



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

**TESIS**

**“OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE LEVADURAS POR DIFERENTES  
MÉTODOS Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE”**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACOBIOLOGA**

**PRESENTA:**

**BELEM VARGAS OCHOA**

**ASESOR: DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS ALFREDO SAAVEDRA  
MOLINA**

**COASESOR: MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL  
JORGE ARTURO MEJÍA BARAJAS**

**MORELIA, MICH. JUNIO 2015**

## DEDICATORIA

*A mi papá, J. Trinidad Vargas Lázaro, que gracias a su esfuerzo y trabajo incesante, me brindó los medios para lograr obtener una formación profesional y sobretodo porque ha inspirado en mí grandes anhelos y con su ejemplo me ha guiado siempre.*

*A mi mamá, María Luisa Ochoa Soriano por su esfuerzo, cariño, atención y apoyo incondicional, que me han dado fortaleza para superar diversos retos.*

*A mis hermanos Guillermo, Iván, Gustavo y Adrián que gracias a su trabajo, paciencia y tenacidad, me han apoyado durante todos los años de estudio. Pero sobre todo, por su cariño y ejemplo.*

*A Kevin B. Ruíz Guzmán por su compañía, apoyo, cariño y las vivencias que me hicieron crecer como persona.*

*A mis compañeros de estudio, ahora colegas, por su apoyo, por hacer muy amena mi etapa de estudiante y por su valiosa amistad.*

## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular a la Facultad de Químico Farmacobiología, por mi formación académica.*

*A la universidad de Colima en específico la Facultad de Ciencias Químicas y a todos mis maestros, por ser parte de mi formación académica, por ser ejemplares e inculcarme metas y aspiraciones profesionales.*

*Al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, particularmente el Laboratorio de Bioquímica, incluidos todos los investigadores que de él forman parte, muy especialmente al Dr. Alfredo Saavedra Molina por su asesoría, su apoyo y por permitirme desarrollar este proyecto.*

*A Jorge Arturo Mejía Barajas por su asesoría, enseñanzas, paciencia y apoyo.*

*A mis papás y hermanos, por ser mis pilares.*

## ÍNDICE GENERAL

Índice general.....	I
Índice de figuras .....	III
Índice de tablas .....	III
Índice de gráficas.....	III
<b>1. Resumen</b> .....	1
<b>2. Abstract</b> .....	2
<b>3. Introducción</b> .....	3
3.1. Industria de alimentos .....	3
3.2. Deterioro de alimentos .....	4
3.3 Lipoperoxidación.....	5
3.4 Conservación de alimentos.....	6
3.5 Conservación de alimentos mediante la adición de antioxidantes .....	7
3.6 Levaduras .....	12
3.6.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	13
3.6.2 <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	14
3.7 Extractos de levadura con capacidad antioxidante .....	14
3.8 Métodos de obtención de extractos .....	15
3.9 Capacidad antioxidante de extractos de levadura de acuerdo a la cepa de levadura .....	17
3.10 Capacidad antioxidante de extractos de levadura de acuerdo al contenido de glutatión.....	18
3.11 Pruebas para la evaluación de la actividad antioxidante .....	19
<b>4. Justificación</b> .....	22
<b>5. Hipótesis</b> .....	22
<b>6. Objetivos</b> .....	22
<b>7. Materiales y métodos</b> .....	23

7.1 Levaduras .....	23
7.2 Reactivos y solventes .....	23
7.3 Cultivo de levaduras .....	24
7.4 Obtención de extractos de levaduras .....	24
7.4.1 Autólisis .....	24
7.4.2 Autólisis (con ajuste de pH) .....	24
7.4.3 Plasmólisis .....	24
7.5 Métodos de evaluación de capacidad antioxidante <i>in vitro</i> .....	25
7.5.1 Reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) .....	25
7.5.2 Reducción de peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	25
7.5.3 Poder reductor .....	26
7.5.4 Capacidad antioxidante total .....	26
7.5.5 Antilipoperoxidación .....	27
7.6 Cuantificación de glutatión reducido (GSH) .....	27
7.7 Equipos .....	27
7.8 Análisis estadístico .....	27
<b>8. Resultados</b> .....	<b>28</b>
<b>9. Discusión</b> .....	<b>34</b>
<b>10. Conclusión</b> .....	<b>39</b>
<b>11. Bibliografía</b> .....	<b>39</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de antioxidantes naturales.....	9
Figura 2. Estructura química de antioxidantes sintéticos.....	10
Figura 3. Reducción del radical libre DPPH· de extractos de okara fermentada con diferentes levaduras.....	17
Figura 4. Poder reductor de extractos de okara fermentada con diferentes levaduras.....	18
Figura 5. Reducción del radical libre DPPH·.....	20
Figura 6. Reacción de TBARS.....	21
Figura 7. Determinación de glutatión reducido (GSH).....	22

## ÍNDICE DE TRABLAS

Tabla 1. Componentes porcentuales de las levaduras.....	13
---	----

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Determinación del rendimiento en la obtención de extractos de levaduras <i>S. cerevisiae</i> W303 y MC4 y <i>K. marxianus</i> OFF1 y SLP1 obtenidos por los métodos de autólisis, autólisis con ajuste de pH y plasmólisis.....	28
Gráfica 2. Ensayo de reducción del radical DPPH· por levaduras <i>S. cerevisiae</i> W303 y MC4 y <i>K. marxianus</i> OFF1 y SLP1 obtenidos por los métodos de autólisis, autólisis con ajuste de pH y plasmólisis.....	29
Gráfica 3. Reducción de peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) por levaduras <i>S. cerevisiae</i> W303 y MC4 y <i>K. marxianus</i> OFF1 y SLP1 obtenidos por los métodos de autólisis, autólisis con ajuste de pH y plasmólisis.....	30
Gráfica 4. Determinación de poder reductor por levaduras <i>S. cerevisiae</i> W303 y MC4 y <i>K. marxianus</i> OFF1 y SLP1 obtenidos por los métodos de autólisis, autólisis con ajuste de pH y plasmólisis.....	31
Gráfica 5. Capacidad antioxidante total por extractos de levaduras <i>S. cerevisiae</i> W303 y MC4 y <i>K. marxianus</i> OFF1 y SLP1 obtenidos por los métodos de autólisis, autólisis con ajuste de pH y plasmólisis.....	32

Gráfica 6. Determinación de porcentaje (%) de índice antioxidante a partir de la prueba de antilipoperoxidación por extractos de levaduras *S. cerevisiae* W303 y MC4 y *K. marxianus* OFF1 y SLP1 obtenidos por los métodos de autólisis, autólisis con ajuste de pH y plasmólisis.....33

Gráfica 7. Determinación de glutatión reducido (GSH) en extractos de levaduras *S. cerevisiae* W303 y MC4 y *K. marxianus* OFF1 y SLP1 obtenidos por los métodos de autólisis, autólisis con ajuste de pH y plasmólisis.....34



## 1. RESUMEN

Los antioxidantes son sustancias que retrasan o previenen la oxidación de sustratos celulares oxidables. Son utilizados en la industria alimentaria como una clase de aditivos. La peroxidación lipídica, es una de las mayores causas del deterioro de los alimentos y tiene como consecuencias, alteraciones en el aroma, sabor (enranciamiento), color, pérdida de nutrientes y genera sustancias potencialmente tóxicas. Los antioxidantes sintéticos son usados por la industria alimentaria para prevenir o retrasar la peroxidación de lípidos presentes en los alimentos. Sin embargo, sus aplicaciones han sido limitadas debido a su posible toxicidad y componentes carcinogénicos producidos durante su degradación. Por lo anterior, en los años recientes se ha desarrollado el interés en encontrar antioxidantes más saludables, económicos, efectivos y naturales, que puedan por un lado, proteger el organismo del estrés oxidativo y con ello, retrasar el progreso de muchas enfermedades crónicas, y además, ser útiles en la industria alimentaria como aditivos, para preservar la calidad de los alimentos sin aportar riesgos para la salud. Debido a que los usos de las levaduras, como la producción de bebidas fermentadas o la elaboración de pan, son comúnmente conocidos entre las personas, estos microorganismos conservan una imagen positiva ante los consumidores, lo que ocasiona que sean consideradas como una fuente segura de ingredientes y aditivos para el procesamiento de los alimentos. Sus constituyentes son considerados como compuestos de valor nutricional para humanos y animales superiores, además, las levaduras sintetizan compuestos bioactivos que pueden servir como antioxidantes, entre ellos el glutatión. El extracto de levadura consta de los componentes hidrosolubles de la célula de levadura y para su obtención, los métodos más comunes y sencillos son la autólisis y plasmólisis. Con los antecedentes mencionados, en el presente trabajo se obtuvieron 12 extractos de 4 cepas de levaduras mediante tres métodos diferentes, en donde el método de autólisis presentó el mayor rendimiento. En tres de las cinco pruebas utilizadas para determinar la capacidad antioxidante *in vitro*, al menos un extracto de la levadura SLP1 presentó una mayor actividad, con respecto a los extractos obtenidos de las otras levaduras. Los extractos obtenidos por el método 3 (plasmólisis), tienden a tener mayor actividad antioxidante *in vitro*.

Palabras clave: extracto de levadura, capacidad antioxidante, lipoperoxidación.





## 2. ABSTRACT

Antioxidants are substances that delay or prevent the oxidation of cellular oxidizable substrates. They are used in the food industry as additives. Lipid peroxidation is one of the most important cause of food spoilage, it has consequences like off-flavours and odours (rancidity), lost of colour and nutrients and the development of toxic compounds. Synthetic antioxidants are usually used as food additives by the food industry to prevent or delay lipid peroxidation of fatty foods. However, their application has been limited because of possible toxic and carcinogenic components formed during their degradation. In view of these health concerns, in recent years, there has been an increasing interest in finding safer, more effective, economic and natural antioxidants, that can on the one hand, protect the human body from free radicals and retard the progress of many chronic diseases and, on the other hand, be useful in the food industry as food additives, to protect the food's quality without health risks. Most individuals have a positive image of yeasts because of their well-known association with the production of bread and fermented beverages. For that reason consumers considered yeasts as safe source of ingredients and additives for food processing. Yeast constituents are considered as compounds of nutritional value to human and higher animals, furthermore, yeast synthesize bioactive compounds that can serve as antioxidants, for example glutathione. Yeast extracts are concentrates of the soluble components of yeast cells and are generally produced by autolysis and plasmolysis. According to that background, in this work there were obtained 12 yeast extracts of 4 yeast strains, through three different methods. Yeast extracts obtained by autolysis showed the highest yield. In three of the five antioxidant activity assays, at least one SLP1 yeast extract showed higher antioxidative activity than the other obtained extracts. The extracts obtained by method 3 (plasmolysis) tend to have higher "in vitro" antioxidant activity than the ones obtained by autolysis.

Key words: yeast extract, antioxidant activity, lipid peroxidation.





### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Industria de alimentos

En la actualidad, el sistema de producción-consumo de alimentos es complejo y los alimentos son en gran medida seguros, succulentos, nutritivos, diversos, convenientes, menos costosos y más fácilmente accesibles que hace algunos años. Este vasto sistema incluye la producción agrícola y la cosecha, el almacenamiento de materias primas, la fabricación de alimentos (formulación, procesamiento y empaquetado), su transporte y distribución, la venta y preparación de alimentos en el hogar. La ciencia y la tecnología de alimentos contribuyen en gran medida al éxito de este moderno sistema de alimentos con la interacción de disciplinas como química, biología, nutrición, toxicología, biotecnología, genómica, sistemas computacionales, y otras disciplinas, para resolver problemas difíciles como deficiencias nutricionales y el incremento de la inocuidad de los alimentos. El impacto de los métodos modernos del sistema de manufactura es evidente en el suministro de alimentos. La calidad puede mantenerse o incluso perfeccionarse y la inocuidad de alimentos puede mejorarse. Nutrientes sensibles pueden ser preservados, vitaminas y minerales pueden ser añadidos, las toxinas pueden ser removidas y los alimentos pueden ser diseñados para optimizar la salud y reducir los riesgos de enfermedades (Flores *et al.*, 2010).

Los objetivos de la industria de alimentos son:

- Extender el periodo durante el cual el alimento permanece estable (vida útil) mediante técnicas de preservación que inhiban cambios microbiológicos o bioquímicos y así brinden tiempo suficiente para su distribución, venta y almacenamiento en casa.
- Incrementar la variedad en la dieta proporcionando un amplio rango de sabores, colores, aromas y texturas.
- Tecnificar el procesamiento de alimentos.
- Proveer nutrientes requeridos para una buena salud.
- Generar ingresos para las compañías manufactureras y sus accionistas.





Estos objetivos existen en mayor o menor medida en todos los procesamientos de alimentos, sin embargo, ciertos productos pueden enfatizar alguno de estos objetivos. Todos los alimentos procesados involucran una combinación de procedimientos para conseguir cambios intencionales en materias primas. Cada uno de los procesos tiene un efecto específico, identificable y previsto en el alimento, de esta forma la naturaleza del producto final está determinada por la combinación y la secuencia de dichas operaciones (Fellows, 2009).

### **3.2 Deterioro de alimentos**

Los mayores atributos de la calidad de los alimentos son la textura, el sabor, el color, la apariencia y el valor nutricional. Tales atributos pueden experimentar cambios indeseables durante su procesamiento y almacenamiento (Gordon, 1946). Los alimentos pueden deteriorarse en general por factores físicos, químicos y biológicos. Los compuestos orgánicos e inorgánicos altamente susceptibles a la oxidación que componen los alimentos, el balance entre estos compuestos, así como las estructuras y dispersiones únicas que contribuyen a la textura y consistencia de los productos procesados y sin procesar, son afectados por casi cada variable en el ambiente. Algunos de los factores que afectan de forma adversa a los alimentos son la temperatura, radiaciones, oxígeno, humedad, desecación, enzimas propias de los alimentos, microorganismos, insectos y roedores, contaminantes industriales y el tiempo. Esta gama de factores potencialmente destructivos y la amplia diversidad de alimentos naturales y procesados, es la razón por la cual los métodos de conservación encuentran aplicación en la tecnología moderna de los alimentos (Potter y Hotchkiss, 1998).

La oxidación de lípidos (lipoperoxidación) es uno de los mayores cambios químicos que ocurren durante el procesamiento, almacenamiento, distribución y preparación final de los alimentos y da lugar a un deterioro en su calidad. Todos los alimentos que contienen lípidos, incluso en niveles bajos (<1%), son susceptibles de oxidación. Los productos de la oxidación lipídica son ubicuos en los alimentos, a pesar de que existe una variación en el tipo y niveles de estos productos y aunque dichos niveles son generalmente bajos, el problema de la oxidación de lípidos compromete la calidad de los alimentos y limita su vida útil. Cambios deletéreos en alimentos causados por la oxidación lipídica incluyen no

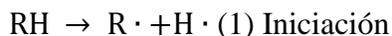




solo pérdida de buen sabor o desarrollo de olores desagradables, sino además, pérdida de color, valor nutricional y la acumulación de compuestos que pueden ser perjudiciales para la salud de los consumidores (Wasowicz *et al.*, 2004). Las reacciones oxidativas pueden disminuir la calidad nutricional de los alimentos, debido a la degradación de vitaminas liposolubles y ácidos grasos esenciales (Lima y Abdalla, 2001; Ramalho y Neuza, 2006). La pérdida del buen sabor es debido a la generación de compuestos de sabor desagradable, que se obtienen principalmente del rompimiento de los ácidos grasos insaturados durante la autooxidación (Nawar y Fennema, 1985). Además, durante la formación y descomposición de los hidroperóxidos, se generan una serie de compuestos oxidados como cetonas, aldehídos, alcanos y alquenos de bajo peso molecular y de alta volatilidad, que determinan el valor sensorial del alimento. Este fenómeno se denomina rancidez (Rodríguez *et al.*, 2007).

### 3.3 Lipoperoxidación

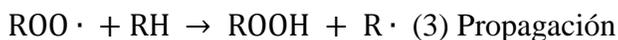
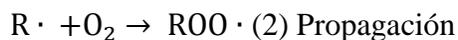
La lipoperoxidación es una reacción espontánea del oxígeno molecular con los lípidos, que provoca un deterioro oxidativo. Se desarrolla mediante un mecanismo en cadena por radicales libres involucrando tres etapas (Gordon, 2001). La peroxidación es iniciada por el ataque de cualquier especie química, con suficiente reactividad para abstraer un átomo de hidrógeno de un grupo metileno, presente en la cadena lateral de los ácidos grasos. Entre mayor sea el número de dobles enlaces, más fácil será remover un átomo de hidrógeno, por lo cual, los ácidos grasos poliinsaturados son particularmente susceptibles de la peroxidación (Halliwell, 1993). En la etapa de iniciación (1) el radical lipídico  $R\cdot$ , se forma a partir del lípido (RH), un ácido graso insaturado, usualmente por el ataque de radicales libres o por trazas de metales.



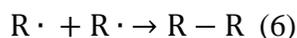
El radical lipídico ( $R\cdot$ ) formado se reorganiza molecularmente para incrementar su estabilidad y reacciona rápidamente con oxígeno (2) para dar un radical peroxilo ( $ROO\cdot$ ), el cual ataca a otra molécula de lípido (RH) y sustrae un átomo de hidrógeno para formar un hidroperóxido lipídico ( $ROOH$ ) y un nuevo radical lipídico, que inicia de nuevo la



secuencia de propagación (3). Esta cadena de reacción se va prolongando por el paso continuo de un electrón desapareado de una molécula a otra.



De esta manera, gran cantidad de moléculas de lípidos pueden ser oxidadas hasta hidroperóxidos por muchas reacciones de iniciación. El ciclo de propagación es interrumpido por las reacciones de terminación (4-6), en las cuales hay consumo de los radicales (Rodríguez *et al.*, 2007).



La reacción en cadena finalizará cuando se cumpla alguna de las siguientes condiciones, se consume una de las moléculas reactivas, es decir, los ácidos grasos o el oxígeno, se forma un radical relativamente poco reactivo o dos radicales al reaccionar forman un par no radical. Entre los productos formados durante la peroxidación lipídica se incluyen, entre otros, el 4-hidroxi-2-alquenal, el 4-hidroxinonenal (4-HNE) y el malondialdehído (MDA) (Spiteller, 2001).

### 3.4 Conservación de alimentos

Durante la Cumbre Mundial de Seguridad Alimentaria en el 2009, expertos reconocieron que para el 2050 la producción de alimentos debería incrementarse de un 34-70% más de la producción actual, lo anterior con el objetivo de alimentar una población prevista de 9 billones de personas (FAO, 2009). Se estima que aproximadamente la mitad de la producción agrícola de alimentos, en países desarrollados y subdesarrollados, se desperdician como consecuencia de métodos deficientes de manejo, procesamiento, almacenamiento y distribución. Por lo anterior, el avance científico enfocado en la producción agrícola, ciencia, tecnología y sistemas de distribución de alimentos, es de vital importancia para reducir dichas pérdidas. Para proveer de suficientes alimentos a dicha





población, es necesario incrementar significativamente la producción agrícola de los niveles actuales y hacer más eficiente el sistema de manufactura de alimentos, mediante la reducción en el uso de energía, el descenso en la producción de residuos y la producción de alimentos con vida útil prolongada (Floros, 2010). Por consiguiente, la conservación de los alimentos representa un tema de importancia vital que justifica una labor activa de estudio tanto de los procedimientos tradicionales de conservación como de nuevas técnicas.

El concepto general de la preservación de los alimentos es prevenir o evitar el desarrollo de microorganismos (bacterias, levaduras y mohos), para que el alimento no se deteriore durante el almacenaje. Al mismo tiempo, se deben controlar los cambios químicos y bioquímicos que provocan deterioro. De esta manera, se logra obtener un alimento sin alteraciones en sus características típicas (color, sabor y aroma), y puede ser consumido sin riesgo durante un cierto período. La preservación de alimentos se define como el conjunto de tratamientos que prolonga la vida útil de aquéllos, manteniendo, en el mayor grado posible, sus atributos de calidad, incluyendo color, textura, sabor y especialmente valor nutritivo. Esta definición involucra una amplia escala de tiempos de conservación, desde períodos cortos, dados por métodos domésticos, hasta períodos muy prolongados, dados por procesos industriales estrictamente controlados. Los procesos, técnicas y métodos de conservación de alimentos son muy variados; la adición de sustancias es uno de esos métodos (FAO, 2009).

### **3.5 Conservación de alimentos mediante la adición de antioxidantes**

Los antioxidantes se definen como sustancias que prolongan la vida de almacén de los productos, protegiéndolos del deterioro ocasionado por la oxidación (COFEPRIS, 2012). La utilización de antioxidantes es uno de los procedimientos más eficaces en la prevención de la oxidación de los alimentos grasos y por ende de su conservación. Se trata de sustancias que son capaces de inhibir o retardar el desarrollo de la oxidación; actúan impidiendo que ésta se inicie o se propague. Estas sustancias se pueden encontrar como constituyentes naturales de los alimentos, pero además, pueden ser añadidos intencionalmente o ser formados durante el procesamiento. El objetivo principal de adicionar antioxidantes, no es incrementar o mejorar la calidad de los alimentos, sino mantener la calidad propia y extender la vida útil (Giese, 1996). Sin embargo, los





antioxidantes no sólo contribuyen a aumentar la vida útil del alimento, sin ocasionar un deterioro nutritivo o sensorial, sino que además, reducen pérdidas nutricionales, amplían el rango de usos de los lípidos en diferentes productos y su empleo en combinación con otros métodos de preservación reduce los costos de conservación (Medina, 2010). Es deseable que los antioxidantes para uso en alimentos sean baratos, no tóxicos, efectivos a bajas concentraciones, estables y capaces de mantener su actividad después de someter los alimentos a diversos procesos (Giese, 1996). Los antioxidantes pueden clasificarse en naturales, artificiales y antioxidantes sinérgicos.

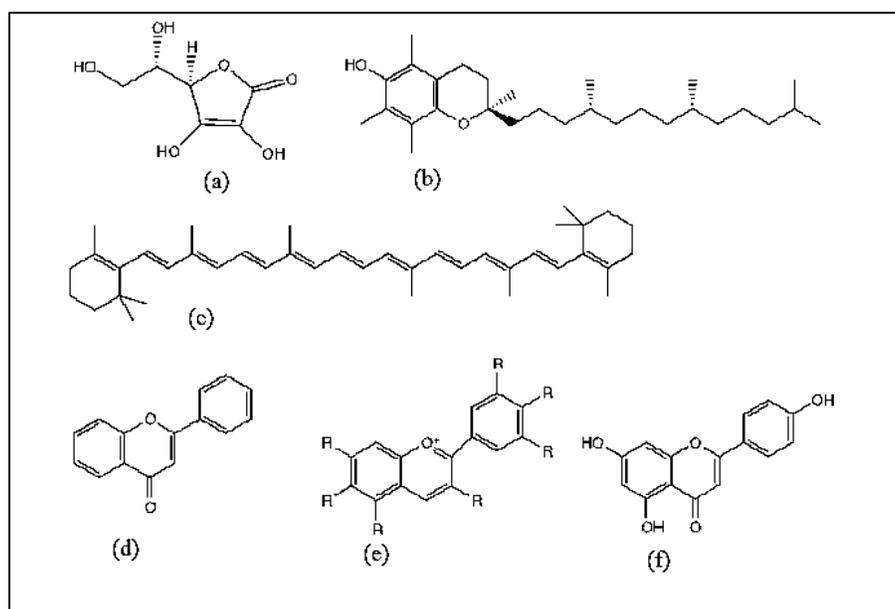
#### Antioxidantes naturales

Son aquellos que se encuentran en fuentes naturales como frutas o vegetales. Algunos antioxidantes naturales encontrados comúnmente en los alimentos son la vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferoles), vitamina A (carotenoides), distintos polifenoles incluidos flavonoides, antocianinas, licopeno (un tipo de carotenoide) y coenzima Q<sub>10</sub> (conocida como ubiquinol). La estructura química de estos compuestos se observa en la figura 1 (Shivkumar *et al.*, 2011). El ácido ascórbico y los tocoferoles son los antioxidantes naturales más importantes comercialmente. Otras fuentes de antioxidantes naturales son aminoácidos, proteínas e hidrolizados de proteínas, productos de la reacción de Maillard, fosfolípidos y esteroides. El procesamiento de los alimentos puede inducir la formación de antioxidantes. Los antioxidantes naturales permiten la producción de alimentos estables con niveles inocuos que se promueven como ingredientes naturales (Giese, 1996).

Numerosas aminos, aminoácidos, péptidos e hidrolizados de proteínas poseen actividad antioxidante. Los aminoácidos tienen capacidad quelante, y también poseen actividad antioxidante cuando son usados por sí solos. La glicina, la metionina, la histidina, el triptófano, la prolina y la lisina son efectivos antioxidantes en aceite (Rajalakshmi y Narasimhan, 1996). Péptidos que contienen histidina como carnosina (Kansci *et al.*, 1994), péptidos sintéticos (Chen *et al.*, 1996), así como péptidos obtenidos de la hidrólisis de proteínas (Chen *et al.*, 1995; Shahidi *et al.*, 1996), poseen también actividad antioxidante.



Los productos de la reacción de Maillard (PRM) son un ejemplo de antioxidantes naturales. Son producidos por la reacción de azúcares reductores y aminoácidos, péptidos o proteínas. La reacción de Maillard (RM) se lleva a cabo en tres etapas generales. Los compuestos producidos durante la etapa final son principalmente compuestos poliméricos de color café llamados melanoidinas (Wagner *et al.*, 2002), las cuales contribuyen fuertemente al aroma, al sabor, al color así como al potencial antioxidante de los alimentos

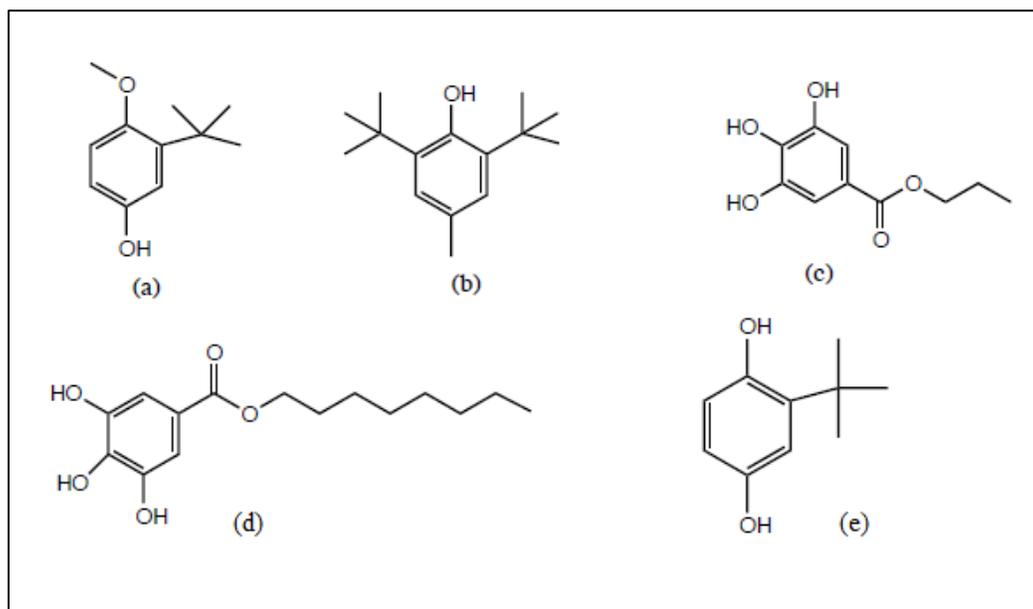


**Figura 1.** Estructura química de antioxidantes naturales: (a) ácido ascórbico, (b) vitamina E, (c) beta-caroteno, (d) flavonoide, (e) antocianina y (f) polifenol (Shivkumar *et al.*, 2011).

almacenados y procesados (Manzocco *et al.*, 2011). El desarrollo de moléculas antioxidantes es uno de los efectos deseados de la RM, por lo cual las propiedades antioxidantes de los PRM se han estudiado en sistemas modelo (Jaythilakann y Sharma, 2006; Phisut y Jiraporn, 2013). Los PRM son considerados como seguros, debido a que aparecen de manera natural como productos en alimentos después de la cocción a temperaturas superiores a 80°C. El efecto antioxidante de los PRM se debe a la habilidad que tienen estas fracciones de quelar metales y reducir compuestos carbonílicos (Borelli *et al.*, 2002). El efecto inhibitorio de las melanoidinas en la autoxidación es más fuerte que el del butilhidroxianisol (BHA) o el galato de propilo, (antioxidantes comerciales) (Sommer, 1996).

## Antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes sintéticos son sintetizados químicamente puesto que no se encuentran en la naturaleza (Shahidi *et al.*, 1992). Son adicionados intencionalmente a los alimentos como conservadores para inhibir la oxidación de lípidos. Algunos antioxidantes sintéticos aprobados para el uso en alimentos son el BHA, el butilhidroxitolueno (BHT), el galato de propilo (GP), de octilo (GO) y de dodecilo (GD), el etoxiquin, el palmitato de ascorbilo y la terbutilhidroquinona (TBHQ) (Figura 2). Aunque el empleo de antioxidantes alimentarios sintéticos está permitido, las normativas internacionales tienden a restringir su empleo (Medina, 2010). Los antioxidantes de mayor uso en la industria de alimentos son los compuestos sintéticos BHA y BHT, sin embargo, se ha demostrado que estos compuestos presentan efectos secundarios como el aumento del colesterol, hepatomegalia e inducción de cáncer en células de ratas (Lindenschmidt *et al.*, 1986; Bush y Taylor, 1998). Debido a estas restricciones, así como la creciente preferencia de los consumidores por aditivos naturales e inocuos para la salud, la industria se ha enfocado en materias naturales como fuente de antioxidantes (Mathew, 2006; Manzoor *et al.*, 2014).



**Figura 2.** Estructura química de antioxidantes sintéticos: (a) BHA, (b) BHT, (c) GP, (d) GO y (e) TBHQ (Shivkumar *et al.*, 2011).



## Sinérgicos de antioxidantes

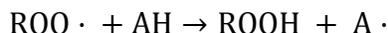
Se ha demostrado que existen antioxidantes que al combinarlos con otro antioxidante, o con un compuesto que por sí sólo no tiene efecto antioxidante, aumentan su capacidad produciendo un efecto mayor que el que pueden causar solos. De esta forma, es posible disminuir la dosis de antioxidante (Kuklinski, 2003). Considerando la complejidad de los alimentos en los cuales se llevan a cabo las reacciones de oxidación, se podría suponer que un solo mecanismo antioxidante no proveería el efecto esperado de protección del alimento contra cambios indeseables de oxidación. Ningún antioxidante es capaz de controlar todos los factores que influyen en la estabilidad oxidativa del alimento. Basados en los sistemas biológicos de defensa antioxidante se observó que estos están constituidos por diversos componentes de características físicas y químicas variadas, los cuales pueden realizar más efectivamente su protección antioxidante mediante cooperación. Por lo tanto, los antioxidantes en alimentos deberían aplicarse como sistemas, conteniendo componentes que actúen mediante mecanismos diferentes, por ejemplo, inhibiendo diferentes prooxidantes (quelantes de iones metálicos, captadores de radicales libres o especies reactivas del oxígeno, compuestos que desactiven las enzimas); activos en varias regiones del sistema (fase acuosa, interface, fase lipídica), porque de esta forma, serían capaces de probar el efecto sinérgico (Zhang y Omaye, 2000). La hipótesis más común del mecanismo de las reacciones de sinergismo entre antioxidantes, es que estos producen la regeneración de antioxidantes primarios a través de la transferencia de hidrógeno de la molécula sinérgica, reduciendo la iniciación de la oxidación causada por complejos de iones metálicos, captación de oxígeno singulete, reducción de peróxidos lipídicos a productos no radicalarios estables (por ejemplo alcoholes), mejorando la estabilidad de antioxidantes primarios mediante la acidificación del medio u operando en diferentes ubicaciones donde la oxidación se lleva a cabo (fase acuosa, interface, fase lipídica)(Schwarz *et al.*, 2000). Ejemplos de sinérgicos de antioxidantes son: ácidos grasos y sus sales, el ácido láctico o el ácido cítrico y secuestradores de metales (Kuklinski, 2003).

De acuerdo al mecanismo de acción los antioxidantes se pueden clasificar en dos grupos:

### Antioxidantes primarios



Son aceptores de radicales libres. Actúan como donadores de hidrógeno y son capaces de atrapar radicales lipídicos formados durante la lipoperoxidación:



Los radicales antioxidantes formados son estables debido a la deslocalización del electrón desapareado alrededor del anillo fenólico, por lo que no pueden reaccionar fácilmente con ácidos grasos. Son capaces de terminar el mecanismo en cadena por radicales reaccionando con estos últimos (Reische *et al.*, 2002).



Los antioxidantes primarios más importantes son tocoferoles, el BHT, el BHA y el GP.

Antioxidantes secundarios

Contrario a los antioxidantes primarios, no interrumpen el mecanismo en cadena por radicales sino que actúan mediante distintos mecanismos: como reductores y quelantes de metales (ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido etilendiaminotetraacético); como agentes reductores (ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, sulfitos); como inhibidores de oxígeno singulete (carotenoides); y sustancias capaces de regenerar antioxidantes primarios (ácido ascórbico) (Reische *et al.*, 2002).

### 3.6 Levaduras

En la industria alimentaria las levaduras son los microorganismos más ampliamente utilizados (Walker, 1999). Se utilizan en procesos como las fermentaciones de cerveza, vino, sake, sidra, productos de panadería, quesos, embutidos y otros alimentos fermentados. Dichos usos son comúnmente conocidos entre las personas, por lo cual estos microorganismos conservan una imagen positiva ante los consumidores, lo que da lugar a que las levaduras sean consideradas como una fuente segura de ingredientes y aditivos para el procesamiento de los alimentos (Demain *et al.*, 1998). De acuerdo con Stam *et al.* (1998), aproximadamente del 15 al 20% de la producción industrial de estos microorganismos a nivel mundial, es utilizada para la producción de ingredientes y aditivos alimentarios. Además, las levaduras sintetizan compuestos bioactivos que pueden servir como





antioxidantes. A estos compuestos se les ha encontrado numerosos usos en alimentos para retardar la oxidación de grasas y en suplementos nutracéuticos para mejorar la salud y el bienestar (Gazi *et al.*, 2001; Bastin *et al.*, 2002; Doll, 2002; Ok *et al.*, 2003). Las levaduras son benéficas para la salud humana, presentan el grado GRAS (Generalmente reconocidas como seguras), son usadas como fuente económica de nitrógeno y contienen abundantes proteínas, lípidos, RNA, vitaminas y minerales (Walker, 1998; In *et al.*, 2005).

Las levaduras contienen un 75% de agua y un 25 % de materia seca aproximadamente. La composición de la materia seca se presenta en la tabla 1.

Componentes de las levaduras	Porcentaje (%)
Cenizas	7
Carbohidratos	43
Proteínas	48
Grasa	2

**Tabla 1.** Componentes porcentuales de las levaduras (Fajardo *et al.*, 2008)

Las sustancias minerales de las levaduras representan por lo general de un 5 a 9% en peso seco. Los componentes principales son alrededor del 50% de ácido fosfórico y 30% de potasio. Las sustancias nitrogenadas de la levadura representan unas dos terceras partes de su peso seco (30-75%), contienen entre un 5 y 12% de nitrógeno. Estas sustancias se reparten en un 64% de proteína, 10% de peptonas y aminoácidos, 8% de amonio, 10% de purina y el resto consiste en pirimidinas y vitaminas. El contenido normal de aminoácidos depende de la alimentación, de la cantidad de oxígeno, de la temperatura y el cultivo (Fajardo *et al.*, 2008).

### 3.6.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Industrialmente, *Saccharomyces cerevisiae* es utilizada como fuente de enzimas (por ejemplo invertasa), como extracto de levadura autolisado, elaboración de productos de panadería, producción de bebidas fermentadas y como fuente de proteína, vacunas, ácidos grasos y aceites (Fajardo *et al.*, 2008).





### 3.6.2 *Kluyveromyces marxianus*

Diferentes aplicaciones biotecnológicas se han investigado con la levadura *Kluyveromyces marxianus*: producción de enzimas ( $\beta$ -galactosidasa, inulinasa y poli galactourinasas, entre otras), proteína unicelular, compuestos aromáticos, así como etanol, reducción del contenido de lactosa en productos alimenticios, producción de bioingredientes de suero de leche, biorremediación, como agente anticolesterolémico, como huésped para la producción de proteínas heterólogas (Fonseca *et al.*, 2008) y en la producción de extracto de levadura (Revillion, 2003).

### 3.7 Extractos de levadura con capacidad antioxidante

Debido a sus características nutricionales, las células de levadura son utilizadas para la producción de extracto de levadura. Este consta de los componentes hidrosolubles de la célula de levadura, cuya composición incluye principalmente aminoácidos, péptidos, carbohidratos y sales (Sommer, 1996). En la industria alimentaria, los extractos de levadura son utilizados como suplementos alimenticios ya que son fuente de proteínas, enzimas y vitaminas; también se utilizan como aditivos por sus funciones como: agentes saborizantes, potenciadores de sabor, para incrementar los aromas, o servir como agentes colorantes o antioxidantes. (Stam *et al.*, 1998; Saksinchai *et al.*, 2001; Bekatorou *et al.*, 2006; Tanguler y Erten, 2008).

Los compuestos bioactivos sintetizados por las levaduras con capacidad antioxidante, son diversos y entre ellos se encuentran el glutatión, los PRM, aminoácidos azufrados, el carotenoide oxigenado torulahodin, el ácido cítrico en forma de sal y de ácido orgánico, la coenzima Q<sub>10</sub>, la hidroximetil e hidroxiletíl furanona (2H), el tocotrienol, los  $\alpha$ -tocoferoles ( $\alpha$ -TOH) y otras formas de tocoferoles, la riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>) y las flavinas derivadas de ésta, así como el 2-4 hidroxifenil etanol (Imai *et al.*, 1989; Do *et al.*, 1996; Sommer, 1996; Cremer *et al.*, 1999; Sugawara, 2001; Kawamukai, 2002; Penninckx, 2002; Padilla *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2003).





### 3.8 Métodos de obtención de extractos de levadura

El extracto de levadura se obtiene de cultivos puros de levadura o a partir de la biomasa recuperada de procesos fermentativos (Sgarbieri *et al.*, 1999). Existen tres métodos principales para la producción de extracto de levadura: autólisis, plasmólisis e hidrólisis (Nagodawithana, 1994). El proceso de manufactura más frecuentemente usado es la autólisis (Sommer, 1996). La calidad del extracto de levadura en un proceso controlado, depende de factores como temperatura, pH, duración, agentes solubilizantes, viabilidad y concentración de levaduras (Pepler, 1982).

#### Autólisis

Este es un proceso de desintegración llevado a cabo por las propias enzimas endógenas para solubilizar los componentes celulares (Berry, 1982). La autólisis puede ser iniciada por temperatura o choque osmótico, aunque existen otros factores que lo pueden iniciar, causando la muerte celular sin la inactivación de las enzimas endógenas (Sommer, 1996). Después de la muerte celular, se lleva a cabo una desorganización de los sistemas membranosos, de los cuales forma parte la vacuola. En este orgánulo se localizan una amplia gama de enzimas. Cuando ocurre la muerte celular la matriz se desorganiza y las enzimas entran en contacto con sus sustratos. Las enzimas proteolíticas hidrolizan los enlaces peptídicos de las proteínas y liberan productos como péptidos y aminoácidos. Asimismo, las nucleasas degradan ARN y ADN liberando compuestos como nucleósidos, mononucleótidos y polinucleótidos. Las enzimas glucanasa y proteinasa degradan los constituyentes de la pared celular como glucanos y manoproteínas (Dharmadhikari, 1995). Por lo tanto, un autolisado de levadura es un concentrado de los componentes solubles de las células de levadura. Una vez que se retiran los componentes insolubles se obtiene el extracto de levadura (Sommer, 1996).

#### Plasmólisis

Este método es usado con mayor frecuencia por los fabricantes para iniciar rápidamente el proceso de degradación celular. Los químicos más aceptados para efectuar este proceso son sales. También es frecuente el uso de solventes orgánicos como acetato de etilo, isopropanol, tolueno o etanol para facilitar la autólisis. Cuando las sales o dichos





solventes están presentes en el medio, la célula de levadura comienza a perder agua con el propósito de balancear la presión osmótica. Bajo estas condiciones extremas el citoplasma tiende a separarse de la pared celular, condición conocida como plasmólisis. Cuando estas condiciones persisten el tiempo suficiente, las células de levadura mueren rápidamente marcando el comienzo del proceso de desintegración. La adición de un agente plasmolisante tiene la ventaja de iniciar rápidamente la autólisis, resultando en la solubilización rápida, además tiene un efecto bacteriostático o bactericida reduciendo el crecimiento de microorganismos contaminantes. Sin embargo, debido al alto contenido de sales, estos productos tienen uso limitado en la industria de alimentos, puesto que hay una mayor demanda por extractos con bajo contenido en sodio, los extractos son mayormente obtenidos por autólisis y no por plasmólisis (Nagodawithana, 1994).

### Hidrólisis

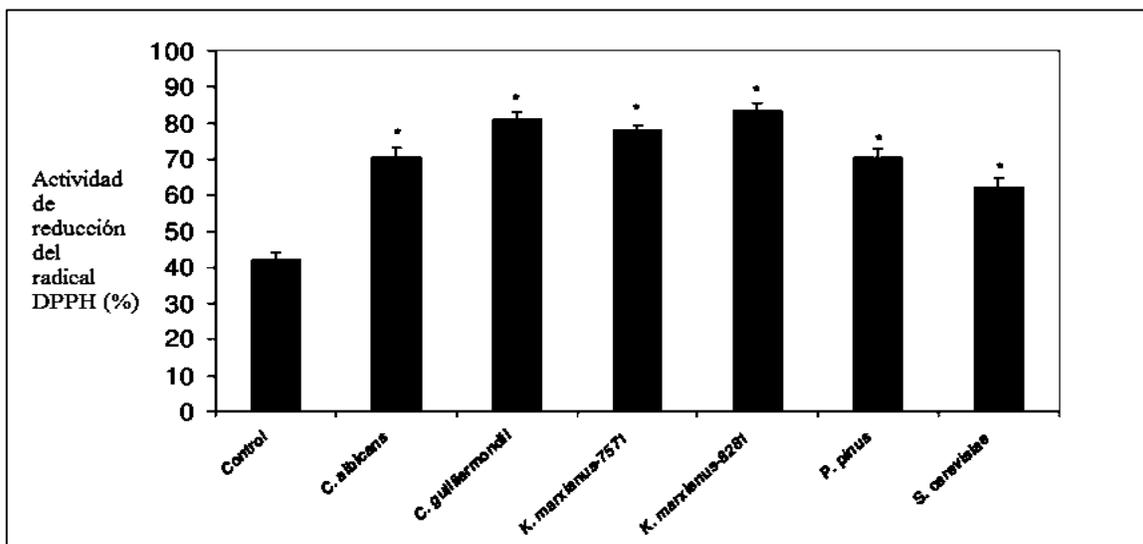
A pesar que es el método más eficiente para solubilizar las células de levadura, es el menos practicado comercialmente en la producción de extracto. En este método se utiliza ácido clorhídrico en las levaduras, en condiciones específicas de temperatura y presión. Típicamente la hidrólisis comienza con levadura seca resuspendida en agua a una concentración de 65-80% de sólidos, seguida de una acidificación con ácido clorhídrico concentrado. La hidrólisis es efectuada a 100°C en un evaporador equipado con un condensador de reflujo hasta que es obtenido el nivel requerido de amino nitrógeno. Generalmente, se obtiene después de 6-12 h, convirtiendo del 50-60% del nitrógeno total en amino nitrógeno. Posteriormente, se realiza la neutralización del hidrolizado a un pH de 5 a 6, generalmente con hidróxido de sodio, seguido de una filtración y concentración en líquido con 45% de sólidos o una pasta de 80% de sólidos. A pesar que el rendimiento es mayor que en la autólisis o en la plasmólisis, algunas desventajas hacen que este proceso sea difícil y caro. La naturaleza corrosiva de los ácidos hace esencial el uso de equipos forrados con vidrio u otro material no reactivo, para ser usados en el manejo de los medios altamente ácidos. Los recipientes de presión usados para la hidrólisis deben ser construidos especialmente para cumplir con altos estándares de seguridad. Por lo tanto, el gran capital necesario para la construcción del lugar de trabajo, hace a este proceso poco atractivo para la producción de extracto. Además, el alto contenido de sales y la destrucción de



aminoácidos y vitaminas han hecho a este proceso menos favorable que la autólisis o plasmólisis (Nagodawithana, 1994).

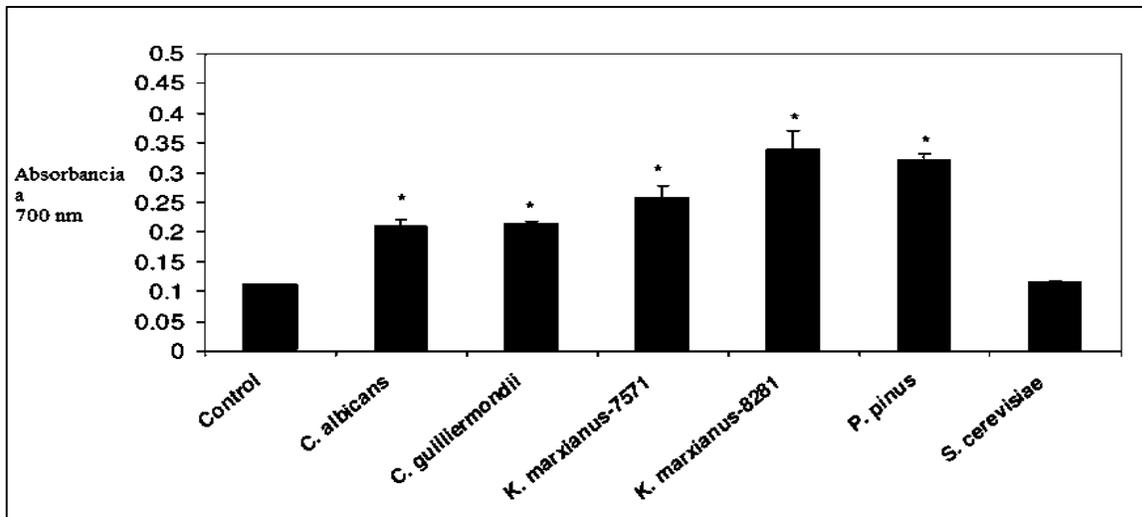
### 3.9 Capacidad antioxidante de extractos de levadura de acuerdo a la cepa de levadura

De acuerdo con estudios realizados por Rashad (2011) sobre la capacidad antioxidante de extractos de okara (subproducto de la elaboración de tofu, leche de soya o proteína de soya) fermentados con distintas cepas de levaduras, se demostró que existe diferencia en dicha capacidad dependiendo de la cepa utilizada para la fermentación. En la figura 3 se muestran las diferencias en la actividad secuestradora de radicales por el ensayo de reducción del radical libre estable DPPH<sup>\*</sup> (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil) de los medios fermentados con diferentes especies y cepas de levadura, respecto al control sin fermentar. Se observa que todos los extractos muestran diversos grados de reducción del radical DPPH<sup>\*</sup> (62.31-83.30%) dependiendo del microorganismo fermentador.



**Figura 3.** Reducción del radical libre DPPH<sup>\*</sup> de extractos de okara no fermentada (control) y fermentada con diferentes levaduras (Rashad, 2011).

En la evaluación del poder reductor de los medios fermentados con diferentes especies y cepas de levadura, se aprecian las diferencias, respecto al control sin fermentar (Figura 4). Se observa además, que la actividad antioxidante varía dependiendo de la cepa utilizada para la fermentación de dichos productos.



**Figura 4.** Poder reductor de extractos de okara no fermentada (control) y fermentada con distintas cepas de levadura (Rashad, 2011).

### 3.10 Capacidad antioxidante de extractos de levadura de acuerdo al contenido de glutatión

Las cepas silvestres de *S. cerevisiae* poseen un contenido intracelular de glutatión de 0.1 a 1% de peso seco (Li *et al.*, 2004). Estudios recientes han descrito cepas de levaduras productoras de glutatión usadas comúnmente para la producción comercial de dicho compuesto (Sakato, 1992; Wei *et al.*, 2003). Además, otros estudios se han enfocado en incrementar la producción de glutatión mediante la suplementación en los medios de cultivo con glucosa, minerales, ATP y fósforo (Li *et al.*, 1998). El glutatión es un tripéptido de glutamato, cisteína y glicina. Es conocido por contener un grupo tiol y estar presente en animales, plantas y microorganismos (Meister *et al.*, 1976). El glutatión (GSH/GSSG) es el tiol más abundante no proteínico y de bajo peso molecular presente en células eucariotas (Penninckx, 2002; Perrone, 2005). Debido a su bajo potencial redox ( $E^0 = 240\text{mV}$ ) y su alta concentración celular, el glutatión es el mayor amortiguador redox a base de grupos tiol (Herrero *et al.*, 2007). Es un importante componente en el mecanismo celular que protege contra los rayos UV (Sollod *et al.*, 1992), metales pesados (Perego *et al.*, 1997) y sustancias orgánicas exógenas (Goto *et al.*, 1995). El glutatión también juega un papel de defensa contra el daño oxidativo en organismos (Berhane *et al.*, 1994). Es usado ampliamente como medicamento y en alimentos nutraceuticos para prevenir la hepatotoxicidad inducida por





acetaminofen, vinil éteres o bromobenceno en animales y en la industria cosmética (Sakato, 1992). Es altamente reducido y puede ser utilizado como antioxidante de grado farmacéutico y alimenticio (Sommer, 1996), su funcionalidad se debe al grupo tiol (SH) de la cisteína (Meister, 1995).

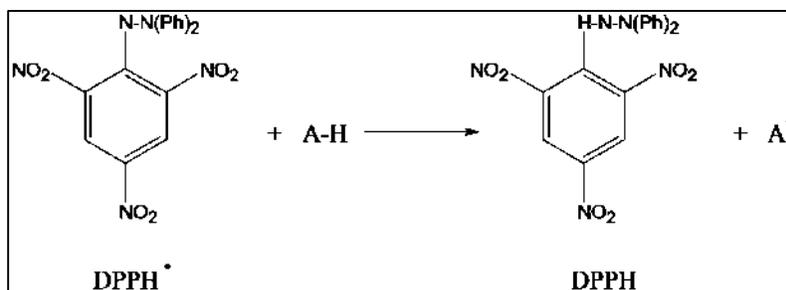
### 3.11 Pruebas para la evaluación de la actividad antioxidante

El estudio de nuevos compuestos con potencial capacidad antioxidante cada vez adquiere más relevancia en los campos de la biología, nutrición, industria alimentaria y medicina, lo que hace necesaria la existencia de métodos *in vitro* simples, rápidos y sobre todo, fiables para la determinación de la capacidad antioxidante de compuestos, ya sea en su forma pura (moléculas aisladas) o compleja (alimentos o muestras biológicas) (Magalhaes *et al.*, 2008). Existen gran variedad de métodos de evaluación de la actividad antioxidante, pero ninguno está oficialmente aprobado ni estandarizado (Frankel y Meyer, 2000). Por lo tanto, una evaluación correcta y completa de la actividad antioxidante requiere el uso de diferentes métodos de ensayo que incluyan y contemplen los múltiples factores y mecanismos que rodean la inhibición del proceso oxidativo (Schlesier *et al.*, 2002). Los métodos de evaluación de la capacidad antioxidante pueden clasificarse en función de la especie oxidante (especies reactivas del oxígeno, especies reactivas del nitrógeno, o radicales estables no biológicos), del mecanismo de actuación del antioxidante (capacidad secuestradora de radicales, capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica, capacidad de reducir metales, etc.) o del sustrato oxidable utilizado (químico o biológico).

#### Método del radical DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Es un ensayo de capacidad secuestradora contra el radical estable DPPH<sup>•</sup>, el cual es un radical no biológico y se evalúa la capacidad reductora total. Se basa en la reducción del radical por captación de un átomo de hidrógeno al añadir el antioxidante (figura 5). Se cuantifica determinando la disminución de la absorbencia a 515 nm (Magalhaes *et al.*, 2008).





**Figura 5.** Reducción del radical libre DPPH<sup>•</sup> (Magalhaes *et al.*, 2008).

#### Ensayo de capacidad de degradación del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

El peróxido de hidrógeno es formado en las células por mecanismos controlados. A pesar de que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoca un amplio espectro de respuestas celulares desde la estimulación del crecimiento mitogénico, hasta apoptosis o necrosis a diferentes niveles de concentración; en altas concentraciones, este compuesto es deletéreo para las células y su acumulación causa la oxidación de moléculas como ADN, proteínas y lípidos. Aunque el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no es muy reactivo por sí mismo, puede ser tóxico ya que está estrechamente relacionado con la producción de radicales. Las sales de hierro y cobre promueven la generación de radicales oxidantes a partir de peróxidos, dicha reacción se conoce como reacción de Fenton (Kohen y Nyska. 2002).



La reacción de descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se evalúa por la pérdida de la absorbencia a 240 nm.

#### Poder reductor

El análisis se basa en el poder reductor de un antioxidante que reduce el ion férrico (Fe<sup>3+</sup>) al ion ferroso (Fe<sup>2+</sup>); formando un complejo azul. Entre mayor sea la absorción a una longitud de onda de 700 nm, mayor será el poder de reducción del extracto, es decir, tendrá una mayor capacidad antioxidante (Roginsky y Lissi, 2005).

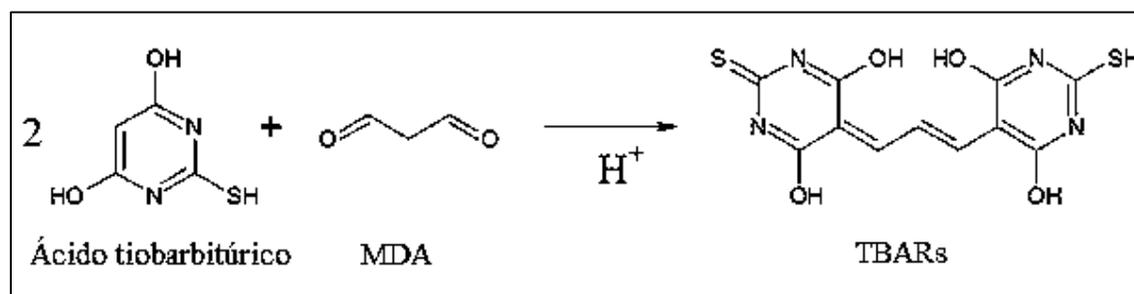


### Capacidad antioxidante total (método del fosfomolibdeno)

Es un método espectrofotométrico basado en la reducción de molibdeno (Mo) (VI) a Mo (V) por el extracto y la subsecuente formación del complejo verde fosfato-Mo (V) a pH ácido con una absorción máxima a 695 nm (Kumaran y Karunakaran, 2007).

### Antilipoperoxidación

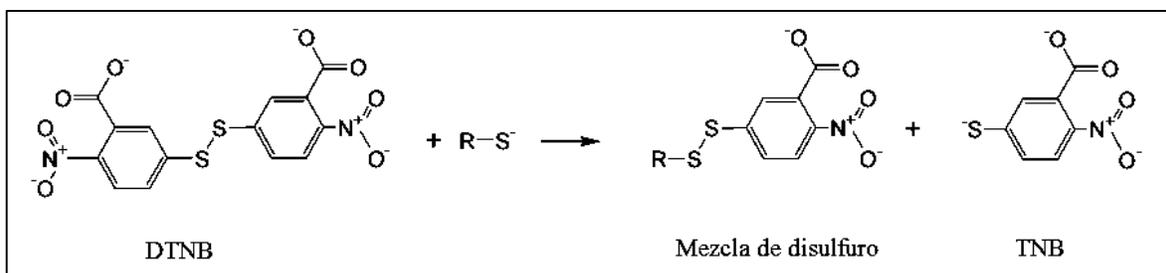
En el proceso de la peroxidación lipídica se liberan ciertos productos secundarios como el malondialdehído (MDA) que se utilizan como marcadores del grado de peroxidación. La cuantificación de MDA se realiza mediante métodos colorimétricos basados en la reacción del MDA con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para generar un aducto coloreado cuya concentración se expresa como sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (figura 6). El porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica reflejará el poder antioxidante de los compuestos estudiados (Ohkowa, 1979).



**Figura 6.** Reacción de TBARS (Ohkowa, 1979).

### Determinación de glutatión reducido (GSH)

El DTNB [ácido 5, 5'-ditiobis- (2-nitrobenzoico)] reacciona con los grupos sulfhidrilo presentes en el glutatión y producen una mezcla de disulfuro y el complejo colorido TNB (ácido 2-nitro-5-tiobenzoico), el cual es detectado espectrofotométricamente a 405 nm (figura 7) (Hazemm, 2011).



**Figura 7.** Determinación de glutatión reducido (GSH) (Hazemm, 2011).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Existe la necesidad de encontrar antioxidantes naturales, siendo los extractos de levadura poseedores de capacidad antioxidante, la cual puede variar de acuerdo a cada cepa y método de obtención del extracto, por lo que es necesario evaluar dicha capacidad en cepas no estudiadas.

#### 5. HIPÓTESIS

Los extractos de levadura poseen capacidad antioxidante, la cual difiere conforme a la cepa de levadura y el método de obtención del extracto.

#### 6. OBJETIVOS

##### Objetivo General

- Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de extractos de levaduras obtenidos por diferentes métodos.



## Objetivos Particulares

- Obtener extractos de las levaduras *S. cerevisiae* W303 y MC4, y *K. marxianus* OFF1 y SPL1, por diferentes métodos.
- Determinar la capacidad antioxidante *in vitro* de extractos de las levaduras *S. cerevisiae* W303 y MC4, y *K. marxianus* OFF1 y SPL1.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Levaduras

Las levaduras utilizadas en este estudio fueron obtenidas de la colección de cultivos del CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, México). *S. cerevisiae* W303 es la cepa comercial obtenida de la ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). Las cepas de levaduras obtenidas del CIATEJ fueron aisladas de fermentaciones espontáneas de mezcal en diferentes estados de la república Mexicana. Las cepas OFF1 y SPL1 de *K. marxianus* fueron aisladas de destilerías rurales mexicanas en los estados de San Luis Potosí y Guerrero, respectivamente. La cepa MC4 de *S. cerevisiae* fue aislada de una destilería rural en Oaxaca.

### 7.2 Reactivos y solventes

Extracto de levadura, peptona, dextrosa, hidróxido de sodio (NaOH), ácido clorhídrico (HCl), ácido sulfúrico ( $H_2(SO_4)$ ), fosfato de sodio ( $Na_2HPO_4$ ), acetato de etilo ( $C_4H_8O_2$ ), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH·), ácido ascórbico, ácido acético, ácido tricloroacético (ATC), ácido tiobarbitúrico (ATB), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), molibdato de amonio ( $(NH_4)_6Mo_7O_2 \cdot 4 H_2O$ ), ferrocianuro de potasio ( $C_6N_6FeK_4$ ), cloruro férrico ( $FeCl_3$ ), sulfato ferroso ( $FeSO_4$ ), duodecil sulfato de sodio, ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), todos de grado reactivo y obtenidos de Sigma, México.





### 7.3 Cultivo de levaduras

Se realizó un pre-cultivo de las levaduras *S. cerevisiae* (W303 y MC4) y *K. marxianus* (OFF1 y SPL1) mediante la inoculación con una asa en 10 ml de medio YPD líquido (extracto de levadura 1%, peptona 2% y dextrosa 2%), con incubación con agitación constante de 180 rpm a temperatura ambiente. A las 24 h se tomó una muestra para resembrar un cultivo en 60 ml de medio YPD líquido, manteniendo las condiciones del precultivo mencionadas anteriormente.

### 7.4 Obtención de extractos de levaduras

#### 7.4.1 Autolisis

Para la obtención del extracto de levadura por el método de autolisis (Sommer, 1996), se mezclaron 60 ml del cultivo en medio YPD líquido de levadura con 120 ml de agua destilada. La suspensión fue incubada a temperatura ambiente por 72 h. Después de la incubación, la solución fue centrifugada a 2000 x g por 10 min. Los residuos (precipitado) se lavaron dos veces con agua destilada, después se centrifugaron a 2000 x g por 10 min. El precipitado fue desechado. El total de sólidos fue determinado a peso seco después de secar la solución de extracto de levadura a 110°C hasta peso constante. El extracto se disolvió en agua desionizada para obtener una concentración de 10 mg/ml.

#### 7.4.2 Autolisis (con ajuste de pH)

Inicialmente se obtuvo el peso seco de las levaduras, se disolvieron en agua destilada con relación a 4 ml de agua por cada 600 mg de levadura. El pH de la suspensión se ajustó a 6 con NaOH, 2N o HCl, 2N. Se efectuó la autolisis a temperatura de 50°C por 24 h. Al finalizar, el proceso se sometió a 80°C por 30 min. La suspensión se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se centrifugó a 2000 x g por 10 min a 4°C. El precipitado fue desechado. El total de sólidos se determinó a peso seco después de secar la solución de extracto de levadura a 110°C hasta peso constante. El extracto se disolvió en agua desionizada para obtener una concentración de 10 mg/ml (Tangler *et al.* (2008).





### 7.4.3 Plasmólisis

Este método se realizó de acuerdo a lo reportado por Barrete *et al.* (1999), para lo cual, se obtuvo inicialmente el peso seco de las levaduras y se disolvieron en agua destilada a una concentración de 18%. Se añadió 1.5 ml de acetato de etilo ( $C_4H_8O_2$ ) por cada 100 ml de suspensión de levaduras. El pH fue ajustado a 5.5 con NaOH 2N ó HCl 2N, según el caso. Se efectuó la autólisis a 48°C, con agitación constante a 100 rpm, por 24 h. La suspensión fue centrifugada a 2000 x g por 10 min. El precipitado fue desechado. El total de sólidos fue determinado a peso seco después de secar la solución de extracto de levadura a 110°C hasta peso constante. El extracto se disolvió en agua desionizada para obtener una concentración de 10 mg/ml.

## 7.5 Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante

### 7.5.1 Reducción del radical DPPH\*

La actividad antioxidante del extracto de levadura basada en la reducción del radical libre estable DPPH\* (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil), se determinó de acuerdo al método descrito por Lee *et al.* (2004). 100µl de extracto de levadura (10mg/ml) fueron añadidos en tubos de ensayo y completados a un volumen de 1.0 ml con agua destilada. Se añadió a cada tubo 1.0 ml de solución DPPH\* (0.2 mM en etanol), se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. El control fue preparado por el mismo procedimiento sin el extracto de levadura. La absorbencia de la solución se midió a 517 nm. La inhibición del radical DPPH\* fue calculada en porcentaje con la siguiente ecuación:

$$I\% = [(A_{control} - A_{muestra})/A_{control}]x 100$$

### 7.5.2 Reducción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )

La determinación de la capacidad de reducción de  $H_2O_2$  se determinó de acuerdo al método descrito por Ruch *et al.* (1984). Para lo cual 100 µl de extracto de levadura (10 mg/ml) se disolvieron en 3.4 ml de buffer de fosfato 0.1M (pH 7.4) y fueron mezclados con





600  $\mu$ l de  $H_2O_2$  43 mM. Se determinó la absorbencia de la mezcla de reacción a 230 nm. El porcentaje de capacidad de reducción de  $H_2O_2$  se calculó con la fórmula:

$$\% \text{ de reducción de } H_2O_2 = 1 - \frac{\text{Muestra}_{230}}{\text{Control}_{230}} \times 100$$

### 7.5.3 Poder reductor

El poder reductor de los extractos de levadura se determinó por el método de Mathew y Abraham (2006). En primer lugar, se añadió a un tubo 100  $\mu$ l de extracto de levadura (10 mg/ml) y se completó a 1 ml con agua destilada. Se adicionó 2.5 ml de buffer de fosfato (0.2 M, pH 6.6) y 2.5 ml de solución de ferrocianuro de potasio ( $C_6N_6FeK_4$ ) 1% p/v. Se mezcló en un vortex y la mezcla se incubó a 50°C por 20 min. Después de la incubación, se agregó 1.5 ml de solución de ácido tricloroacético (ATC) 10% p/v a cada mezcla y posteriormente, se centrifugó a 3000 x g por 10 min. Se tomaron 2.5 ml de sobrenadante y se mezclaron con 2.5 ml de agua destilada. Se añadió 0.5 ml de solución de cloruro férrico ( $FeCl_3$ ) 0.1% p/v. Se mezcló en vortex y se determinó la absorbencia a 700 nm. El blanco fue preparado por el mismo procedimiento sin el extracto de levadura. Se utilizó solución de ácido ascórbico (0.03% p/v) como control positivo.

### 7.5.4 Capacidad antioxidante total

La determinación de la capacidad antioxidante total fue evaluada por el método del fosfomolibdeno, como lo describieron Kumaran y Karunakaran (2007). 100  $\mu$ l de extracto de levadura (10 mg/ml) se completaron a un volumen constante de 0.3 ml con agua destilada. 3.0 ml de la solución reactiva (ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 0.6 M, fosfato de sodio ( $Na_2HPO_4$ ) 28.0 mM y molibdato de amonio ( $(NH_4)_6Mo_7O_2 \cdot 4 H_2O$ ) 4.0 mM) fueron añadidos a cada tubo y posteriormente mezclados. Se incubaron a 95°C por 90 min. El blanco fue preparado por el mismo procedimiento sin el extracto de levadura. Una solución de ácido ascórbico 0.03% p/v fue utilizada como control positivo. Después de enfriar a temperatura ambiente, se midió la absorbencia a 695 nm.





### 7.5.5 Antilipoperoxidación

Se utilizó un ensayo modificado de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico descrito por Ohkawa *et al.* (1979), para lo cual 0.5 ml de homogenado de yema de huevo al 10% (p/v) fueron mezclados con 100  $\mu$ l de extracto de levadura (10 mg/ml). Se completó a un volumen de 1 ml con agua destilada. Se adicionaron 5  $\mu$ l de sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) 0.07 M. Se incubaron por 30 min. Posteriormente, se adicionó 1.5 ml de ácido acético al 20% (pH de 3.5 ajustado con NaOH), 1.5 ml de ácido tiobarbitúrico (ATB) 0.8% p/v en dodecil sulfato de sodio (SDS) 1.1% y 0.5 ml de ácido tricloroacético (ATC) 20%. La solución fue mezclada en vortex y después se calentó a 95°C por 60 min. Después de enfriar se centrifugó a 2000 g por 5 min a 15°C. Se determinó la absorbencia del sobrenadante a 532 nm. El porcentaje del índice antioxidante (IA%) se calculó de acuerdo a:

$$IA\% = (1 - A_T/A_C) \times 100$$

Donde  $A_C$  es el valor de la absorbencia del control completamente oxidado y  $A_T$  es el valor de absorbencia de la muestra.

### 7.6 Cuantificación de glutatión reducido (GSH)

La determinación de glutatión reducido se realizó de acuerdo a Jollow *et al.* (1974), para lo cual se adicionaron 100  $\mu$ l de extracto de levadura (10 mg/ml) a 2.5 ml de buffer de fosfato 0.1M (pH 8) y 1 ml de ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) 0.1mM. Se determinó la absorbencia a 412 nm.

### 7.7 Equipos

Espectrofotómetro UV-Vis Lambda 18 Perkin Elmer, espectrofluorofotómetro 5301-PC Shimadzu, centrífuga Sorvall RC 6+ y centrífuga Beckman Coulter J2MC.

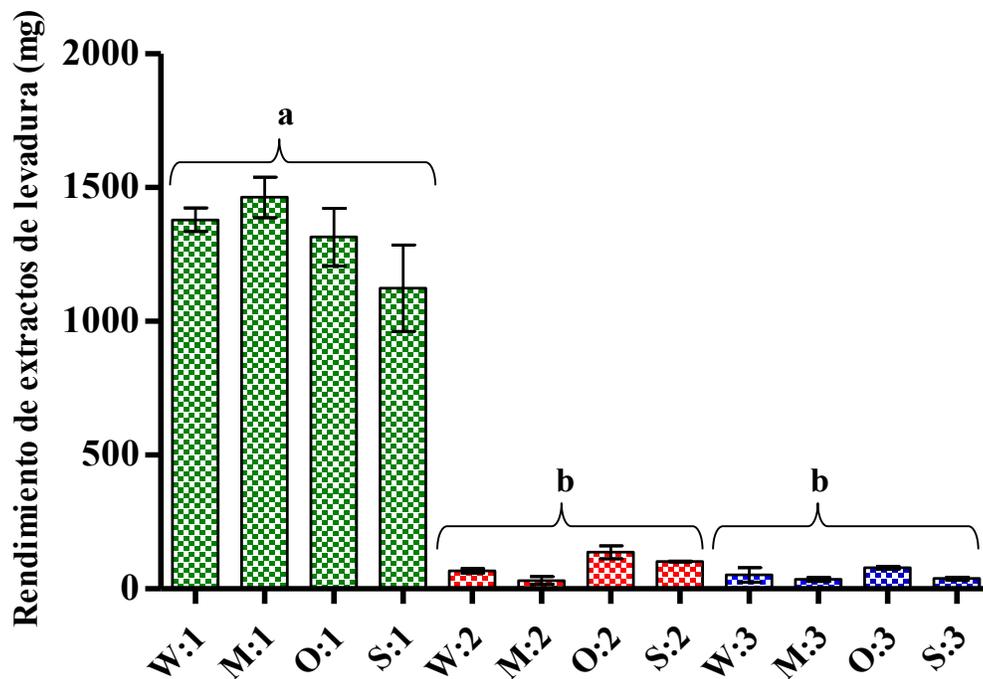
### 7.8 Análisis Estadístico

Los resultados se analizaron con el programa estadístico Statistica 7.0; se realizó en cada experimento el análisis factorial de varianza (ANOVA); se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey con un nivel de significancia de ( $P < 0.01$ ). Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar (E.E.).



## 8. RESULTADOS

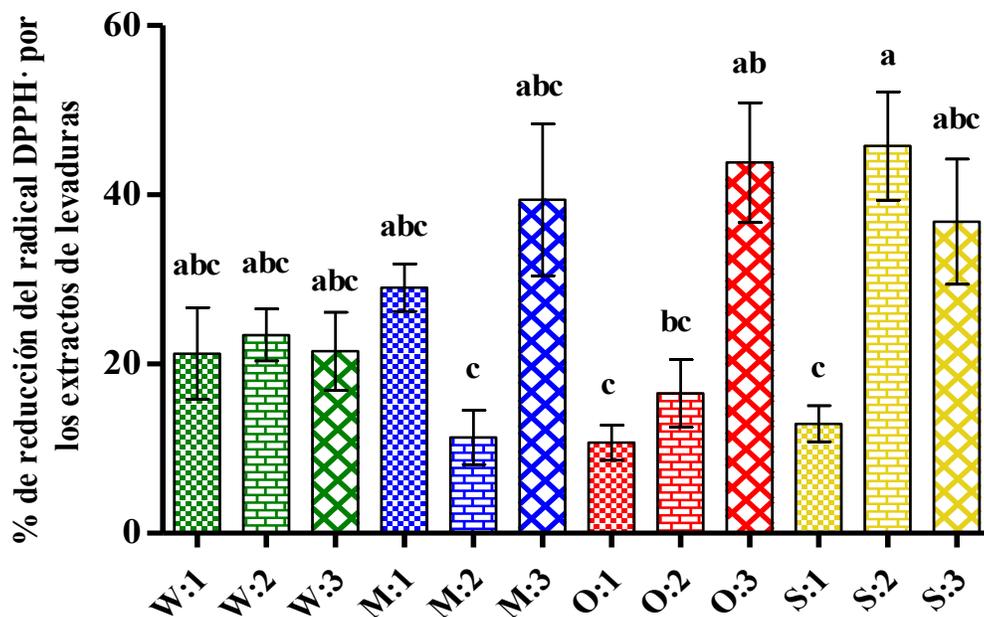
El rendimiento en la obtención de los extractos de levadura fue mayor en los obtenidos por el método de autólisis (1). Como se observa en la gráfica 1, hay una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ), con respecto a los extractos obtenidos por los métodos de autólisis con ajuste de pH (2) y plasmólisis (3). La media correspondiente a los extractos obtenidos por autólisis es de 1,320 mg, para los obtenidos por autólisis con ajuste de pH es de 84.3 mg y en los obtenidos por el método de plasmólisis de 51.2 mg.



**Gráfica 1.** Determinación del rendimiento en la obtención de extractos de levaduras *S. cerevisiae* W303 (W) y MC4 (M) y *K. marxianus* OFF1 (O) y SLP1 (S) obtenidos por los métodos de autólisis (1), autólisis con ajuste de pH (2) y plasmólisis (3). Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ( $p < 0.01$ ). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media  $\pm$  E.E.

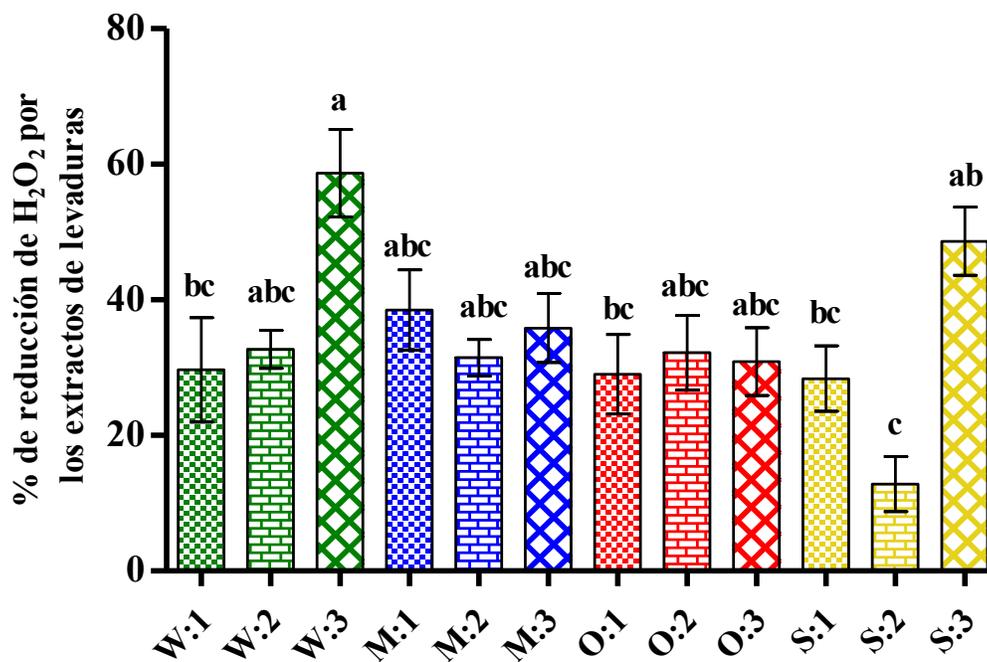
De acuerdo a la gráfica 2, se observa que la capacidad de reducción del radical DPPH<sup>•</sup> es mayor (45.7%) en el extracto de la levadura *K. marxianus* SLP1, obtenida por el método de autólisis con ajuste de pH (S:2). Sin embargo, no hay diferencia

estadísticamente significativa en la capacidad de reducción de dicho radical, en el mencionado extracto con respecto a los extractos de la misma levadura, es decir, *K. marxianus* SLP1 (S:1), obtenido por el método de plasmólisis, cuyo porcentaje de reducción es de 36.8%. Respecto a los extractos obtenidos de la levadura *K. marxianus* OFF1, el obtenido por el método de plasmólisis (O:3) presentó el mayor porcentaje (43.8%) de reducción del radical DPPH'. Los extractos obtenidos mediante el método de autólisis y plasmólisis a partir de la levadura *S. cerevisiae* MC4 (M:1) y (M:3) demostraron un porcentaje de reducción del mencionado radical de 29 y 39.4%, respectivamente. Por último, los extractos obtenidos a partir de la levadura *S. cerevisiae* W303 mediante los métodos de autólisis (W:1), autólisis con ajuste de pH (W:2) y plasmólisis (W:3) presentaron un porcentaje de reducción de dicho radical entre 21.2 y 23.4%.



**Gráfica 2.** Ensayo de reducción del radical DPPH' por extractos de levaduras *S. cerevisiae* W303 (W) y MC4 (M) y *K. marxianus* OFF1 (O) y SLP1 (S) obtenidos por los métodos de autólisis (1), autólisis con ajuste de pH (2) y plasmólisis (3). Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ( $p < 0.01$ ). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media  $\pm$  E.E.

En la gráfica 3 se aprecia que la capacidad de reducción de  $H_2O_2$  es mayor en el extracto de la levadura *S. cerevisiae* W303, obtenido por el método de plasmólisis (W:3) y cuyo porcentaje de reducción es de 58.7%. Dicha capacidad es significativa también en el extracto obtenido por el mismo método, a partir de la levadura *K. marxianus* SLP1 (S:3), cuyo porcentaje de reducción de  $H_2O_2$  es de 48.7%. Sin embargo, no hay diferencia estadísticamente significativa, respecto a los extractos obtenidos por el mismo método y por los métodos de autólisis, así como autólisis con ajuste de pH de las levaduras *S. cerevisiae* W303 (W:2), *S. cerevisiae* MC4 (M:1), (M:2), (M:3) y *K. marxianus* OFF1 (O:2), (O:3), cuya capacidad de reducción se encuentra entre 30.9 y 38.5 %.

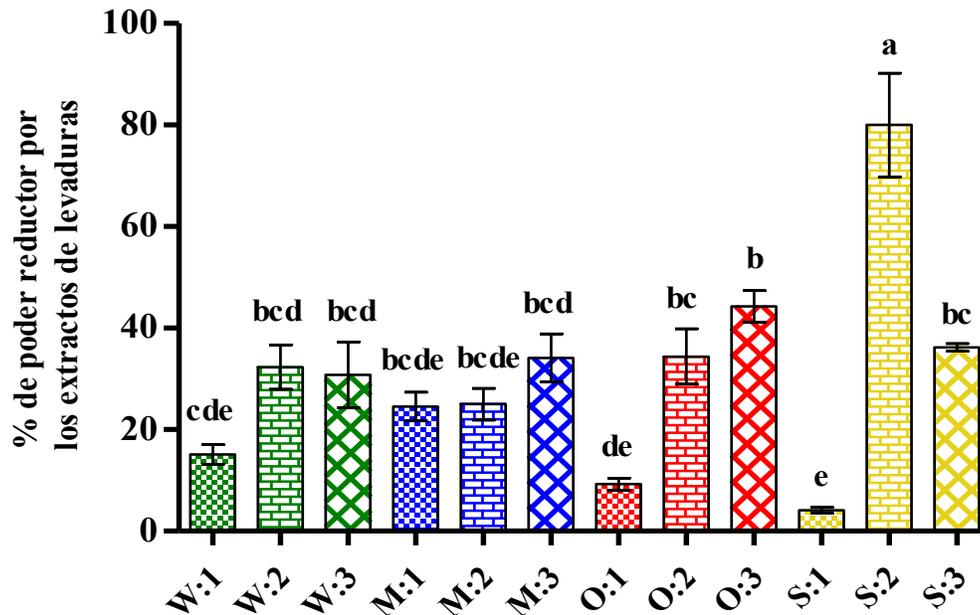


**Gráfica 3.** Reducción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por extractos de levaduras *S. cerevisiae* W303 (W) y MC4 (M) y *K. marxianus* OFF1 (O) y SLP1 (S) obtenidos por los métodos de autólisis (1), autólisis con ajuste de pH (2) y plasmólisis (3). Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ( $p < 0.01$ ). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media  $\pm$  E.E.

En la gráfica 4 se observa que la capacidad de reducción es estadísticamente mayor en el extracto de la levadura *K. marxianus* SLP1 (S:2), obtenido por el método de autólisis



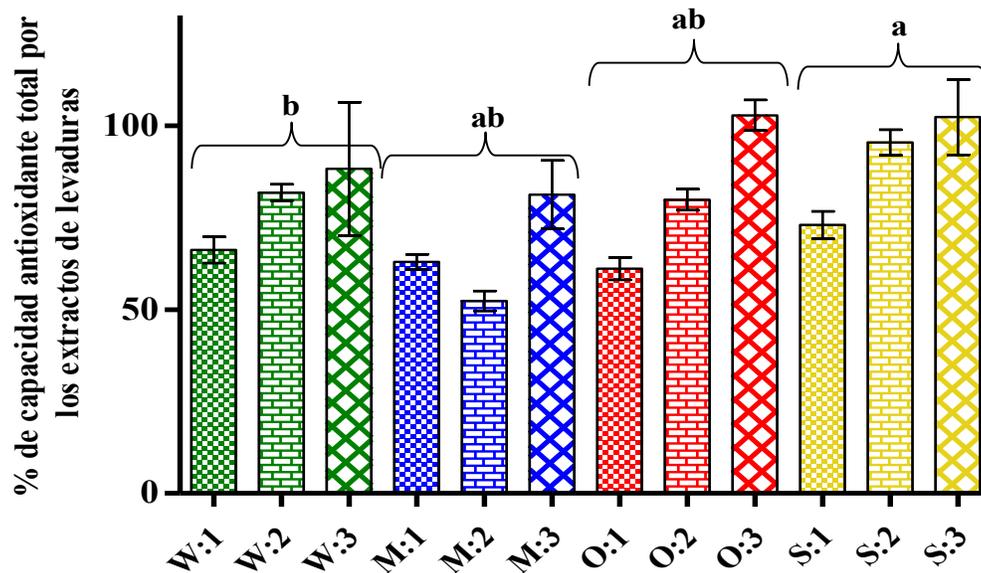
con ajuste de pH, respecto al resto de los extractos. Dicho porcentaje es de 80% y fue comparado con el poder reductor de una solución de ácido ascórbico (0.03% p/v), cuyo valor se consideró como el 100%.



**Gráfica 4.** Determinación de poder reductor por extractos de levaduras *S. cerevisiae* W303 (W) y MC4 (M) y *K. marxianus* OFF1 (O) y SLP1 (S) obtenidos por los métodos de autólisis (1), autólisis con ajuste de pH (2) y plasmólisis (3). Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ( $p < 0.01$ ). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media  $\pm$  E.E.

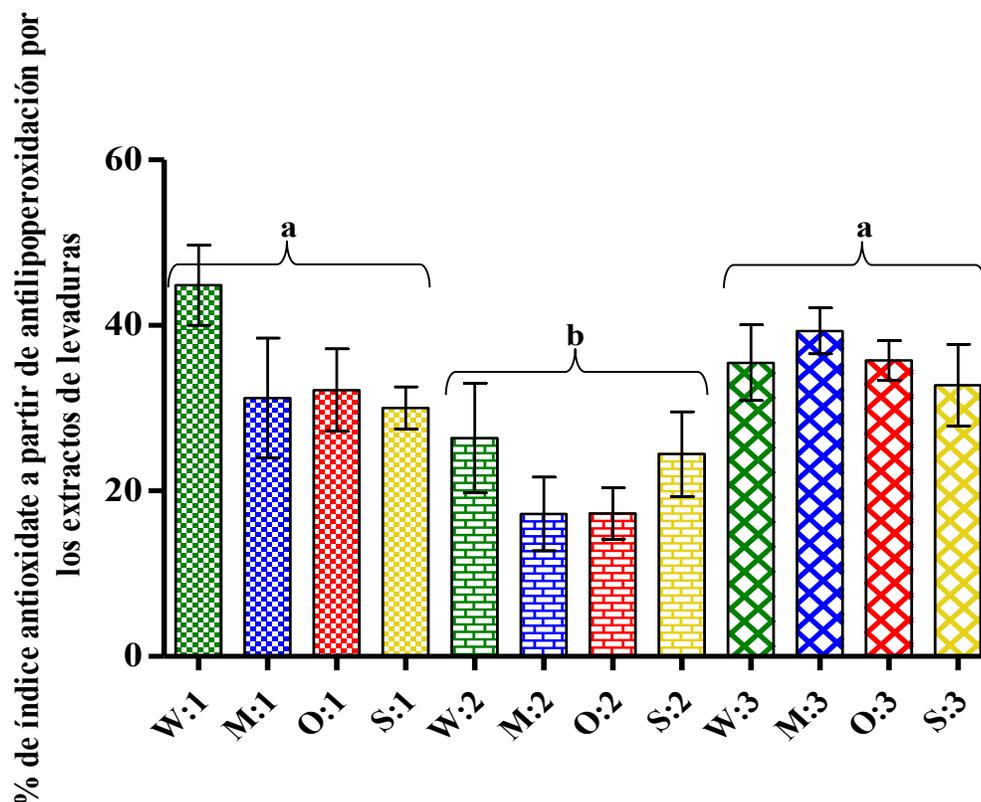
No se observó una diferencia estadísticamente significativa en la determinación de la capacidad antioxidante total, de los extractos de las levaduras *S. cerevisiae* W303 (W) y MC4 (M) y *K. marxianus* OFF1 (O) y SLP1 (S) obtenidos por los métodos de autólisis (1), autólisis con ajuste de pH (2) y plasmólisis (3), de acuerdo a la prueba estadística ANOVA factorial ( $p < 0.01$ ), mediante la cual se evaluó la interacción método-cepa. Sin embargo, sí se determinó una diferencia de acuerdo a la levadura, como se aprecia en la gráfica 5. La levadura con mayor capacidad antioxidante total es *K. marxianus* SLP1 (S) con un porcentaje de 90.3 %, no obstante, no hay diferencia estadísticamente significativa, respecto a los extractos de las levaduras *K. marxianus* OFF1 (O) y *S. cerevisiae* MC4 (M),

cuya capacidad antioxidante total es de 81.3 y 78.8%, respectivamente. Dichos valores fueron comparados con la actividad antioxidante del ácido ascórbico (0.03% p/v), cuyo valor se consideró como el 100%.



**Gráfica 5.** Capacidad antioxidante total por extractos de levaduras *S. cerevisiae* W303 (W) y MC4 (M) y *K. marxianus* OFF1 (O) y SLP1 (S) obtenidos por los métodos de autólisis (1), autólisis con ajuste de pH (2) y plasmólisis (3). Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ( $p < 0.01$ ). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media  $\pm$  E.E.

En la determinación de (%) índice antioxidante a partir de la prueba de antilipoperoxidación, por los extractos de las levaduras, no se observó una diferencia estadísticamente significativa, de acuerdo a la prueba estadística ANOVA factorial, al evaluar la interacción método-cepa. Sin embargo, se observó que existe una diferencia de acuerdo al método de obtención del extracto, como se observa en la gráfica 6, donde el método que presenta mayor (%) de índice antioxidante a partir de la prueba de antilipoperoxidación, es el método de plasmólisis y cuyo porcentaje es de 35.8%; es seguido del método de autólisis con 34.6%; mientras que el método de autólisis con ajuste de pH presenta un porcentaje de 21.3% el cual fue estadísticamente diferente ( $p < 0.01$ ), respecto a los otros métodos.

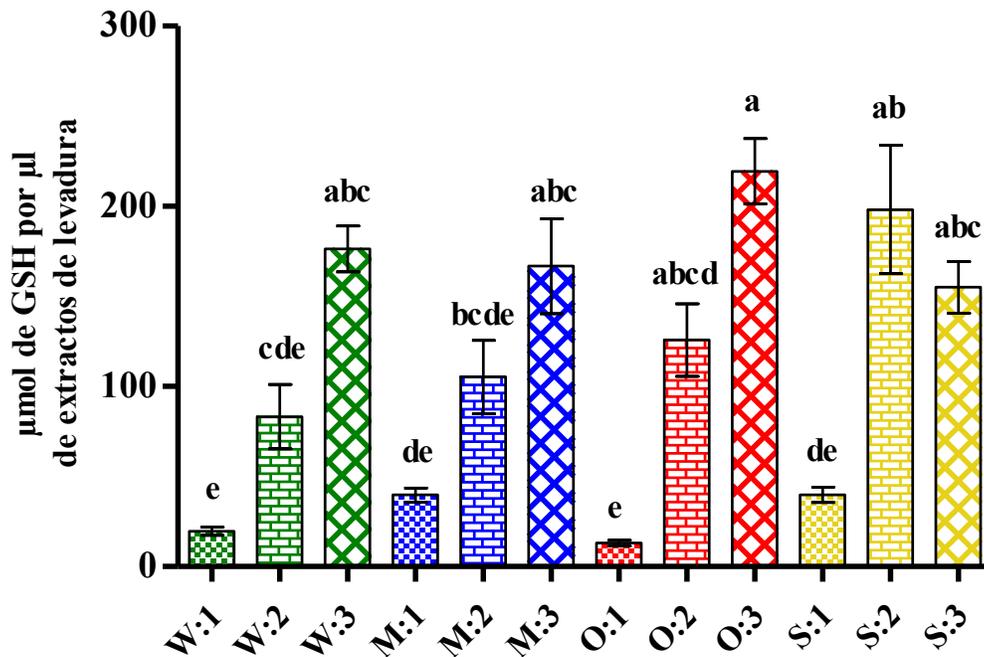


**Gráfica 6.** % de índice antioxidante a partir de la prueba de antilipoperoxidación por extractos de levaduras *S. cerevisiae* W303 (W) y MC4 (M) y *K. marxianus* OFF1 (O) y SLP1 (S) obtenidos por los métodos de autólisis (1), autólisis con ajuste de pH (2) y plasmólisis (3). Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ( $p < 0.01$ ). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media  $\pm$  E.E.

El contenido de glutatión reducido es mayor, como se aprecia en la gráfica 7, en el extracto de la levadura *K. marxianus* OFF1, obtenido por el método de plasmólisis (O:3). Dicho contenido es de 219.4  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$  de extracto. Sin embargo, no hay diferencia estadísticamente significativa respecto al contenido de dicho compuesto en el mencionado extracto, con respecto a los extractos de las levaduras *S. cerevisiae* W303 (W:3), *S. cerevisiae* MC4 (M:3) y *K. marxianus* SLP1 (S:3), obtenidos por el mismo método, así



como respecto a los extractos de las levaduras *K. marxianus* OFF1 (O:2) y SLP1 (S:2) obtenidas por el método de autólisis con ajuste de pH, cuyo contenido se encuentra entre 125.7 y 198.2  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$  de extracto.



**Gráfica 7.** Determinación de glutatión reducido (GSH) en extractos de levaduras *S. cerevisiae* W303 (W) y MC4 (M) y *K. marxianus* OFF1 (O) y SLP1 (S) obtenidos por los métodos de autólisis (1), autólisis con ajuste de pH (2) y plasmólisis (3). Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ( $p < 0.01$ ). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media  $\pm$  E.E.

## 9. DISCUSIÓN

Se estima que aproximadamente la mitad de la producción agrícola de alimentos, en países desarrollados y subdesarrollados, se desperdician como consecuencia de métodos deficientes de manejo, procesamiento, almacenamiento y distribución (Floros, 2010). La preservación de alimentos se define como el conjunto de tratamientos que prolonga la vida útil de aquéllos, manteniendo, en el mayor grado posible, sus atributos de calidad, incluyendo color, textura, sabor y especialmente valor nutritivo (FAO, 2009). La pérdida



del buen sabor es debido a la generación de compuestos de sabor desagradable, que se obtienen principalmente del rompimiento de los ácidos grasos insaturados durante la autooxidación (Nawar y Fennema, 1985). La oxidación de lípidos (lipoperoxidación) es uno de los mayores cambios químicos que ocurren durante el procesamiento, almacenamiento, distribución y preparación final de los alimentos y provoca un deterioro en su calidad (Wasowicz *et al.*, 2004). Los antioxidantes son compuestos que pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas evitando la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres (Halliwell, 1999). Existe una gran variedad de métodos de evaluación de la actividad antioxidante, pero ninguno está oficialmente aprobado ni estandarizado. Por lo tanto, una evaluación correcta y completa de la actividad antioxidante, requiere el uso de diferentes métodos de ensayo que incluyan y contemplen los múltiples factores y mecanismos que rodean la inhibición del proceso oxidativo (Schlesier *et al.*, 2002).

Por otro lado, se ha reportado que las levaduras sintetizan compuestos bioactivos que pueden servir como antioxidantes. A estos compuestos se les ha encontrado numerosos usos en alimentos para retardar la oxidación de grasas y en suplementos nutracéuticos para mejorar la salud y el bienestar (Gazi *et al.*, 2001; Bastin *et al.*, 2002; Doll, 2002; Ok *et al.*, 2003). Debido a que en general existe una percepción segura de las levaduras por los consumidores, son consideradas como una fuente segura de ingredientes y aditivos en los alimentos procesados. Por lo anterior y las características nutricionales de las levaduras, éstas son utilizadas para la obtención de extractos (Demain *et al.*, 1998; Sommer, 1996). Los extractos de levadura pueden ser obtenidos por diferentes métodos, los cuales pueden influir en los componentes obtenidos de las levaduras (Boonyeun *et al.*, 2011).

Con estos antecedentes observamos que existe una necesidad de encontrar antioxidantes naturales que puedan ser empleados de forma segura en la industria alimentaria, puesto que los extractos de levadura pueden presentar dicha capacidad, la cual puede aumentar de acuerdo al método de obtención de los extractos, así como por la cepa de levadura utilizada. En este trabajo se obtuvieron los extractos de dos levaduras de especies de *S. cerevisiae* (MC4 y W303) y dos especies de *K. marxianus* (OFF1 y SLP1), mediante los métodos de autólisis (1), autólisis con ajuste de pH (2) y plasmólisis (3).





La cantidad de extracto, determinada como rendimiento, es una propiedad importante en la selección de un método, ya que ésta nos indica la proporción de extracto obtenida, por la cantidad de materia utilizada y por lo tanto, la disponibilidad de éste para ser utilizado como antioxidante. En la gráfica 1 se observó cómo el rendimiento varió considerablemente de acuerdo al método utilizado. El método que generó el mayor rendimiento fue el de autólisis, lo anterior posiblemente debido al mayor tiempo (72 h) que se dejaron suspendidas las levaduras, lo que permitió un mayor tiempo de contacto entre el material biológico y el solvente (agua). En los otros métodos utilizados para la obtención del extracto, el tiempo de incubación en agua fue de 24 h.

Existen diferentes métodos para determinar la capacidad antioxidante; uno de estos métodos se basa en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>), la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado. Esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción en solución etanólica a 520 nm (Molyneux, 2004). Se ha demostrado que compuestos como la cisteína, el glutatión, el ácido ascórbico, los tocoferoles, los flavonoides, los taninos y las aminas aromáticas, reducen y decoloran el DPPH<sup>•</sup>, debido a su habilidad para donar hidrógeno (Kumaran y Karunakaran, 2007). La cisteína, el GSH y los tocoferoles son compuestos del extracto de levadura que posiblemente participen en dicha actividad anti radicales libres, lo que concuerda con los resultados obtenidos. Los extractos S:2, O:3, M:3 y S:3, con mayor actividad de reducción del radical DPPH<sup>•</sup> (Gráfica 2), también son los que presentan mayor contenido de GSH (Gráfica 7).

Otro de los métodos utilizados para la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro*, consiste en la capacidad de reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En células vivas, la reducción de este compuesto es debido principalmente a la actividad de la catalasa. Debido a su estructura estable y rígida, esta enzima presenta estabilidad térmica y resistencia a la proteólisis, lo que puede explicar su conservación después de los tratamientos a los que se sometieron las células de levadura, con la finalidad de obtener los extractos. La actividad enzimática de la catalasa en condiciones normales de crecimiento de las levaduras utilizadas, es similar, lo que podría explicar, que en general, se observa una reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> similar. Los extractos clasificados como W:3 y S:3 presentaron la mayor reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gráfica 3). Estos extractos fueron obtenidos mediante plasmólisis. En la plasmólisis a diferencia de





la autólisis, se genera un estrés mediante la incubación con acetato de etilo ( $C_4H_8O_2$ ), la producción de este estrés podría estar induciendo una mayor producción o actividad de la enzima catalasa, la cual se conserva en los extractos (W:3 y S:3) y que generó la mayor reducción del  $H_2O_2$  (Gráfica 3).

La capacidad de reducción está generalmente asociada con la presencia de reductores, los cuales se ha demostrado que ejercen la acción antioxidante donando un átomo de hidrógeno que interrumpe la cadena de radicales libres. La presencia de compuestos reductores causa la reducción del complejo ferrocianuro ( $Fe^{3+}$ ) a la forma ferrosa ( $Fe^{2+}$ ). Mediante la detección de la formación de perlas azul prussian a 700 nm, resultado de la reacción anterior, es posible monitorear la concentración de  $Fe^{2+}$  (Hazem, 2011). La mayor capacidad reductora observada en el extracto clasificado como S:2, presentó una correlación con la concentración de GSH, debido a que este extracto fue uno de los que presentó mayor concentración (Gráfica 7). El GSH dona un hidrógeno, el cual puede reducir al  $Fe^{3+}$  con la subsecuente formación del color azul. Al encontrarse en una mayor concentración en el extracto S:2, genera una mayor reducción del  $Fe^{3+}$ . La actividad antioxidante total se evaluó mediante la reducción de molibdeno (Mo) (VI) a Mo (V) y formación del complejo verde fosfato-Mo (V). Como referencia se midió la capacidad reductora del ácido ascórbico. Mediante esta técnica no se observó una mayor actividad en alguno de los extractos comparando los doce extractos obtenidos, sin embargo, se observó una tendencia a una mayor capacidad reductora del Mo (VI) en los extractos obtenidos por el método 3 (Gráfica 5). Al realizar la comparación por cepas, se observó que las cepas de *K. marxianus* presentaron mayor capacidad de reducción del Mo (VI). Es posible que los extractos obtenidos de las cepas de *S. cerevisiae* presenten menor capacidad de reducción de este compuesto, debido a una menor concentración de compuestos reductores, ya que se ha reportado que las cepas de *K. marxianus* presentan una mayor tolerancia a altas temperaturas, un factor utilizado para la obtención de los extractos. La tolerancia a la alta temperatura podría influir en la conservación de los compuestos con capacidad reductora obtenidos de las levaduras de *K. marxianus* (OFF1 y SLP1).

La iniciación de la lipoperoxidación por el sulfato ferroso ( $FeSO_4$ ) se lleva a cabo *in vitro*, a través de la formación del complejo ferril-perferril, o bien, a través de radicales hidroxilo ( $\cdot OH$ ) mediante la reacción de Fenton, lo que inicia una cascada de reacciones





oxidativas (Kumari, 2012). En los resultados obtenidos al realizar la comparación por método y cepa, no hay un extracto que presente mayor capacidad antilipoperoxidante, pero al comparar por método utilizado para la obtención de los extractos, si se observa una menor capacidad en los extractos obtenidos por el método de autólisis con ajuste de pH (Gráfica 6). La capacidad antilipoperoxidante observada en los extractos, se puede atribuir a diferentes fenómenos. Estos fenómenos podrían ser la inhibición en la formación del complejo ferril-perferril, reducción de radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) o superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) o cambiando la proporción de  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ , reduciendo el ritmo de conversión del estado ferroso a férrico o bien, quelando el hierro mismo (Kumari *et al.*, 2012). En la evaluación de la reducción de  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ , se observó una mayor capacidad del extracto clasificado como S:2 (Gráfica 4), sin embargo, no presentó una mayor capacidad antilipoperoxidante con respecto al resto de los extractos, por lo que la capacidad de reducción de este metal no es suficiente para evitar la lipoperoxidación. El radical  $\cdot\text{OH}$ , una de las principales moléculas generadoras de la lipoperoxidación, se forma a través de la reacción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  con el  $\text{Fe}^{2+}$ . Al evaluar la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  se observó que los extractos W:3 y S:3 presentaron mayor capacidad de reducción de este compuesto, efecto que coincide con una mayor capacidad antilipoperoxidante. Con este resultado, se puede sugerir que estos extractos reducen el  $\text{H}_2\text{O}_2$  evitando la reacción con el  $\text{Fe}^{2+}$  y así la lipoperoxidación.

El GSH es un tripéptido y el antioxidante que se encuentra en mayor concentración dentro de la célula. El GSH es capaz de interactuar directamente con especies reactivas del oxígeno (ERO) como  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$ ,  $\text{HClO}$  y  $\text{O}_2^-$ . También, actúa como agente quelante, por lo que, de acuerdo a su mecanismo de acción, se clasifica como antioxidante secundario. El método utilizado para la obtención de los extractos influyó en la concentración de GSH presente en éstos, ya que se ha reportado que la levadura SLP1 (S), presenta mayor concentración de GSH que el resto de levaduras utilizadas, sin embargo, en los extractos obtenidos no se observó tal hecho. Los extractos obtenidos por plasmólisis tienden a presentar la mayor homogeneidad en su capacidad antilipoperoxidante, así como la mayor concentración de GSH. Aunque se observa esta tendencia del GSH con la capacidad antilipoperoxidante, con los resultados obtenidos del resto de pruebas antioxidantes *in vitro*, se sugiere que los extractos presentan diferentes mecanismos de





reducción de oxidantes, que podrían contribuir de manera sinérgica a la conservación de los alimentos, evitando su oxidación.

## 10. CONCLUSIÓN

Los extractos de levaduras presentan capacidad antioxidante *in vitro*, la cual es modificada por el método de obtención de extracto, así como por la cepa de levadura utilizada. Además, ya que no se observó una capacidad antilipoperoxidante directamente relacionada con la concentración de GSH y las pruebas *in vitro*, se sugieren otros posibles compuestos antioxidantes presentes en los extractos, con diferentes mecanismos de reducción de oxidantes.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Barrete J, Claude P, Champagne, Jacques G. (1999). Development of bacterial contamination during production of yeast extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(7): 3261.

Bastin P, Dillemans M, Van Nederveelde L, Boivin P, Debourg A. (2002) Evaluation of the potent antioxidant effect of *Saccharomyces cerevisiae* extracts during beer production. *Cerevisiae.* 27(1): 27-32.

Bekatorou A, Psarianos C, Koutinas A. (2006). Production of food grade yeasts. *Food Technol. Biotechnol*, 44: 407-415.

Berhane K, Widersten M, Engstrom A, Kozarich J.W, Mannervik B. (1994). Detoxication of base propanals and other, -unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferase. *Proc. Natl. Acad, Sci USA.* 911480-1484.

Berry, D.R. (1982). *Yeast in Industry.* In *biology of yeast.* London: Edward. p. 48-58.

Boonyeun P, Shotipruk A, Prommuak C, Suphantharika M, Muangnapoh C. (2011). Enhancement of amino acid production by two-step autolysis of spent brewer's yeast. *Chem. Eng. Comm.* 198: 1594-1602.

Borrelli R, Fogliano V, Monti S, Ames J. (2002). Characterization of melanoidins from a glucose-glycine model system. *Eur Food Res Technol.* 215(3): 210-215.





Bush R.K, Taylor S.L. (1998). Adverse reactions to food and drug additives, in allergy: principles and practice. 5<sup>a</sup> ed. St. Louis: Mosby. p.1183.

Chen H.M, Muramoto K, Yamaguchi F, Nokihara K. (1996). Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. J. Agric. Food Chem. 44: 2619.

Chen H.M, Muramoto K, Yamauchi F. (1995). Structural analysis of antioxidative peptides from soybean -conglycinin. J. Agric. Food Chem. 43: 574.

Cofepris (2012). Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias. En: Diario oficial, p. 4.

Cremer J, Vatou V, Braveny I. (1999). 2,4-(Hydroxyphenyl)-ethanol, an antioxidative agent produced by *Candida* spp., impairs neutrophilic yeast killing in vitro. FEMS Microbiol Lett. 170(2): 319–325.

Demain A.L, Phaff H.J, Kurtzman C.P. (1998). The industrial and agricultural significance of yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW (eds) The yeasts – a taxonomic study, 4th edn. Amsterdam: Elsevier. 199. p. 13–19.

Dharmadhikari M. (1995). Yeast Autolysis. Missouri State Fruit Experiment Station 10(6): 1-4.

Do T.Q, Schultz J.R, Clarke C.F. (1996). Enhanced sensitivity of ubiquinone-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* to products of autoxidized polyunsaturated fatty acids. Proc Natl Acad Sci USA. 93(15): 7534-7539.

Doll M. Yeast-renaissance of an old natural remedy. Erfahrungsheilkunde. 51(5): 354-357.

Dziezak J.D. (1987). Application of food colorants. Food Technol. 41: 78-88.

Fajardo C, Erika E, Sarmiento F, Sandra C. (2008). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana de Colombia. Facultad de ciencias Básicas. Microbiología Industrial. Bogotá.

FAO. (2009). Feeding the world, eradicating hunger. World Summit on Food Security. 2009. Nov 16–18; Roma: Food and Agricultural Organization of the United Nations. WSFS 2009/INF/2.

Fellows P.J. (2009). Food Processing Technology: Principles and Practice. 3<sup>a</sup> ed. Elsevier. 3-4.





Floros J.D, Newsome R, Fisher W. (2010) Feeding the world today and tomorrow: the importance of food science and technology an IFT scientific review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9: 573-574.

Fonseca G.G, Heinzle E, Wittmann C, Gombert A.K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol*. 79(3): 339-354.

Frankel E.N, Meyer A.S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J Sci Food Agric*. 80: 1925-1941.

Gazi M.R, Hoshikuma A, Kanda K, Murata A, Kato F. (2001). Detection of free radical scavenging activity in yeast culture. *Saga Daigaku Nogakubu Iho*. 86: 67-74.

Giese J. (1996). Antioxidants: Tools for preventing lipid oxidation. *Food Technol*. 50: 72.

Gordon M.H. The development of oxidative rancidity. (2001) En: *Antioxidants in Food – Practical Applications* (eds. J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon). CRC Press, Washington, pp. 7-22.

Gordon R.L. (1946) *Food Packaging: Principles and Practice*. 3<sup>a</sup> ed. CRC Press. 295-296.

Halliwell, B. Chirico S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*57: 715.

Halliwell, B. Gutteridge J.M.C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. 3rd Oxfrd, United Kingdom: Ed. Oxford University Press.

Haumann B. (1990). Antioxidants: Firms seeking products they can label as “natural”. *INFORM*. 1:1002.

Hazemm M.M. (2011). Antioxidant and immunostimulating activities of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) autolysates. *World Appl. Sci. J*. 15(8): 1110-1119.

Herrero E, Ros J, Belli G, Cabiscol E. (2007). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta*. 64:1518–1530.

Imai Y, Yazawa S, Suzuki K, Yamaguchi Y, Shibazaki M, Saito T. (1989). Active oxygen-removing Q-1047R and its fermentative and synthetic manufacture. *Jpn Kokai Tokkyo Koho*. 12.

In M.J, Kim D.C, Chae H.J. (2005). Downstream process for the production of yeast extract using brewer's yeast cells. *Biotechnol. Biopro. Eng*. 10: 85-90.

Jaythilakan K, Sharma G.K. (2006). Role of sugar-amino acid interaction products (MRPs) as antioxidant in methyl linoleate model system. *Food Chem*. 95: 620-626.





Jollow D.J, Mitchell J.R, Zampaglione N, Gillete J.R. (1974). Bromobenzene-induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite. *Pharmacol.* 11: 151-169.

Kansci G, Genot C, Gandemer G. (1994). Evaluation of antioxidant effect of carnosine on phospholipids by oxygen-uptake and TBA test. *Sci. Aliments.*14: 663.

Kawamukai M. (2002). Biosynthesis, bioproduction and novel roles of ubiquinone. *J Biosci Bioeng.* 94(6): 511–517.

Kohen R y Nyska A. (2002). Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 30(6): 620-650.

Kuklinski C. (2003). *Nutrición y bromatología*, Omega, España.

Kumaran A, Karunakaran R.J.(2007). *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus species* from India. *LWT-Food Science and Technol.* 40(2): 344-352.

Kumari D.K, Gangwar M, Kumar A.S, Bushan Y.T, Shankar J.T, Tiwari S. (2012). Evaluation of *in vitro* antioxidant capacity and reducing potential of polyherbal drug-Bhāraṅgādi. *Anc Sci. Life.* 32(1): 24-28.

Lee JY, Hwang W.I, Lim S.T. (2004). Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle roots. *J. Ethnopharmacol.*, 93: 409-415.

Li Y, Chen J, Zhou N, Fu W, Ruan W, Lun S. (1998). Effects of amino acids and yeast extract on glutathione production. *Chin. J. Pharm.* 29: 537-542.

Li Y, Wei G, Chen J. (2004). Glutathione: a review on biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 233-242.

Lima E.S, Abdalla D.S.P. (2001). Peroxidação lipídica: Mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Bras. Cienc. Farm.* 37: 293-303.

Lindenschmidt R.C, Trika A.F, Guard M.E, Witschi H.P. (1986). The effect of butylated hydroxytoluene on liver and colon tumor development in mice. *Toxicol.* 38(2): 151-160.

Magalhaes L.M, Segundo M.A, Reis S, Lima J.L. (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta.* 613: 1-19.

Manzocco L, Calligaris S, Mastrocola D, Nicoli M, Lericci C. (2011). Review of nonenzymatic browning and antioxidant capacity in processed food. *Trends Food Sci Tech.* 11: 340-346.





Manzoor A, Sowriappan J, Shabir A. (2014). Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Science*. 98 (1): 21-33.

Mathew S, Abraham T.E. (2006). Studies on the antioxidant activities of Cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. *Food Chem*. 94: 520-528.

Medina I. (2010). Antioxidantes naturales en alimentos ricos en ácidos grasos  $\omega$ -3. En Ruiz, D., Moure, A., (comp.), *Antioxidantes naturales. Aspectos saludables, toxicológicos y aplicaciones industriales*. Santiago de Compostela.

Meister A. (1995). Glutathione metabolism. *Methods Enzymol*. 251: 3-13.

Mesiter A, Tate S. (1976). Glutathione and related  $\gamma$ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annu. Rev. Biochem*. 45: 559-604.

Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrilhydracyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 26(2): 211-219.

Nagodawithana T. (1992). Yeast-derived flavors and flavor enhancers and their probable mode of action. *Food Technol*. 46: 138-144.

Nagodawithana, T. (1994). Savoury flavors. In: *Bioprocess production of flavour fragrance and color ingredients* (Ed. A. Gabelman), John Wiley and Sons, New York. p. 135-168.

Nawar W.W y Fennema O.R. (1985). "Lipids in Food Chemistry". New York: Marcel Dekker, Inc. p. 139-244.

Ohkowa M, Ohisi N, Yagi K. (1979). *Anal. Biochem*. 95: 351-358.

Ok T, Lin N.N, Zaima T, Nakajima H. (2003). Para-aminobenzaldehyde produced by yeast *Zygosaccharomyces rouxii* and its antioxidant activity. *Abstr Gen Meet Am Soc Microbiol*. 103: 0-09.

Padilla S, Jonassen T, Jimenez H.M.A, Fernandez D.J.M, Lopez G, Marbois B, Navas P, Clarke C.F, Santos O.C. (2004). Demethoxy-Q, an intermediate of coenzyme Q biosynthesis, fails to support respiration in *Saccharomyces cerevisiae* and lacks antioxidant activity. *J Biol Chem*. 279(25): 25995-26004.

Penninckx M.J. (2002). An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Rese*. 2(3): 295-305.

Peppler H.J. (1982). Yeast extracts. In: *Economic Microbiology*, Vol.: 7, Academic Press, London, pp. 293-312.





- Perego P, Weghe J.V, Ow D.W, Howell D.W. (1997). Role of determinants of cadmium sensitivity in the tolerance of *Schizosaccharomyces pombe* to cisplatin. *Mol. Pharmacol.* 51: 12-18.
- Perrone G.G, Grant C.M, Dawes I.W. (2005). Genetic and environmental factors influencing glutathione homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 16: 218–230.
- Phisut N, Jiraporn B. (2013). Characteristics and antioxidant activity of Maillard reaction products derived from chitosan-sugar solution. *IFRJ.* 20(3): 1077-1085.
- Potter N.N, Hotchkiss J.H. (1998). *Food science.* 5<sup>a</sup> ed. Aspen publishers.113.
- Rajalakshmi D, Narasimhan S. (1996). Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In: *Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives* (D. L. Madhavi, S. S. Desphande, and D. K. Salunkhe, eds.). Dekker, New York. p. 65.
- Ramalho V.C, Neuza J. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quím. Nova.* 29 (4): 755–760.
- Rashad M, Mahmoud A, Abdou H, Nooman M. (2011). Improvement of nutritional quality and antioxidant activities of yeast fermented soybean curd residue. *Afr. J. Biotechnol.* 10(30): 5750-5759.
- Reische D.W, Lillard D.A, Eitenmiller R.R. (2002). Antioxidants in: *Food Lipids* (eds. CC. Akoh, D.B Min). Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, p. 489-541;
- Revillion J.P.P, Brandelli A, Zachia M.A. (2003). Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus*. *Brazilian Arch. Biol Biotechnol.* 46(1): 121-127.
- Rodríguez A, Lozada V, Larraín M.A, Quitral V, Vinagre J, Aubourg S.P.(2007). Development of lipid changes related to quality loss during the frozen storage of farmed coho salmon. *JAACS.* 84: 727-734.
- Roginsky V y Lissi E.A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* 92: 235-254.
- Ruch R.T, Cheng S.J, Klaunig J.E. (1984). *Methods Enzymol.* 5: 198-209.
- Sakato K, Tanaka H. (1992).Advanced control of glutathione fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.* 40: 904-912.
- Saksinchai S, Suphantharika M, Verduyn C. (2001). Application of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki: a physiological study. *World J Microbiol Biotechnol.* 17:307–316.





Schwarz K, Huang S, German J, Tiersch B, Hertmann J, Frankel N. (2000). Activities of antioxidants are affected by colloidal properties of oil-in-water and water-in-oil emulsions and bulk oils. *J. Agric. Food Chem.* 48:4874-4882.

Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic Res.* 36(2): 177-187.

Sgarbieri, V. Alvim I, Vilela E, Baldini V, Bragagnol N. (1999). Produção Piloto de Derivados de Levedura (*Saccharomyces* sp.) para uso como Ingrediente na Formulação de Alimentos. *Brazilian Journal Food Technol.* 2: 119-125.

Shahidi F, Amarowilz R. (1996). Antioxidant activity of protein hydrolysates from aquatic species. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 1197.

Shahidi F, Janitha P.K, Wanasundara P.D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition.* 32: 67-103.

Shivkumar S, Venkatesh R, Sood D. (2011). A review of the physiological implications of antioxidants in food. [Interactive qualifying project report] Worcester: Worcester Polytechnic Institute. Faculty of science. Department of Chemistry and Biochemistry.

Sollod C.C, Jenks A.E, Daub M.E. (1992). Cell Surface redox potential as a mechanism of defense against photosensitizers in fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 444-449.

Sommer R. (1996). Yeast autolysate. The 9th International Symposium on Yeast, Sydney.

Spiteller G. (2001). Lipid peroxidation in aging and age-dependent disease. *Exp Gerontol.* 36: 1425-1457.

Stam H, Hoogland M, Laane C. (1998). Food flavours from yeast. In: Wood BJ (ed) *Microbiology of Fermented Foods.* Vol 2, 2nd edn. London: Blackie. p. 505-542.

Sugawara E. (2001). Formation by yeast of the aroma component specific to miso and soy sauce. *Foods Food Ingrid J Jpn.* 193: 57-65.

Suzuki T, Sugawara E, Kobayashi H. (2003). Hydroxy ethyl or methyl furanone, a flavor component of soy sauce is mutagen or antimutagen? Dual inhibitory and promotive effect and its mechanism in mutation tests. *Aroma Res.* 4(3): 280-284.

Tanguler H y Erten H. (2008). Utilisation of spent brewer's yeast for yeast extract production by autolysis: The effect of temperature. *Food and Bioproducts Processing.* 86: 317-132.

Wagner K.H, Derkits S, Herr M, Schuli W, Elmadfa I. (2002). Antioxidative potential of melanoidins isolated from a roasted glucose-glycine model. *Food Chem.* 78: 375-382.





Walker G.M. (1998). *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Wiley and Sons, Chichester. p. 265-320.

Walker G.M. (1999). *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Wiley and Sons, Chichester. p. 350.

Wasowicz E, Gramza A, Hés M, Jelén H.H, Koczak J, Malecka M, Szkudlarz S.M, Rudzińska M, Samotyja U, Wojtasiak R.Z. (2004). Oxidation of lipids in food. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 13(54): 87-100.

Wei G, Li Y, Chen J. (2003). Effect of surfactants on extracellular accumulation of glutathione by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem.* 38: 1133-1138.

Zhang P y Omaye S. (2000).  $\beta$ -caroteno and protein oxidation; effect of ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol. *Toxicology.* 146:37-47.

