	Molienda húmeda para la producción de almidón de cebada.....	22
4.5.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	23
4.6.	Producción enzimática de <i>Aureobasidium pullulans</i>	24
4.6.1.	Amilasas.	24
4.6.2.	α -amilasas (E.C. 3.2.1.1).	24
4.6.3.	Glucoamilasas.	25
4.6.4.	Glucosidasas.....	25
4.6.5.	β -glucosidasas.....	25
4.6.6.	-glucosidasas	26
4.7.	Ácido glucónico.....	26
5.	JUSTIFICACIÓN.	28
6.	OBJETIVOS.	28
6.1.1.	OBJETIVO GENERAL.....	28
6.1.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	28
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.	29
7.1.1.	Microorganismos.	29

7.1.2. Propagación de <i>Aureobasidium pullulans</i> en medio a base de glucosa.	29
7.2. Extracción del almidón a partir del grano de cebada.	29
7.2.1. Fase de limpieza.	29
7.2.2. Fase de extracción del almidón.	30
7.3. Pretratamiento de almidón de cebada con HCl y NaOH.	30
7.4. Formulación del medio a base de almidón para crecimiento y producción de ácido glucónico.....	30
7.5. Evaluación de crecimiento de <i>A. pullulans</i> en medio sólido y cultivo en matraz.	31
7.6. Cultivo por lote a nivel reactor.....	32
7.7. Cultivo Semilote a nivel matraz y reactor.	32
7.8. Cultivo en semilote con medio a base de glucosa a nivel reactor.....	33
7.9. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	33
7.9.1. Cuentas celulares.....	33
7.9.2. Cuantificación de glucosa.	33
7.9.3. Azúcares reductores.	34
7.9.4. Carbohidratos totales.....	34
7.9.5. Ácidos orgánicos.	34
7.10. Ensayos enzimáticos.	35
7.10.1. Determinación de actividad de glucoamilasas de <i>A. pullulans</i>	35
7.10.2. Determinación de actividad de amilasas sobre almidón gelatinizado y sin gelatinizar. 35	
7.10.3. Determinación de β -glucosidasas de <i>A. pullulans</i>	35
7.10.4. Determinación de α - glucosidasas de <i>A. pullulans</i>	36
7.10.5. Determinación de α -amilasas de <i>A. pullulans</i>	36
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	37
8.1. Extracción de almidón a partir de cebada maltera de baja calidad.....	37
8.2. Evaluación de la propagación de <i>A. pullulans</i> cepa CDBB-L-1345 en cultivos en líquido a nivel matraz.....	42
8.3. Evaluación de la producción de ácido glucónico por <i>A. pullulans</i> utilizando el almidón extraído a partir del grano de cebada de baja calidad.	43
8.4. Comparación de crecimiento de <i>A. pullulans</i> cepas ATCC15233 y CDBB-L-1345 en diferentes medios de cultivo y condiciones de pH.	48
8.5. Evaluación del crecimiento de <i>Aureobasidium pullulans</i> en cultivos líquidos.	54

8.6.	Fermentación en cultivo semilote a base de glucosa nivel fermentador.....	65
8.7.	Producción de ácido glucónico.	68
8.8.	Determinación de actividades amilolíticas en cultivo por lote y semilote.	75
9.	Costo de producción de la fermentación de <i>A. pullulans</i> utilizando almidón extraído de la cebada de mala calidad.	85
10.	CONCLUSIONES.....	82
11.	PERSPECTIVAS.....	83
12.	BIBLIOGRAFIA.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Canal de comercialización de la cebada maltera en México.	15
Figura 2. Principales estados productores de cebada.	17
Figura 3. Estructura de la amilosa y amilopectina.	19
Figura 4. Estructura de la amilosa.	20
Figura 5. Estructura de la amilopectina.	21
Figura 6. (A) Cebada sucia, (B) Cebada limpia.	37
Figura 7. (A) Cáscara de cebada. (B) grano de cebada sin cascarilla.	38
Figura 8. Harina obtenida a partir de la cebada de mala calidad.	38
Figura 9. (A) Macerado (B) Tamizado de producto de molienda, (C) Suspensión obtenida, (D) fases obtenidas después de centrifugar.	40
Figura 10. (A) Almidón y (B) Fase color café.	40
Figura 11. Cinética de crecimiento de <i>A. pullulans</i> en medio líquido basado en glucosa.	43
Figura 12. A) crecimiento de <i>A. pullulans</i> y consumo de sustrato y B) Cromatograma a la hora 10 de fermentación.	45
Figura 13. A) Crecimiento de <i>A. pullulans</i> y consumo de glucosa y B) cromatograma obtenido a la hora 10 de fermentación.	47
Figura 14. Crecimiento y morfología en cultivos en placa. A) Cepa ATCC15233 y (B) cepa CDBB-L-1345 a 24 h de incubación. C) cepa ATCC15233 y D) cepa CDBB-L-1345 a 48 h de incubación.	49
Figura 15. ATCC15233 a 72 h de incubación en Saboraud y Czapeck.	50
Figura 16. Morfología de <i>A. pullulans</i> a siete días de incubación. A) Cepa ATCC15233 y B) Cepa CDBB-L-1345 en medio Saboraud, PDA y Czapeck.	50
Figura 17. A) Cepa ATCC15233 y B) Cepa CDBB-L-1345 a 24 h de incubación; C) Cepa ATCC15233 y D) Cepa CDBB-L-1345 a 48 h de incubación.	51
Figura 18 Comparación de crecimiento de <i>A. pullulans</i> en medios sólidos formulados con almidón extraído de la cebada a pH 5.5. (A) Cepa ATCC15233 y (B) Cepa CDBB-L-1345.	52
Figura 19. Muestra Cepa ATCC15233 y B) Cepa CDBB-L-1345 a pH 6.7 a 7 días de incubación.	53
Figura 20. Cambios morfológicos de <i>A. pullulans</i> a diferentes condiciones de pH (Li et al. 2009).	54
Figura 21. Crecimiento de <i>A. pullulans</i> ATCC15233 a nivel matraz.	55
Figura 22. Fermentador de 5 l	55
Figura 23. (A) Correlación de crecimiento y consumo de sustratos (B) perfil de consumo de NaOH.	57
Figura 24. Cinética en matraz C:N 80	59
Figura 25. Fermentaciones a nivel matraz en medios líquido basados en almidón a diferentes relaciones C:N, (B) 100 y (C) 200.	60
Figura 26. A) relación de crecimiento y consumo de sustratos B) relación del crecimiento con el consumo de NaOH.	62
Figura 27. Consumo de sustratos, (B) relación de crecimiento y perfil de oxígeno disuelto	63
Figura 28. Cinética en cultivo semilote de <i>A. pullulas</i> a relación C: N de 500.	65
Figura 29. A) Crecimiento y consumo de glucosa, (B) Relación del crecimiento con consumo de glucosa y carbohidratos totales.	66
Figura 30. Relación del crecimiento con el consumo de NaOH.	67
Figura 31. Producción de ácido glucónico. (A) Nivel matraz, (B) medio a base de almidón en cultivo semilote C:N=80.	70
Figura 32. Producción de ácido glucónico en medio a base de glucosa y en medio a base de almidón cultivo en semilote relación C:N=500.	70

<i>Figura 33. Cromatograma de estándar de ácido glucónico.</i>	71
<i>Figura 34 A) Cromatograma a las 35h de fermentación en medio basado en almidón y B) cromatograma a las 37h de fermentación medio a base de glucosa.</i>	72
<i>Figura 35. Cinética de crecimiento de A. pullulans y producción de glucoamilasas.</i>	76
<i>Figura 36. Crecimiento de A. pullulans y actividad de α-glucosidasas, β-glucosidasas y α-amilasas en cultivos en lote a nivel fermentador.</i>	78
<i>Figura 37. Correlación de enzimas amilolíticas y consumo de sustrato en cultivos en lote.</i>	79
<i>Figura 38. . Actividad enzimática con almidón gelatinizado y sin gelatinizar</i>	80
<i>Figura 39 Perfil de glucosa liberado con almidón gelificado y sin gelificar en muestras obtenidas en la fermentación en lote.</i>	81
<i>Figura 40 Actividad de amilasa en cultivo semilote de A. pullulans.</i>	82
<i>Figura 41. Crecimiento de A. pullulans y producción de α-glucosidasas y β-glucosidasas en cultivos en semilote.</i>	83
<i>Figura 42. Comportamiento de la producción de enzimas amilolíticas en cultivo semilote.</i>	84

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Composición química de la cebada (Astiasarán et al. 1999)</i>	18
<i>Tabla 2. Algunas características de amilosa y amilopectina (Thomas et al 1997)</i>	19
<i>Tabla 3. Formulación del medio para crecimiento de A. pullulans y producción de ácido glucónico</i>	31
<i>Tabla 4. Formulación para producción de ácido glucónico medio a base de glucosa</i>	33
<i>Tabla 5. Rendimientos obtenidos en la fase de limpieza a partir de cebada maltera de baja calidad</i>	39
<i>Tabla 6. Rendimientos obtenidos en la fase de extracción a partir de cebada de mala calidad.</i>	41
<i>Tabla 7. Crecimiento de A. pullulans</i>	42
<i>Tabla 8 Parámetros cinéticos de la cepa de A. pullulans ATCC15233 en cultivo en lote reactor de 5 litros.</i>	58
<i>Tabla 9 Parámetros cinéticos de la cepa de A. pullulans ATCC15233 en cultivo en semilote con medio basado en almidón en reactor de 5 litros.</i>	64
<i>Tabla 10 Parámetros cinéticos de la cepa de A. pullulans ATCC15233 en cultivo en semilote con medio basado en glucosa en reactor de 5 litros.</i>	68
<i>Tabla 11 Bioproductos sintetizados a partir de A. pullulans y sus aplicaciones potenciales (Chi et al. 2009)</i>	74
<i>Tabla 12. Comparación de la actividad de glucoamilasas.</i>	76
<i>Tabla 13 Comparación del costo estimado de la fermentación de A. pullulans con almidón comercial extraído partir de maíz y almidón extraído de la cebada maltera de baja calidad. Base de cálculo 1000 litros.</i>	78
<i>Tabla 14 Comparación del costo estimado de la fermentación de A. pullulans con glucosa y almidón extraído de la cebada maltera de baja calidad. Base de cálculo 1000 litros.</i>	80

1. RESUMEN

En México existe una producción de cebada maltera de baja calidad que no puede colocarse en el único mercado existente. Esta cebada puede ser un sustrato potencial de bajo costo para la producción de productos de valor agregado gracias al almidón contenido en el grano. *Aureobasidium pullulans* es un hongo tipo levadura que ha sido reconocida como una levadura de interés industrial y ha sido reportada la producción de enzimas amilolíticas y ácido glucónico entre otros. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad amilolítica y la producción de ácido glucónico, utilizando almidón extraído de cebada de baja calidad del Estado de Hidalgo. Se estableció una metodología de extracción del almidón, de la cual se obtuvo un rendimiento de recuperación del 31.8%. Con el almidón extraído se formularon medios sólidos y medios líquidos a distintas relaciones carbono: nitrógeno (C:N) y se evaluaron dos cepas de *A. pullulans* la ATCC15233 y la CDBB-L 1345. La cepa ATCC15233 fue la que presentó mejores características de crecimiento en medio sólido a una relación C:N de ocho. Esta relación fue utilizada en cultivos en matraz y en reactor de 5 l. Los primeros experimentos se enfocaron a la producción de ácido glucónico a nivel reactor en cultivos en lote y semilote, pero la concentración máximas alcanzadas fue de 3.5 g/l con medio basado en almidón en cultivo semilote a una relación C:N de 500. Sin embargo, la capacidad de hidrólisis de la levadura fue notable en todos estos experimentos al determinar una acumulación de azúcares reductores y glucosa residual en el medio. Las máximas actividades enzimáticas determinadas en cultivo en lote fueron: amilasas, 291 U/ml; α -glucosidasas, 7.6 U/ml; β -glucosidasas, 1.7 U/ml y α -amilasas, 10.8 U/ml. Para el cultivo en semilote las actividades enzimáticas fueron: amilasas, 260 U/ml; α -glucosidasas, 2.6 U/ml y β -glucosidasas, 0.38 U/ml. En otros experimentos se demuestra la actividad de las enzimas amilolíticas con almidón gelatinizando y sin gelatinizar. Estas enzimas son importantes para la hidrólisis de almidón. Con estos resultados se demuestra que la utilización del almidón de cebada de baja calidad puede ser un sustrato potencial en la producción de productos de valor agregado tales como enzimas amilolíticas que son demandadas industrialmente para diversas aplicaciones.

2. SUMMARY

Although, there is one market for all malt Barley produced in Mexico, some portion of it is rejected because did not fulfill the grain quality requirements established by for malt production industry. Hence, local farmers stored the grains for several months or barley grain is sold as cattle food. This low quality grain could be useful as a low cost raw material for production of value added products due to its starch content. *Aureobasidium pullulans* is fungus yeast like that has been recognized as important industrial yeast that produces amylolytic enzymes and gluconic acid. The goal of this study was to evaluate gluconic acid production and amylolytic activities using starch extracted from low quality Barley grain from Hidalgo State, Mexico. In this study, it was established a methodology to extract barley starch, the yield obtained was 31.8% on dry mass basis. This barley starch were used to formulate solid and liquid media culture with different carbon:nitrogen ratio. The strains *A. pullulans* ATCC15233 and CDBB-L1345 were evaluated. The strain ATCC15233 showed a faster growth in solid media at C:N ratio of eight. The experiments conducted in reactor with 5-liters were focused in gluconic acid production, but maximum acid concentration was 3.5 g/l in media formulated with barley starch and C:N of 500. However, it was noticed the hydrolytic capacity of *A. pullulans* to barley starch due to the accumulation of reduced sugars as well as residual glucose determined in fermentations. Maximum enzymatic activities determined in batch cultures at reactor level were glucoamylases, 291 U/ml; α -glucosidasas, 7.6 U/ml; β -glucosidasas, 1.7 y α -amylases, 10.8 U/ml. For semi-batch culture the activities were glucoamylases, 260 U/ml; α -glucosidasas, 2.6 U/ml y β -glucosidasas, 0.38 U/ml. Also, it were determined the glucoamylase activities by cell free supernatants on gelatinized and ungelatinized barley starch. These enzymes are important for efficient hydrolysis of starch. These results demonstrate that starch extracted from low quality barley grain could be useful as an economic raw material to produce value added products like amylolytic enzymes that have industrial interest applications.

3. INTRODUCCIÓN.

En la actualidad la cebada es el cuarto cereal cultivado a nivel mundial después del trigo, arroz y maíz. En México los Estados de Hidalgo y Tlaxcala son los dos principales productores de cebada en grano de temporal (SAGARPA 2009). La cebada producida por ambos estados es de la especie *Hordeum vulgare* de seis hileras de grano. La cebada es la principal materia prima de la industria maltera – cervecera. Si la producción de cebada no reúne los criterios de calidad requeridos, el grano se destina a la ganadería al no haber otra alternativa en el mercado o proceso de transformación donde se coloque su producción. Adicionalmente solo existe una empresa comercializadora de cebada en México, controlada por el monopolio cervecero del país. Entonces es de vital importancia crear procesos alternos de transformación de cebada en nuestro país que puedan utilizar el grano que no puede ser colocado en la industria de la cerveza.

Existen 18 estados en México que reportan siembra de cebada. Sin embargo, el altiplano central es la principal zona productora de cebada maltera. Entre 1980 y 2003, los estados de Hidalgo, México, Puebla y Tlaxcala aportaron el 68% del grano producido en México cultivado en zonas de temporal, sumando la cosecha de Guanajuato, donde se siembra en condiciones de riego, la cifra llega al 77% (Aguilar et al. 2004). En México se considera que el 90% de la producción de cebada se destina a la elaboración de la malta para la producción de cerveza y algunos de los subproductos (del proceso de malteo) se destina a alimentación de ganado, productos químicos (SAGARPA 2004). No obstante el éxito de esta agroindustria en el mercado doméstico e internacional, los beneficios no han llegado del todo a los productores cebaderos mexicanos, que se ven desplazados por la importaciones, de la malta obtenida del grano, la cual está libre de arancel y es el principal insumo en la fabricación de la cerveza (Schewentesius et al. 2004). En el período 2002-2007, México importó 1,397 millones de toneladas de cebada y otros productos derivados, equivalentes a \$264 millones de dólares. Entre 2006 y 2007, el volumen de importaciones de este producto presentó una disminución del 6.5%. Cifras preliminares indican que en 2008, el volumen de importaciones de cebada y sus derivados aumentó en 59%, respecto a 2007. El 57% de las importaciones realizadas

en este período provinieron de los Estados Unidos y Canadá, los cuales participan con el 43% y 11% del volumen total (Financiera Rural 2009). Por lo tanto al no tener otra alternativa la cebada pasa hacer consumo para animales o simplemente se almacena. Una de las alternativas para esta industria, es utilizarse como materia prima para producción de compuestos de mayor valor agregado y al igual que la cerveza, por medio de fermentación, como pueden ser la producción de metabolitos secundario, enzimas, etc. El único canal de comercialización de la cebada maltera en México, es el reportado en la Figura 1.

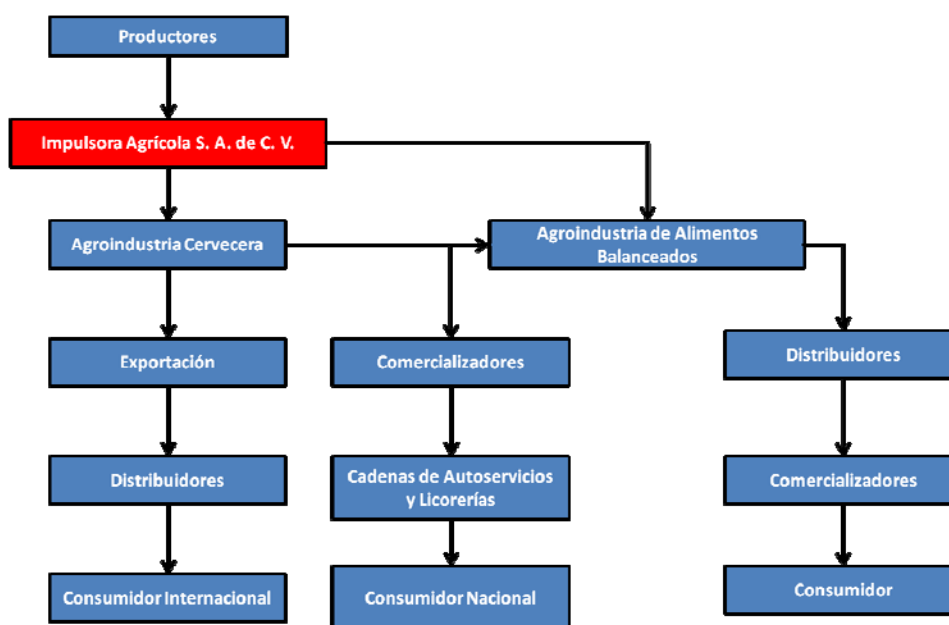


Figura 1. Canal de comercialización de la cebada maltera en México.

4. ANTECEDENTES

4.1. La cebada maltera.

La cebada pertenece a la familia de las gramíneas, plantas herbáceas con flores. Pertenece al género *Hordeum* dentro de este género se encuentran las especies: *Hordeum vulgare* L., que incluye las variedades con espigas de 6 hileras y *Hordeum distichum* L., que incluye a las variedades de espigas de 2 hileras las especies más importantes en la industria cervecera (Hornsey 2003). Las exigencias en cuanto al clima son muy pocas, por lo que su cultivo se encuentra muy extendido, aunque crece mejor en los climas frescos y moderadamente secos. Requiere pocas unidades de calor para alcanzar la madurez fisiológica, por ello alcanza altas latitudes y altitudes, está adaptada a un amplio intervalo de condiciones ambientales en las zonas templadas y frías, alcanza de 70 a 110 cm de altura. Además el uso de la producción depende de la calidad maltera, ya que generalmente la cebada tiene dicho uso (Financiera rural 2009).

4.1.1. Principales estados productores de cebada.

El estado de Guanajuato, produjo 313 mil de toneladas en promedio entre el año 2002 y 2008; sin embargo, para este último año la producción total fue de 242 miles de toneladas, lo que equivale a un aumento del 11% respecto a la producción presentada en 2007, su Tasa Media Anual de Crecimiento (TMAC) en el período 2002–2008 es de 4.5%.

Hidalgo es el segundo estado productor de cebada, entre el año 2002 y 2008 registró una producción promedio de 213 miles de toneladas por año. Al cierre de 2008, la producción total fue de 242 miles de toneladas, 36% superior a la producción registrada en 2007. En 2006, Hidalgo alcanzó una producción récord de 263 miles de

toneladas; sin embargo, a partir de ese año, su producción presenta altas (2008) y bajas (2007), lo cual se ve reflejado en la TMAC de 8% en el período (2002-2008). Los estados de Tlaxcala y Estado de México representan el 19% de la producción nacional con un volumen de 90 y 62 miles de toneladas respectivamente. Durante el período 2002-2008, Tlaxcala presentó altibajos en su producción, ubicando la TMAC en 7.5%, mientras que la TMAC más alta nacional se presenta en el Estado de México, del 16% (Financiera Rural 2009).

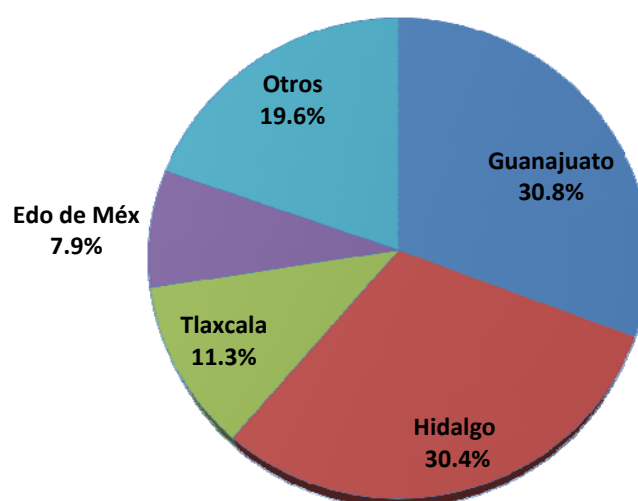


Figura 2. Principales estados productores de cebada.

4.1.2. Características generales.

El principal uso de la cebada es para la producción de cerveza uno de los primeros procesos biotecnológicos, la cual se caracteriza por tener carbohidratos fermentables, proteínas, minerales y una alta actividad enzimática. Existen una gran variedad de parámetros que determinan una cebada de buena calidad como son: color, la humedad, el porcentaje de germinación, el peso de los mil granos, el grado de pureza, tamaño y forma del grano, etc. En la Tabla 1 se muestra la composición de la cebada en base seca.

Tabla 1. Composición química de la cebada (Astiasarán et al. 1999)

Componentes	Cebada (%)
Agua	11.7
Proteína	10.6
Lípidos	2.1
Almidón	52.2
Otros HCO ^a	19.6
Fibra cruda	1.6
Minerales	2.3

a= HCO: Hidratos de Carbono

4.2. Composición química de la cebada.

4.2.1. Almidón de cebada.

El almidón es un polímero semicristalino compuesto de D-glucosa unidas entre sí mediante enlaces glucosídicos, de gran abundancia en la naturaleza, por lo que se considera una buena fuente de obtención de este azúcar para la fermentación económica y rentable (Navarro y Sossa 2003). La cantidad de almidón contenido en el grano de cereal varía pero generalmente oscila entre el 60 y 75 % del peso del grano. El almidón presente en los granos es el más importante de los carbohidratos para fines industriales resultando preciso degradarlo enzimáticamente con una gelatinización previa por acción de calor sometándolo a un intenso trabajo mecánico. El almidón consta de dos fracciones: amilosa (20% p/p) que es soluble en agua y amilopectina (80% p/p) que es insoluble en agua con alto peso molecular. En la Figura 3 se presenta la estructura de la amilosa y amilopectina y en la Tabla 2 se observan algunas de las características de amilosa y amilopectina.

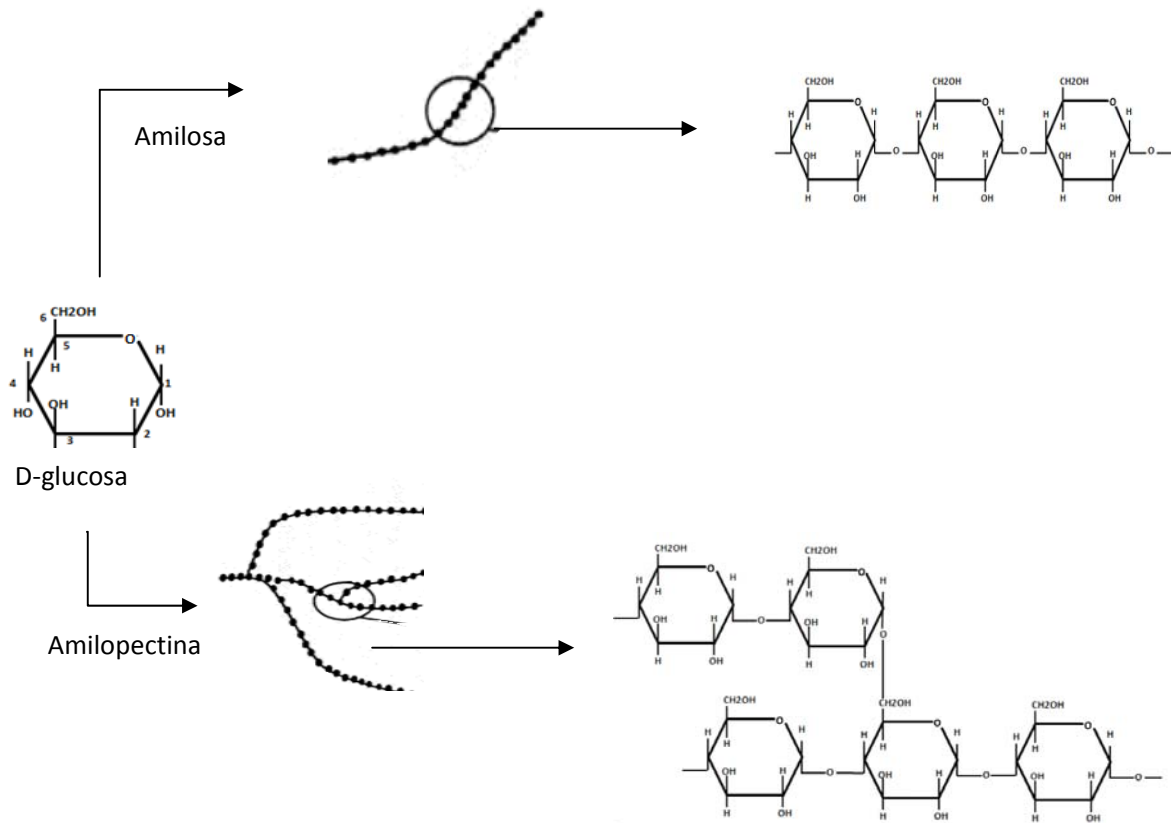


Figura 3. Estructura de la amilosa y amilopectina.

Tabla 2. Algunas características de amilosa y amilopectina (Thomas et al 1997)

Características	Amilosa	Amilopectina
Forma	Esencialmente lineal	Ramificada
Enlace	α -(1-4)	α -(1-4) y α -(1-6)
Peso molecular	Típicamente <0.5 millón g/mol	50-500 millón g/mol
Película	Fuerte	Débil
Color con yodo	Azul	Marrón rojizo

4.2.2. Amilosa.

Es un polímero lineal formado por D-glucosa que se encuentran unidas entre sí por enlaces α -(1-4) que representa un 99% de su estructura; también se ha probado la presencia de ciertas ramificaciones unidas por enlaces α -(1-6) (Figura 4). Dichas ramificaciones se encuentra de forma espaciada e infrecuente, lo que permite observar su comportamiento esencialmente lineal (Biliaderis 1998; Buléon et.al. 1998), tiene una masa molar aproximada de 10^5 - 10^6 Da. La naturaleza lineal, flexible y de gran longitud de la cadena de amilosa, le confiere la capacidad de enrollarse formando una estructura helicoidal, con 6 unidades de D-glucosa por giro, de esta forma dentro de la hélice se propicia un entorno hidrofóbico, con la capacidad de formar complejos con yodo, alcoholes o ácidos orgánicos (Morrison 1995; Tang et al. 2002). Se ha considerado que las regiones helicoidales son relativamente rígidas y se presentan de 10 a 15 giros por región (Whistler y Daniel 1984).

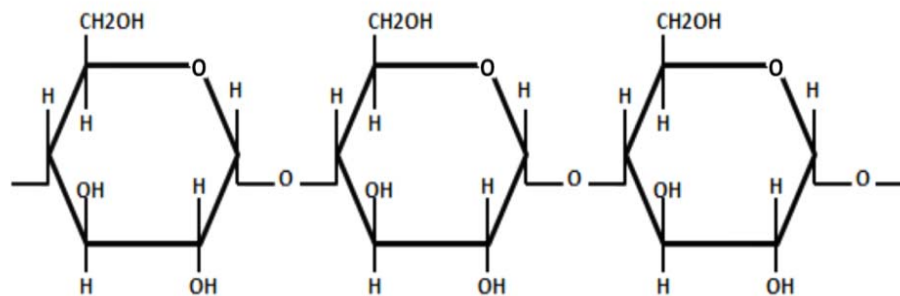


Figura 4. Estructura de la amilosa.

4.2.3. Amilopectina.

Es un polímero semicristalino y altamente ramificado, formando por aproximadamente 595,238 unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces α -(1-4) que representan un 92-96% con puntos de ramificación unidos mediante enlaces α -

(1-6) que representan un 5-6% de su estructura. Dichas ramificaciones se localizan aproximadamente cada 15 o 25 unidades de D-glucosa, aunque el intervalo puede excederse a 19 o 31 unidades dependiendo del contenido de amilosa en el almidón (Biliaderis 1998; Tang et al. 2002).

La amilopectina tiene un peso molecular mucho mayor que la amilosa, alrededor de 10^7 - 10^9 Da (Buléon et al. 1998; Morrison et al. 1990). Dependiendo de la fuente botánica, la amilopectina es el principal componente en la mayoría de los almidones (70-80%), (Eerlingen y Delcour 1995).

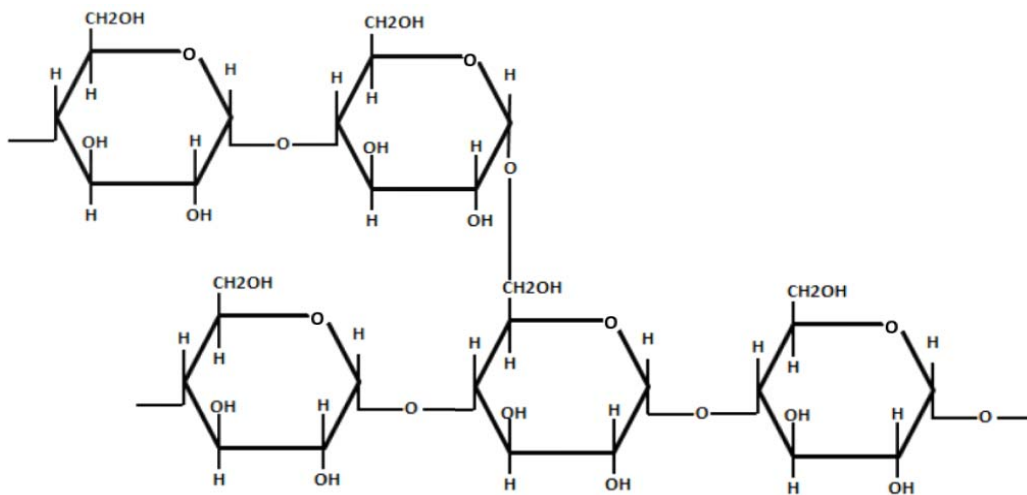


Figura 5. Estructura de la amilopectina.

4.3. Cambios hidrotérmicos producidos en el almidón para gelatinización.

4.3.1. Gelatinización.

A temperatura ambiente los gránulos de almidón son insolubles en agua, sin embargo, si una suspensión acuosa se calienta por encima de 60 °C los gránulos comienzan a hincharse. Eventualmente, las moléculas de almidón se dispersan en la solución. Este proceso se le conoce como gelatinización.

La temperatura necesaria para la completa dispersión o gelatinización depende de la fuente de almidón. Para la mayoría de los almidones una temperatura de 105-110 °C es suficiente. A los 25-40% de sólidos secos, la viscosidad del almidón gelatinizado es muy alta, por lo que se requiere un agente de adelgazamiento. La disminución de la viscosidad se puede lograr mediante una combinación de fuerza de corte ejercida y la acción de ácidos o enzimas (Bentley 1999).

4.4. Aislamiento del almidón a partir de cereales.

El paso más importante para el almidón es el aislamiento, el cual debe lograrse sin que haya una modificación significativa de su estructura y que este sea obtenido en cantidades suficientes. Los procesos para la extracción de almidón a partir de cereales son denominados de “molienda húmeda”. El grano es remojado en soluciones con diversos compuestos químicos que tienen la finalidad de impedir el crecimiento de microorganismos y romper la matriz proteica que está íntimamente ligada con los gránulos de almidón. Además se usa agua como vínculo para lograr la conducción, separación y purificación de este importante carbohidrato (Serna 2001; Ji et al 2004).

4.4.1. Molienda húmeda para la producción de almidón de cebada.

Antes de iniciar el proceso de molienda húmeda, a los granos de cebada se les realiza un proceso de limpieza mecánica donde se quita toda material no deseado, como ramas, piedras, otros granos como la avena, pedazos de insectos. Un aspirado remueve paja y desempolva los granos y los electroimanes quitan pedazos de metales que pudieran contener (Bemiller et al. 1984).

El macerado o remojo, es el paso más importante del proceso ya que con este da inicio la molienda húmeda. En este paso la mayor parte del germen es liberado de manera íntegra ya que se tendría el riesgo de liberar lípidos, los cuales serían absorbidos en su mayoría por el gluten dificultando su extracción. Más de la mitad

del almidón y gluten está siendo liberado en esta etapa. El resultado de la molienda es recuperado mediante hidrociclones para separar el germen de la mezcla de fibra, almidón y gluten, tomando en cuenta la densidad de las distintas fracciones obtenidas (Bemiller et al. 1984; Serna 2001).

Una vez que se tiene separado al germen, se procesa a realizar una molienda al endospermo con la finalidad de obtener partículas más finas. Mediante tamizado, se logra separar el almidón que deriva principalmente del endospermo harinoso y gluten del material fibroso; el almidón que resta de las piezas más grandes de fibra es recuperado de manera más eficiente por lavado. En este punto el producto principal contiene almidón, gluten y material orgánico soluble.

La menor densidad de las partículas de gluten hidratado (1.1 g/cm^3), en comparación con el almidón (1.5 g/cm^3) facilitando su separación por centrifugación generalmente en dos fases: 1) en la parte superior una capa color amarillo correspondiente al gluten y 2) por otro lado una capa blanca perteneciente al almidón, el cual es lavado y filtrado para quitar cualquier residuo de gluten que haya quedado. Una segunda centrifugación ayuda a que el contenido final de proteínas disminuya. Finalmente el almidón se deshidrata mediante inyección del producto húmedo en un secador con corriente de aire caliente (Bemiller et al. 1984).

4.5. *Aureobasidium pullulans*.

Aureobasidium pullulans es un hongo tipo levadura, es un saprobio de distribución mundial, más común del suelo, hojas y madera de los árboles. Se aísla de cocinas y baños y puede estropear las paredes pintadas. Además, es un buen modelo para estudiar el estrés provocado por las sales y el calor, debido a que también se aísla de manera frecuente a partir de medios ambientes marinos (Managbanag y Torzilli, 2002.) *A. pullulans* ha sido considerado como un efectivo agente de biocontrol (Mounir et al. 2007) fue aislada de la superficie de la manzana en Marruecos y previamente seleccionada por su alta actividad antagonista contra *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* (Mounir et al. 2007). *A. pullulans* tiene muchos usos en

diferentes campos por que tiene la capacidad de producir pululano, enzimas extracelulares tales como proteasas, lipasas y amilasas, sideroforos, ácido glucónico (Chi et al. 2009).

4.6. Producción enzimática de *Aureobasidium pullulans*.

Se ha reportado que *A. pullulans* produce enzimas de las cuales se encuentran el grupo de las amilasas.

4.6.1. Amilasas.

Las amilasas son enzimas que hidrolizan moléculas de almidón dando diversos productos incluyendo dextrinas y progresivamente pequeños polímeros compuestos por unidades de glucosa. Las amilasas pueden ser sintetizadas de diversas fuentes incluyendo plantas, animales y microorganismos. Las amilasas se pueden dividir en tres grupos: α -amilasas, β -amilasas y glucoamilasas. La familia de las enzimas amilasas son de gran interés en la biotecnología porque su uso lo tienen principalmente en la sacarificación de almidones y también en las industrias textil y alimentos. Las α -amilasas son unas de las más populares y las más importantes a nivel industrial (Días 2003).

4.6.2. α -amilasas (E.C. 3.2.1.1).

Las α -amilasas han sido derivadas de diversos hongos, levaduras, bacterias y actinomicetos, sin embargo las enzimas de hongos y bacterias tienen dominado la aplicación en el sector industrial (Gupta et al 2003). Cataliza la hidrólisis al azar los enlaces glucosídicos α -1,4 de la región central de la cadena de amilasas y amilopectina, exceptuando las moléculas cercanas a la ramificación, obteniendo como resultado glucosa, maltosa y oligosacáridos de varios tamaños (Couto 2005). Esta enzima tiene un peso molecular de 50 KDa, estable a valores de pH entre 5.5 y

8.0 con una actividad óptima en pH 5.9. Las α -amilasas son enzimas dependientes de calcio, aunque el catión no esté integrado en el centro activo de la enzima, se encuentra frecuentemente unido a la enzima y solo puede ser removido a valores de pH bajos por el uso de agentes quelantes. La completa remoción de calcio conlleva a una pérdida total de actividad (Pedroza 1999). Se cree que el Ca^{+2} estabiliza la conformación global de la enzima, encontrando hasta 10 iones por molécula de enzima (Carrera 2003). La importancia radica en que mantiene la molécula de la enzima en la configuración óptima para generar una máxima actividad y estabilidad. A menudo se nombra la α -amilasa como enzima licuante, debida a su rápida acción para disminuir la viscosidad de las soluciones de almidón (Pedroza 1999).

4.6.3. Glucoamilasas.

El principal producto final de la acción de la glucoamilasa sobre el almidón es glucosa la diferencia claramente de la α -amilasa y la β -amilasa. La enzima también produce pequeñas cantidades de oligosacáridos. La sacarificación del almidón puede alcanzar hasta 96% de dextrosa. La acción de la enzima causa la inversión de la configuración, produciendo β -glucosa, su actividad es máxima entre pH 4 y 5.5, y temperatura alrededor de 55-65 °C (Carrera 2003).

4.6.4. Glucosidasas

Enzimas que catalizan la hidrólisis de diferentes glucósidos, la actividad de las β -glucosidasas es la que predomina en este grupo de enzimas (Valderrama 2001).

4.6.5. β -glucosidasas.

Es una importante enzima del complejo celulolíticos necesaria para la completa hidrólisis de celulosa, las β -glucosidasas hidrolizan celulosa a glucosa, son también capaces de degradar antocianinas, produciendo azúcares libres (Ribeiro et al. 2007).

La β -glucosidasa es generalmente responsable de la regulación de todo el proceso celulolítico y es un factor importante en la hidrólisis enzimática de la celulosa. La síntesis de estas enzimas depende de diversos factores tales como la edad del cultivo, la presencia de compuestos inductores en el medio y de los niveles intracelulares de nutrientes y minerales (De Palma et al. 2002).

4.6.6. α -glucosidasas

La α -glucosidasa es una exoenzima que acorta las cadenas de almidón en una unidad, a partir del extremo no reductor y libera glucosa. Necesita agua para realizar la hidrólisis, ataca enlaces α -1,4 ó α -1,6 éste último con menos frecuencia (González 2002). Responsable del desdoblamiento poli y oligosacáridos a monosacáridos absorbibles. El intervalo de pH para la acción de la enzima es de 3.5 a 7 y la temperatura óptima es de 65 °C.

4.7. Ácido glucónico

El ácido glucónico es un ácido débil, no tóxico, no corrosivo y altamente soluble en agua. Sus aplicaciones se encuentran en las industrias: química, farmacéutica, plásticos, alimentos, bebidas, textilera y otras. También puede ser usado en propósitos de limpieza y en la industria de la construcción, como aditivo de cementos para incrementar su resistencia y estabilidad (Milson et al. 1985; Huestede et al. 1989, Roher 1996,). La producción anual del ácido glucónico es de 50,000-60,000 toneladas anuales (Gavrilescu et al. 2005), por lo que puede ser un producto de comercialización a partir de la cebada siempre y cuando se obtengan altos rendimientos. Hasta el momento se han reportado una serie de microorganismos capaces de producir el ácido glucónico, los hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, y *Mycoderma* y bacterias como: *Gluconobacter* sp. Su producción anual

es de 50,000 a 60,000 toneladas (Gayrilescu et al. 2005). Su precio depende del grado de pureza.

Con la información planteada hasta el momento es necesario desarrollar procesos de transformación en México, gracias a la Biotecnología es posible realizar lo anterior. Por lo que se pueden aprovechar materias primas como la cebada maltera de baja calidad por medio de organismos notable de importancia industrial como *Aureobasidium pullulans*. En este contexto se presenta la factibilidad de usar el almidón extraído de cebada de mala calidad del Estado de Hidalgo y su aplicación en la producción de enzimas de interés industrial.

5. JUSTIFICACIÓN.

Los procesos de transformación de materias primas en México son escasos, por lo que surge la necesidad de establecerlos y se crea una alternativa tanto a productores en particular de la cebada como a empresarios interesados en obtener productos de mayor valor agregado. El presente estudio pretende evaluar la actividad de enzimas amilolíticas y la producción de ácido glucónico y demostrar la factibilidad de utilizar almidón extraído de cebada maltera de mala calidad para ser utilizado en la generación de productos de mayor valor agregado.

6. OBJETIVOS.

6.1.1. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la producción de ácido glucónico y las actividades amilolíticas en cultivo por lote y semilote utilizando cebada maltera de baja calidad.

6.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Establecer un proceso de extracción de almidón de cebada maltera de baja calidad para formular un medio de cultivo.
- Establecer un proceso de fermentación para la producción de *Aureobasidium pullulans* a partir de almidón del grano de cebada de baja calidad.
- Evaluar la capacidad de amilolítica y de producción de ácido glucónico en cultivos en lote y semilote.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1.1. Microorganismos.

Los microorganismos utilizados fueron dos cepas de *Aureobasidium pullulans* la CDBB-L 1345 de colección microbiana del CINVESTAV y la ATCC-15233. *A. pullulans* se sembró en placas de en agar papa dextrosa (PDA) y se incubó a 30°C durante 48 h. Las células fueron conservadas en tubos inclinados en medio PDA, para su conservación se hicieron resiembras periódicas.

7.1.2. Propagación de *Aureobasidium pullulans* en medio a base de glucosa.

La cepa de *A. pullulans* CDBB-L 1345 se creció en medio sólido PDA, se incubó la placa a 30 °C, de esta placa se tomaron colonias a diferentes tiempos de incubación (12, 24, 36 h) y se inocularon en matraces con medio líquido a base de glucosa y estos a su vez se incubaron a 30 °C, 160 rpm y se tomaron muestra cada 24 h.

7.2. Extracción del almidón a partir del grano de cebada.

La extracción del almidón se realizó empleando las modificaciones reportadas por de Wang y Wang (2004).

7.2.1. Fase de limpieza.

La cebada completa fue pesada y clasificada. Para quitar impurezas se utilizó un tamiz del No. 8 y 10 US (Unidades estándar). Posteriormente, la cebada libre de impurezas fue molida en una licuadora de uso doméstico a máxima velocidad

durante 2 min dándole un descanso entre cada minuto para evitar calentamiento de la cebada. La harina obtenida se pesó para determinar rendimientos.

7.2.2. Fase de extracción del almidón.

La harina se sometió a un tratamiento con NaOH al 0.1%, en una mezcla 1:2 (p/v) durante 18 h a 4 °C. Después de esta maceración la harina húmeda se molió en licuadora a máxima velocidad durante 2 min dando reposo entre cada minuto para evitar calentamiento (dos ciclos). La suspensión obtenida se tamizó en malla del No. 100 (0.150 mm) y 200 (0.075 mm). Las partículas obtenidas se lavaron dos veces con agua destilada. Esta operación de molienda-lavado se realizó dos veces. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 10000 rpm, 10 min a 4 °C, el sobrenadante fue descartado. El paquete obtenido contiene las dos fases, la del almidón y la proteica. La fase inferior que es la que contiene almidón se recupera y resuspende en agua, se ajusta a un pH de 6.5 con HCl, posteriormente el almidón se centrifugó a las mismas condiciones que las anteriores, se desechó el sobrenadante y se obtiene la fase que contiene el almidón se secó a 30 °C durante 24 h.

7.3. Pretratamiento de almidón de cebada con HCl y NaOH.

Se emplearon cuatro tratamientos, tres usando ácido clorhídrico a concentraciones 2 % durante 2 h, 4 % por 4 h y 6 % por 6 h y un último tratamiento usando H₂SO₄ a una concentración de 0.05 M a 50 °C. Todos se prepararon a una relación 1:3 p/v.

7.4. Formulación del medio a base de almidón para crecimiento y producción de ácido glucónico.

Con el almidón extraído de la cebada se realizó la formulación del medio para el crecimiento de *A. pullulans* y la producción de ácido glucónico, como se observa en la Tabla 3 en la cual se presenta la composición del medio el cual se vario

proporcionalmente la fuente de carbono y de nitrógeno para obtener las diferentes relaciones C:N requeridas.

Tabla 3. Formulación del medio para crecimiento de *A. pullulans* y producción de ácido glucónico

Componente	Concentración (g/l)
Almidón	50
NH ₄ Cl	8.6
Extracto de levadura	5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
KH ₂ PO ₄	0.3
CaCO ₃	5
Tiamina	0.001

7.5. Evaluación de crecimiento de *A. pullulans* en medio sólido y cultivo en matraz.

Para mejorar el crecimiento de la levadura, primero se hizo crecer en diferentes medios sólidos: PDA, Sabraud y Czapek; adicionalmente se usó como fuente de carbono el almidón extraído de cebada a 3 diferentes relaciones C:N (8, 15 y 20) (Tabla 3) y a dos condiciones de pH 5.5 y 6.7, se incubaron a 30°C y se monitorearon hasta las 72 h. Se inocularon matraces con medios líquidos formulados con el medio basado en almidón (Tabla 3) a las tres relaciones C:N mencionadas anteriormente, las sales reportadas por Anastassiadis et al. (2003). Las condiciones a las que se incubaron los medios líquidos fueron 30°C a 200 rpm y pH 5.5. El medio usado para placas fue el mismo medio usado en medio líquido solo que se le agregó 20 g/l de agar.

7.6. Cultivo por lote a nivel reactor.

Para el cultivo en lote a nivel fermentador de 5 l en un cultivo por lote, se utilizó el medio a base de almidón, controlando los tiempos de incubación de placa a 30°C durante 24 h, el tiempo de incubación del inóculo fue por 12 h a 200 rpm, 30°C y pH 5.5. Las condiciones en el fermentador fueron: 4 L del medio a una relación C: N de 8 (Tabla 3), 30 °C, 600 rpm, pH 5.5 y 1 vvm.

7.7. Cultivo Semilote a nivel matraz y reactor.

Para los cultivos en semilote a nivel matraz, se inocularon matraces con *A. pullulans* a partir de un cultivo en placa con el medio con relación C:N de 8 para el crecimiento de la levadura, se incubaron 12 h a 30 °C, 200 rpm y pH 5.5, posteriormente se recuperaron las células por centrifugación a 10,000 rpm, 7 min y 4°C, los paquetes celulares se lavaron dos veces con solución salina estéril al 0.85%, se resuspendieron en 20 ml de la misma solución y se inocularon matraces a diferentes relaciones C:N (80, 100 y 200). Se aplicaron las mismas condiciones de incubación que las anteriores y solo se modificó el pH a 6.5 para la producción de metabolitos secundarios y se monitorearon cada 12 h. La mejor relación C:N para la alimentación se implementó a nivel fermentador de 5 l para mejorar la producción de metabolitos secundarios y la generación de enzimas y se comparará con el medio a base de glucosa reportado por Anastassiadis et al. (2003).

Para los cultivos en semilote a nivel reactor de 5 l se realizaron en dos etapas: la primera en la cual las primeras 26 h fue con 2 l del medio a una relación C:N de 8 (Tabla 3), pH 5.5, 30 °C, 1 vvm y 600 rpm de agitación. La segunda etapa se realizó una alimentación con 2-litros de medio a una relación C:N de 80 y las condiciones a pH 6.5, 30 °C, 1 vvm y 600 rpm de agitación. En otra fermentación se siguió el mismo procedimiento pero la segunda etapa se realizó con un medio a una relación C:N de 500 para la alimentación que ocurrió a las 20 y la primera etapa fue exactamente igual que la anterior con las mismas condiciones de fermentación.

7.8. Cultivo en semilote con medio a base de glucosa a nivel reactor.

Se realizó una cinética en reactor de 5 l con medio a base de glucosa (Tabla 4) reportada por Anastassiadis et al. (2003). Las condiciones de la fermentación fueron a 30°C, 600 rpm, 1 vvm, pH 5.5 en la primera etapa y pH 6.5 después de la alimentación la cual ocurrió a las 28 h, (etapa de producción de metabolitos secundarios).

Tabla 4. Formulación para producción de ácido glucónico medio a base de glucosa

Componentes	Inoculo (g/l)	Fermentación (g/l)
Glucosa	30	160
NH ₄ Cl	3	0.3
Extracto de Levadura	0.7	0.3
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.35	0.2
KH ₂ PO ₄	5	
CaCO ₃	5	
Tiamina	0.002	

7.9. MÉTODOS ANALÍTICOS.

7.9.1. Cuentas celulares.

Las cuentas celulares se evaluaron microscópicamente por medio de una cámara Neubauer. Las cuentas se realizaron por duplicado.

7.9.2. Cuantificación de glucosa.

La glucosa se analizó por medio de un Analizador Bioquímico YSI (2700 Select) por medio del método enzimático (glucosa oxidasa). De las muestras de fermentación, se tomaron muestras de 1 ml y se centrifugaron a 10,000 rpm a 4°C, el sobrenadante fue utilizado para el análisis. Este mismo sobrenadante se utilizó para realizar el análisis de ácidos orgánicos.

7.9.3. Azúcares reductores.

Se empleó un método colorimétrico ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), la lectura se realizó a 540 nm, de las muestras tomadas en la fermentación se tomó 0.5 mL de sobrenadante y se le agregó 0.5 ml de reactivo DNS se colocó a baño maría por 5 min, se agregaron 5 ml de agua destilada, se dejó reposar 5 min y leer la absorbancia de color formado a 540 nm.

7.9.4. Carbohidratos totales.

Se analizaron por la técnica de fenol-sulfúrico. Se utilizó el sobrenadante de las muestras de la fermentación, se tomó 1 ml de solución de la muestra, se le agregó 0.6 ml de solución de fenol al 5% (p/v) y se agregó 3.6 ml de H₂SO₄ concentrado se dejó enfriar la reacción por 30 min. Se determinó la intensidad del color naranja en el espectrofotómetro a 490 nm.

7.9.5. Ácidos orgánicos.

Se realizaron curvas de calibración del ácido glucónico, así como del gluconato de calcio y gluconato de sodio. Los análisis se realizaron por HPLC (Perkin Elmer) con detector UV y arreglo de diodos. La fase utilizada fue 2% de acetonitrilo y 5 mM de TBA, a un flujo de 0.4 ml·min⁻¹. Los ácidos se analizaron a 210 nm (Anastassiadis et al. 2000)

7.10. Ensayos enzimáticos.

7.10.1. Determinación de actividad de glucoamilasas de *A. pullulans*.

La mezcla de reacción contiene 2.0 ml de una solución de 10 g/l de almidón soluble en 0.2 M de solución amortiguadora de acetato (pH 4.5) y 0.5 ml de sobrenadante. Ésta mezcla se incubó a 60 °C por 30 min, se centrifugó a 10,000 rpm a 4 °C durante 7 min. La concentración de azúcar reductor en la mezcla de reacción fue determinado usando el método DNS y por método enzimático mediante el analizador bioquímico YSI. Una unidad de actividad de amilasa fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de azúcares reductores (glucosa) por minuto bajo las condiciones de ensayo (Li et al., 2006).

7.10.2. Determinación de actividad de amilasas sobre almidón gelatinizado y sin gelatinizar.

El ensayo fue realizado con una mezcla de reacción la cual contenía 10 μ l de sobrenadante y 1 ml de 10g/l de gránulos de almidón de cebada gelatinizado o 1 ml de 10 g/l de almidón de cebada sin gelatinizar en 0.2 M de solución amortiguadora de acetato (pH 4.5). La reacción fue llevada a cabo a 60 °C y 180 rpm por 30 min. Se centrifugó a 10,000 rpm, a 4 °C por 7 min, la cantidad de glucosa liberada se determinó con un analizador bioquímico YSI (Li et al. 2006).

7.10.3. Determinación de β -glucosidasas de *A. pullulans*.

Se usaron 50 μ l de medio previamente filtrada, 250 μ l de solución amortiguadora de acetato de sodio (200 mM, pH 4.5), 250 μ l *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (PNPG) (4 mM, sigma). Después de la incubación a 60 °C por 30 min., la reacción fue

interrumpida con 1 ml de carbonato de sodio 1 M y el color fue medido a 410 nm. Una unidad de β -glucosidasa corresponde a la concentración de enzima que libera 1 μ mol de nitrofenol por min en la mezcla de reacción (Ribeiro et al. 2007).

7.10.4. Determinación de α -glucosidasas de *A. pullulans*.

Se usaron 50 μ l de medio previamente filtrada, 250 μ l de solución amortiguadora de acetato de sodio (200 mM, pH 4.5), 250 μ l *p*-nitrofenil α -D-glucosidasa (PNPG) (4 mM, sigma). Después de la incubación a 60 °C por 30 min, la reacción fue interrumpida con 1 ml de carbonato de sodio 1 M y el color fue medido a 410 nm. Una unidad α -D-glucosidasa es definida como la concentración de enzima que libera 1 μ mol de *p*-nitrofenol (pNP) por min en la mezcla de reacción bajo las condiciones de ensayo (Saha et al. 1993).

7.10.5. Determinación de α -amilasas de *A. pullulans*.

El ensayo se realizo con una mezcla de reacción la cual contenía 200 μ l de solución amortiguadora de acetato de sodio (200mM, pH 4.5), 500 μ l de *p*-nitrofenil-D-maltosidasa (2nM, Sigma) y 100 μ l de sobrenadante. Después de 30 min de incubación a 70 °C la reacción se detuvo con 1ml de Na₂CO₃ 2M y el nitrofenol liberado se cuantifico a 410 nm en espectro (Silva 2005).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.1. Extracción de almidón a partir de cebada maltera de baja calidad.

La cebada fue obtenida en la Cd. de Pachuca por medio de productores locales. La cebada fue tamizada en un tamiz 8 y 10 US para quitarle la mayoría de impurezas como piedras, algunos otros granos como avena, polvo (Figura 6 A) y las impurezas de mayor tamaño como ramas, insectos se quitaron manualmente, para tener una cebada totalmente limpia como se muestra en la Figura 6B.

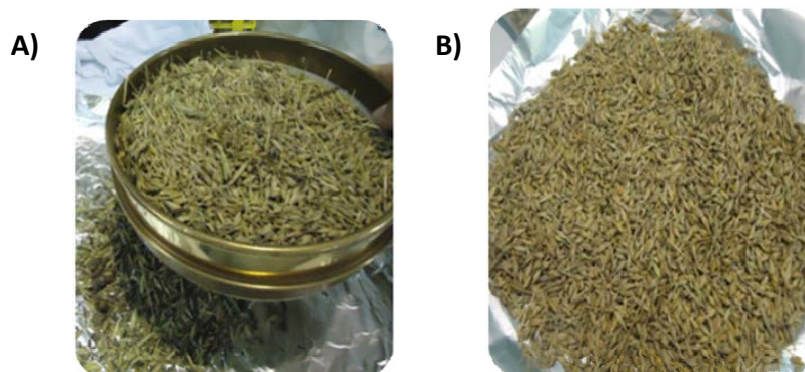


Figura 6. (A) Cebada sucia, (B) Cebada limpia.

La cebada libre de impurezas se sometió al proceso de perlado (quitar la cascarilla) el cual consta de moler la cebada en un molino para granos y especias ajustando la apertura de los discos del molino para que solo le pueda quitar la cascarilla a los granos de cebada, se pasó por un tamiz No. 8 US para eliminar la cascarilla, la que no se logró quitar con el tamiz se realizó manualmente, en la Figura 7 se muestra el grano sin cascarilla.

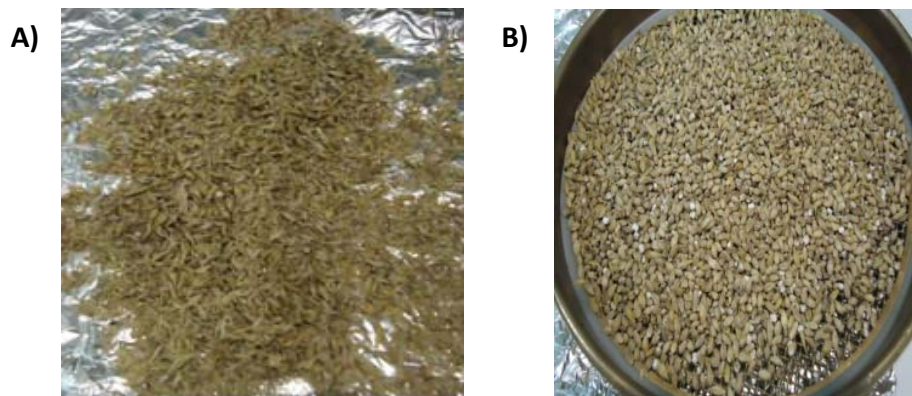


Figura 7. (A) Cáscara de cebada. (B) grano de cebada sin cascarilla.

Una vez obtenido el grano sin cascarilla, se procedió a moler el grano en una licuadora (Oster) a máxima velocidad durante dos min hasta la obtención de una harina (Figura 8). Este procedimiento se consideró la fase de limpieza, todo este procedimiento se realizó en seco. Esto para no influir con las características del almidón contenido en el grano y no generar pérdidas durante el proceso.

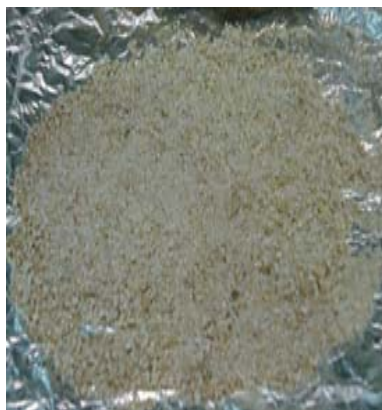


Figura 8. Harina obtenida a partir de la cebada de mala calidad.

Los rendimientos que se obtuvieron en la fase de limpieza hasta obtener la harina se describen en la Tabla 5.

Tabla 5. Rendimientos obtenidos en la fase de limpieza a partir de cebada maltera de baja calidad

Peso inicial (g)	Peso grano (g)	Rendimiento (%)	Peso grano (g)	Peso harina (g)	Rendimiento (%)	Rendimiento total (%)
2500	2125	85	2125	2096	98	83.84

A partir de la harina obtenida se procedió a realizar el proceso de extracción del almidón de la cebada. A la harina se le realizó un macerado con NaOH al 0.1%, 1:2 (p/v) dejándolo durante 18 h a 4 °C (Figura 9A), el producto obtenido se pasó por un tamiz con malla No 100 y 200 US, las partículas obtenidas en el tamiz se lavaron 2 veces con agua destilada, el proceso de molienda-lavado se realizó dos veces (Figura 9B). En la Figura 9C se observa la suspensión obtenida la cual se centrifugo a 10000 rpm, 10 min, 4 °C, se formaron dos fases la color blanca correspondiente al almidón y la de color café correspondiente a la fase que contiene proteínas (Figura 9D), fibra, almidón que no se llego a separar (Wang y Wang, 2002; 2004),. Las fases se separaron cuidadosamente con ayuda de una espátula (Figura 9D).

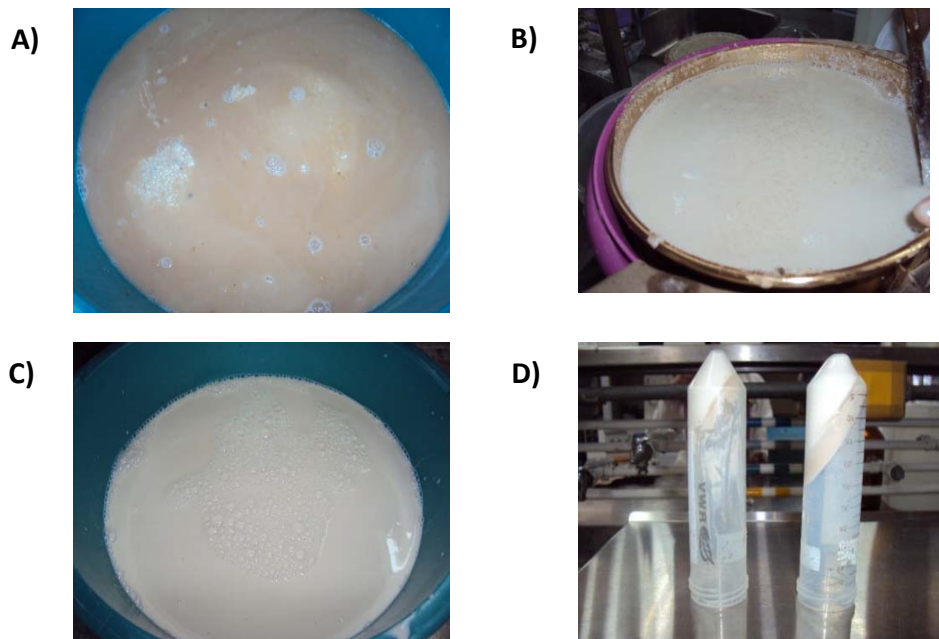


Figura 9. (A) Macerado (B) Tamizado de producto de molienda, (C) Suspensión obtenida, (D) fases obtenidas después de centrifugar.

La fase color café fue conservada para su caracterización posterior. El almidón obtenido se resuspendió, ajustándole el pH a 6.5 con HCl y se centrifugó a las mismas condiciones que las anteriores, se separan nuevamente las fases de almidón y la de color café, el sobrenadante se descarta, las dos fases se secaron a 30°C durante 24 h. En la Figura 10, se muestra el almidón y la fase color café

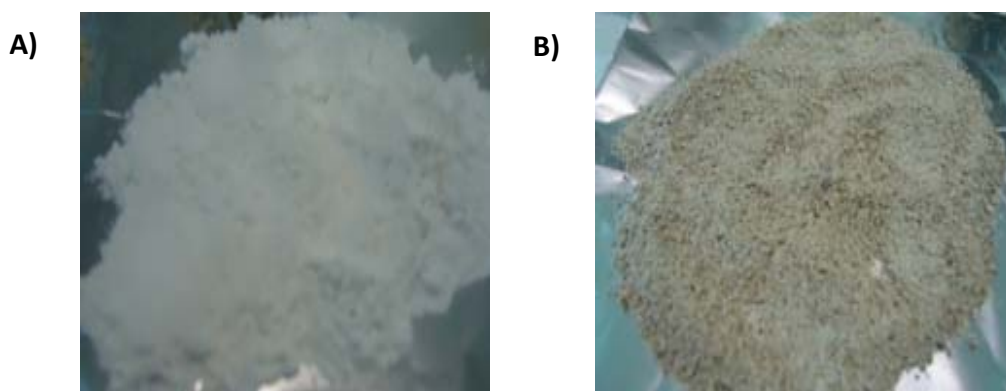


Figura 10. (A) Almidón y (B) Fase color café.

Los rendimientos que se obtuvieron en la fase de extracción del almidón se describen en la Tabla 6.

Tabla 6. Rendimientos obtenidos en la fase de extracción a partir de cebada de mala calidad.

Peso harina (g)	Peso Almidón (g)	Peso Pigmentos (g)	Rendimiento de. almidón (%)
2096	668	608	31.8

Se realizó la extracción de almidón de la cebada con cascarilla para comparar rendimientos y reducir el proceso de extracción, en el cual se logro incrementar el rendimiento de almidón a 36%, se ha encontrando que el rendimiento de almidón a partir de cebada con o sin cáscara es de 60% en ambos procesos; usando un método con solución amortiguadora de acetato de sodio 0.002 M (pH 6.5) (Prieto et al. 2009), es el único reporte encontrado hasta el momento para la extracción de almidón a partir de cebada que se considera de buena calidad. En cuanto a la calidad es notoria la diferencia entre una cebada de buena calidad y una de mala calidad. Sin embargo, al ser un producto que no cumple con especificaciones para el proceso de malteo para la industria cervecera, podría ser una materia prima potencial para ser utilizada en la producción de ácido glucónico, esto se ve reflejado en los rendimientos obtenidos en ambos procesos.

Se ha reportado que el porcentaje de almidón a partir de maíz blanco es de 60.4% y para maíces pigmentados está entre 57 y 65%, usando una metodología de Gómez (1992), el cual se realiza con éter y etanol (Agama et al. 2005). La metodología que se empleó (Wang y Wang 2004) tiene una gran ventaja sobre los métodos para la extracción de almidón a partir de maíz y cebada de buena calidad ya que en esas metodologías se utilizan solventes que pueden incrementar las etapas y por tanto los costos en la extracción de almidón de diferentes fuentes.

8.2. Evaluación de la propagación de *A. pullulans* cepa CDBB-L-1345 en cultivos en líquido a nivel matraz.

Con la finalidad de evaluar el crecimiento de *A. pullulans* en un medio de cultivo basado en almidón, primero se verificó la propagación de *A. pullulans* a partir de cultivos en placa y su posterior inoculación en el medio líquido basado en glucosa. De la placa con el medio PDA incubada se tomó muestra celular (12, 24 y 36 h) y se inocularon en matraces con medio a base de glucosa (M1, M2, M3) estos se monitorearon cada 24h, en el M1 la máxima cuenta celular ocurrió a las 48 h con 3.34×10^9 células/ml, en el M2 a las 48h se obtuvo una cuenta celular de 4.4×10^9 células/ml y en el M3 fue de 4.64×10^9 células/ml en el mismo tiempo que las anteriores (Tabla 7).

Tabla 7. Crecimiento de *A. pullulans*

Tiempo (h)	M1 (12 h) (células/ml)	M2 (24 h) (células/ml)	M3 (36 h) (células/ml)
0	5.45E+07	7.15E+07	1.21E+08
24	2.77E+09	2.95E+09	3.33E+09
48	3.34E+09	4.40E+09	4.64E+09
120	3.30E+09	4.65E+09	4.71E+09

En el M2 y M3 el comportamiento de crecimiento de *A. pullulans* fue similar, por ello se decidió que el mejor tiempo para tomar colonias del medio sólido y propagarlo en el medio líquido pueden ser de tiempos 24 ó 36 h de incubación ya que se observa que a las 120 h la concentración celular es similar (Figura 11). Para experimentos posteriores se decidió tomar colonias de 24 h de crecimiento.

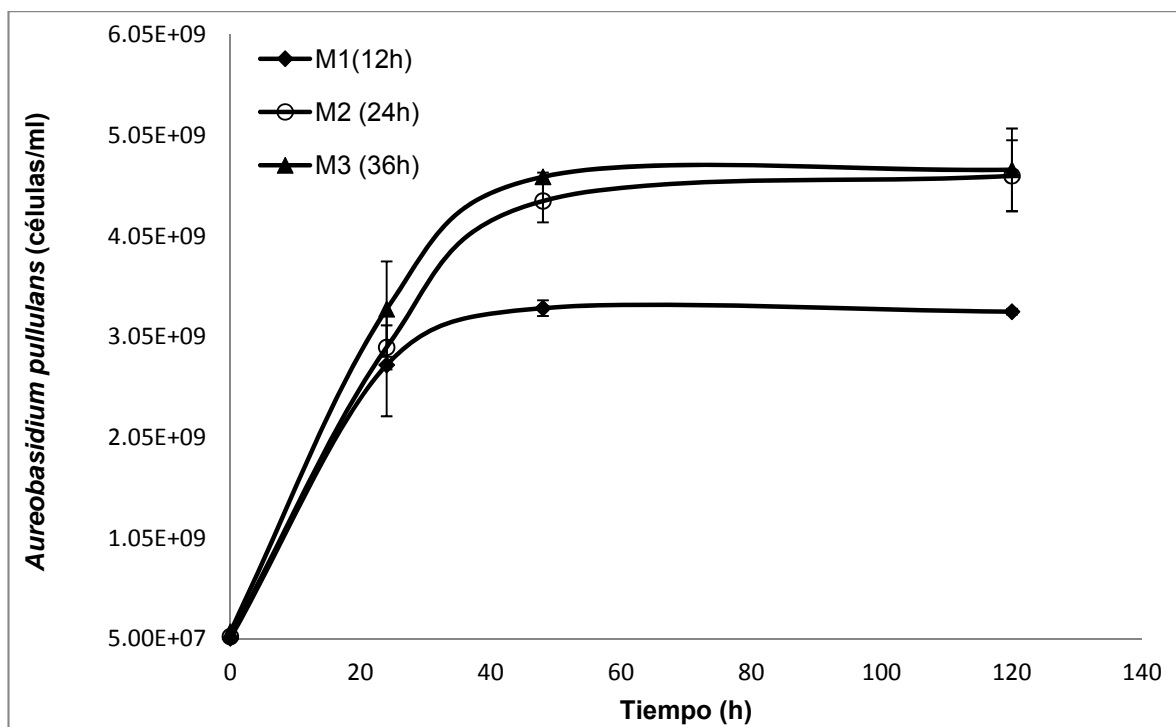


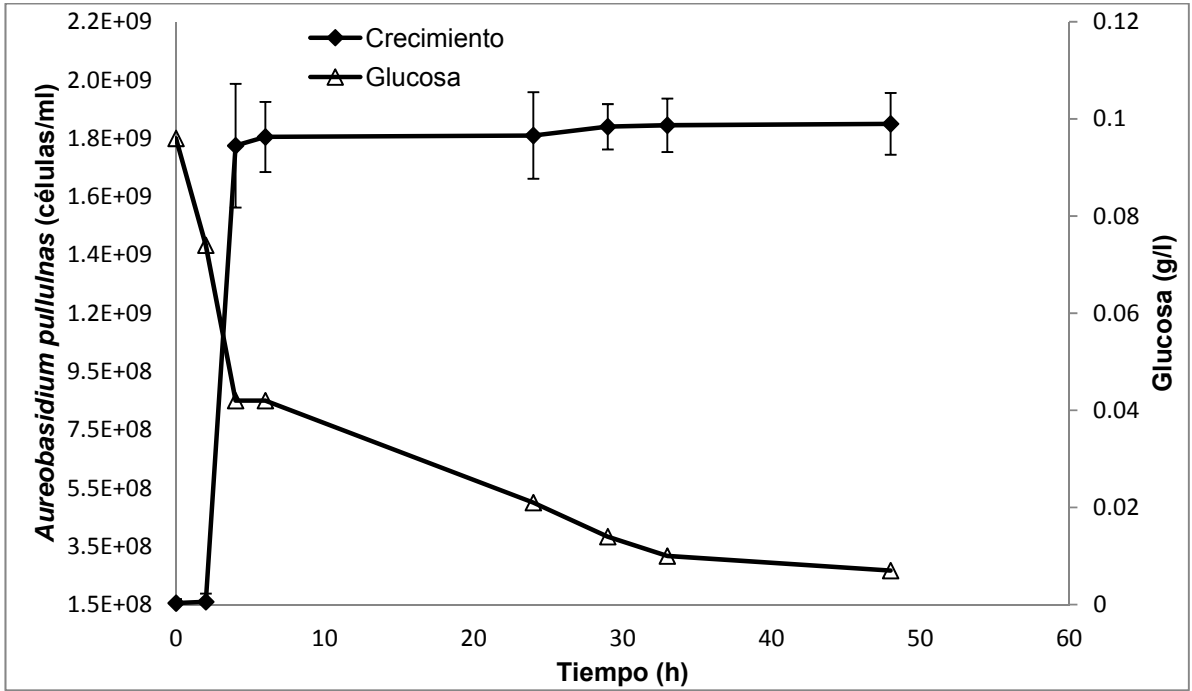
Figura 11. Cinética de crecimiento de *A. pullulans* en medio líquido basado en glucosa.

8.3. Evaluación de la producción de ácido glucónico por *A. pullulans* utilizando el almidón extraído a partir del grano de cebada de baja calidad.

Una vez establecido el tiempo adecuado de propagación se procedió a formular el medio de cultivo basado en almidón, este medio utilizó las sales reportadas por Anastassiadis et al. (2003). En la Figura 12A se puede observar la cinética de crecimiento de *A. pullulans*, la fase estacionaria se estableció a las 4 h de fermentación alcanzando 1.73×10^9 células/ml y el consumo de sustrato en el cual se partió de 0.1 g/l de glucosa, observando el perfil de consumo de glucosa nos indica que *A. pullulans* tiene enzimas que hidrolizan el almidón y así poder generar monómero de glucosa, los cuales no se puede observar en la determinación de esta porque la levadura los consume de inmediato para su crecimiento ya que se observa que desde la hora 10 a hora 50 se mantiene en la fase estacionaria. En la figura 12B, se muestra un cromatograma obtenido de la fermentación del almidón donde se

observa un pico mayoritario con tiempo de retención de 1.209 min que corresponde al ácido glucónico según el estándar del ácido, la muestra de las hora 10 de la fermentación con una dilución 1:10 por lo que la concentración alcanzada basada en ácido glucónico sería del 12 g/l. Sin embargo, este resultado es el esperado, y ya en la siguiente etapa, con las técnicas de cultivo por lote y lote alimentado a nivel reactor se buscaba aumentar la producción del ácido glucónico. Resaltando que no se había reportado la producción de ácido glucónico a partir del almidón de cebada.

A)



B)

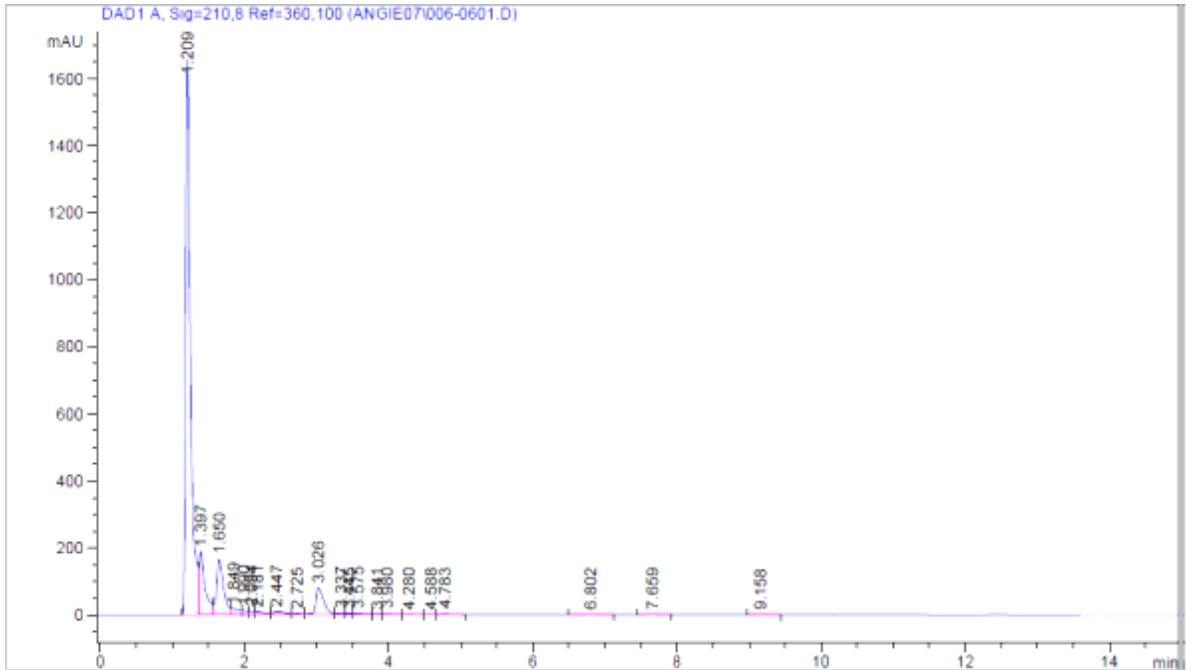
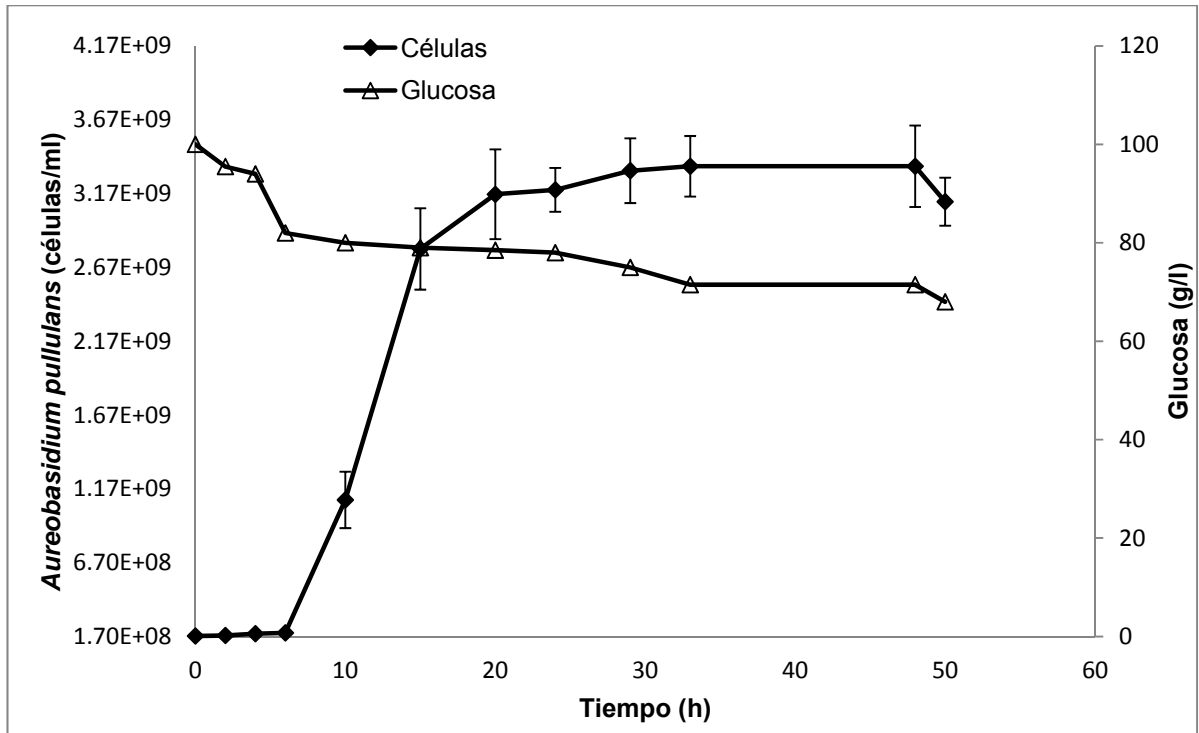


Figura 12. A) crecimiento de *A. pullulans* y consumo de sustrato y B) Cromatograma a la hora 10 de fermentación.

También se realizaron experimentos con el medio basado en glucosa, con el fin de comprobar la capacidad productora de ácido glucónico de *A. pullulans*, el medio fue realizado como lo reporta Anastassiadis et al. 2003. En la Figura 13A se puede observar la cinética de crecimiento de *A. pullulans* en la cual se llega a la fase estacionaria a la hora 15, alcanzando una máximo de cuentas celulares de 2.8×10^9 células/ml, las que se mantienen hasta las 50 horas en la fase estacionaria, en cuanto al consumo de sustrato se partió de 100 g/l de glucosa y la levadura solo consumió la mitad de sustrato. En la Figura 13B se observa el cromatograma de producción de ácido glucónico que en este caso llegó a una concentración de aproximadamente 10 g/l, en el mismo orden de magnitud que en el obtenido con el medio de almidón. Estos resultados indican que la levadura utilizada en este experimento no fue capaz de producir una mayor cantidad de metabolitos, específicamente ácido glucónico, aún cuando se utilizó el mismo medio reportado en la literatura, por lo que la producción debe estar relacionada con las características de la cepa productora más que por el medio de cultivo utilizado. Cabe resaltar que la concentración de glucosa en el medio era de 100 g/l, por lo que los resultados obtenidos con el medio de almidón representan un mejor rendimiento en cuanto a la producción de ácido glucónico. Sin embargo lo que reporta Anastassiadis et al. 2003, estos datos están por debajo ya este autor a nivel matraz obtiene de 23 a 140 g/l de ácido glucónico, cabe aclarar que los autores realizan variación de la concentración de glucosa y algunas sales para mejorar la concentración de ácido glucónico

A)



B)

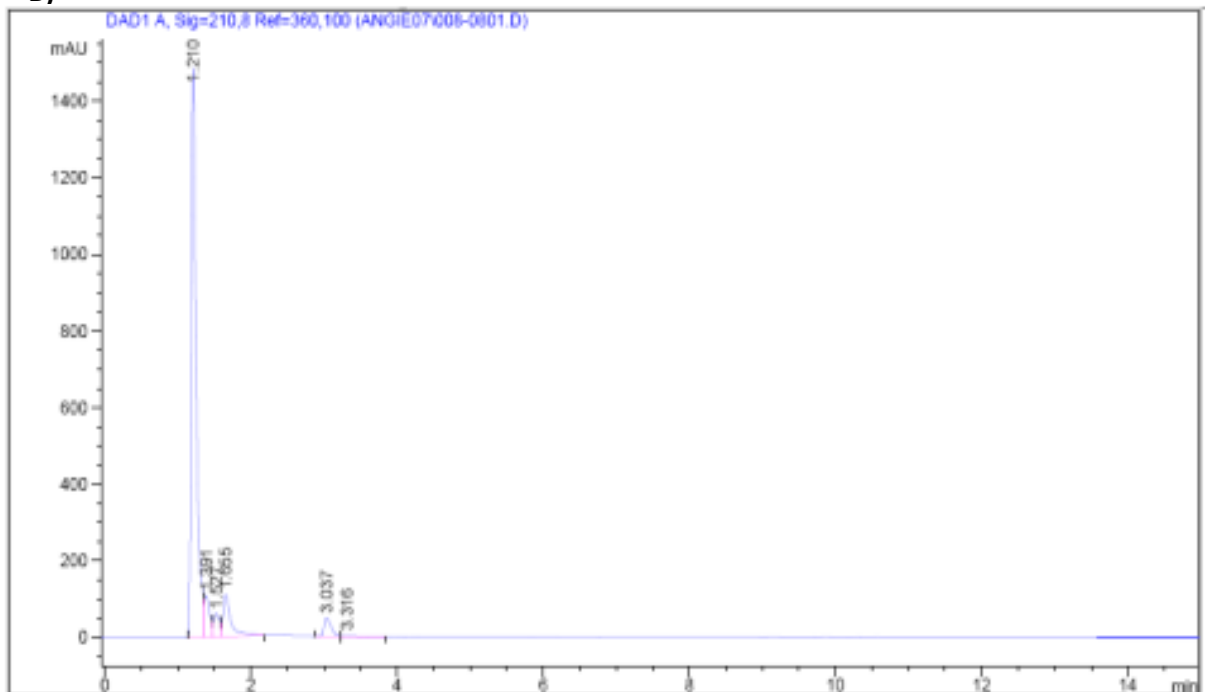


Figura 13. A) Crecimiento de *A. pullulans* y consumo de glucosa y B) cromatograma obtenido a la hora 10 de fermentación.

Estos resultados obtenidos fueron con la cepa CDBB-L-1345 la cual crecía de color cremoso a los 5 días de incubación y presentaba una morfología levaduriforme. La forma de conservación de la levadura fue una crioconservación con glicerol. Durante un periodo de dos meses hubo cortes de energía en las instalaciones del CIBA-IPN por tiempos prolongados, esto tuvo una repercusión en la conservación del microorganismo de estudio; ya que en experimentos subsecuentes la morfología que presentaba la levadura era diferente y no hubo reproducibilidad en los resultados al montar los experimentos relacionados con la producción de ácido glucónico, es por ello que se adquirió la misma cepa en la colección microbiana del CINVESTAV y se consiguió la cepa de colección la ATCC15233 con la cuales se realizaron los experimentos siguientes.

8.4. Comparación de crecimiento de *A. pullulans* cepas ATCC15233 y CDBB-L-1345 en diferentes medios de cultivo y condiciones de pH.

Se adquirió la cepa de colección microbiana del CINVESTAV (*A. pullulans* CDBB-L-1345) y se obtuvo otra levadura mediante donación del laboratorio de Bioingeniería del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería la cepa de *A. pullulans* ATCC15233. Se hizo la comparación morfológica de la levadura en diferentes medios de cultivo comerciales y en medios formulados con el almidón extraído del grano de cebada, todos en cultivo sólido. Adicionalmente se compararon diferentes condiciones de pH, se ha reportado que este parámetro influye en la morfología de *A. pullulans*. (Li et al. 2009). En la Figura 14 se muestra la comparación en los medios Saboraud, Czapeck y PDA a diferentes tiempos de incubación. Cabe resaltar que, aunque se adquirió la misma cepa en la colección microbiana del CINVESTAV, ésta tampoco mostró las características iniciales, por lo que se sugiere que el método de conservación del microorganismo es probablemente el parámetro más importante para la reproducibilidad de los resultados. Por otro lado, se observó un buen crecimiento de *A. pullulans* ATCC15233 a las 24 h en los medios PDA y Saboraud. A las 48 h el crecimiento era más evidente en los tres medios analizados, la cepa

CDBB-L-1345 presentó crecimiento hasta las 48 h en el medio PDA, su crecimiento fue de color verde.

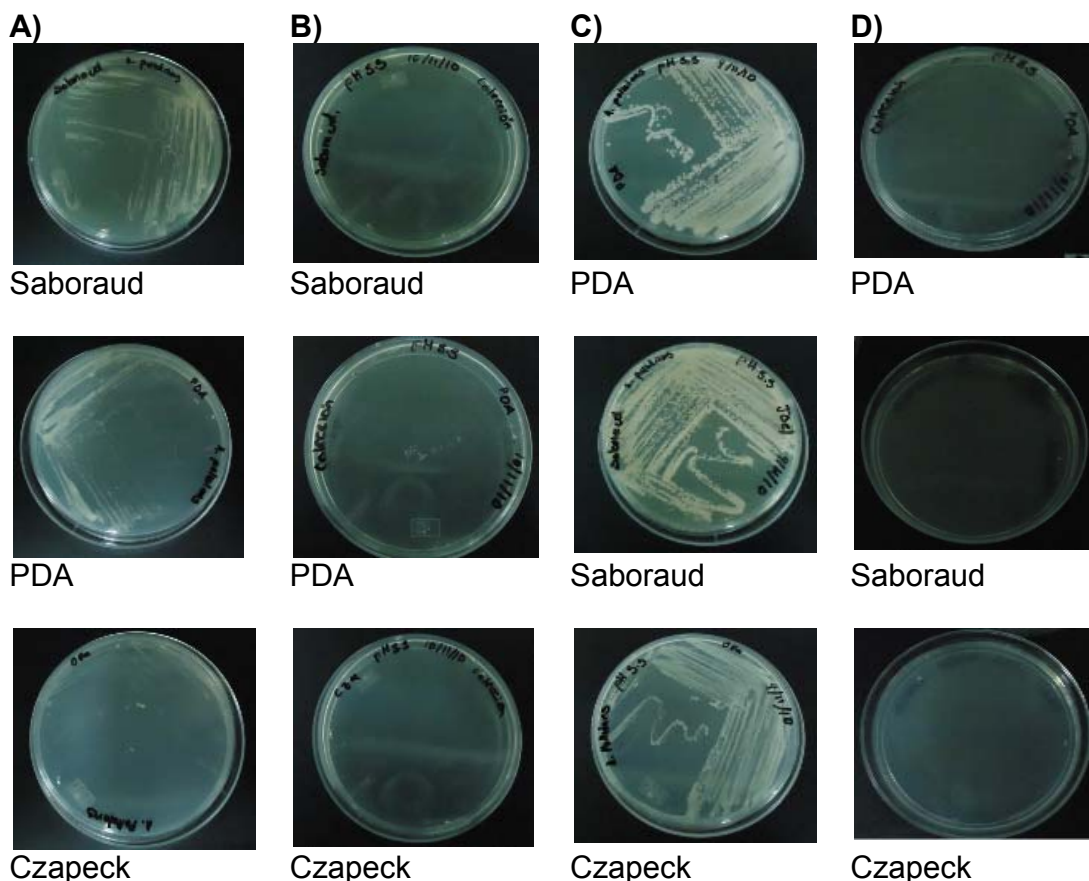


Figura 14. Crecimiento y morfología en cultivos en placa. A) Cepa ATCC15233 y (B) cepa CDBB-L-1345 a 24 h de incubación. C) cepa ATCC15233 y D) cepa CDBB-L-1345 a 48 h de incubación.

En la Figura 15, se compara el crecimiento de la cepa ATCC15233 en los medios de cultivo PDA, Saboraud y Czapek a las 72 h de incubación, en los tres medios se observó un crecimiento comparable. En estas condiciones fue apreciable una pigmentación de color verde en *A. pullulans* en el medio PDA y Saboraud ya que en estos dos medio el crecimiento de *A. pullulans* fue más rápido y este color que presentaron las placas es propicio del ciclo de vida del microorganismo ya que cuando el cultivo es joven presenta un color cremoso y con forme avanza el tiempo

de incubación presenta un color ligeramente rosa y finalmente un color verde cuando el cultivo es viejo (Chi et al. 2009).

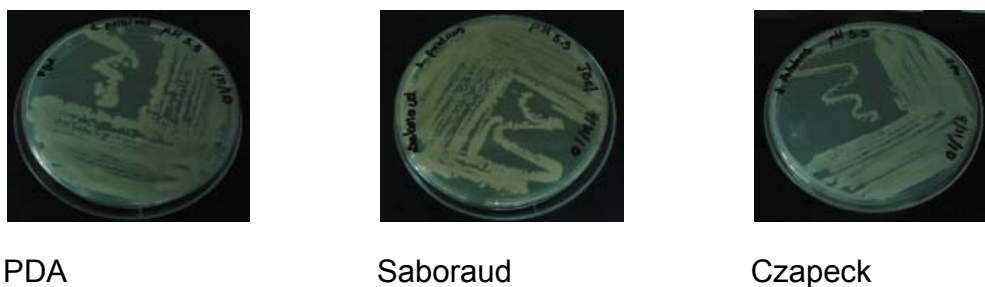


Figura 15. ATCC15233 a 72 h de incubación en Saboraud y Czapeck.

Ésta pigmentación es mucho más evidente en a los siete días de incubación (Figura 16) pero era marcadamente en la cepa de CDBB-L-1345. La pigmentación verde que presenta *A. pullulans* se debe a la edad del cultivo.

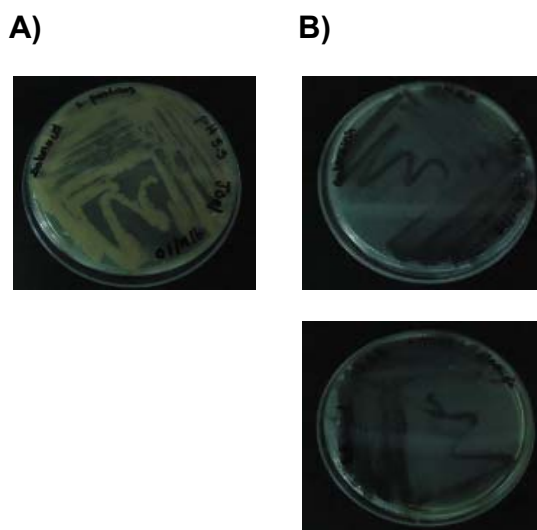


Figura 16. Morfología de *A. pullulans* a siete días de incubación. A) Cepa ATCC15233 y B) Cepa CDBB-L-1345 en medio Saboraud, PDA y Czapeck.

Las células vistas al microscopio en los diferentes tiempos evaluados mostraron que en tiempos de 24 h y 48 h las células mantienen una forma levaduriforme, mientras que a tiempos tardíos de incubación las células se diferenciaban en hifas, las cuales son las que producen los pigmentos de color verde esta característica es indeseable de *A. pullulans* ya que es la producción de un pigmento oscuro como la melanina (Chi et al. 2009), por lo que los posteriores experimentos se enfocaron a la comparación de los medios formulados con el almidón extraído del grano de la cebada a las diferentes condiciones de relaciones C:N y condiciones de pH para ver si se presentaba la morfología verde de *A. pullulans* como se demostró ser más evidente en la cepa CDBB-L-1345. En la Figura 17, se muestra dicha comparación de crecimiento en medio con relación C:N (8, 15 y 20) a pH 5.5.

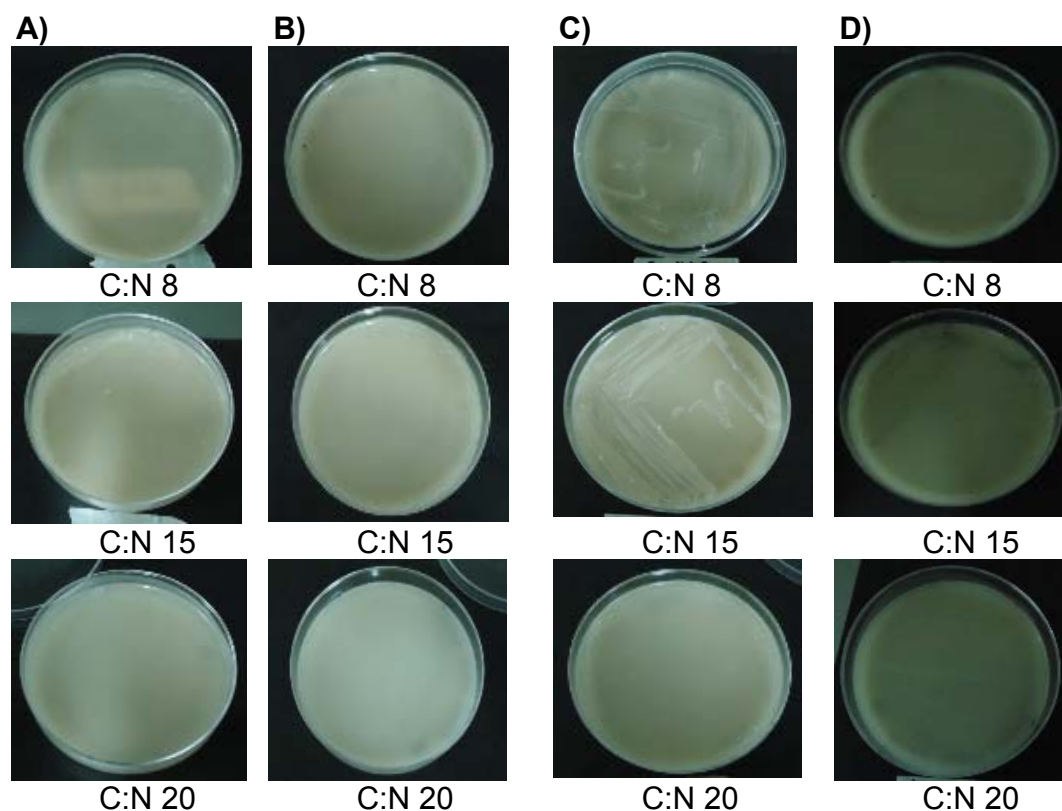


Figura 17. A) Cepa ATCC15233 y B) Cepa CDBB-L-1345 a 24 h de incubación; C) Cepa ATCC15233 y D) Cepa CDBB-L-1345 a 48 h de incubación.

En las Figura 18 se compara el crecimiento a los siete días de incubación donde es clara la diferencia entre las cepas de estudio. Donde la morfología indeseable corresponde a la cepa de *A. pullulans* CDBB-L-1345, por lo que se decidió descartar esta en los estudios de producción a nivel matraz y a nivel reactor.

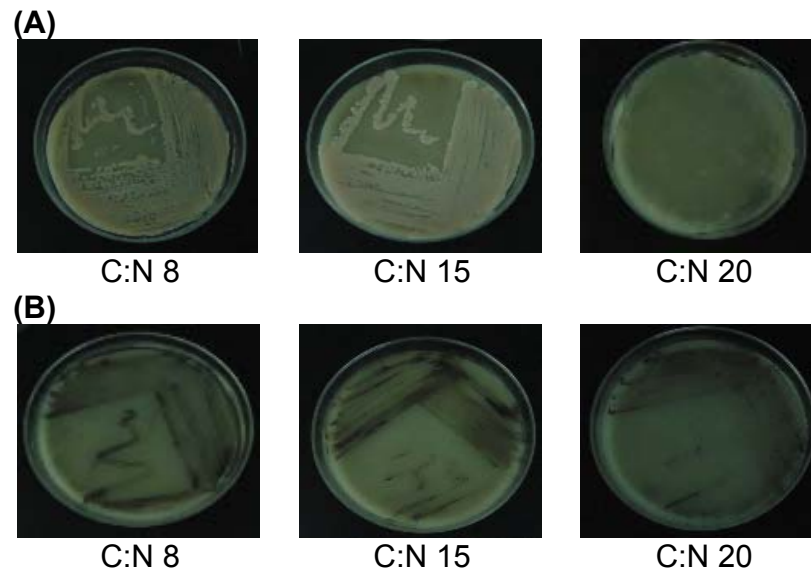


Figura 18 Comparación de crecimiento de *A. pullulans* en medios sólidos formulados con almidón extraído de la cebada a pH 5.5. (A) Cepa ATCC15233 y (B) Cepa CDBB-L-1345.

En cuanto al crecimiento de *A. pullulans* a pH 6.7 (Figura 19) fue lento en comparación con la condición de pH 5.5. Sólo se presenta la observación realizada en el tiempo de siete días. Cabe resaltar que a este pH es el que se reporta para la producción del ácido glucónico (Anastassiadis et al. 2003). Por otro lado, la cepa de *A. pullulans* CDBB-L-1345 volvió a presentar la morfología que produce la pigmentación verde, por lo que la cepa CDBB-L-1345 fue descartada para seguir con los experimentos posteriores dado que uno de los objetivos iniciales del proyecto era evaluar la producción de ácido glucónico y las características morfológicas de dicha cepa en crecimiento en placa de acuerdo con la literatura no son las adecuadas para la producción del ácido glucónico, si no para la producción de melanina (Li et al. 2009).

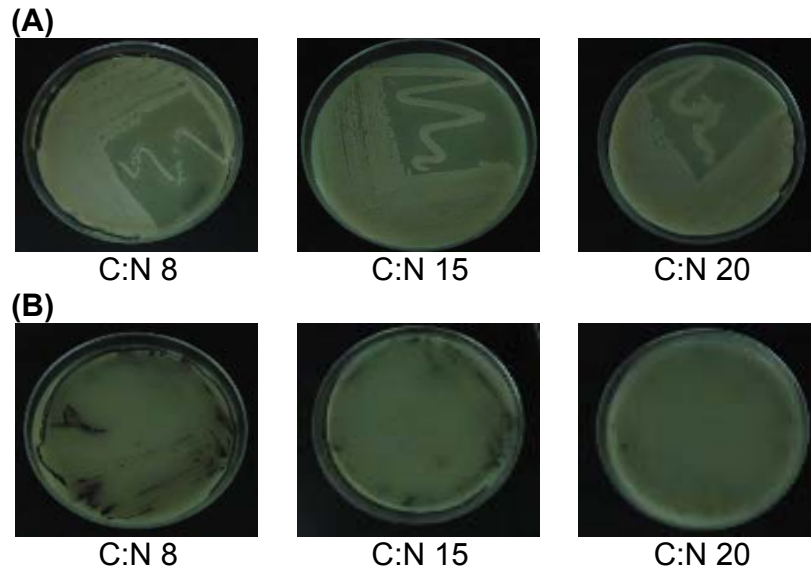


Figura 19. Muestra Cepa ATCC15233 y B) Cepa CDBB-L-1345 a pH 6.7 a 7 días de incubación.

Una vez analizado y observado el crecimiento de las dos cepas se decidió continuar los experimentos con la cepa ATCC15233, ésta presenta las condiciones de morfológicas adecuadas para la obtención de nuestro metabolito de interés según lo reportado por la literatura (Anastassiadis et al . 2003), como se puede observar en la Figura 20, *A. pullulans* tiene un ciclo celular polimórfico que se divide en 6 etapas de acuerdo a los efectos de pH y en particular de la fuente de nitrógeno y carbono del medio de cultivo y la cepa ATCC15233 presentó una morfología levaduriforme (SC) desde las 24 h hasta los 7 días de incubación, en cambio la cepa CDBB-L-1345 no presentó un buen crecimiento y presentaba una morfología de clamidosporas (CH) (Li et al. 2009), por lo que se descartó esta cepa para experimentos en reactor.

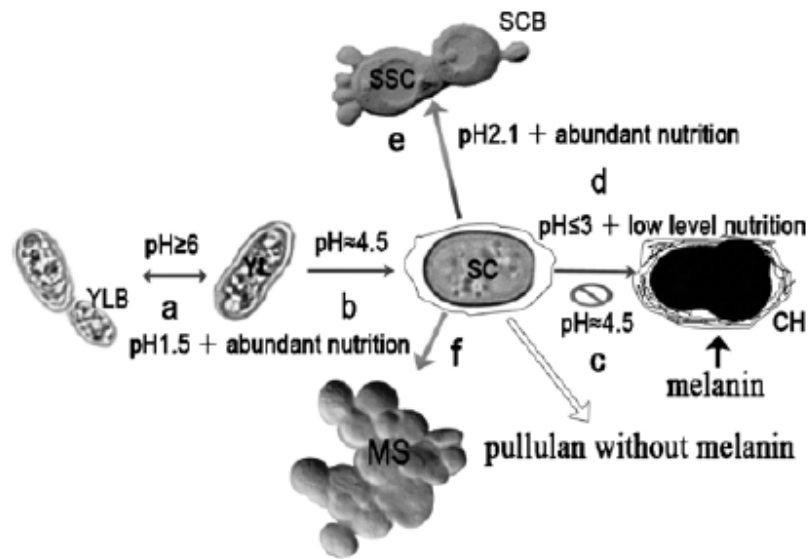


Figura 20. Cambios morfológicos de *A. pullulans* a diferentes condiciones de pH (Li et al. 2009).

8.5. Evaluación del crecimiento de *Aureobasidium pullulans* en cultivos líquidos.

Las relaciones C:N evaluadas en cultivos en placa sirvieron para establecer los cultivos líquidos con el medio formulado con almidón extraído de la cebada para mejorar la producción celular. En la Figura 21, se muestra el crecimiento de *A. pullulans* en medio líquido en cultivos en matraz a las relaciones C:N 8, 15, 20. En las relaciones C:N de 8 y 15 se observa un crecimiento adecuado, siendo más rápido y con mayor cuentas celulares en la en la relación C:N de 8, por lo que se estableció esta relación en los medios de cultivo como la mejor para sostener el crecimiento de la levadura.

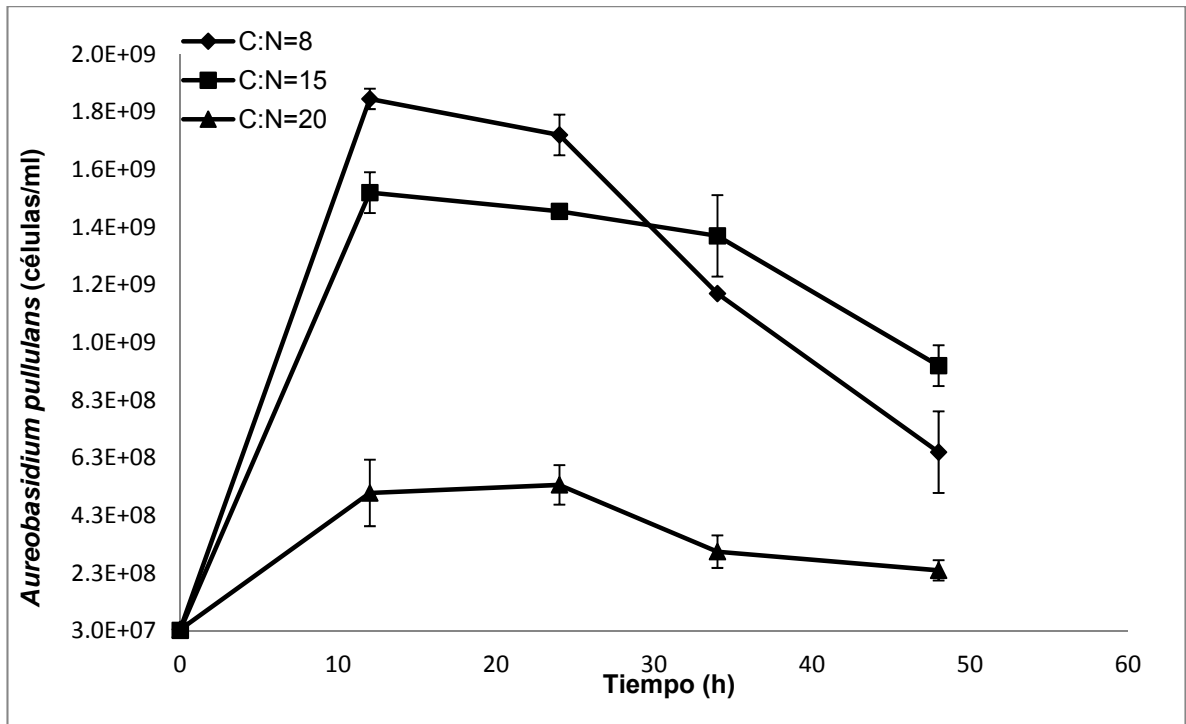


Figura 21. Crecimiento de *A. pullulans* ATCC15233 a nivel matraz.

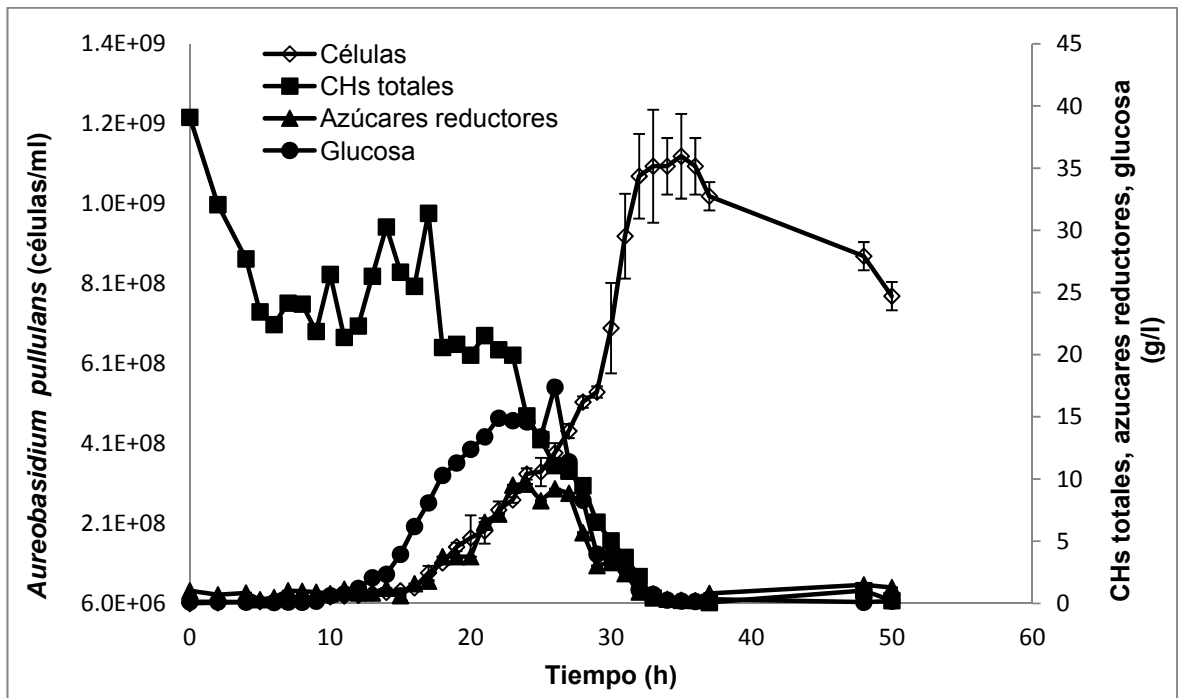
Una vez establecidas las condiciones adecuadas de crecimiento a nivel matraz se procedió a formular el medio de cultivo basado en almidón a nivel fermentador a una relación C:N de 8. En la Figura 22 se muestra una imagen del reactor de 5-litros donde llevaron a cabo las fermentaciones por lote y semilote.



Figura 22. Fermentador de 5 l

En la Figura 23A, se muestra la cinética de crecimiento de *A. pullulans*, la fase estacionaria se determinó a las 31 h, el consumo de carbohidratos totales y el consumo de glucosa. El consumo de carbohidratos totales se observa desde el inicio de la fermentación, sin embargo no se vio reflejado con el crecimiento, el cual fue apreciable hasta la hora 12, tiempo en el cual se observa que la glucosa residual aumentaba, cabe aclarar que esto no quiere decir que no hubiera glucosa residual desde un inicio del proceso, para que se presente el crecimiento el almidón debe ser hidrolizado a sus unidades monoméricas que en este caso es glucosa, la cual se va consumiendo al liberarse. El perfil de glucosa residual, también nos indica que puede haber una acumulación de glucosa en el fermentador, para posteriormente ser consumida en su totalidad, este perfil ajusta también con el perfil de consumo de azúcares totales. Estos resultados nos indican la capacidad enzimática de *A. pullulans* tiene para hidrolizar almidón. Esto quiere decir que *A. pullulans* produce amilasas, las cuales hidrolizan el almidón, son enzimas muy apreciadas en las industrias de alimentos, textil, papeleras y de farmacia (Gupta et al., 2003). Estos resultados también abren una perspectiva de uso del procesos de fermentación, ya que se pueden separar tanto los metabolitos producidos por *A. pullulans* al final de la fermentación y obtener más productos de valor agregado que pueden ser las enzimas *per se*. En la Figura 23B se muestra el perfil de consumo de NaOH, el cual tiene el mismo comportamiento que el perfil de crecimiento, esto puede relacionarse con la producción de metabolitos que acidifican el medio.

A)



B)

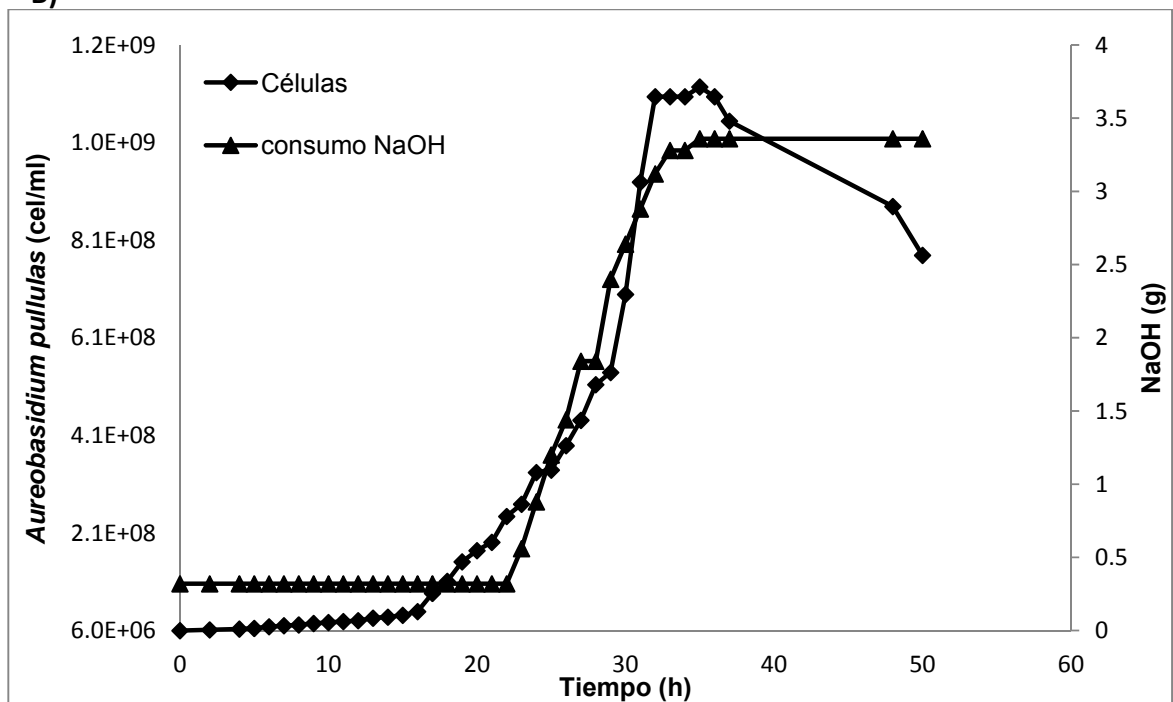


Figura 23. (A) Correlación de crecimiento y consumo de sustratos (B) perfil de consumo de NaOH.

Los parámetros cinéticos determinados en esta cinética se mencionan en la Tabla 8.

Tabla 8 Parámetros cinéticos de la cepa de *A. pullulans* ATCC15233 en cultivo en lote reactor de 5 litros.

Parámetro	
Máximo no. de células (células/ml)	1.1x10 ⁹
*Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹)	0.17
*Velocidad volumétrica de consumo de carbohidratos totales (g/lh)	2.81 (t ₀ -t ₆)
	1.8 (t ₂₁ -t ₃₃)
*Velocidad de acumulación de glucosa (g/lh)	1.4 (t ₁₁ -t ₂₂)
*Velocidad de consumo de glucosa (g/lh)	4.33 (t ₂₆ -t ₂₉)

*las velocidades fueron determinadas gráficamente y ajustadas a un comportamiento exponencial para la velocidad específica de crecimiento y lineal o polinomio para las velocidades de consumo.
^lcorresponde al tiempo de fermentación

Con estos resultados se demuestra que la producción celular es adecuada a una relación C:N de 8 en cultivos en reactor ya que se obtuvo una concentración celular alta, adicionalmente los parámetros cinéticos nos indican que tanto el crecimiento como el consumo de sustratos es adecuado para una producción a nivel industrial.

Una vez comprobada la producción celular en el reactor, se procedió a evaluar una relación C:N con el almidón extraído a relaciones C:N (80,100 y 200) a nivel matraz y a un pH inicial de 6.5, para evaluar la producción de ácido glucónico ya que Anastassiadis et al. 2003 reporta concentraciones de glucosa muy altas de 100 hasta 360 g/l, de las cuales se les calculó la relación C:N a los medios que utiliza el autor y corresponden a 400 y 500, es por ello que se decide ver el comportamiento de a relaciones C:N menores. Estos experimentos se realizaron cosechando las células de un cultivo de 12 horas en el medio de almidón a una relación C:N de 8 a nivel matraz, las células fueron lavadas con solución salina estéril y se inocularon en los medios a las distintas relaciones C:N. En la Figura 24, se presenta la cinética con

relación C:N de 80 el consumo total de carbohidratos fue de 75 % a las 24 h fue donde se consumió mas el sustrato.

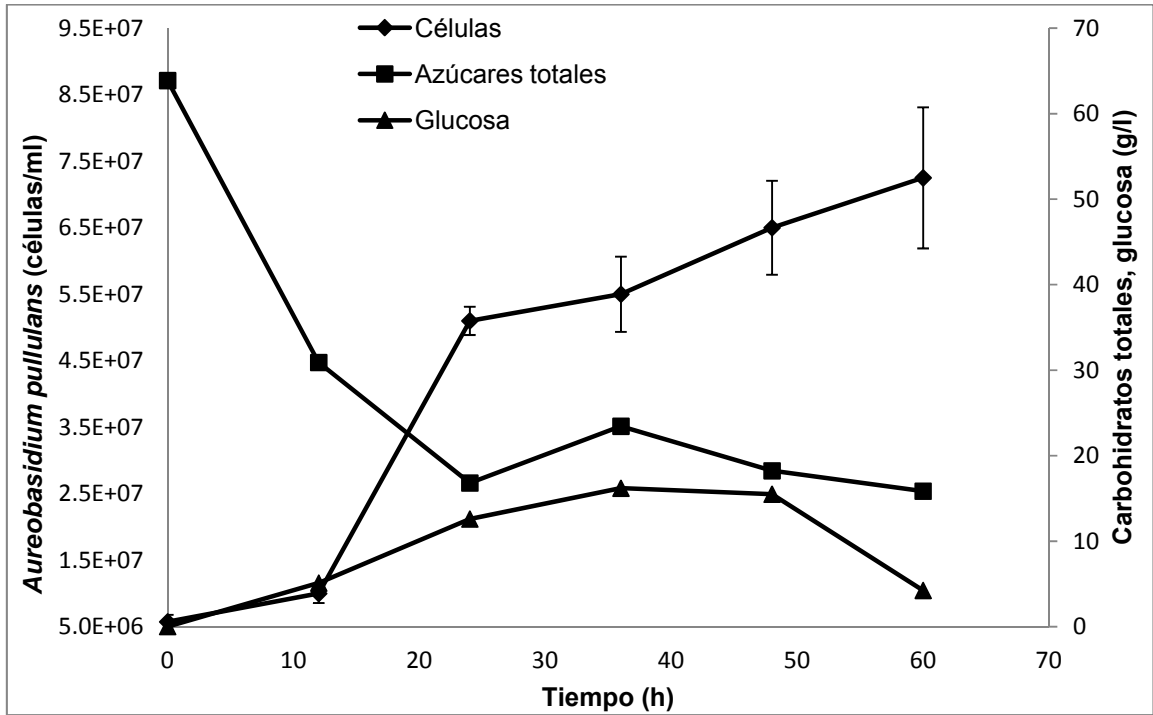


Figura 24. Cinética en matraz C:N 80

En la Figura 25 se presentan los resultados de las cinéticas a las relaciones C:N 100 y 200, en todos los cultivos se presentó crecimiento. Sin embargo, el perfil y cuentas celulares alcanzadas fue diferente al encontrado en las relaciones C:N menores, adicionalmente las cuentas celulares alcanzadas fueron menores. El consumo total (final de la fermentación) de carbohidratos fue del 76% y 83% a las relaciones de C:N (100 y 200) respectivamente. El perfil de consumo de carbohidratos totales fue diferente en los tiempos en los que se muestrearon los experimentos y a las 24 h del proceso se consumió la mayor parte de los azúcares totales siendo comparables en todos los casos, 76% a C:N 100 y 75% a C:N 200. Sin embargo, por el perfil obtenido en la relación C:N de 200 la velocidad de consumo es mayor. En todos los casos se observa la acumulación y consumo de glucosa al igual que en las relaciones C:N evaluadas para crecimiento, esto también demuestra la capacidad de *A. pullulans* de hidrolizar el almidón y sobre todo a concentraciones altas de sólido.

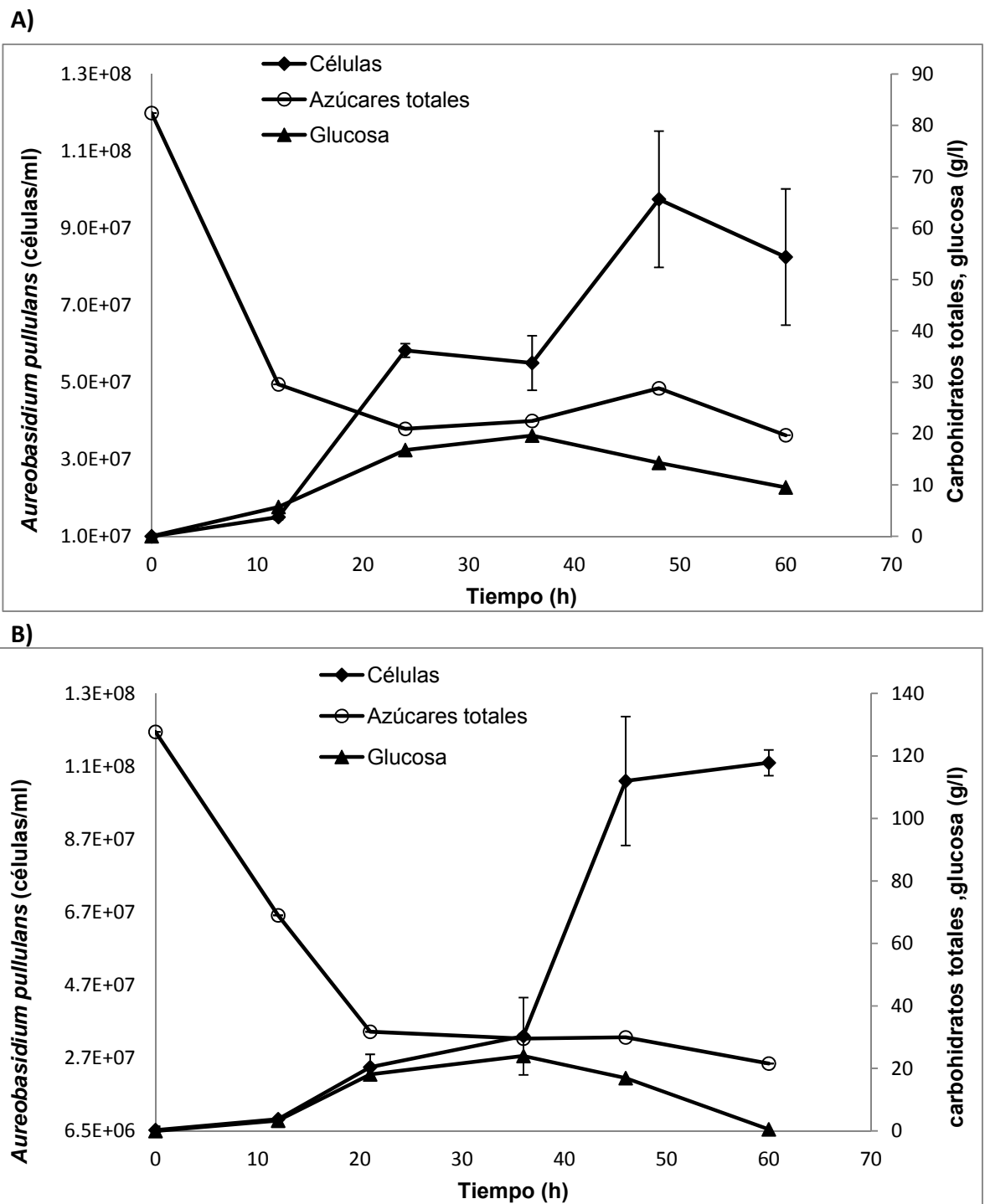


Figura 25. Fermentaciones a nivel matraz en medios líquido basados en almidón a diferentes relaciones C:N, (B) 100 y (C) 200.

El siguiente paso fue probar un cultivo semilote a nivel fermentador. La cinética de fermentación con el medio basado en almidón se presenta en la Figura 26. La primera etapa del proceso comprendió la fase de crecimiento de *A. pullulans* (Figura 26 A), con el medio a una relación C:N de 8 y controlada a un pH de 5.5 para obtener una densidad celular suficiente. La etapa de alimentación se decidió realizar a la hora 26 de la fermentación, las células antes de la adición del medio nuevo fueron 2.97×10^8 células/ml, magnitud comparable a las cuentas determinadas en la fermentación en el lote anterior (Figura 23). El medio nuevo adicionado fue formulado a una relación C:N de 80 y un pH de 6.5 para la etapa de producción del ácido. Las cuentas celulares máximas alcanzadas en esta etapa fueron de 6.48×10^8 células/ml. Aunque existe un aumento en células este no fue en el orden de magnitud en el cultivo en lote evaluado anteriormente. El perfil de consumo de azúcares es variable en la primera etapa del proceso, esto puede ser explicado ya que se observan partículas de almidón, las cuales mediante la técnica de análisis (fenol sulfúrico) pueden causar error. Sin embargo, por el perfil determinado de glucosa, demuestra que el almidón es hidrolizado desde el comienzo de la fermentación. Por su parte, la glucosa residual llega a un punto máximo de concentración de 14 g/l. En la Figura 26B se observa la relación del crecimiento con el consumo de hidróxido de sodio se puede observar que en las primeras 20 h el consumo fue constante tiempo en el cual se estaba consumiendo ácido para mantener el pH, después de ese tiempo el consumo fue incrementando con forme al tiempo de fermentación hasta consumir aproximadamente 11g de NaOH.

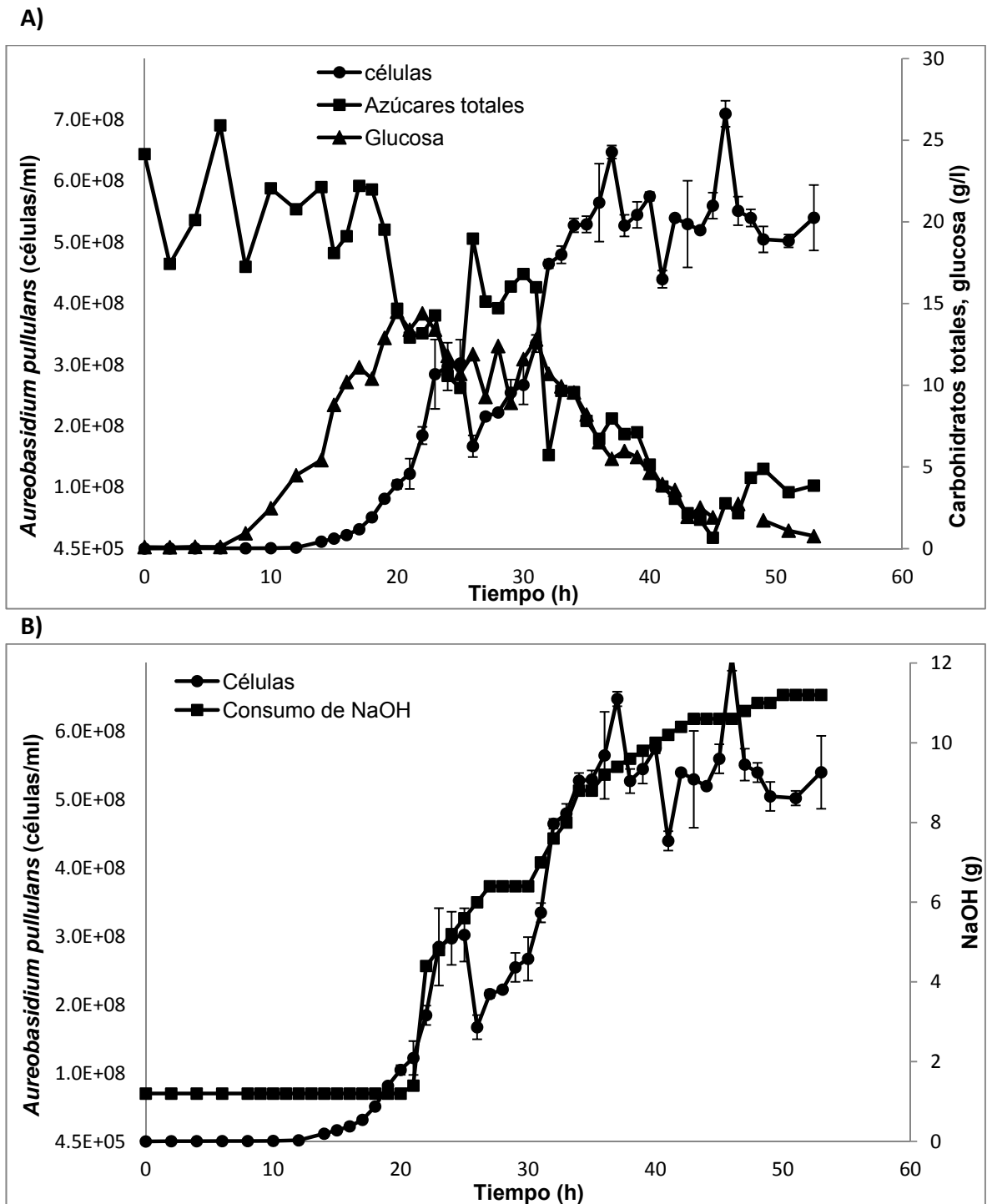


Figura 26. A) relación de crecimiento y consumo de sustratos B) relación del crecimiento con el consumo de NaOH.

En la Figura 27 se observa la relación del crecimiento respecto al consumo de oxígeno disuelto en el cual durante las primeras 26h se había consumido un 60% de oxígeno, una vez realizada la alimentación el oxígeno incrementa debido a que se le ajusta el volumen de aire que se requiere para el volumen de medio adicionado. Los parámetros cinéticos más importantes se presentan en la Tabla 9.

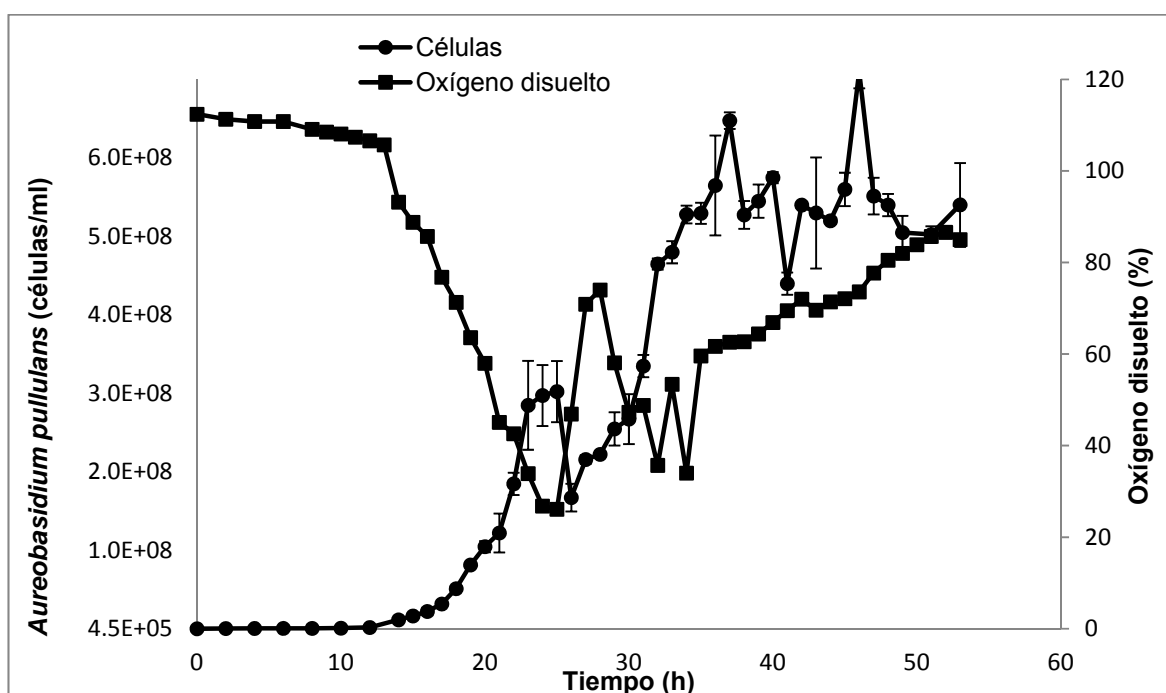


Figura 27. Consumo de sustratos, (B) relación de crecimiento y perfil de oxígeno disuelto

Tabla 9 Parámetros cinéticos de la cepa de *A. pullulans* ATCC15233 en cultivo en semilote con medio basado en almidón en reactor de 5 litros.

Parámetro	
Máximo no. de células en la primera etapa (células/ml)	2.97x10 ⁸
*Velocidad específica de crecimiento en la primera etapa (h ⁻¹)	0.30
Máximo no. de células en la segunda etapa (células/ml)	6.48x10 ⁸
*Velocidad específica de crecimiento en la segunda etapa (h ⁻¹)	0.12
*Velocidad de acumulación de glucosa (g/lh)	1.04 (t ₈ -t ₂₂)
*Velocidad de consumo de glucosa (g/lh)	0.73 (t ₃₁ -t ₄₅)

*las velocidades fueron determinadas gráficamente y ajustadas a un comportamiento exponencial para la velocidad específica de crecimiento y lineal o polinomio para las velocidades de consumo.

t¹corresponde al tiempo de fermentación

Se realizó otra cinética en cultivo en semilote, las primeras 20 h se llevó a cabo con una relación C:N de 8, posterior a ese tiempo se alimentó con una relación de C:N de 500 se realizó a esta relación C:N por que Anastassiadis et al. 2003 reporta que obtiene su máxima concentración de ácido glucónico una relación C:N similar a 500 En la Figura 28 se puede observar que después de la alimentación (20 h) existe un incremento en el crecimiento de *A. pullulans* llegando a la fase estacionaria hasta las 34 h. Se determinaron los carbohidratos totales iniciando con una concentración de aprox. 26 g/l de carbohidratos solubles, en cuanto a la evaluación de la concentración de glucosa se observa que al iniciar la fermentación existía poca concentración de glucosa residual y conforme transcurre la fermentación existe un acumulamiento de glucosa del tiempo 21 al 34 h llegando hasta 10 g/l esto nos indica que *A. pullulans* genera enzimas que facilitan la degradación de almidón.

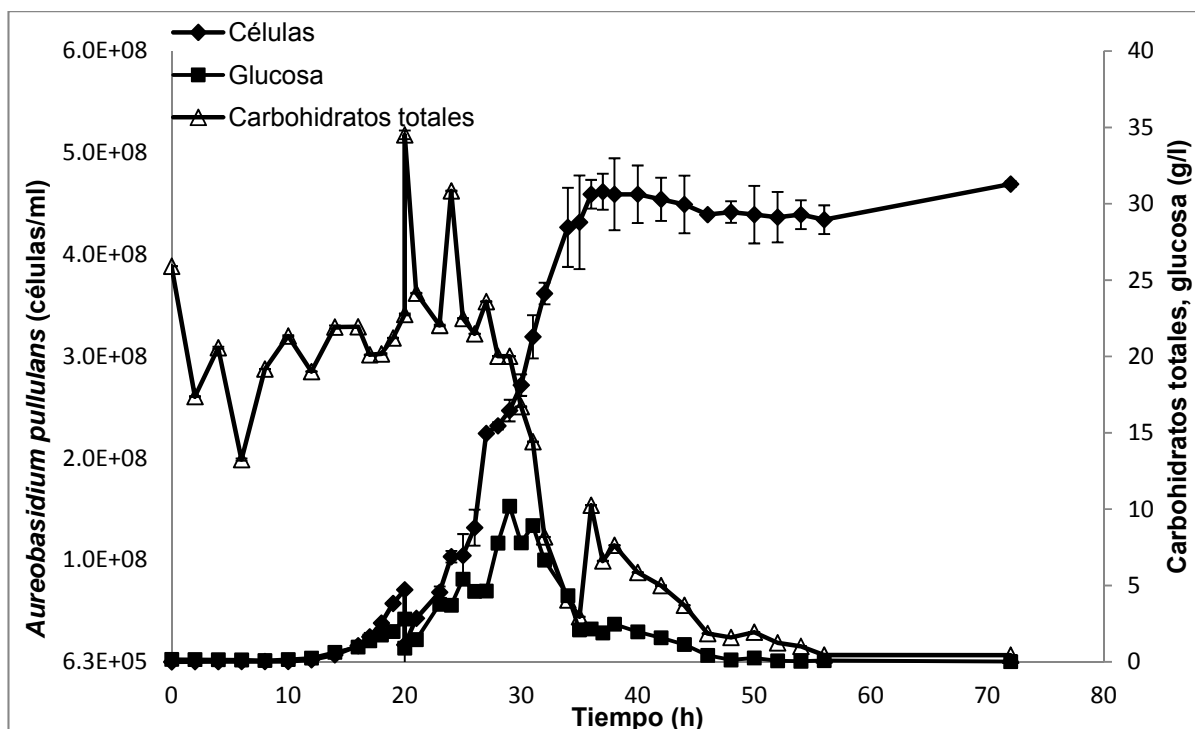
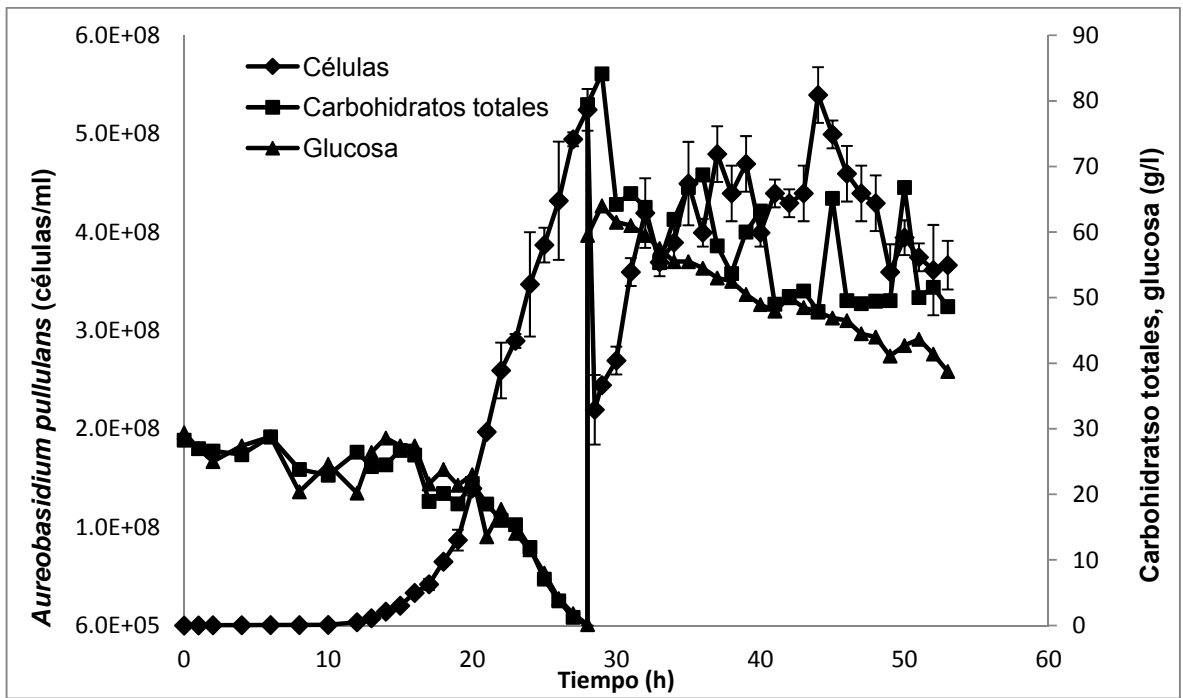


Figura 28. Cinética en cultivo semilote de *A. pullulans* a relación C: N de 500.

8.6. Fermentación en cultivo semilote a base de glucosa nivel fermentador.

También se realizaron experimentos con el medio basado en glucosa, con el fin de comprobar la capacidad productora de ácido glucónico de *A. pullulans* (Figura 29A), sales reportadas por Anastassiadis (2003). Las cuentas celulares alcanzadas antes de la alimentación fueron de 5.25×10^8 células/ml. La alimentación se realizó a las 28 horas iniciada la fermentación, tiempo en el cual la glucosa se consumió. La concentración de glucosa al inicio de la segunda etapa fue de 60 g/l, pero a diferencia del medio basado en almidón, la fuente de carbono (glucosa) solo se consumió un 39% (Figura 29A). De igual manera no hubo un crecimiento abundante en la segunda etapa, donde se determinaron cuentas celulares de 5.4×10^8 células/ml. En Figura 29B se observa la relación del crecimiento respecto al consumo de oxígeno en donde durante las primeras 28 h se consumió 95% de oxígeno disuelto, una vez que se realizó la alimentación se ajustó el volumen de aire con el volumen de medio adicionado llegando hasta 47% de oxígeno disuelto.

A)



B)

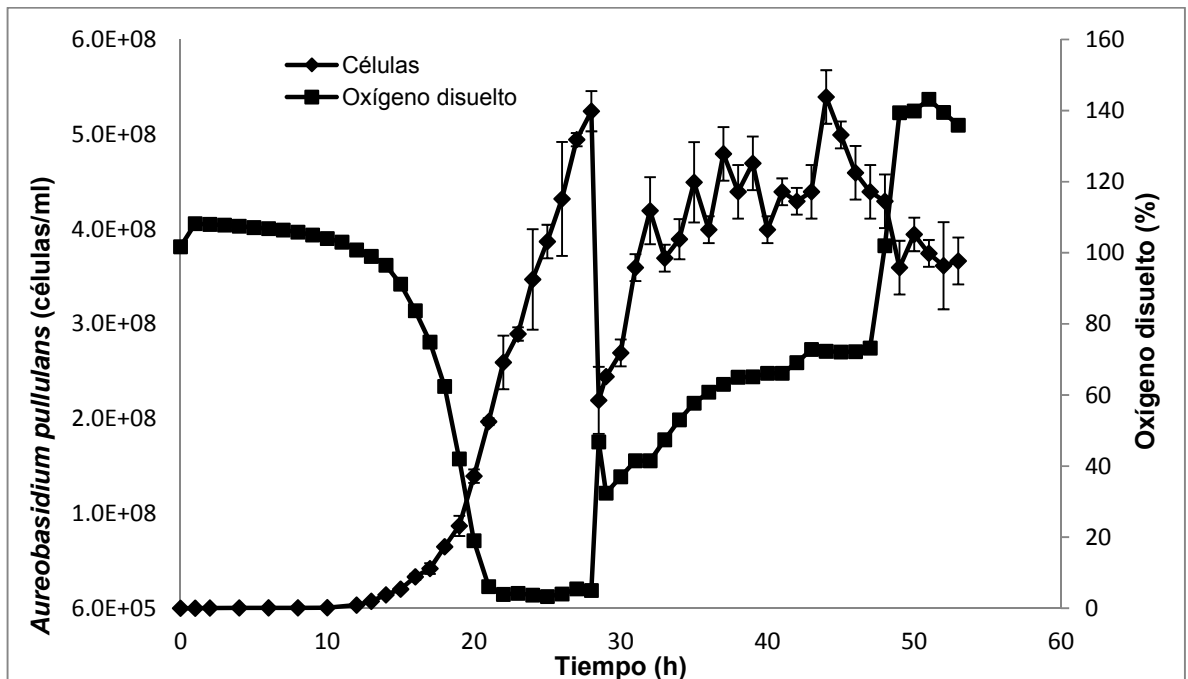


Figura 29. A) Crecimiento y consumo de glucosa, (B) Relación del crecimiento con consumo de glucosa y carbohidratos totales.

En la Figura 30 se observa la relación del crecimiento con el consumo de NaOH en donde el consumo inicio a las 13 horas de fermentación llegando a consumir hasta 8 g de NaOH, podemos observar que el consumo de base es menor comparado con la del medio a base de almidón.

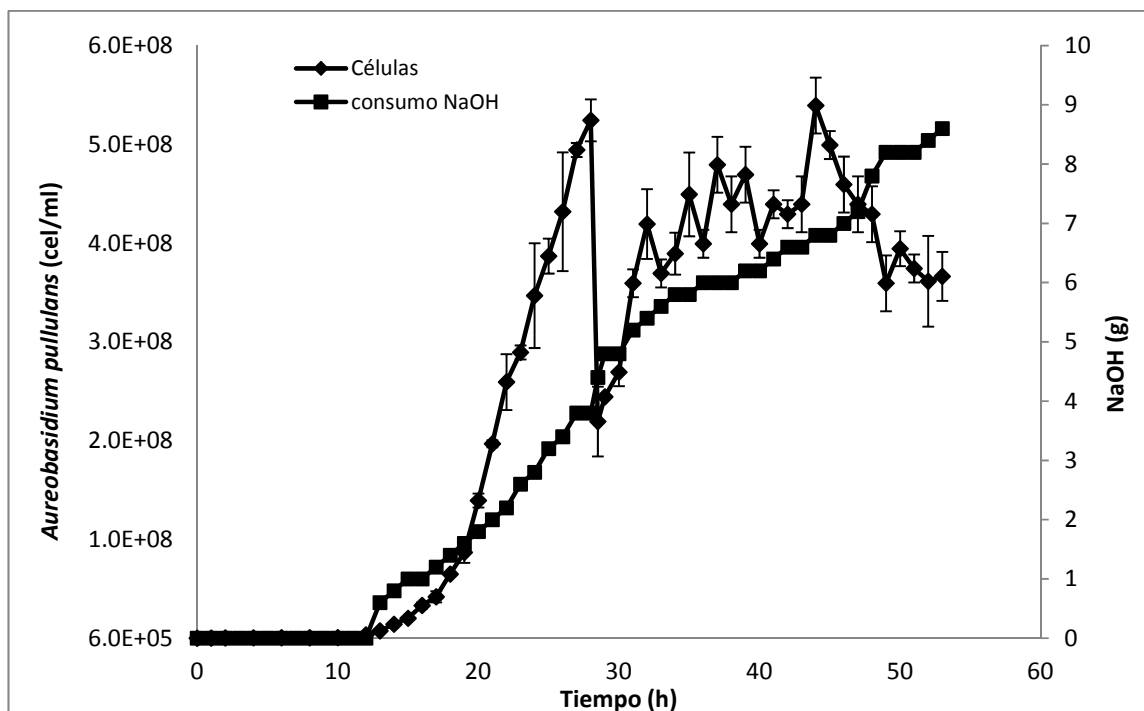


Figura 30. Relación del crecimiento con el consumo de NaOH.

En la Tabla 10 se observan los parámetros cinéticos evaluados en esta fermentación

Tabla 10 Parámetros cinéticos de la cepa de *A. pullulans* ATCC15233 en cultivo en semilote con medio basado en glucosa en reactor de 5 litros.

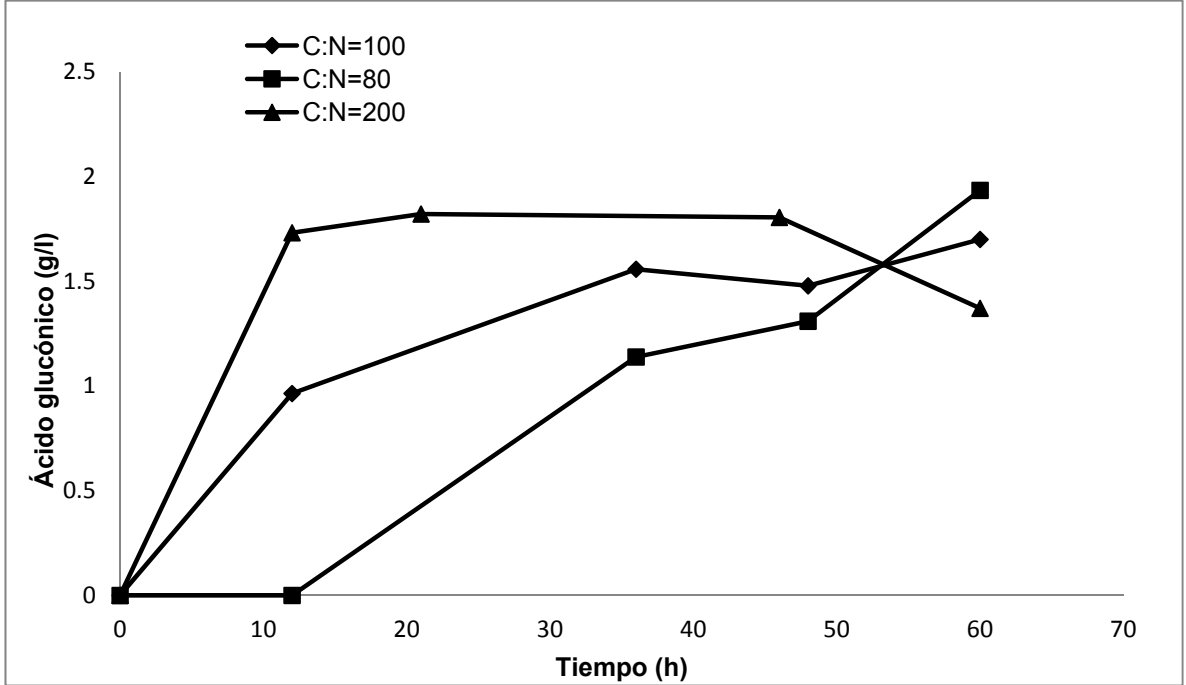
Parámetro	
Máximo no. de células en la primera etapa (células/ml)	5.25x10 ⁸
*Velocidad específica de crecimiento en la primera etapa (h ⁻¹)	0.40
Máximo no. de células en la segunda etapa (células/ml)	5.4x10 ⁸
*Velocidad específica de crecimiento en la segunda etapa (h ⁻¹)	0.20
*Máxima velocidad de consumo de glucosa en la primera etapa (g/lh)	2.66 (t ₂₀ -t ₂₈)
*Máxima velocidad de consumo de glucosa (g/lh)	0.73 (t ₂₉ -t ₅₃)

*las velocidades fueron determinadas gráficamente y ajustadas a un comportamiento exponencial para la velocidad específica de crecimiento y lineal o polinomio para las velocidades de consumo.
^tcorresponde al tiempo de fermentación

8.7. Producción de ácido glucónico.

En la Figura 31A se observa la producción de ácido glucónico en la fermentación a nivel matraz con las tres relaciones C:N (80, 100 y 200) en la cual se observa que en las relaciones C:N (100 y 200) la producción de ácido glucónico inició a las 12 h de incubación, siendo constante la producción de ácido glucónico en relación C:N de 200 con una concentración de 1.82 g/l desde la hora 21 hasta las 48 h. En la Figura 31B muestra la producción de ácido glucónico en medio basado en almidón en el cual la máxima producción de ácido glucónico fue a las 35 h de fermentación con 3.65 g/l.

A)



B)

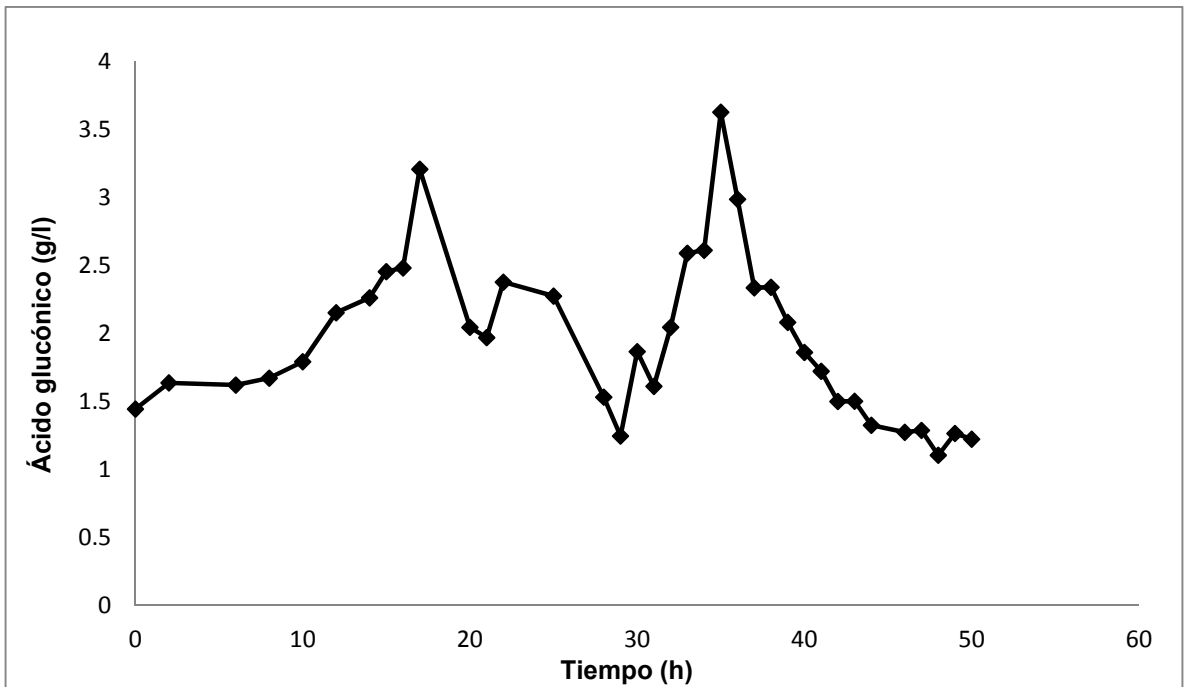


Figura 31. Producción de ácido glucónico. (A) Nivel matraz, (B) medio a base de almidón en cultivo semilote C:N=80.

En la figura 32 se observa la producción de ácido glucónico en el medio basado en glucosa cultivo en semilote con una concentración de glucosa de 160g/l en alimentación, la máxima producción de ácido glucónico fue a las 37 h con 4.22 g/l y también se observa la producción de ácido glucónico para el medio a base de almidón con una relación C:N de 500, en el cual la máxima concentración de ácido glucónico ocurrió a las 44 h con 2.3 g/l, comparando la producción de ácido glucónico en cultivos a base de almidón en estos es menor la producción de ácido glucónico que en el medio a base de glucosa

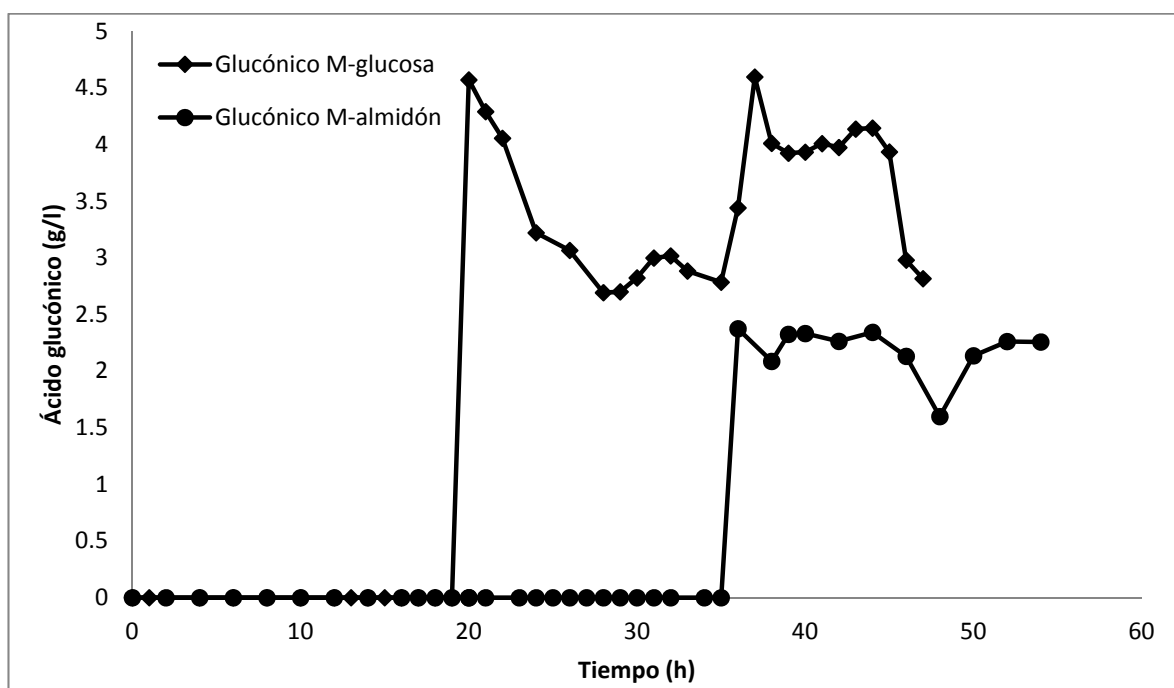


Figura 32. Producción de ácido glucónico en medio a base de glucosa y en medio a base de almidón cultivo en semilote relación C:N=500.

En la Figura 33 se observa un cromatograma correspondiente al estándar de ácido glucónico a una concentración de 3 g/l, en el cual presenta un tiempo de retención de 2.25 min.

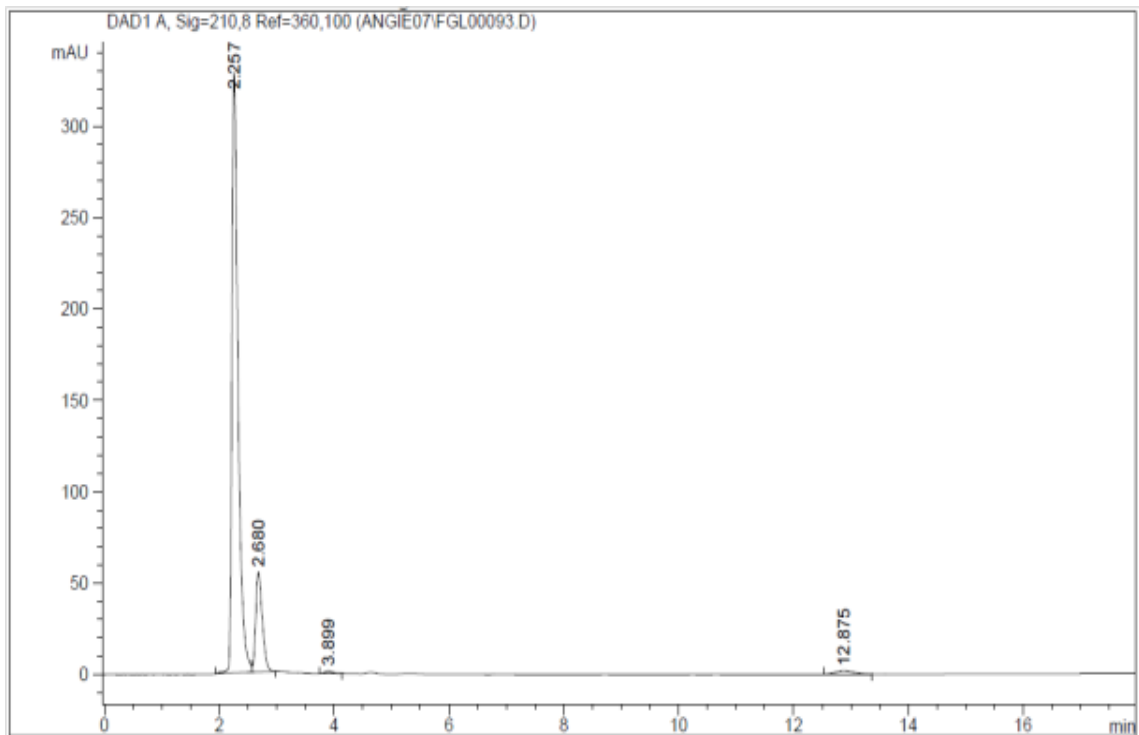


Figura 33. Cromatograma de estándar de ácido glucónico.

En la Figura 34A que corresponde a un cromatograma del medio a base de almidón a 35 h de fermentación en donde se observa el pico del ácido glucónico ya identificado a los 2.25 min como se observa en la Figura 33, pero existen otros 2 picos que incrementando con el paso del tiempo de fermentación que es el 3.15 y el de 13.79 min, en la Figura 34B corresponde a un cromatograma de medio basado en glucosa a las 37 h de fermentación en este caso se observa el pico del ácido glucónico a los 2.25 min y hay 2 picos más que incrementan con el paso de la fermentación el de 2.15 y 2.88 min, está por definirse a que compuestos corresponden estos tiempos de retención.

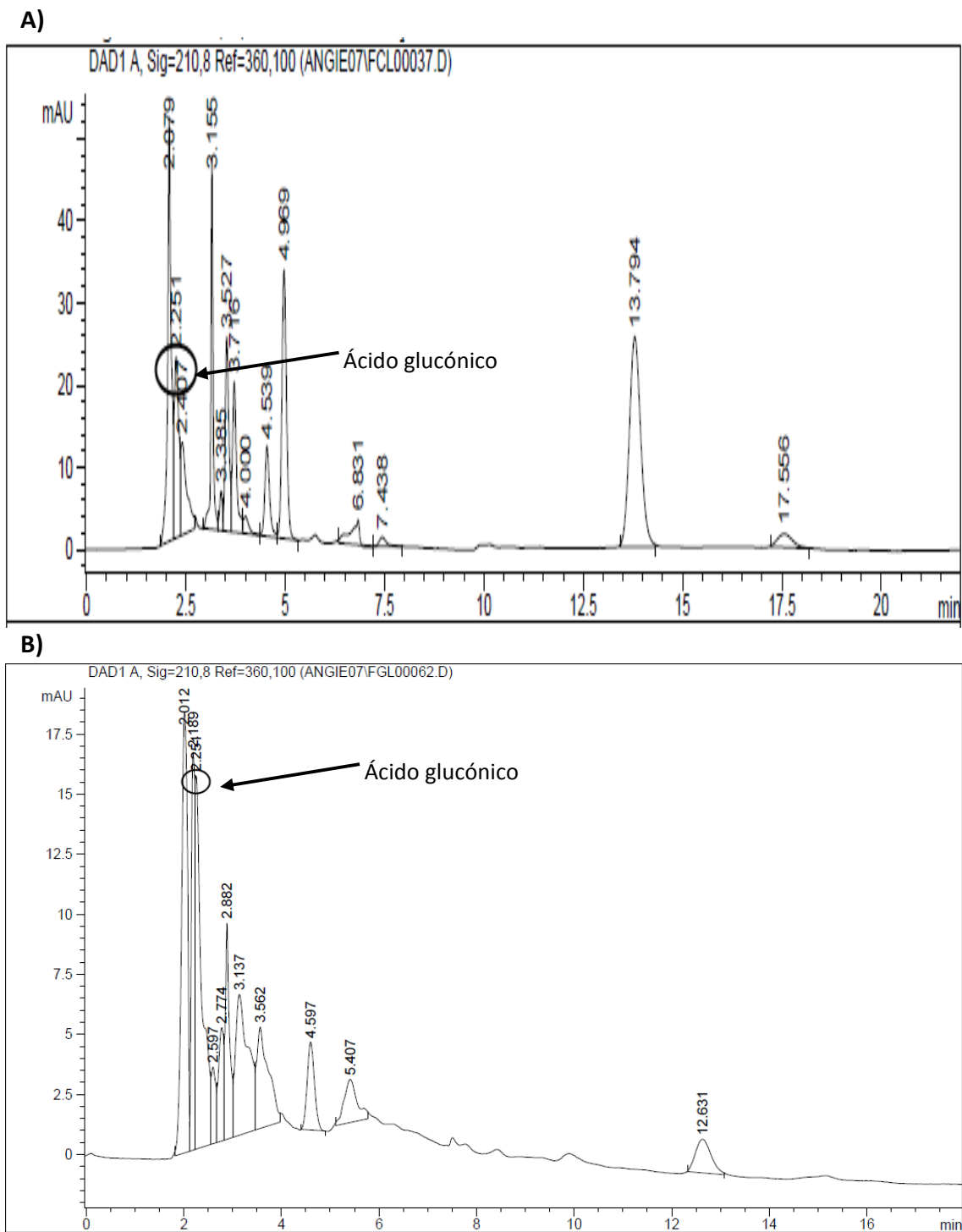


Figura 34 A) Cromatograma a las 35h de fermentación en medio basado en almidón y B) cromatograma a las 37h de fermentación medio a base de glucosa.

En este aspecto, los resultados cubiertos al momento no logran compararse con los resultados que se reportan para *A. pullulans* en la producción de ácido glucónico, las cuales son de hasta 120 g/l en cultivos en lote y de 400 g/l en cultivos continuos utilizando relaciones C:N de 500 y con medios basados en glucosa (Anastassiadis et al. 2000) también se ha reportado que produce 220 g/l en cultivo continuo y en lote alimentado 315 g/l de ácido, con una alimentación de glucosa de 450 g/l (Anastassiadis et al. 2005) y se ha reportado producción de ácido glucónico con *Penicillium variable* de 70 g/l en cultivo por lote y 240 g/l en cultivo por lote alimentado (Crognale et al. 2008). Sin embargo, la perspectiva de utilizar *Aureobasidium pullulans* para utilizar el almidón extraído del grano de cebada de baja calidad es confiable. *A. pullulans*, es una levadura cosmopolita con diversas aplicaciones industriales (Tabla 11). Si bien, con los resultados no es propicia para la producción de ácido glucónico, al menos no la cepa de *A. pullulans* ATCC15233, es posible generar otros productos potenciales a partir del almidón extraído del grano de cebada de baja calidad. *A. pullulans* es de las pocas levaduras reportadas que producen amilasas extracelulares además se ha reportado a levaduras de los géneros *Saccharomycopsis*, *Schwanniomyces*, *Candida japonica* y *Filobasidium capsuligenum* (Li et al 2007). Las amilasas tienen aplicaciones actuales en la industria alimentaria, farmacéutica, etc. El almidón puede ser un buen sustrato para la producción de estas levaduras ya que en la producción a gran escala sale mucho más barato que utilizar otras fuentes de carbono como glucosa o sacarosa. Más aún *A. pullulans*, se ha reportado que puede hidrolizar los enlaces glucosídicos α -1,4 y β -1,6 de las moléculas del almidón (Li et al. 2007). Es por ello que se decidió realizar el análisis de la producción de la actividad amilolítica de *A. pullulans* en cultivo por lote y semilote.

Tabla 11 Bioproductos sintetizados a partir de *A. pullulans* y sus aplicaciones potenciales (Chi et al. 2009)

Bioproductos	Aplicaciones
Pululano	Polímeros impermeables de oxígeno, fibras, adhesivos, agentes encapsulantes, alimentos de bajas calorías, anticoagulante, compuestos con actividades antitrombóticas y antivirales, materiales para la industria química.
Amilasas	Licuefacción y sacarificación del de almidón, industria textil, aditivos para detergentes, producción de etanol, enzimas para diagnóstico, producción de jarabes fructosados.
Celulasas	Mejoramiento de fibras de celulosa, industria textil, industria de detergentes, producción de biocombustibles, depuración de contaminantes.
Lipasas	Catálisis en reacciones de: hidrólisis, interesterificación, alcoholisis, acidólisis, esterificación y aminólisis.
Proteasas alcalinas	Aditivos para detergentes, procesamiento de pieles, recuperación de plata, propósitos médicos, procesamiento de alimentos, ensilajes, industria química, depuración de contaminantes, digestión de proteínas.
Xilanasas	Industria papelera, industria de fermentación y alimentaria, así como depuración de contaminantes.
Manasas	Blanqueamiento de papel, bioconversiones de desechos de biomasa a azúcares fermentables, reducir viscosidad de extractos de café, , producción de oligosacáridos de manosa.
β -fructofuranosidasas y maltosiltransferasas	Alivio de síntomas de constipación, mejoramiento de la composición de lípidos en sangre en el tratamiento de hiperlipidemias; aumento en la adsorción de calcio y magnesio; supresión en la producción de sustancias putrefactas en el intestino de humanos y animales, producción de factores de crecimiento de bifidobacterias.
Proteína unicelular	Consumo animal y humano, fuentes de proteínas y péptidos bioactivos.
Agente de Biocontrol	Inhibición de microorganismos indeseables en frutos, granos y vegetales.
Sideróforos	Medicina, recuperación de metales y biorremediación de sitios contaminados.

8.8. Determinación de actividades amilolíticas en cultivo por lote y semilote.

Se realizó una cinética en cultivo por lote a una relación C:N de 8 en la cual el tiempo de fermentación fue hasta las 46 horas, se monitoreo cada 2 h. En la Figura 35 se muestra la cinética en la que se observar que la actividad de glucoamilasas va incrementando conforme al tiempo de fermentación, llegando al tiempo 22 que fue el tiempo que presentó la máxima actividad con 291 U/ml, en los tiempos seguidos existió un decaimiento en la producción de glucoamilasas, esto comparado con la ya reportado (Tabla 12) en se observa que usando como sustrato almidón soluble la máxima actividad de esta enzima ocurre al tiempo 32 con aproximadamente 10 U/ml en el cual la actividad enzimática se mantiene constante hasta las 72 h (Li et al. 2007). También se ha reportado la actividad de esta enzima usando como sustrato amilosa y amilopectina en las cuales se presenta muy poca actividad comparado con este trabajo (Tabla 12) y se observa que con *Bacillus* sp. Se presenta una actividad de 90 U/ml en almidón soluble y esta incrementa su actividad con almidón de papa (Goyal et al. 2005). Con todo esto se observa que la actividad de glucoamilasas usando medio a base de almidón de cebada se obtiene una actividad mucho mayor que con los otros sustratos reportados y la actividad de las glucoamilasas depende de la composición de almidón.

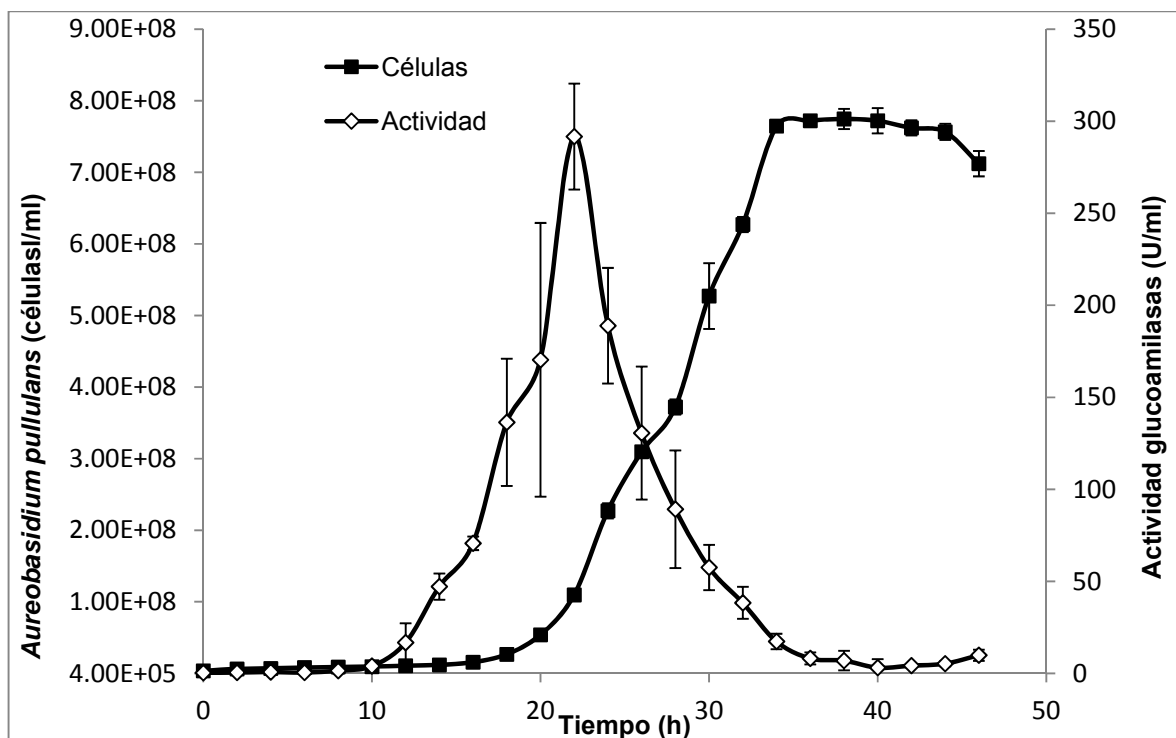


Figura 35. Cinética de crecimiento de *A. pullulans* y producción de glucoamilasas.

Tabla 12. Comparación de la actividad de glucoamilasas.

Sustrato	Actividad glucoamilasas (U/ml)	Cepa	Referencia
Almidón de cebada	290	<i>A. pullulans</i> ATCC 15233	Este trabajo
Almidón soluble	10	<i>A. pullulans</i> N-13d	Li et al. 2007
Almidón soluble	0.37	<i>A. pullulans</i> NRRL Y12974	Saha et al. 1993
Amilosa	0.29	<i>A. pullulans</i> NRRL Y12974	Saha et al. 1994
Amilopectina	0.46	<i>A. pullulans</i> NRRL Y12974	Saha et al. 1995
Almidón soluble	90	<i>Bacillus</i> sp.	Goyal et al. 2005
Almidón de maíz	81	<i>Bacillus</i> sp.	Goyal et al. 2006
Almidón de papa	181	<i>Bacillus</i> sp.	Goyal et al. 2007

En cuanto a la producción de α y β - glucosidasas, (Figura 36) se puede apreciar que la producción de α -glucosidasas se correlaciona con el crecimiento de *A. pullulans* llegando a su máxima producción a las 34 h que es cuando se llega a las fase

estacionaria, la máxima actividad de enzima a esta hora fue de 7.6 U/ml. en cuanto a la producción de β -glucosidasas, su máxima actividad ocurrió a las 36 h con 1.7 U/ml aunque aparentemente estas actividades son bajas, los resultados obtenidos a estas condiciones son mejores comparando las actividades con lo reportado en la literatura, donde para las α -glucosidasas se logra obtener hasta 2.14 U/ml usando como fuente de carbono almidón soluble, la actividad de α -glucosidasas usando como fuente de carbono amilosa fue de 0.77 y con amilopectina se reporta una actividad de 1.59 U/ml, con un tiempo de fermentación de 4 días (Saha et al.,1993). Para las β -glucosidasas la actividad reportada obtenida por *A. pullulans* es de aproximadamente de 0.2 U/ml a pH 5.5, (Ribeiro et al, 2007) se compara con este pH ya que la fermentación para determinación de estas enzimas se realizó a pH 5.5. La actividad de las β -glucosidasas usando como sustrato salvado de maíz se obtiene una actividad de 0.27 U/ml la cual se mantiene constante desde la hora 96 a las 144 h (Saha et al. 1994). Esto nos indica que la cantidad de estas enzimas obtenidas están por encima de la que se ha reportado hasta el momento para *A. pullulans*.

También en la Figura 36 se observa la actividad de las α -amilasas, las cuales muestran un perfil similar al de las α -glucosidasas, en la cual la máxima actividad se presenta a las 38 h con aproximadamente 11 U/ml, siendo su principal función romper los enlaces glucosídicos en la región central de la amilosa y amilopectina, exceptuando las moléculas cercanas a la ramificación (Cruger et al. 1993) es por ello que el perfil de estas dos enzimas es similar ya que en cuanto a su función solo se diferencia en que las α -glucosidasas es capaz de romper algunos enlaces glucosídicos α -1,6.

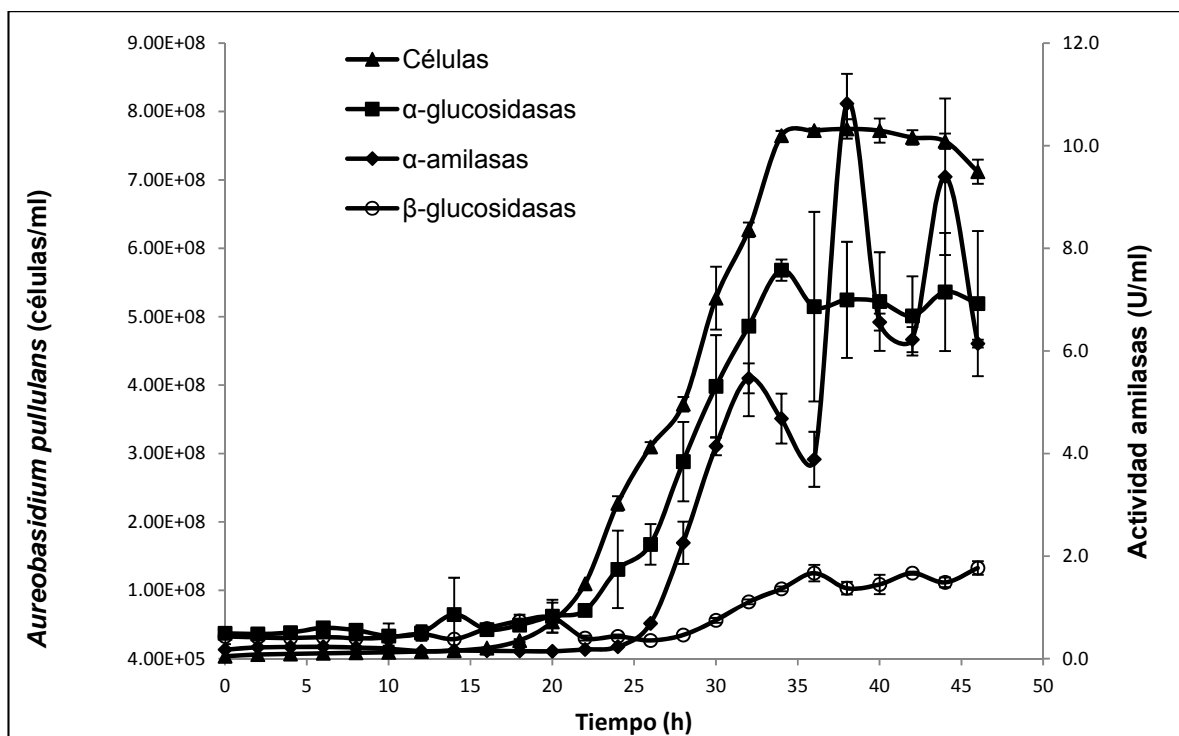


Figura 36. Crecimiento de *A. pullulans* y actividad de α -glucosidasas, β -glucosidasas y α -amilasas en cultivos en lote a nivel fermentador.

En la Figura 37 se observa la relación de las enzimas amilolíticas (glucoamilasas, α -amilasa, α -glucosidasas y β -glucosidasas) en la cual se ve el diferente comportamiento que tienen en este proceso de fermentación el intervalo de tiempo de mayor actividad para glucoamilasas fue a partir de las 18 a las 26 horas al mismo tiempo en que la glucosa del medio aumento teniendo una máxima concentración a las 26 h con 11.3 g/l, una vez que la actividad de las glucoamilasas disminuyo la actividad de las α -amilasas y α -glucosidasas incremento observado su mayor actividad para las α -amilasas de las 38 a las 44 horas de fermentación con su mayor actividad a la hora 38 con 10.8 U/ml en cuanto a las α -glucosidasas se mantuvo constante a partir de las 30 a las 46 horas con su mayor actividad a las 34 h con 7.6 U/ml, en cuanto a la actividad de las β -glucosidasas fue mucho menor que todas las enzimas evaluadas, esto se a que la enzima se inhibe a cierta concentración de glucosa, es por ello que su actividad incrementa cuando los niveles de glucosa

disminuyen (Lo et al.1990) este comportamiento de las enzimas amilolíticas se relaciona perfectamente con el perfil de consumo de sustrato (Figura 37).

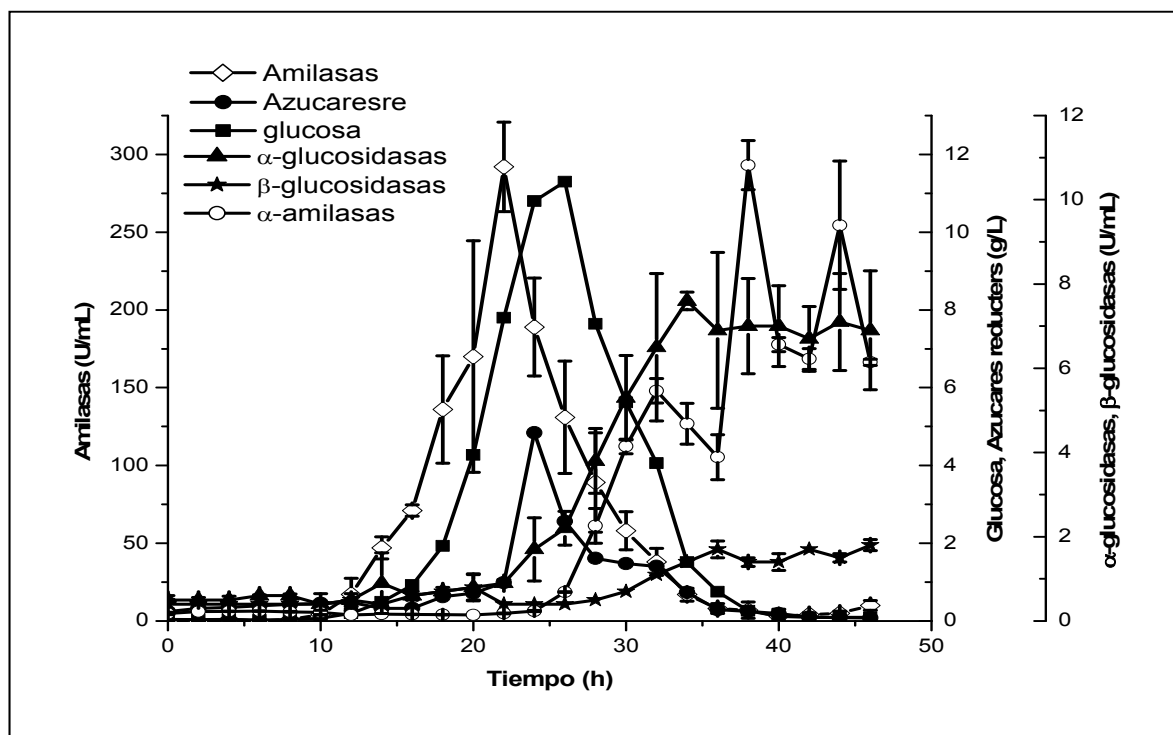


Figura 37. Correlación de enzimas amilolíticas y consumo de sustrato en cultivos en lote.

De esta fermentación, se determinó la actividad de glucoamilasas con almidón gelatinizado (G) y sin gelatinizar (SG), este es un experimento importante ya que en la industria de hidrólisis de almidón, este es gelatinizado a una temperatura alta (60 °C a 90 °C) por lo que enzimas que son capaces de hidrolizar almidón sin gelatinizar puede ahorrar costos de proceso y es de gran interés industrial. Observamos en la Figura 38 que el ensayo realizado con almidón gelatinizado es la que presento mayor actividad enzimática en el tiempo 32 h con 250 U/ml, comparado con el almidón sin gelatinizar que su mayor actividad fue a las 24 h con 220 U/ml y su perfil cae más

rápidamente que con el almidón sin gelatinizar, se determino la actividad enzimática por el método de azúcares reductores. Esto nos indica que con el tratamiento de gelatinización, el almidón presenta mayor actividad enzimática ya que en gránulos de almidón la amilosa y amilopectina se encuentran unidos mediante enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares que dan en el almidón su estabilidad la cual la pierde con el agua al calentar la solución, los enlaces hidrógeno se rompen y el almidón se dispersa favoreciendo así la acción de la enzimas sobre el almidón. (Bentley 1999).

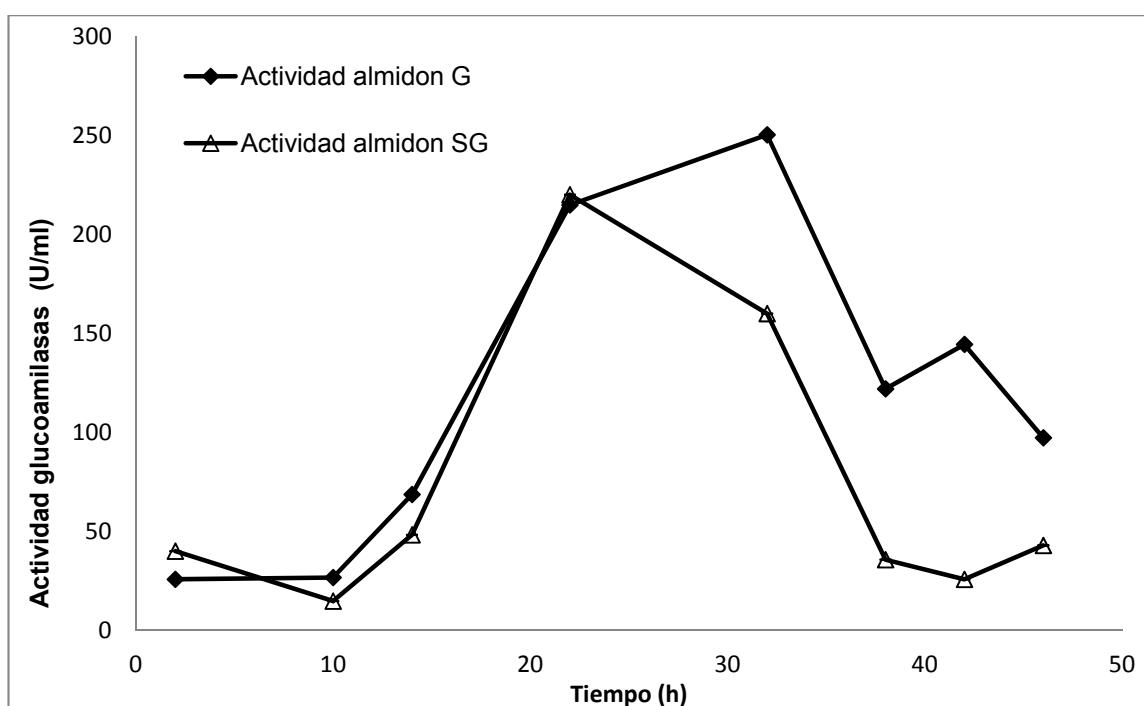


Figura 38. . Actividad enzimática con almidón gelatinizado y sin gelatinizar

El análisis de glucosa en las reacciones se presenta en la Figura 39 en el cual se observa en las primeras horas un perfil similar para ambos procesos. Para el almidón sin gelatinizar llega a una concentración de glucosa de 9.2 g/l a las 32 h, en cuanto al almidón gelatinizado su máxima concentración de glucosa ocurrió a las 24 h con 10.9 g/l, en los tiempos posteriores la concentración de la glucosa disminuyó en el

almidón gelatinizado comparado con la del almidón sin gelatinizar. Esta información junto con el perfil de actividad de las diferentes enzimas en la fermentación nos indica que las enzimas α -glucosidasas y β -glucosidasas están actuando y son importantes para lograr una hidrólisis eficiente del almidón (Saha et al. 1993).

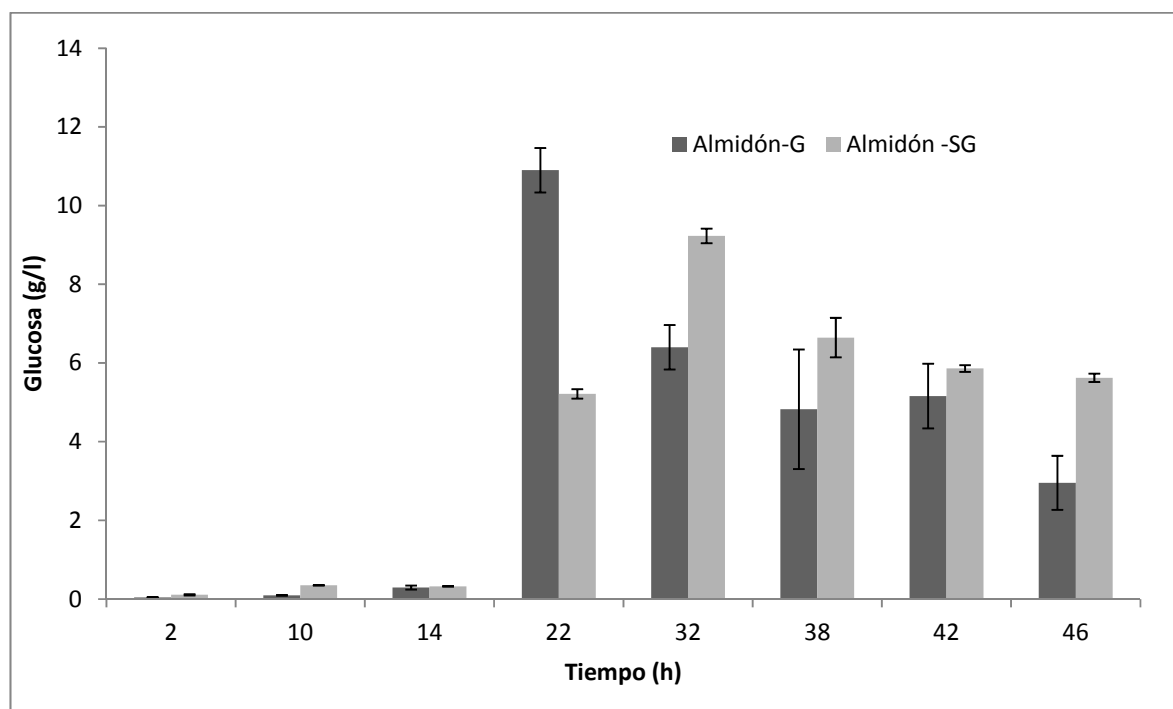


Figura 39 Perfil de glucosa liberado con almidón gelificado y sin gelificar en muestras obtenidas en la fermentación en lote.

En cuanto a la producción de glucoamilasas en cultivo en semilote el cual se llevo a cabo a pH 6.5 después de la alimentación. En la Figura 40 se observa que en la primera etapa de la fermentación la máxima actividad de glucoamilasas ocurrió a las 16 h con aprox. 98 U/ml, y después de la alimentación la máxima actividad obtenida fue a las 25 h con 260 U/ml, los datos obtenido a estas condiciones fueron menores comparado con la cinética en cultivo por lote que a las 22 h presento su máxima actividad de 291 U/ml (Figura 35). Esto nos indica que a pH 6.5 la enzima no es tan activa como a pH 5.5. Hasta el momento no existen reportes de la actividad de esta

enzima en cultivo en semilote, pero aun a estas condiciones la producción de esta enzima esta por arriba de lo que ha reportado (Tabla 12).

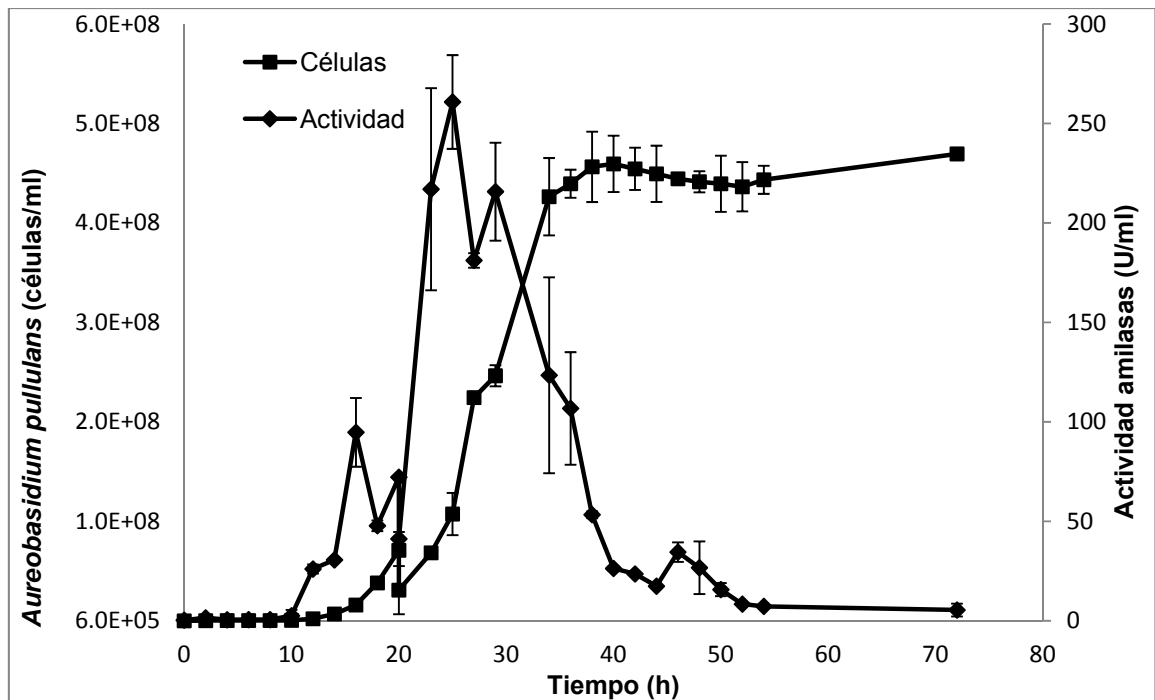


Figura 40 Actividad de amilasa en cultivo semilote de *A. pullulans*.

En cuanto a la producción de α -glucosidasa y β -glucosidasas (Figura 41) se observa que la producción de α -glucosidasas después de la alimentación se relaciona con el crecimiento celular hasta llegar a la fase estacionaria presentando en este caso la máxima actividad a las 42 horas con 2.6 U/ml, en este caso la β - glucosidasas se observo muy poca actividad llegando a su máxima a la hora 36 con 0.38 U/ml, en los dos casos se obtuvo menor actividad comparando estos datos con el cultivo por lote (Figura 36).

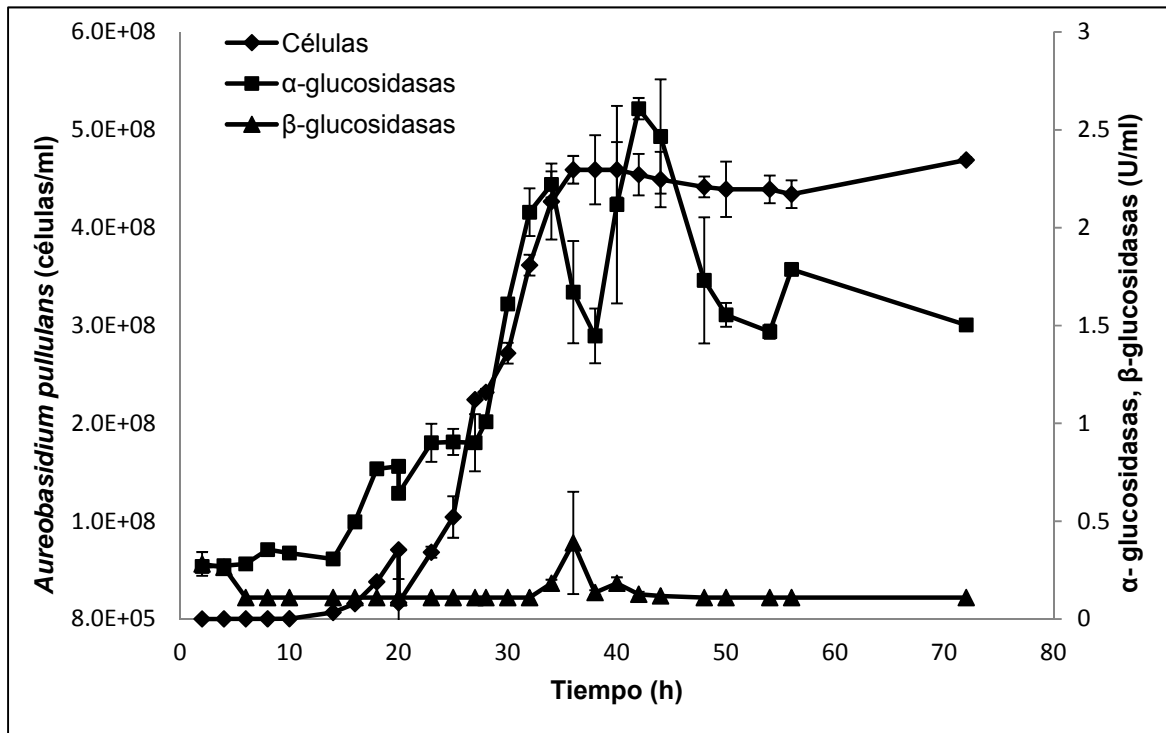


Figura 41. Crecimiento de *A. pullulans* y producción de α -glucosidasas y β -glucosidasas en cultivos en semilote.

En la Figura 42 se observa la relación de las enzimas amilolíticas y el consumo de sustrato, se puede observar que cuando existe mayor actividad de glucoamilasas del tiempo 23 al 36, a este intervalo de tiempo existe un acumulamiento de glucosa llegando a una máxima de 10.2 g/l a la 29 h esto es porque la acción que ejerce esta enzima sobre el almidón es generar glucosa y algunos oligosacáridos (Carrera, 2003). Conforme el microorganismo va consumiendo la glucosa la α -glucosidasas incrementa su actividad iniciando desde el tiempo 28 al 46 h, en cuanto a la β -glucosidasas su actividad es muy baja, aquí es mucho más evidente la inhibición de esta enzima, esto nos indica que una vez que se desactiva las glucoamilasas inicia la actividad de las α -glucosidasas para seguir con la hidrólisis del almidón y para que el microorganismo siga su metabolismo. La disminución en la producción de enzimas amilolíticas con esta fermentación tal vez se deba al cambio de pH con el que se

llevo a cabo esta fermentación la cual se llevo a cabo a pH 6.5 y las glucoamilasas presentan una estabilidad a intervalos de pH de 3-5.5 y las α -glucosidasas su estabilidad se encuentra entere pH 3.5-7 (Saha et al. 1993) La producción de estas enzimas en cultivos en semilote no se han reportado es por ello que solo se compara con los de cultivo por lote realizados en este trabajo.

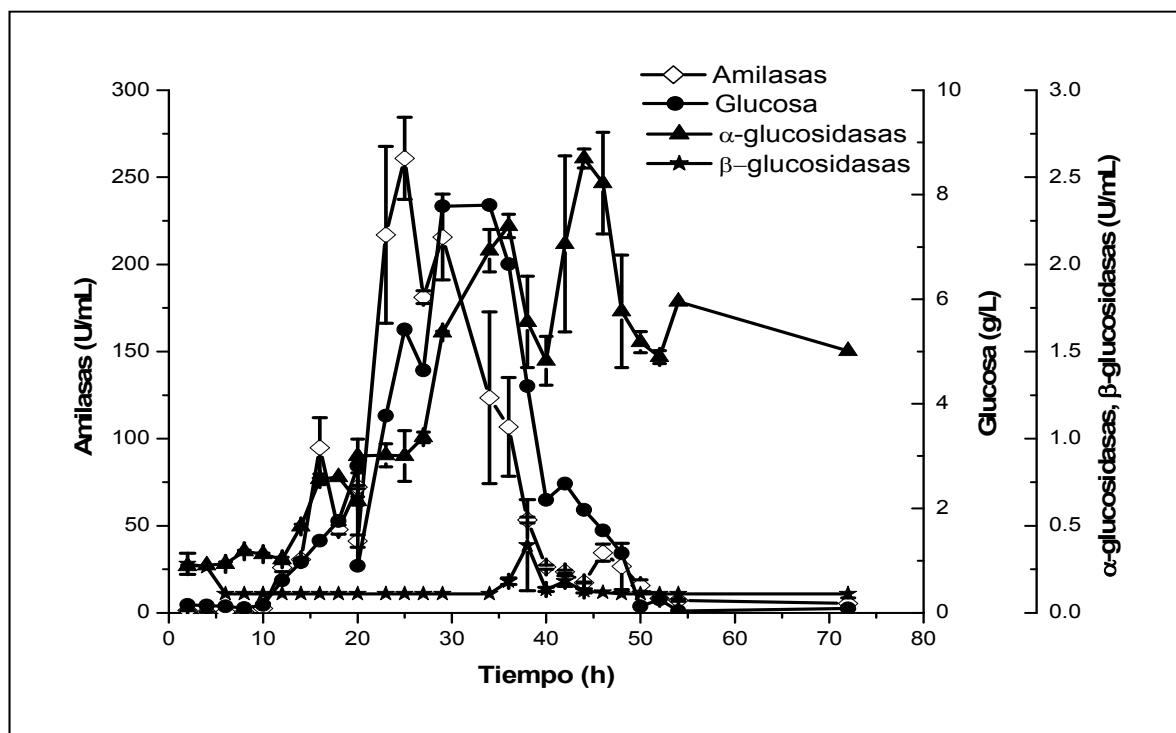


Figura 42. Comportamiento de la producción de enzimas amilolíticas en cultivo semilote.

Hasta la fecha de la realización de este trabajo, no ha sido descrita la actividad de amilolítica de *A. pullulans* utilizando almidón extraído de cebada. Los reportes existentes como se observa en la Tabla 12 han relacionado únicamente la producción amilolítica utilizando almidón soluble a base de papa, así como almidón de maíz (Li et al. 2007). Los resultados presentados en este trabajo, establecen las bases para poder utilizar la cebada maltera de baja calidad como materia prima potencial en la producción de productos con mayor valor agregado. Esto puede ser una alternativa de mercado para productores que no pueden colocar su producción al

no alcanzar la calidad establecida por la única empresa comercializadora de cebada maltera.

9. Costo de producción de la fermentación de *A. pullulans* utilizando almidón extraído de la cebada de mala calidad.

Con los resultados obtenidos, si bien el medio de cultivo formulado no es propicio para la producción de ácido glucónico, puede ser potencialmente usado para la producción de enzimas amilolíticas por lo que se calculó el costo de la fermentación de *A. pullulans* con el almidón extraído de la cebada y su comparación con almidón comercial (Tabla 12) y glucosa (Tabla 13). El precio de la cebada que se reporta en el análisis de costo es estimado, ya que no hay un precio determinado por kg de cebada de mala calidad. Sin embargo, el precio por tonelada de la cebada según el Consejo Mexicano de la Cebada Maltera A. C. (http://www.campomexicano.gob.mx/portal_sispro/index.php?portal=cebada) y concertado desde el 2005 es de \$2,150.00 (M. N.), esto nos daría un precio de \$2.15 (M. N.) por kg de cebada. Este precio de una manera asegura la venta de la cebada por parte de la empresa Impulsora Agrícola, pero si el producto no cumple con los requisitos de la maltera, la cosecha de la cebada es rechazada. Por lo que el precio estimado de la cebada maltera de baja calidad se consideró de \$1.05 (M. N). Como vemos la evaluación en el costo de producción a una escala de producción de 1000 litros de *A. pullulans* a partir del almidón de la cebada resulta costeable, siendo 31% más económico si se compara con el almidón comercial extraído del maíz y 45% más económico que un medio basado en glucosa. Esto en términos de producciones industriales representa un ahorro considerable. Aún cuando la producción de ácido glucónico se minimiza. En este aspecto, el proyecto se ve afectado en cuanto a la perspectiva del producto final que era el ácido glucónico. Sin embargo, la propuesta de utilizar la cebada maltera de baja calidad con la levadura *A. pullulans* es potencial en México, primero por su capacidad de hidrolizar almidón, y la segunda ya que no existe otra comercializadora que acepte cebada maltera de baja calidad. Con la presente etapa se demuestra que este grano de baja calidad puede tener un

mercado alternativo para generar productos biotecnológicos inclusive de mayor valor agregado que el que se tenía contemplado en un inicio. Se ha determinado explorar el uso de *A. pullulans* como productor de amilasas y evaluar las células obtenidas en la fermentación como agentes de control biológico con experimentos muy específicos de tal manera que los productos finales del proyecto se cumplan sustancialmente.

Tabla 13 Comparación del costo estimado de la fermentación de *A. pullulans* con almidón comercial extraído partir de maíz y almidón extraído de la cebada maltera de baja calidad. Base de cálculo 1000 litros.

Descripción	P.U. \$/Kg	Cantidad (Kg)				Costo (Pesos M.N.)			
		Lote		Semilote		Lote		Semilote	
		Almidón comercial	Almidón extraído	Almidón comercial	Almidón extraído	Almidón comercial	Almidón extraído	Almidón comercial	Almidón extraído
Cebada	\$ 1.05	-	125	-	162.5	\$ -	\$ 131.25	\$ -	\$ 170.63
Almidón comercial	\$ 33.64	50	-	65	-	\$ 1,682.00	\$ -	\$ 2,186.60	\$ -
Extracción de almidón									
Macerado									
NaOH	\$ 30.19	-	0.25	-	0.325	\$ -	\$ 7.55	\$ -	\$ 9.81
Hidrolisis									
HCl	\$ 17.88	-	2.5	-	3.25	\$ -	\$ 44.70	\$ -	\$ 58.11
Ajuste de pH									
NaOH	\$ 30.19	-	2.5	-	3.25	\$ -	\$ 75.47	\$ -	\$ 98.10
Subtotal Almidón						\$ 1,682.00	\$ 258.96	\$ 2,186.60	\$ 336.65
Medio de cultivo para crecimiento									
Almidón		50	50	25	25	\$ 1,682.00	\$ 258.96	\$ 841.00	\$ 129.48
NH ₄ Cl	\$ 8.94	8.6	8.6	4.3	4.3	\$ 76.88	\$ 76.88	\$ 38.44	\$ 38.44
Extracto de levadura	\$ 284.45	5	5	2.5	2.5	\$ 1,422.23	\$ 1,422.23	\$ 711.11	\$ 711.11
MgSO ₄ ·7H ₂ O	\$ 6.15	0.2	0.2	0.1	0.1	\$ 1.23	\$ 1.23	\$ 0.62	\$ 0.62
KH ₂ PO ₄	\$ 56.42	0.3	0.3	0.15	0.15	\$ 16.93	\$ 16.93	\$ 8.46	\$ 8.46
CaCO ₃	\$ 7.55	5	5	2.5	2.5	\$ 37.73	\$ 37.73	\$ 18.87	\$ 18.87
Tiamina	\$ 61,184.70	0.001	0.001	0.0005	0.0005	\$ 61.18	\$ 61.18	\$ 30.59	\$ 30.59
Subtotal Medio de cultivo crecimiento						\$ 3,298.18	\$ 1,875.14	\$ 1,649.09	\$ 937.57

Medio de cultivo para producción									
Almidón				40	40			\$ 1,345.60	\$ 207.17
NH ₄ Cl	\$ 8.94			0.6	0.6	\$ -	\$ -	\$ 5.36	\$ 5.36
Extracto de levadura	\$ 284.45			0.65	0.65	\$ -	\$ -	\$ 184.89	\$ 184.89
MgSO ₄ ·7H ₂ O	\$ 6.15			0.01	0.01	\$ -	\$ -	\$ 0.06	\$ 0.06
KH ₂ PO ₄	\$ 56.42			0.15	0.15	\$ -	\$ -	\$ 8.46	\$ 8.46
CaCO ₃	\$ 7.55			2.5	2.5	\$ -	\$ -	\$ 18.87	\$ 18.87
Tiamina	\$ 61,184.70			0.0005	0.0005	\$ -	\$ -	\$ 30.59	\$ 30.59
Subtotal Medio de cultivo crecimiento						\$ -	\$ -	\$ 1,593.84	\$ 455.40
Subtotal Medios de cultivo						\$ 3,298.18	\$ 1,875.14	\$ 3,242.93	\$ 1,392.98
Servicios auxiliares									
Vapor	\$ 696.60					\$ 696.60	\$ 696.60	\$ 696.60	\$ 696.60
Electricidad	\$ 696.60					\$ 696.60	\$ 696.60	\$ 696.60	\$ 696.60
Subtotal Servicios auxiliares						\$ 1,393.20	\$ 1,393.20	\$ 1,393.20	\$ 1,393.20
TOTAL						\$4,691.38	\$ 3,268.34	\$4,636.13	\$2,786.18

Tabla 14 Comparación del costo estimado de la fermentación de *A. pullulans* con glucosa y almidón extraído de la cebada maltera de baja calidad. Base de cálculo 1000 litros.

Descripción	P.U. \$/Kg	Cantidad (Kg)				Costo (Pesos M.N.)			
		Lote		Semilote		Lote		Semilote	
		Glucosa	Almidón extraído	Glucosa	Almidón extraído	Glucosa	Almidón extraído	Glucosa	Almidón extraído
Cebada	\$ 1.05		125		162.5	\$ -	\$ 131.25	\$ -	\$ 170.63
Glucosa	\$ 60.32	50		65		\$ 3,016.00	\$ -	\$ 3,920.80	\$ -
Extracción de almidón									
Macerado									
NaOH	\$ 30.19		0.25		0.325	\$ -	\$ 7.55	\$ -	\$ 9.81
Hidrólisis									
HCl	\$ 17.88		2.5		3.25	\$ -	\$ 44.70	\$ -	\$ 58.11
Ajuste de pH									
NaOH	\$ 30.19		2.5		3.25	\$ -	\$ 75.47	\$ -	\$ 98.10
Subtotal Almidón						\$ 3,016.00	\$ 258.96	\$ 3,920.80	\$ 336.65
Medio de cultivo para crecimiento									
Almidón			50		25		\$ 258.96		\$ 129.48
Glucosa		50		25		\$ 3,016.00		\$ 1,508.00	
NH ₄ Cl	\$ 8.94	8.6	8.6	4.3	4.3	\$ 76.88	\$ 76.88	\$ 38.44	\$ 38.44
Extracto de levadura	\$ 284.45	5	5	2.5	2.5	\$ 1,422.23	\$ 1,422.23	\$ 711.11	\$ 711.11
MgSO ₄ ·7H ₂ O	\$ 6.15	0.2	0.2	0.1	0.1	\$ 1.23	\$ 1.23	\$ 0.62	\$ 0.62
KH ₂ PO ₄	\$ 56.42	0.3	0.3	0.15	0.15	\$ 16.93	\$ 16.93	\$ 8.46	\$ 8.46
CaCO ₃	\$ 7.55	5	5	2.5	2.5	\$ 37.73	\$ 37.73	\$ 18.87	\$ 18.87
Tiamina	\$ 61,184.70	0.001	0.001	0.0005	0.0005	\$ 61.18	\$ 61.18	\$ 30.59	\$ 30.59
Subtotal Medio de cultivo crecimiento						\$ 4,632.18	\$ 1,875.14	\$ 2,316.09	\$ 937.57

Medio de cultivo para producción									
Almidón					40				\$ 207.17
Glucosa				40				\$ 2,412.80	
NH ₄ Cl	\$ 8.94			0.6	0.6	\$ -	\$ -	\$ 5.36	\$ 5.36
Extracto de levadura	\$ 284.45			0.65	0.65	\$ -	\$ -	\$ 184.89	\$ 184.89
MgSO ₄ ·7H ₂ O	\$ 6.15			0.01	0.01	\$ -	\$ -	\$ 0.06	\$ 0.06
KH ₂ PO ₄	\$ 56.42			0.15	0.15	\$ -	\$ -	\$ 8.46	\$ 8.46
CaCO ₃	\$ 7.55			2.5	2.5	\$ -	\$ -	\$ 18.87	\$ 18.87
Tiamina	\$ 61,184.70			0.0005	0.0005	\$ -	\$ -	\$ 30.59	\$ 30.59
Subtotal Medio de cultivo crecimiento						\$ -	\$ -	\$ 2,661.04	\$ 455.40
Subtotal Medios de cultivo						\$ 4,632.18	\$ 1,875.14	\$ 4,977.13	\$ 1,392.98
Servicios auxiliares									
Vapor	\$ 696.60					\$ 696.60	\$ 696.60	\$ 696.60	\$ 696.60
Electricidad	\$ 696.60					\$ 696.60	\$ 696.60	\$ 696.60	\$ 696.60
Subtotal Servicios auxiliares						\$ 1,393.20	\$ 1,393.20	\$ 1,393.20	\$ 1,393.20
TOTAL						\$6,025.38	\$3,268.34	\$ 6,370.33	\$2,786.18

10. CONCLUSIONES.

Fue posible obtener un rendimiento de 31.8 % de la extracción de almidón de cebada maltera de baja calidad el rendimiento obtenido fue adecuado por considerarse una materia prima de desecho.

Se comprobó que la Cepa ATCC15233 crece a pH 5.5 en menor tiempo que a pH 6.7 tanto en medios comerciales como en el medio formulado con almidón extraído de cebada.

Se comprobó que *A. pullulans* crece tanto en placa como en medio líquido empleando como fuente de carbono almidón extraído de cebada obteniendo los mejores resultados en las relaciones C:N de 8 y 15.

Las concentraciones de ácido glucónico en las fermentaciones tanto a nivel matraz como a nivel reactor resultaron estar muy por debajo de las que están reportadas en la literatura inclusive a relaciones C:N altas por lo que no es factible producir ácido glucónico con la cepa *A. pullulans* ATCC 15233.

Las actividades las amilasas de *A. pullulans* ATCC15233 en cultivo por lote de 291 U/ml, son altas comparadas con la reportada en literatura para *A. pullulans* N-13d donde la máxima actividad obtenida es de 10 U/ml.

Las actividades de α -glucosidasas y β -glucosidasas de *A. pullulans* ATCC15233 determinadas en cultivos en lote son también elevadas a comparación de aquellas reportadas para *A. pullulans* NRRL Y12974A.

La actividad amilolítica en cultivo en lote con una relación C:N de 8 fueron superiores a comparación de las obtenidas en cultivo en semilote a relación C:N de 500.

Las actividades amilolíticas obtenidas con *A. pullulans* ATCC15233 demostraron la capacidad de hidrólisis en almidón gelatinizado, almidón sin gelatinizar, así como en almidón de cebada y de maíz comercial a diferentes concentraciones.

La cebada maltera de baja calidad del Estado de Hidalgo es un sustrato potencial de bajo costo que puede ser utilizado en la producción de bienes de mayor valor agregado como las enzimas amilolíticas.

11. PERSPECTIVAS

Cuantificar la cantidad de enzimas amilolíticas producidas tanto en cultivo por lote como en cultivo por lote alimentado.

Implementar un proceso de purificación de enzimas amilolíticas.

Evaluar la capacidad de *A. pullulans* como agente de control biológico.

12. BIBLIOGRAFIA

Agama A. E., Ottenhof M. A., Farhat A. I., Paredes L. O., Ortiz C. J., Bello P. L. A. (2005) Isolation and characterization of starch from pigmented maizes. *Agrociencia* 39:419-429.

Aguilar J, Schwentesius R (2004). La producción de la cebada en México-ventaja comparativa no catalizada.

Anastassiadis S, Aivasidis A, Wandrey C (2003) continuous gluconic acid production by isolated yeast-like mould strains of *Aureobasidium pullulans*. *Appl microbial Biotechnol*, 61:110-117.

Anastassiadis S., Aivasidis A. and Wandrey C. (2000). Process for the production of gluconic acid with a strain of *Aureobasidium pullulans* (de Bary).Arnaud. Us Patent 5692286.

Bently S. I. (1999) Enzymes, starch conversion. In: encyclopedia of Bioprocess Technology: fermentation, Biocatalysis and bioseparation (Eds) Flickinger C. M. and Drew W. S., pp 1104-1113.

Biliaderis, C.G. (1998), Structures and phase transitions of starch polymers. Polysaccharide Association Structures in Food (Walter, R.H., Ed.). Marcel Dekker, Nueva York. 57-168

Buleon A., Colonna P., Planchot V., Ball S. (1998) Starch granules: structure and biosynthesis. *International journal of biological macromolecules*. 23:85-112.

Carrera E. J. (2003) Production and application of industrial enzymes. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Vol 1.

Chi Z., Wang F., Chi Z., Yue L., Liu G., Zhang T. (2009) Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*. 82:793-804.

Couto R. S., Sanroman A. Ma. (2005) Application of solid-state fermentation to food industry. *Journal of food Engineering* 76:291-302.

Diaz A., Sieiro C., Villa G. T. (2003) Production and partial characterization of a β -amylase by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied microbiology* 36:203-207.

Eerlingen R.C. Delcour J A (1995) Formation, analysis, structure and properties of type III enzyme resistant starch. *Journal cereal* 21:1-8.

De Palma F. E. R., Gomes E., Da Silva R. (2002) Purification and Characterization of Two β -Glucosidases from the Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Folia microbial* 47:685-690.

Financiera rural (2009). Dirección general adjunta de planeación estratégica y análisis sectorial. Estado de México.

Freer N. S., Saha C. B., Bothast (1994) Production, Purification, and Properties of a Thermostable β -glucosidase from a Color Variant Strain of *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology* 60:3774-3780.

Gavrilescu M., Chisti Y. (2005) Biotechnology-a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol Adv*, 23:471-499.

González I. (2002) Inmovilización de bacterias proteolíticas y amilolíticas provenientes de aguas residuales y compost de café para el postratamiento de aguas residuales del beneficio húmedo del café. Tesis maestría, Dpto. Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá Colombia.

Goyal N., Gupta K. J., Soni K. S., (2005) A novel raw digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzymes and Microbial Technology* 37:723-734.

Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami K. V., Chauhan B. (2003) Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry* 38:1599-1616

Hornsey I. S. (2003) Elaboración de cerveza: microbiología, bioquímica y tecnología. Ed Acirbia S.A. Zaragoza, España.

Karkalas, Morrison R. W., (1990) Starch lipids and how they relate to starch, *Methods in Plant Biochemistry*. In: P. M. Dey (Ed) Academic Press, Vol 2, London, pp 323-352

Li B., Zhang N., Peng Q., Yin T. (2009) production of pigment-free pullulans by swollen cell in *Aureobasidium pullulans* NG which cell differentiation was affected by pH and nutrition. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:293-300.

Li H., Chi Z., Duan X., Wang L., Sheng J., Wu L. (2007) Glucoamylase production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and hydrolysis of potato starch granules by the enzyme. *Process Biochemistry* 42:462-465.

Lo C. A., Barbier J. R., Willick E. G. (1990) Kinetic and specificities of two closely related β -glucosidases secreted by *Schizophyllum commune*. Journal Biochemistry 192:173-181.

Mounir R., Durieux A., Bodo E., Allard C., Simon P. J., Achbani H. E., El-Jaafari S., Douira A., Jijakli H. M. (2007) Production, formulation and antagonistic activity of the biocontrol like-yeast *Aureobasidium pullulans* against *Penicillium expansum*. Biotechnol 29:553-559.

Morrison R. W. (1995) starch lipids and how they relate to starch granules structure and functionally. Cereal foods world 40:437-446

Navarro M. A., Sosa D. P. (2003) Obtención de etanol a partir de almidón de papa proveniente del sector agrícola. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana, Dpto. de microbiología, Bogotá Colombia.

Pedroza A. (1999) Producción de amilasas termoestables a partir de *Thermus* sp. Tesis de maestría, Dpto. de microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá Colombia.

Prieto M. J. M., Rubio H. U., Román G. A. D., Méndez M., González R. C. A., Prieto G. F. (2009) Degradation of barley starch (*Hordeum sativus* L.) correlation between the gelatinization and size of grains. Multiciencias 9:115-125.

Ribeiro L. S. R., Gomes E., Da Silva R. (2007) Characterization and comparison of thermostability of purified β -glucosidases from a mesophilic *Aureobasidium pullulans* and a thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. Process Biochemistry 42:1101-1106

Saha C. B., Silman W. R., Bothast J. R. (1993) Amylolytic Enzymes produced by a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. Current Microbiology 26:267-273.

SAGARPA, 2004. Subdelegación de planeación y desarrollo rural. Estado de México; claridades agropecuarias.

Silva M. T., Angelis D. A., Carvalho A. A. F., Da Silva R., Boscolo M., Gomes E. (2005) Production of Saccharogenic and Dextrinogenic Amylase by *Rhizomucor pusillus* A 13.36. Journal of Microbiology, 43:561-568.

Tang H., Watanabe K., Mitsunaga T. (2002) Structure and functionality of large, medium and small granule starches in normal and waxy barley endosperms. Carbohydrate Polymers 49:217-224.

Thomas D. J., Atwell A. W. (1997) Starches. Eagan Press, St Paul, U.S.A.

Schwentenius R, Aguilar J, Gomez M (2004). ¿El campo, aguanta más? 2ª edición. CIESTAM y LaJornada, México, pp. 265.

Wang and Wang (2001). Rice starch isolation by neutral protease and high-intensity ultrasound. *Journal of Cereal Science* 39: 291–296.

Whistler RL. Daniel JR. (1984) Molecular structure of starch. In:RL Whistler, JN Bemiller, EF Paschall, eds, *starch: Chemistry and Technology*, ed 2. Academic Press, New York pp 153-182