

15.43
557e
979
-CC.GG.

095728

Ej. 3.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

ELABORACION DE TABLETAS DE LEVADURA
CANDIDA UTILIS, OBTENIDA EN MELAZA DE CAÑA
PARA NUTRICION HUMANA

TRABAJO PRESENTADO POR

MARIA HERMINIA HERNANDEZ CEDILLOS

PREVIO A LA OPCION DEL TITULO DE

LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

SEPTIEMBRE DE 1979



SAN SALVADOR,

EL SALVADOR,

CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

LICENCIADO JOSE LUIS ARGUETA ANTILLON

SECRETARIO

LICENCIADO OSCAR ARMANDO ACEVEDO

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

DOCTOR ATILIO AVENDAÑO SUAREZ

SECRETARIA

DOCTORA LUZ MARTINEZ DE MIRALDA

A S E S O R

DOCTORA CONCHA LEMUS DE BENDIX

J U R A D O C A L I F I C A D O R

DOCTORA LEONOR ISABEL DE LINARES

DOCTORA MERCEDES RAMOS

INGENIERO MARIA DEL CARMEN DE MEDRANO

L U G A R D E P R A C T I C A S

FACULTAD DE MEDICINA Y

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso,

A mi esposo: Ricardo Alfonso Luna,

A mis hijos: Miriam Esther y

David Ricardo,

A mis padres: Joaquín Hernández T.,

Herminia C. de Hernández

A mis hermanos: Joaquín, Salvador,

Mauricio, Vilma,

Gloria y Marta Lilian, y

A mis sobrinos.

A G R A D E C I M I E N T O S

A mis Maestros: Doctora Concha Lemus de Bendix, Doctora Leonor Isabel de Linares, Ingeniero María del Carmen Guillén de Medrano y Doctora Mercedes Ramos, por su asesoramiento, revisión y corrección de este trabajo.

A la Doctora Aura Alida Valladares ; Licenciadas Delmy Ruth Agreda de Lima y Maribel Odette López, por su valiosa colaboración.

Al personal Docente y Administrativo del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina y de nuestra Facultad, por su enseñanza y ayuda.

A mis familiares, compañeros y amigos. por su constante aliento.

Gracias

INDICE DE CONTENIDO

CAPITULO	PAG.	
I	INTRODUCCION	
	A. OBJETIVO	2
	B. REVISION BIBLIOGRAFICA	5
II	PARTE EXPERIMENTAL	
	A. MATERIALES Y EQUIPO UTILIZADO	19
	B. METODO MICROBIOLOGICO EMPLEADO PARA LA PREPARACION Y CONSERVACION DE LA CEPA	23
	C. METODO MICROBIOLOGICO EMPLEADO PARA PROPAGACION DE LEVADURA CANDIDA UTILIS	30
	D. METODO DE ELABORACION DE TABLETAS	35
	E. METODO PARA APLICAR PELICULA DE RECU- BRIMIENTO DE LAS TABLETAS DE LEVADURA	37
	F. DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE PROTEI- NAS EN TABLETAS DE LEVADURA CANDIDA - UTILIS	38
	G. ADMINISTRACION DE LEVADURA A RATONES Y EVALUACION TOXICOLOGICA	40
III	METODOLOGIA	43

	PAG.
IV RESULTADOS	51
V DISCUSION	57
VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	69
APENDICE	73
BIBLIOGRAFIA	78

I N D I C E D E T A B L A S

TABLA		PAG.
I	COMPOSICION DE PROTEINAS Y AMINOACIDOS ESENCIALES A PARTIR DE DIFERENTES FUENTES	14
II	COMPOSICION COMPARATIVA DE VITAMINAS PRE- SENTES EN DIFERENTES FUENTES (Mg. %)	15
III	FERMENTACION DE COMPUESTOS HIDROCARBONADOS POR LEVADURA CANDIDA UTILIS OBTENIDA EN MEDIO AGAR MELAZA DE CAÑA	51
IV	ASIMILACION DE COMPUESTOS HIDROCARBONADOS POR LEVADURA CANDIDA UTILIS	52
V	ANALISIS PROMEDIO DE LEVADURA CANDIDA UTILIS OBTENIDA A PARTIR DE MELAZA DE CAÑA, CALCULO EN BASE SECA EXPRESADA EN (%)	53
VI	RENDIMIENTO OBTENIDO	53
VII	PORCENTAJE DE PROTEINAS PRESENTES EN CANDIDA UTILIS (MATERIA PRIMA) OBTENIDA EN AGAR MELAZA DE CAÑA	54
VIII	PORCENTAJE DE PROTEINAS PRESENTES EN CADA TABLETA DE CANDIDA UTILIS	55

TABLA		PAG.
IX	COMPARACION ENTRE RATONES ALIMENTADOS CON LEVADURA CAJONERA UTILIS MAS TORTILLA Y RATONES ALIMENTADOS CON PURINA	56
X	COMPAÑIAS QUE PROCESAN SCP	67

I N D I C E D E I L U S T R A C I O N E S

FIGURA No.		PAG.
1	CANDIDA UTILIS DESPUES DE 3 DIAS EN EXTRACTO DE MALTA	9
2	CULTIVO EN PLACA EN AGAR HARINA DE MAIZ	9
3	LEVADURAS EN GEMACION ACTIVA	9
4	CULTIVO DE CANDIDA UTILIS EN MELAZA DE CAÑA	32
5	FORMA DE RECOLECTAR LA LEVADURA	32
6	LEVADURAS LAVADAS OBTENIDAS DEL CULTIVO AGAR MELAZA DE CAÑA	34
7	POLVO DE LEVADURA CANDIDA UTILIS	36
8	RATONES ALIMENTADOS CON LEVADURA Y TORTILLA	41

I N T R O D U C C I O N

A. OBJETIVO.

El presente trabajo tiene como finalidad primordial el estudio de factibilidad del aprovechamiento para consumo humano de la levadura comestible Candida utilis producida en melaza de caña y preparada en forma de tabletas.

La levadura tiene propiedades como: un alto contenido de proteínas y de vitaminas del complejo B y carece de toxicidad para animales y humanos, por lo cual amerita que se investigue la posibilidad de que sea administrada en la dieta de nuestro pueblo. Además, su estabilidad bioquímica y capacidad para transformar una amplia variedad de sustancias de desechos hidrocarbonados indica que puede aprovecharse a escala industrial.

Nuestro interés es mejorar la situación nutricional de la población de El Salvador y otros países de América Latina. La creciente demanda de alimentos como resultado del aumento poblacional, -- ha establecido en Centro América y en especial en El Salvador, -- una escasa disponibilidad de alimentos, en particular de aquellos que tradicionalmente constituyen fuentes de proteína. Esta situación se agrava por el aumento progresivo del costo de dichos alimentos, tanto para la alimentación humana como animal, y por el -- agotamiento paulatino de los terrenos cultivables. Eso repercute

negativamente en el estado nutricional de la población, en especial los niños, y contribuye a agravar los problemas de salud del área.

La producción de proteínas para consumo humano a partir de organismos que se multiplican rápidamente y cuya producción no requiere tierras agrícolas ni personal numeroso y que usan como substratos, residuos industriales tales como: melaza de caña, miel de remolacha, pulpa de café, jugo fermentado de cactus, vinazas, hidrocarburos derivados del petróleo, presenta múltiples ventajas para países con los problemas mencionados.

Existen varios tipos de microorganismos que se utilizan para la producción de alimentos tales como algas, hongos miceliales y levaduras.

De acuerdo con nuestra investigación bibliográfica, en El Salvador se han realizado muy pocos estudios referente a la producción de alimentos de origen unicelular. La consideración del potencial que como fuente de proteínas representan, ha motivado nuestro interés para la realización del presente trabajo con la levadura Cándida utilis utilizando melaza de caña, la cual es abundante, de fácil obtención y de bajo costo en nuestro medio. Su fácil asimilación por la levadura y su conversión en proteínas y vitaminas, es una de sus mayores ventajas como substrato. Por las razones mencionadas, esta levadura podría resultar de bajo costo

para el consumidor.

Reportamos los datos obtenidos de su investigación a nivel de laboratorio, con el fin de proporcionar los métodos necesarios y -- las bases de trabajo para desarrollar un plan piloto, que poste-- riormente podría ser utilizado a escala industrial.

Se ha preparado la levadura en forma de tabletas, lo cual facilitaría su autoadministración. Después del proceso, los análisis -- químicos han mostrado que conserva su contenido de proteínas y vi taminas y que su sabor es agradable al paladar.

Para hacer este trabajo se tomó muy en cuenta los estudios rea-- lizados por el Instituto de Nutrición para Centro América y Panamá (INCATM), donde se explica que la solución a la deficiencia -- proteínica en Centro América se reduce a encontrar una fuente de proteína de alto valor biológico en forma concentrada, de elaboración económica y a través de un proceso fácilmente adaptable a la región.

Esperamos que esta experiencia sea de utilidad para las personas que trabajan en este campo y que motive su uso en humanos para re solver el problema de nutrición de nuestra población.

B. REVISION BIBLIOGRAFICA.

1. DATOS HISTORICOS Y PERSPECTIVAS.

John H. Litchfield en su publicación "Microbial Cells on Your Menu" 1/ afirma que todos nosotros comemos células microbianas contenidas en los productos horneados, quesos, leches agrias, salsas fermentadas, hongos y varios productos alimenticios -- orientales. Las células microbianas que consumimos en los -- alimentos incluyen: algas, bacterias y hongos. Otras células microbianas vivientes están involucradas en el desarrollo de las características de sabor y aroma de nuestros alimentos. - Tales alimentos han sido consumidos por el hombre desde tiempos antiguos; sin embargo, la tecnología de producción de células microbianas para alimento se ha desarrollado solamente en los últimos 100 años, y su producción en gran escala ha recibido impulso en el Siglo XX, particularmente después de la Primera Guerra Mundial.

Perspectivas Futuras.- El principal objetivo de cualquier -- proceso para la producción de material de células microbianas como alimento, es alcanzar la máxima productividad (concentración celular por promedio de crecimiento específico), y el coeficiente de producción (peso seco de células o proteína por

1/ John H. Litchfield, "Microbial Cells on Your Menu",
CHEMTECH, p. 218, **Ab**, 1978.

unidad de peso de sustrato) y, además, obtener un producto - que tenga una proporción de aminoácidos que se comporte adecuadamente como alimento en animales domésticos y que no tenga residuos de sustancias tóxicas o carcinogénicas. Para la aplicación en la alimentación humana, los requisitos adicionales - de bajo contenido de ácidos nucleicos, un buen color, sabor, - aroma y textura, también son necesarios.

Para alcanzar los objetivos principales, habrá que lograr productividades y rendimientos económicamente atractivos. Sin embargo, pueden haber limitaciones en cuanto al costo, que pueden incurrir en la producción de un producto de proteína unicelular al no poder competir con proteínas provenientes de plantas de cosecha o de fuentes de producto animal, tales como harina de soya y harina de pescado.

Los organismos tolerantes de altas temperaturas en rango termofílico minimizarían los costos de enfriamiento en muchos procesos. El perfeccionamiento de los métodos de obtención, tales como la oxigenación adecuada del medio de crecimiento, tendrán como consecuencia producir el material unicelular deseado con el mínimo de consumo de energía. Esto sería un factor económico importante para aumentar el interés de los sectores industriales en los procesos de producción de células microbianas.^{1/}

^{1/} Ibid, p.222

Desde el punto de vista de la alimentación humana, ha habido - considerable actividad para estudiar la calidad de la proteína de origen unicelular aislada de células microbianas y para modificar estos productos, a fin de mejorar su funcionalidad y - reducir su contenido de ácidos nucleicos. El extracto de proteínas de levadura usado en panificación y el glican de esa levadura, han sido aprobados para el uso como aditivos de alimentos en los Estados Unidos. 1/

En Brasil se ha producido a escala industrial levadura Torula utilis usando residuos líquidos de la fermentación alcohólica (vinazas), la cual ha sido investigada en el Instituto de Antibióticos de Recife. Se ha usado principalmente en la preparación de alimentos para aves de corral. 2/

Las células microbianas tienen actualmente un lugar en las reservas alimenticias mundiales para animales y humanos. En el futuro su importancia será mayor, ya que es razonable esperar que una porción sustancial de las proteínas para alimento humano y animal, será derivada de fuentes microbianas. Su uso va a depender de su capacidad para competir en precio, disponibilidad y calidad, con otros alimentos animales o vegetales. So

1/ Ibid, p. 222

2/ Moisés Behar y Ricardo Bressani, Recursos Proteínicos en América Latina (Memoria), INCAP, Dc 1970, p. 314.

lamente a través de investigaciones continuas y del desarrollo de esfuerzos de todos los países, se podrán desarrollar mejores procedimientos de producción de células microbianas para cubrir una parte de las necesidades de alimento mundial en el futuro. 1/

2. DESCRIPCION DE LA LEVADURA.

Las células de levadura Cándida utilis pueden medir entre 3.5 a 4.5 micras de ancho por 7 a 13 micras de largo. Es un organismo monocelular que se presenta en forma ovoide o cilíndrica, siendo su estructura interna muy compleja. Se reproduce en forma vegetativa, exclusivamente por gemación (ver Fig. 1 y 3). En medio agar harina de maíz, después de la gemación, permanecen unidas gran número de células, formando un pseudomicelio (Fig. 2). 2/

En cultivo puro las células individuales ofrecen notable variedad en el tamaño y la forma, según la edad y el medio. La pared celular es muy fina en las células jóvenes, pero se va haciendo más gruesa con la edad. Las levaduras viejas contienen sustancias nutritivas de reserva, como hidratos de carbono, grasas y proteínas; sus paredes gruesas las hacen ex-

1/ Litchfield, Op. Cit. p.222

2/ J. Lodder, The Yeast, a Taxonomic Study, 2a. Edición, Neri Holland Publishing Company, Amsterdam, 1970. p. 1064-1065

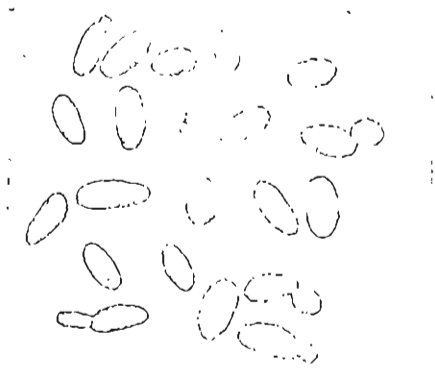


Fig.1
 CANDIDA UTILIS, Después de
 3 días en Extracto de Malta.
 The Yeast, Ed.I. 1952

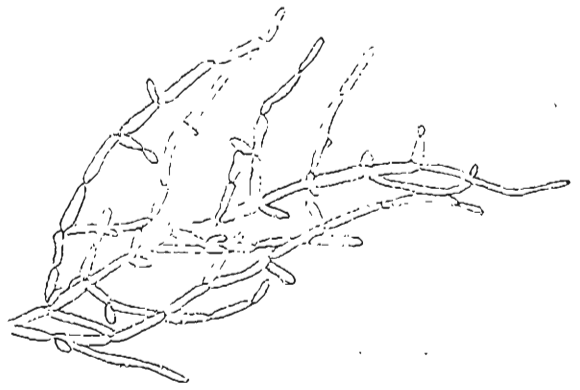
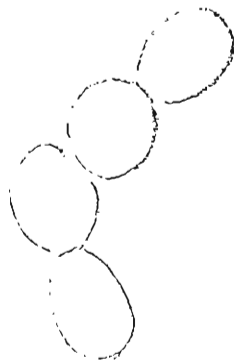
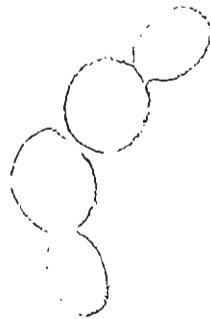


Fig.2
 Cultivo en placa en Agar Harina
 de Maíz.

A



B



D

Fig.3
 Las Levaduras en Gemación Activa producen células hijas maduras en unos 30 minutos. Estas fotografías se tomaron con intervalos de 10 minutos. La célula de levadura puede producir por gemación, durante el curso de su vida, unas 24 generaciones de células.

cepcionalmente resistentes a las condiciones desfavorables de calor, luz, desecación y acción química. 1/ Tienen las características de ser fermentativas, pueden formar película y pueden presentar pseudomicelio. 2/

Lodder J. (1970) y Frazier, W. C. (1976) clasificaron esta -- levadura de la siguiente manera: 3/, 4/

Nombre Científico:	CANDIDA UTILIS
División:	Hongos
Filum:	Eumicetos
Clase:	Deuteromicetos
Orden:	Criptococales
Familia:	Criptococáceas
Subfamilia:	Criptococoideas
Género:	Cándida
Especie :	Utilis

1/ M. J. Peleazar. Microbiología. 2a. Edición. Madrid, - España. Ediciones Castilla, S.A. 1966. p. 215.

2/ W. C. Frazier. Microbiología de los Alimentos. Zaragoza, España. Editorial Acribia. 1976. pp. 38-39.

3/ Lodder, Op. Cit., p. 1064.

4/ Frazier, Op. Cit. p. 39

Sinónimos: 1/

<u>Torula utilis</u>	Henneberg 1926
<u>Torulopsis utilis</u>	(Henneberg) Lodder 1934
<u>Cryptococcus utilis</u>	(Henneberg) Anderson et Skinner, 1947
<u>Candida guilliermondii</u> (Cast).	Langeron et Guerra var. Nitratophilia Diddens et Lodder, 1942.
<u>Torulopsis utilis</u>	(Henneberg) Lodder var. Major Thaysen et Morris 1943.

3. VALOR NUTRICIONAL.

El valor nutricional de esta levadura se puede estudiar por varios métodos; uno de ellos es el contenido de nitrógeno asimilable y por medio de ensayos a corto plazo de alimentación en ratas, destinados a probar la eficiencia de absorción y utilización de un contenido en nitrógeno. 2/

Los alimentos de origen unicelular están compuestos principalmente por proteínas con cantidades variables de ácidos nucleicos, carbohidratos, grasas, agua y otros elementos como fósforo y potasio. La composición específica depende del orga--

1/ Lodder, Op. Cit., p. 1064.

2/ G. D. Kapsiotis. Los Alimentos Obtenidos a Partir de Residuos y Consideraciones Nutricionales, Alimentación y -- Nutrición, Volumen 3:2, p. 14, 1977.

nismo en particular utilizado y del medio standarizado sobre el cual crece. 1/

Cuando es convenientemente producida y tratada, estas sustancias no son tóxicas ni alergénicas, y son nutritivas para -- animales y para humanos. Tienen alto valor nutritivo y su -- calidad es comparable a las proteínas provenientes de la soya y por lo tanto, pueden tener particular utilidad en la fortificación de los alimentos. 2/

Weslien, Calloway y Margen, recomiendan que el ser humano promedio no debe consumir más de 2 gms diarios de ácido ribonucleico, para que el contenido de ácidos nucleicos en la sangre no sobrepase de 7.0 mg por 100 ml y 1000 mg por día en la orina; por lo tanto, el suplemento diario de proteínas de origen unicelular acompañando dietas bajas en proteínas, no debe ser mayor de 20 gms. diarios, siempre que las levaduras contengan aproximadamente 1 a 2 gms. de ácidos nucleicos por cada 10 gms de proteína. 3/

1/ D. D. MacLaren. Single-Cell Protein - An Overview. CHEM-TECH, Oc.1975. p. 594.

2/ Ibid, p. 596.

3/ Moisés Behar y Ricardo Bressani. Recursos Proteínicos en América Latina (Memorias), INCAP, Guatemala. Dc.1970, p. 311.

Según el Departamento de Salud, Educación y Bienestar, Servicio de Salud Pública de la Administración de Alimentos y Drogas, la levadura torula (CAMBIDA UTILIS) puede ser usada sin riesgo en alimentos, toda vez que el contenido total de ácido fólico no exceda 0.04 mg por gm de levadura (aproximadamente 0.008 mg de ácido pteroylglutámico por gm de levadura. 1/

Su valor nutricional puede demostrarse en las tablas 1 y 2.

En la tabla I se especifica la composición de proteínas y aminoácidos esenciales (% en peso) a partir de diferentes -- fuentes, observándose que en levadura torula obtenida en melaza de caña, en cuanto a proteínas es comparable con el contenido de proteína-vitamina BP, y es ligeramente mayor que el contenido de proteínas de la leche de vaca y harina de trigo, y es ligeramente menor que la res; observándose además, que es rica en lisina triptofano y pobre en metionina, aminoácidos que son limitantes de cereales y legumbres.

En la Tabla II se especifica la composición de vitaminas en mg % a partir de diferentes fuentes, observándose que la levadura Cándida utilis obtenida en melaza de caña supera a estos alimentos en lo que se refiere al contenido de vitaminas: Thiamin, riboflavina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, pero carece de la vitamina B12 o cobalamina.

1/ Departamento de Salud, Educación y Bienestar, Servicio de Salud Pública, Administración de Alimentos y Drogas, Rockville, Maryland 20852, 1972 (Sec.121.1125).

TABLA I
COMPOSICION DE PROTEINAS Y AMINOACIDOS ESLENCIALES (% EN PESO) A PARTIR DE
DIFERENTES FUENTES
(Base Seca)

	Harina de Trigo	Res	Leche de Vaca	Levadura Torula (seca)ob tenida en Molaza de Caña	Concentrado de Proteína- Vitamina BP (Levadura)
Proteína Base Seca	13.2	59.4	33.1	44.4	43.6
<u>Aminoácidos Esencia- les (%/peso)</u>					
Leucina	7.0	8.0	11.0	7.6	7.0
Isoleucina	4.2	6.0	7.8	5.5	3.05
Valina	4.1	5.5	7.05	6.0	8.40
Treonina	2.7	5.0	4.7	5.4	9.10
Metionina	1.5	3.2	3.2	0.8	1.20
Cistina	1.9	1.2	1.0	1.0	0.10
Lisina	1.9	10.0	8.7	6.8	11.60
Arginina	4.2	7.7	4.2	4.1	8.0
Histidina	2.2	3.3	2.6	1.7	8.10
Fenil-Alanina	5.5	5.0	5.5	3.9	7.90
Triptofano	0.8	1.4	1.5	1.6	1.17

Champagnat, Vernet, C. Lainé, B. and Filicez, J. Biosynthesis of Protein
Vitamin Concentrates from Petroleum Nature 197 (4862). 1963, p. 14.

TABLA II
 COMPOSICION COMPARATIVA EN VITAMINAS (Mg %)

	Thiemia B1	Ribofla- na B2	Acido Ni- cotínico P. P.	Acido Pan- toténico	Fyridoxi- na B6	Cobelamina B12
Mínimo Diario p/ humano adulto mg/kg	2	3	15	3	2	0.01
Levadura Seca C. utilis obtenida en melaza de caña	2 - 20	30-60	200-500	30-200	40-90	
Levadura obtenida del petróleo	3- 16	75	180-200	150-192	23	0.11
Hígado	5 - 10	16	75-275	30- 60	5	8
Leche	0.3-07	1 - 3	1- 0	1- 4	1-3	
Cereales	0.5-7	10-15	10 -30	5 - 20	3- 6	

Carlos Da Silva Laccas, Op. Cit. p. 122.

4. EVALUACION DE LA LEVADURA TORULA PARA CONSUMO HUMANO.

La levadura torula se ha usado en pequeñas cantidades en la dieta humana por muchos años, como suplemento de proteínas y vitaminas. Levadura Torula seca producida por Lake States Division, Rhinelander, Wisconsin, se usó para alimentar a estudiantes del MIT en adición a su dieta regular, por un período de 6 a 11 semanas.

La levadura fue administrada de la siguiente manera: 11 recibieron 45 gms, 27 recibieron 90 gms, y 12 recibieron 135 gms de levadura diariamente.

En general fue bien aceptada y no se observaron disturbios -- gastrointestinales; 12 de los 50 estudiantes desarrollaron una moderada descamación de las palmas de las manos y de los pies, indolora, después de las primeras 3 ó 4 semanas. Esta descamación no fue progresiva ni empeoró y desapareció pronto, después del experimento. Se preparó un antígeno de la levadura, pero éste no dió ninguna reacción dérmica a ninguno de los sujetos.

3 de los sujetos que consumieron 45 y 90 gms. tuvieron concentraciones finales de ácido úrico abajo de 7 mg/100; 7 de los que consumieron 45 gms, 7 de los que consumieron 90 gms. y 7 de los que consumieron 135 gms tuvieron niveles de ácido úri-

co arriba de 8.0 mgs/100 ml.

La excreción urinaria de ácido úrico aumenta variablemente con el consumo de levaduras. La digestibilidad y el valor proteínico de la levadura son buenos, pero hay limitación con respecto a las cantidades que deben ser consumidas diariamente por el hombre. 1/, 2/.

Se necesitan extensos estudios sobre la seguridad del producto para satisfacer los requerimientos de las agencias reguladoras, antes de que el producto sea autorizado para consumo humano. 3/

1/ The United States Pharmacopeia. Nineteenth Revision -- (USP XIX). p. 758.

2/ Evaluation of Torula Yeast for human consumption. U. Udo, V. Young, J. Edozien, and N. Scrimshaw. MIT. Cambridge.

3/ Litchfield, Op. Cit, p. 221.

PARTE EXPERIMENTAL

A. MATERIALES Y EQUIPO UTILIZADO.

1. MATERIALES

Tubos de ensayo 120 x 75 mm.

Cajas de Petri

Botellas Roux

Láminas de Acero Inoxidable

Erlenmeyer de 3000 ml

Erlenmeyer de 125 ml

Frascos Goteros

Mecheros de gas

Probetas de 1000 ml

Probetas de 100 ml

Balones de 100 ml

Balones Kjeldahl

Vidrio de reloj pequeño

Espátulas pequeñas

Espátulas grandes

Gradillas de madera

Asas Bacteriológicas

Beaker 1000 ml

Beaker 50 ml

Beaker 25 ml

Frascos para centrífuga

Pipetas volumétricas 5 ml

Pipetas Mohr 25 ml

2. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

a. Para método Microbiológico

Cepa de *CANDIDA UTILIS* #9226 obtenida de "America Type Cultural Collection" especial para la alimentación.

Melaza de caña

Fosfato de Amonio dibásico

Agar-Agar "Difco"

Fosfato de amonio dibásico

Agar dextrosado de Sabouraud "Difco"

Caldo dextrosado de Sabouraud "Difco"

Agar sangre extracto de buey BBL

Yeast nitrógeno base BBL

Azul de bromotimol

Agar harina de maíz "Difco"

Agua destilada

Solución salina 0.85%

Solución de Gram

Aceite de inmersión

Cristal violeta

Glucosa BBL

Maltosa BBL

Sucrosa BBL

Lactosa BBL

Dextrosa BBL

Galactosa BBL

Rafinosa BBL

b. Para elaboración de tabletas

Almidón desecado

Lactosa desecada

Estearato de magnesio

PVP

Alcohol

Color para dulces

Shelac orange (laca)

Sílica Gel

c. Para método analítico (determinación de proteínas)

Oxido de mercurio

Sulfato de potasio

Acido sulfúrico concentrado

Parafina

Soluciones de sulfato de potasio al 8%

Granallas de zinc

Solución de hidróxido de sodio al 45%

Rojo de metilo

Hidróxido de sodio 0.1 N

Acido sulfúrico 0.1 N

Sílica Gel.

d. Animales de experimentación

Ratones (+)

3. EQUIPO

Cristalería en general

Balanza granataria

Balanza analítica Metler H78AR

Estufa Thelco Modelo 16

Refrigerador

Centrífuga

Autoclave de construcción vertical Modelo B-C-H, Webeco

Microscopio Leitz

Cocina

Aparato de Kjeldahl

Horno

Desecador

Tamices de diferentes mallas

Máquina tableteadora de 12 punzones rotativos, Hanseat Wilhelm fette.

Granulador en seco tipo TG 115

Desintegrador Erweka - Apparatebon 6 m.b.h.

(+) Ratones blancos proporcionados por el Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina

Heusentaman Kr. Offenbach/Main, made in Western Germany, Type VZ4 N° 19787, W: 80 A-V: 110 Hz: 50.

Friabilizador (aparato para el ensayo de comprimidos al desgaste por rodadura y caída), Erweka, tipo TA3.

Durómetro tipo TB24, Erweka, (Probador de resistencia de rotura para tabletas)

Bombo de pulir tipo PT Erweka

Caldera para grageas tipo DK/UG Erweka

Motor universal AR 400 o KUD

Pulverizador Laboratory Pulverizing mill, Med by Weber Bross & White Metal Works, Inc., Chicago, Ill.

B. METODO MICROBIOLOGICO EMPLEADO PARA LA PREPARACION Y CONSERVACION DE LA CEPA.

1. DESCRIPCION DE LA CEPA DE LEVADURA CANDIDA UTILIS

La cepa CANDIDA UTILIS #9226 con que se trabajó fue proporcionada por la ATCC 1/ y es la que se ha utilizado para alimento. Viene liofilizada dentro de un frasco vial-doble.

2. INDICACIONES PARA ABRIR EL FRASCO (VIDRIO BLANDO).

a. Se calentó vigorosamente el extremo final externo del contenedor, en la llama de un mechero bunsen y se mantuvo inmóvil por un corto período de tiempo, se añadió dos gotas de agua para quebrar el vidrio, se removió el casquillo contenedor con un golpe de un lápiz y se removió el vial interior.

1/ American Type Culture Collection 12301 Parlawnd, Drive Rockville, Maryland (20852) U.S.A.

b. Preparación del vial solo (vidrio borosilicato). Estos -- viales venían encerrados en una piel de celulosa, la cual debía ser removida (ya sea con una hoja puntiaguda o por humedecimiento con agua por algunos minutos) se limó la - ampolleta vigorosamente con una hoja con filo, aproximada- mente a una pulgada de la punta, se desinfectó la ampolla con una gasa humedecida con alcohol, se envolvió la gasa alrededor de la ampolla y se quebró alrededor del área li mada.

3. PARA HACER CRECER EL CULTIVO

a. Asépticamente se añadió al material utilizado 0.3-0.4 ml (no más) de medio líquido con una pipeta Pasteur. Se mez cló bien y se transfirió el total de la mezcla a un tubo conteniendo 5 a 6 ml del caldo. Las últimas gotas de la suspensión fueron transferidas a un tubo con medio de agar dextrosado de Sabouraud inclinado.

b. Se incubó a temperatura ambiente.

4. CONSERVACION DE LA CEPA

La cepa de levadura Cándida utilis se conservó en tubos - con medio Sabouraud dextrosa agar inclinado. Si se quiere - conservar por mayor tiempo, se le agrega aceite mineral pre- viamente esterilizado por calor seco a 180°C por una hora --

hasta cubrir completamente el crecimiento de levadura.

5. COMPROBACION DE LA PUREZA DE LA LEVADURA CANDIDA UTILIS.

Se hicieron preparaciones de la cepa con tinciones de azul de metileno y cristal violeta para comprobar que el cultivo estaba exento de cualquier microorganismo contaminante. Estas -- tinciones se observaron al microscopio. 1/

6. PREPARACION DEL CULTIVO DE LEVADURA PARA PRUEBAS DE FERMENTACION Y ASIMILACION DE AZUCAR PARA COMPROBACION DE LA CEPA. 2/3/

La cepa fue inoculada en medio de agar dextrosado de Sabouraud en placas por el método de estrías, para obtener colonias aisladas; luego se pasó el crecimiento de una colonia a un tubo con caldo glucosado de Sabouraud que se incubó a temperatura ambiente por 72 horas. Al finalizar este tiempo se hicieron resiembras en medio de agar sangre, se incubó a 37°C por 10 días con el fin de observar el tipo de colonias y detectar posibles contaminantes.

1/ Lodder, Op. Cit., p. 1065.

2/ L. Ajello, L. Georg, W. Kaplan y L. Kaufman. Laboratory Manual for Medical Mycology. U.S. Department of Health, Education and Welfare. Public Health Service. Communicable Disease Center. Atlanta, 1968.

3/ Ver página del Apéndice.

7. MEDIOS PARA LA FERMENTACION DE AZUCARES POR LEVADURAS CANDIDA UTILIS.

Los ingredientes que forman parte del caldo extracto de carne, disolverlos en agua, ajustar el pH a 7.2. Dispensar en tubos en cantidades de 10 ml, esterilizarlos a 121°C (15 lbs. de presión) por 15 minutos.

a. Preparación de las soluciones de azúcares

Preparar soluciones al 20% de los carbohidratos siguientes: dextrosa, maltosa, lactosa y sucrosa. Esterilizarlos por filtración.

b. Preparación de solución indicadora: azul de bromo timol. 1/

8. PREPARACION DEL MEDIO PARA OBSERVAR LA FERMENTACION DE AZUCARES.

a. El caldo de extracto de carne refrigerado, dejarlo enfriar a temperatura ambiente.

b. A nueve partes del caldo mencionado añadir una parte del indicador azul de bromo timol, ajustar el pH a 7.2, poner 9.5 ml de este medio en tubos con tapadera de metal conteniendo campanas Durhan, esterilizarlos a 121°C (15 Lbs. de pre-

1/ Ver página 76 del Apéndice.

- si3n) por 10 minutos. Sacarlos inmediatamente del autoclave.
- c. Añadir 0.5 ml de soluci3n de azúcar a los tubos conteniendo el caldo.
- d. Se emulsionaron 2 a 3 colonias de levadura en 5 ml de soluci3n salina estéril. 0.5 ml de la emulsi3n se pipetearon en el tubo conteniendo el medio con azúcar.
- e. A la vez se llevaron tubos testigo conteniendo el mismo medio, menos la sustancia por probar (Cándida utilis)
- f. Se incubaron a temperatura de 28°C y se observaron a: 0, - 24, 48, 72 horas y cada semana, por 24 días.
- g. Cambio de pH que sufre el medio: de azul (pH 7.2) pasa a - amarillo (pH 6), debido a la producci3n de ácidos durante el proceso de fermentaci3n.
- h. La cantidad de CO₂ desprendido y capturado por las campanas de Durhan, se considera una fermentaci3n positiva.
- i. Al tiempo 0 de observaci3n, en el momento de llevarse a -- cabo la inoculaci3n, todos los tubos deben ser de color a-

zul y las campanas de Durhan deben encontrarse completamente llenas y se considera negativo.

Los resultados fueron: glucosa (positivo), maltosa (negativo), sucrosa (positivo) y lactosa (negativo).

Como se observa, estos resultados son de una Cándida utilis. Con esta prueba estamos confirmando su comportamiento clave.

9. MEDIOS PARA LA ASIMILACION DE AZUCARES POR LA LEVADURA CANDIDA UTILIS.

- a. Yeast nitrogen base (Base de Nitrógeno para Levadura) 1/
- b. Se disolvió por calentamiento agar al 2%, se dispensaron - 7 ml en cada tubo de ensayo y se esterilizó a 121°C (15 -- Lbs. de presión) por 15 minutos enfriándolo a 50°C. 2/
- c. Se disolvieron por agitación azúcares en concentración al 20%, se esterilizaron por filtración. Estas soluciones - fueron: lactosa, galactosa, maltosa, rafinosa, sucrosa y glucosa.

1/ Ver página 76 del Apéndice.

2/ Ajello, L. K. Kaplan, Op. Cit.

10. PREPARACION DEL MEDIO PARA OBSERVAR LA ASIMILACION DE -
AZUCARES.

- a. A cada tubo con agar se añadió 1 ml. de base de nitrógeno para levadura y 0.1 ml de la solución de azúcar y se mezcló por rotación.
 - b. A la vez se llevaron tubos testigos conteniendo el mismo - medio, pero que no tenían azúcar. Se usó un tubo testigo para cada solución de azúcar cuando se hizo la prueba.
 - c. Se inclinaron los tubos para que solidificaran.
 - d. Se emulsionaron 2 a 3 colonias de levaduras jóvenes en 5 ml de solución salina estéril.
 - e. 0.5 ml de la emulsión anterior se pipetearon sobre la superficie del medio con azúcar, procurando que el inóculo quede en contacto con toda la superficie del agar. Se -- interpretó la lectura en la siguiente forma:
Positivo: abundante crecimiento.
Negativo: escaso o ningún crecimiento.
- Los resultados fueron Galactosa (-), lactosa (-), mal--tosa (-), Rafinosa (+), sucrosa (+), glucosa (+) 1/

1/ Ibid, p. 1065.

C. METODO MICROBIOLOGICO EMPLEADO PARA PROPAGACION DE LEVADURA -
CANDIDA UTILIS.

1. PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO AGAR MELAZA DE CAÑA.

- a. Se pesaron 100 gms de melaza y se diluyeron con agua destilada hasta hacer un volumen de un litro; se adicionaron 4 gms de fosfato de amonio dibásico más 30 gms de agar.
- b. Se calentó a ebullición hasta lograr una completa disolución.
- c. Se ajustó el pH a 4.5 y se procedió a esterilizar a 121°C (15 Lbs de presión) por 15 minutos, luego se dejó enfriar a 50°C.
- d. Se vertieron cuidadosamente 15 a 20 ml en cajas de Petri, -
o 40 ml cuando se utilizaron botellas Roux estériles, evitando la formación de burbujas de aire que obstaculizan la obtención de una superficie homogénea de crecimiento.
- e. Se dejaron solidificar sobre una superficie plana.
- f. Se almacenaron las placas a temperatura ambiente (25 a 30°C) (ver Fig. 4).

2. PREPARACION DEL INOCULO.

Se preparó una suspensión de levadura de la siguiente manera: con un asa estéril de platino se recogió todo el crecimiento de levadura contenido en el tubo inclinado de Sabouraud y se colocó en un Erlenmeyer conteniendo 99 ml de agua destilada es

téril, de modo que esta suspensión contuviera unos 300 millones de células de Cándida utilis por ml.

3. INOCULACION.

- a. Se inocularon las 50 placas de agar melaza de caña o 10 botellas de Roux, como anteriormente se describió, con 2.5 ml de la suspensión de levadura y se distribuyó uniformemente sobre la superficie del medio.
- b. Se incubó a temperatura ambiente por 72 horas.
- c. Con una pequeña espátula estéril se recogió el crecimiento de levadura de la superficie del medio. Cuando se utilizaron botellas Roux se recogió el crecimiento con una varilla de vidrio doblada en uno de sus extremos en L. (Ver Fig. N°5)

4. ELIMINACION DE LOS RESIDUOS DE MELAZA.

Las levaduras obtenidas conforme lo indicado en el paso c. del numeral anterior, contenían residuos de melaza que hubo que eliminar de la siguiente manera:

- a. El crecimiento obtenido se colocó en un beaker estéril de 1000 ml.
- b. A ésto se le agregó aproximadamente 40 ml de agua destilada estéril, agitando cuidadosamente.
- c. Inmediatamente se vertió la suspensión de levadura así obte

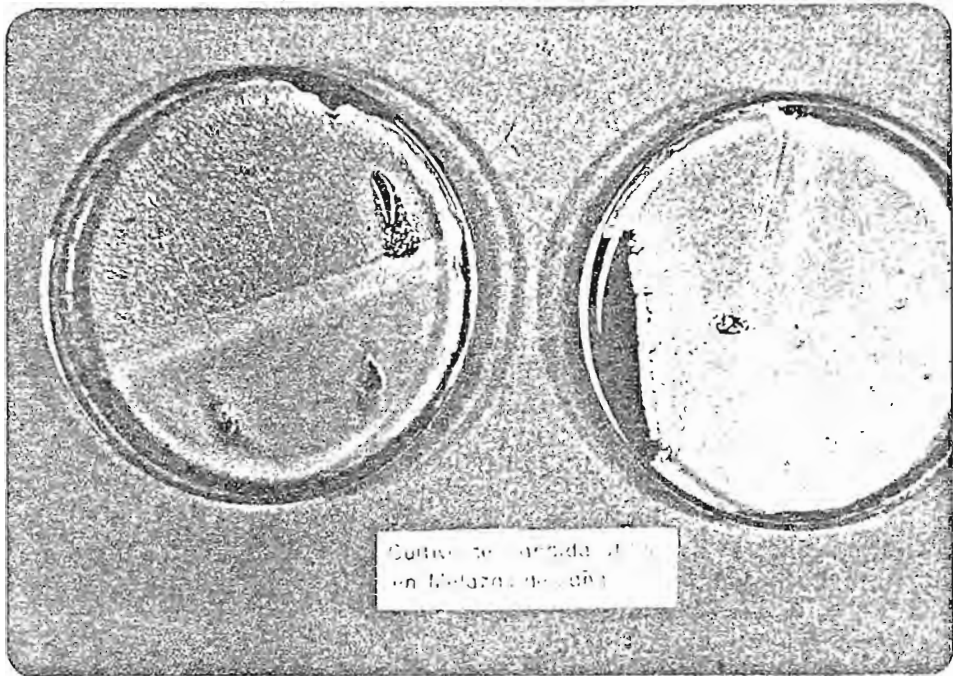


Fig. 4.

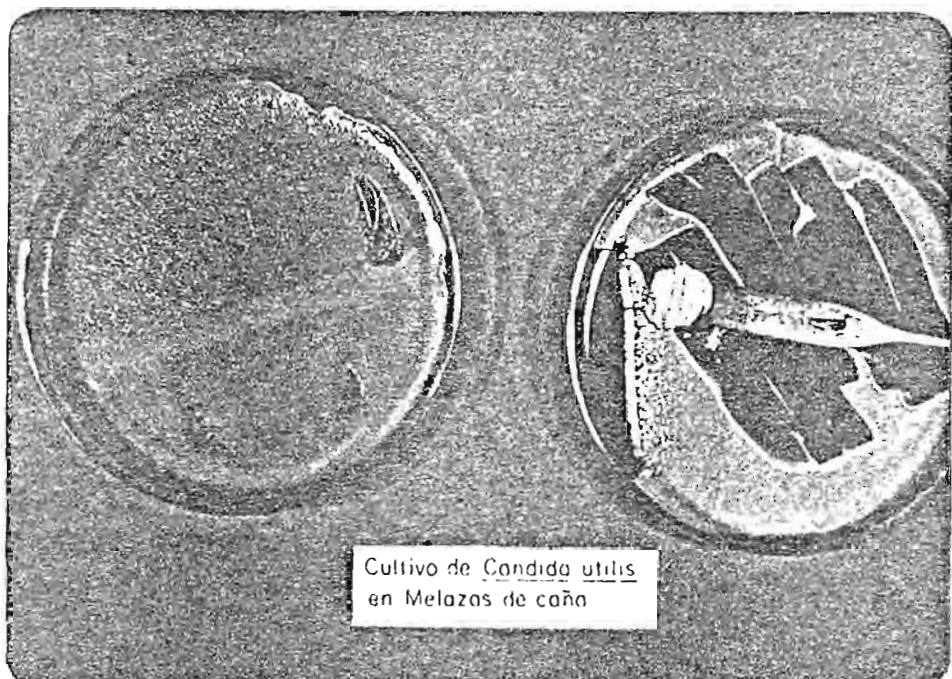


Fig. 5.-

nida en frascos de 130 ml de capacidad y se centrifugó durante 10 minutos a 150 RPM.

- d. Se descartó el líquido sobrenadante.
- e. Los pasos detallados en literales c. y d. fueron repetidos las veces necesarias para eliminar completamente los residuos de melaza, lo cual se consideró que se había logrado -- cuando el líquido sobrenadante se observaba transparente -- (ver Fig. N°6).
- f. Otra alternativa consistió en dejar que la levadura se depositara en los beakers por gravedad, (lo que tomaba aproximadamente 24 horas) decantándose el sobrenadante. Esto se repetía varias veces hasta obtener completamente transparente -- el líquido sobrenadante.

5. SECADO DE LEVADURA.

- a. La levadura lavada fue distribuida en cajas de Petri vacías estériles, las cuales fueron colocadas tapadas en una estufa a 45°C por 120 horas.
- b. Luego se sacaron las cajas de la estufa y se dejaron a temperatura ambiente por 72 horas, con el fin de que se ablandara un poco la levadura para facilitar su remoción.
- c. Se utilizó una pequeña espátula de acero inoxidable para remover la levadura seca de las cajas de Petri.

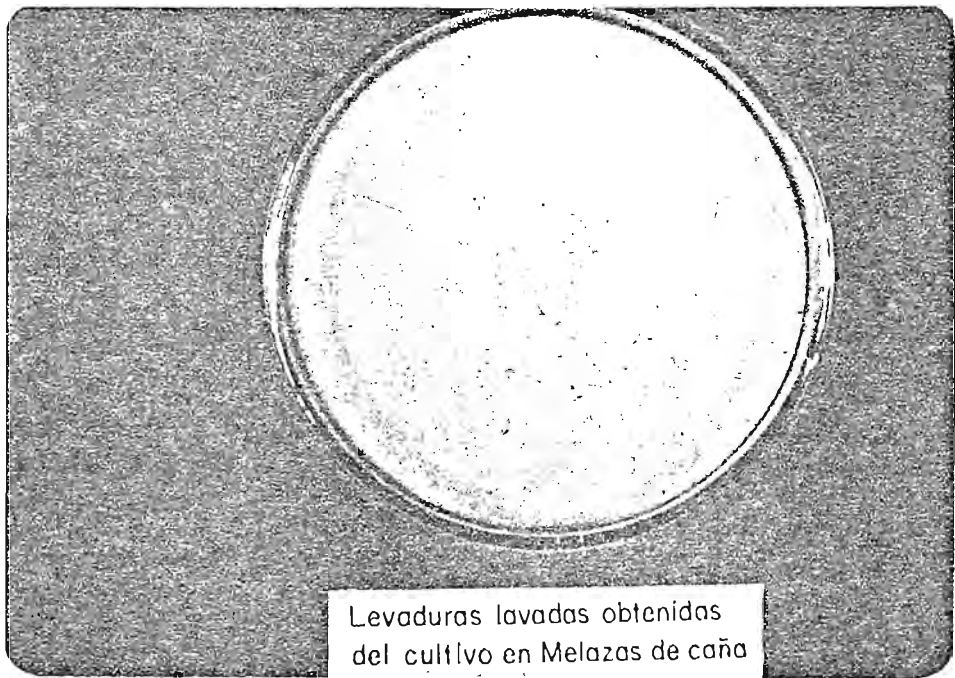


Fig. 6.-

d. La levadura así obtenida se observó en forma de laminillas u hojuelas (ver Fig. N°7).

6 PULVERIZACION DE LA LEVADURA.

a. Las hojuelas fueron reducidas a polvo fino pasándolas por un pulverizador, luego se distribuyó el polvo uniformemente en bandejas y se secó en la estufa a 40°C por 3 horas.

b. Se tamizó por malla #5.

c. El polvo así obtenido, que es amarillo áureo, fue envasado en recipiente ámbar, herméticamente cerrado.

METODO DE ELABORACION DE TABLETAS.

El ensayo que se describe a continuación fue el que dió mejores resultados. Se utilizó granulado de lactosa y almidón y levadura en iguales proporciones más el 1% de estearato de magnesio. Se utilizó el método mixto.

La fórmula apropiada para el principio activo fue:

Levadura <u>Cándida utilis</u>	49.5 %
Granulado lactosa-almidón	49.5 %
Estearato de magnesio	1.0 %

1. TECNICA DE FABRICACION.

a. Para elaborar el granulado lactosa-almidón utilizando el método húmedo fue necesario pasarlo por tamiz número 3, se co-

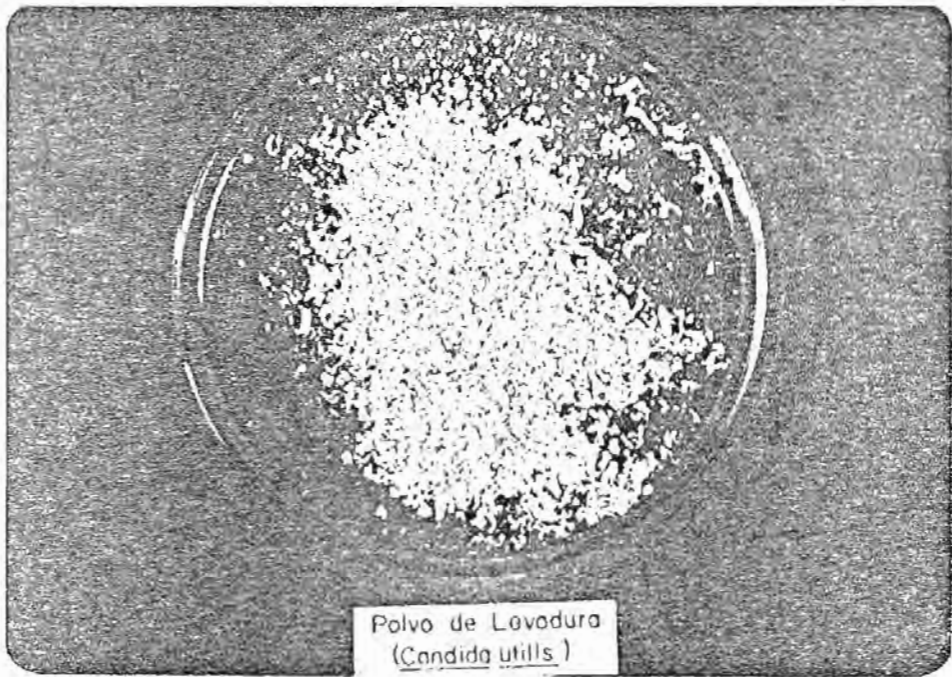


Fig. 7.-

locó en bandejas y se puso a secar en la estufa a 40°C por 3 horas. 1/

- b. Se pasó el polvo de levadura por tamiz #5, se colocó en bandejas y se puso a secar a 40°C por 3 horas.
- c. Se pasó por tamiz #5 el granulado lactosa-almidón y se secó a 40°C por 3 horas.
- d. Se pesó la levadura, el granulado lactosa-almidón y el estearato de magnesio; se mezcló completamente hasta homogeneizar.
- e. Se comprimió la mezcla anterior con punzón #12 mm.
- f. Se pasó por el granulador en seco para comprimir otra vez.
- g. Se tamizó nuevamente con malla #5.
- h. Se tableteó con punzón #12 mm.

E. METODO PARA APLICAR PELICULA DE RECUBRIMIENTO A LAS TABLETAS DE LEVADURA.

1. Se colocaron las tabletas en un bombo de recubrimiento.
2. Se hizo girar el bombo a 30 revoluciones por segundo por 4 horas.
3. Se roció una mínima cantidad de la solución colorante sobre las tabletas en movimiento. Se dejaron secar. 2/
4. Se repitió esta operación hasta obtener una coloración uniforme en las tabletas.

1/ Ver página 77 del Apéndice.

2/ Ver página 77 del Apéndice.

5. Se adicionó al colorante Shelac al 10% en solución alcohólica al 70% en las últimas capas, para evitar la humedad.
6. Se colocaron las tabletas en el pulidor para que adquirieran brillo.
7. Se efectuaron controles de peso, dureza, friabilidad, tiempo de desintegración y de aspecto, para determinar la calidad del producto.
8. Se envasaron en recipientes herméticamente cerrados, a los que se había adicionado previamente un absorbente (sílica gel) y protegidos de la luz, para lograr su conservación.
9. Controles en proceso:

Peso promedio:	506.48 mg
Dureza :	5.75 kg
Friabilidad:	Pasa prueba
Tiempo de desintegración:	20 minutos
Aspecto:	

F. DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE PROTEINAS EN TABLETAS DE LEVADURA *CANDIDA UTILIS*.

El método seguido fue el de Kjeldahl especificado en el AOAC 1/.

1. Se pesaron 20 tabletas de levadura Cándida utilis y se redujeron a polvo fino.
2. Se pesó una cantidad equivalente a 0.5 gms. de levadura.

1/ Horwitz, W. Ed. AOAC, 12th Ed. Washington 1975, pp.15, 1

3. Se agregó 0.7 g de HgO , 15 g de Na_2SO_4 anhidro y 25 ml de H_2SO_4 concentrado.
4. Se colocó el balón en posición inclinada y se calentó suavemente hasta que terminó la formación de espuma.
5. Se dejó hervir hasta que el líquido se aclaró, dejándolo en ebullición durante una hora más.
6. Se dejó enfriar y después se agregaron 200 ml de agua destilada hasta disolución completa y luego se enfrió a una temperatura menor de 25°C .
7. Se agregaron 25 ml. de solución de tiosulfato al 8% y 2 granallas de zinc.
8. Se midieron 50 ml. de solución de H_2SO_4 0.1 N y se colocaron en un Erlenmeyer de 500 ml., se agregaron 3 gotas de indicador rojo de metilo y se colocó en el aparato para recibir el destilado, cuidando que el extremo del condensador quede sumergido en la solución del ácido.
9. Se colocó el balón Kjeldahl en posición inclinada y se agregaron 80 ml. de NaOH al 45%; inmediatamente se colocó el balón en el destilador, se mezcló la solución y se calentó hasta que se destiló todo el amoníaco (más o menos 150 ml. del destilado).
10. Se tituló el exceso de H_2SO_4 0.1 N con solución de NaOH 0.1 N.
11. Se verificó una prueba con un blanco, a la vez que con la muestra, por alguna corrección debido a reactivos.

CALCULO:

$$\text{Protidos \% P/P} = \frac{V \times 0.14}{P} \times 6.25$$

Donde:

V = ml. de H_2SO_4 agregados a la muestra menos ml. de NaOH
0.1 N gastados en la titulación con la muestra.

P = Peso Muestra

G. ADMINISTRACION DE LEVADURA A RATONES Y EVALUACION TOXICOLOGICA.

1. Se administró diariamente a un ratón 6 tabletas de levadura que rotulan 250.70 mg. durante un mes y para suplir los carbohidratos se les administró 20 gms. de tortilla diarios. Como control se usó otro ratón al cual se le suministró purina.
2. Se contaron las tabletas que consumían diariamente y se pesaban tanto el ratón de experimentación como el que servía de control, Se observó un ligero aumento de peso (0.08 gms.) en el ratón alimentado con levadura, comparado con el alimentado con purina.
3. Al final del experimento el ratón alimentado con levadura no --
mostró signos de anormalidad. (Ver Fig. 8).

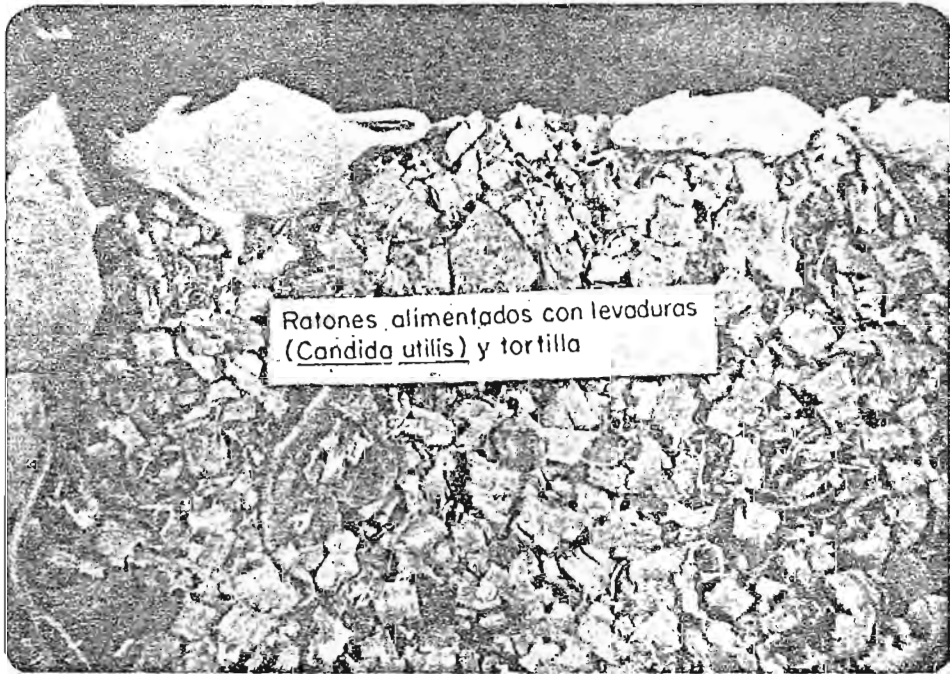


Fig. 8.-

M E T O D O L O G I A

A. DETALLES GENERALES PARA PRODUCCION DE LEVADURAS.

Al seleccionar esta levadura alimenticia se tuvieron presentes una serie de factores como: ser de elevado valor nutritivo, posibilidad de desarrollarse rápidamente con elevado rendimiento, fácil recuperación y buena apariencia.

Magnitud del inóculo.

En el inóculo se usó una concentración de 300,000,000 de células por ml., cantidad capaz de dar un rendimiento máximo de células en el medio de propagación.

Materia Prima.

En la producción de esta levadura se usó la melaza de caña como materia prima por ser fácilmente asequible y asimilable y a la vez de bajo costo.

OBTENCION DEL MEDIO AGAR MELAZA DE CAÑA

Se hicieron ensayos de medios de cultivo utilizando diferentes concentraciones de melaza, sales inorgánicas y agar, a diferentes temperaturas y pH, observándose una marcada diferencia en el crecimiento de la levadura. La sal que dió mejores resultados fue el fosfato de amonio dibásico al 0.4% (fuente de nitrógeno y fósforo); la con-

concentración de melaza más adecuada fue del 10% y la concentración de agar fue del 3%.

Se obtuvo finalmente una concentración óptima de los azúcares y de sales en el medio de cultivo, ya que el factor principal en la producción de levaduras es la presencia de los azúcares asimilables dentro de la materia prima (melaza de caña).

Otro factor de mucho interés fue la temperatura, que debía ser de 25-30°C para que proporcionara un rendimiento máximo con las menores dificultades y el más bajo costo; el valor correcto del pH fue de 4.5 y el tiempo de incubación de 72 horas, para obtener así la tasa máxima de crecimiento y el más alto contenido de proteínas y vitaminas.

PROPAGACION DE LA LEVADURA.

Como se necesitaba obtener una cantidad de levadura que fuese suficiente para elaborar las tabletas, se pensó usar un contenedor que ofreciera una superficie suficiente para el medio, lo cual permitiría un mayor crecimiento.

Se usaron unas bandejas de acero inoxidable de 33.5 cms. de largo por 30 cms. de ancho, provistas de una tapadera de vidrio de 43 cms. de largo por 33 cms. de ancho, las cuales se esterilizaron conjuntamente, después de lo cual se procedió a verter el medio previamente

esterilizado. Este método fue satisfactorio, pero como se incubaba a temperatura ambiente, y el substrato es fermentable, se tuvo el inconveniente que había más posibilidad de contaminación, por lo cual se pensó cubrir las bandejas ya inoculadas con papel de empaque, obteniéndose así, buenos resultados.

También se usaron los métodos ya conocidos. Primeramente se utilizó el de botellas Roux, el cual presentaba la ventaja de boca relativamente pequeña, por lo que no hubo contaminación. Con este método, la cantidad de levadura que se obtiene es menor.

Enseguida se probó usando cajas de Petri, obteniéndose como se esperaba, buenos resultados, ya que no hay contaminación; pero presentaba el inconveniente que se necesitaban muchas placas para obtener la cantidad deseada de levadura.

En la etapa final del experimento se trabajó únicamente con botellas Roux, por presentar menor riesgo de contaminación.

Para el lavado de la levadura se procedió a dejarla en beakers estériles, bien tapados, para que sedimentara por su propio peso, para lo cual necesitó 12 horas; luego se decantó y agregó agua estéril, este paso se repitió varias veces. Este método se consideró adecuado ya que no requiere gasto de energía ni el uso de equipo, pero tenía el inconveniente de necesitar mucho tiempo, debido a lo cual se des-

cartó y se optó por el centrifugado, que presentaba la ventaja de -- que la levadura era separada el mismo día y no sufría contaminación.

Muchas veces al recolectar el crecimiento de levadura se pasaban porciones de agar, por lo que se hizo necesario filtrar la levadura centrifugada haciéndola pasar por un tamiz de malla inoxidable estéril.

De esta levadura se hicieron frotis y se colorearon con cristal violeta y azul de metileno y se observaban al microscopio, para comprobar que no había contaminación. Además se hicieron las pruebas de - asimilación y fermentación para ver si las levaduras habían sufrido cambios en sus características morfológicas y fisiológicas.

D. FULVERIZACION DE LA LEVADURA.

La pulverización de la levadura fue difícil debido a su textura, ya que es muy compacta y absorbe humedad rápidamente.

E. ANALISIS DE DIFERENTES CLASES DE LEVADURA OBTENIDA.

Las clases de levadura obtenidas fueron:

Levadura clara en forma de hojuelas

Levadura oscura pulverizada

Levadura clara pulverizada

Estas fueron sometidas a análisis de proteínas por el método de -- Kjeldahl.

Se observó que la levadura con mayor porcentaje de proteínas fue la tercera, ya que está completamente libre de melazas; y la que tenía el menor porcentaje fue la primera, debido posiblemente, a la falta de homogenización de la muestra para la determinación.

F. ELABORACION DE LAS TABLETAS.

Al diseñar la tableta se deseaba tener una fórmula que cumpliera las siguientes características

1. Que la levadura constituyera por lo menos la mitad del peso total de la tableta.
2. Utilización de excipientes de bajo costo.
3. Que el método utilizado fuese simple y rápido, lo cual haría -- disminuir el precio de la tableta.
4. Que fuera estable al aire y que cumpliera con los requerimientos especificados por la Farmacopea, en lo que a dureza, friabilidad, tiempo de desintegración y variación de peso se refiere.
6. Que tuviera buena presentación, para mejor aceptación por el consumidor.

Para la elaboración de tabletas del polvo seco obtenido se hicieron varios ensayos, utilizando diferentes métodos, variando para ello las concentraciones de levaduras y de los excipientes lactosa-almidón. - Entre los métodos ensayados tenemos:

1. Método de Compresión Directa:

Este método consiste en comprimir directamente la levadura sin -- ningún excipiente; se observó que las partículas carecían de coesión, obteniéndose como consecuencia tabletas con baja dureza.

2. Método por doble compresión:

Este método consiste en hacer una compresión preliminar, quebrar las tabletas haciéndolas pasar por un emulador en seco, obteniéndose los llamados magdaliones, los cuales presentan gran coesión y peso; éstos son pasados por 2 tamices (#3 y #5), obteniéndose de esta manera un granulado adecuado para la compresión final. Se pudo observar que este método tampoco era adecuado, ya que por no llevar excipientes que tuvieran propiedades aglutinantes, siempre presentaban baja dureza las tabletas.

3. Método Mixto:

En este método se utilizó un granulado de lactosa-almidón fabricado por el método húmedo, verificándose varios ensayos, los cuales consistieron en variar las proporciones de granulado y del polvo de levadura (6% de humedad), seguidos por compresión. Dichos ensayos son descritos a continuación:

a. Levadura	90%
Granulado lactosa-almidón	9%
Estearato de magnesio	1%
b. Levadura	80%

Granulado lactosa-almidón	19%
Estearato de magnesio	1%
c. Levadura	70%
Granulado lactosa-almidón	29%
Estearato de magnesio	1%

Utilizando los ensayos anteriores se observó que ninguno de ellos era adecuado, ya que en los ensayos a. y b., las tabletas carecían de cohesión y peso y con el ensayo c. se comprimió la tableta pero carecía de dureza. Por lo tanto se eligió el ensayo en el que van en iguales porcentajes el principio activo y los excipientes, cuya fórmula se detalla a continuación:

Levadura CANDIDA UTILIS	49.5 %
Granulado lactosa-almidón	49.5 %
Estearato de magnesio	1.0 %

A las tabletas elaboradas conforme el ensayo anterior se les determinó el porcentaje de proteínas, y se procedió a administrarse las a los ratones por un mes, para observar la absorción, por medio de un incremento de peso en los mismos. 24 horas antes de la prueba, los ratones fueron aislados y suprimidos de toda alimentación.

R E S U L T A D O S

TABLA III
 FERMENTACION DE COMPUESTOS HIDROCARBONADOS POR LEVADURA
 CANDIDA UTILIS OBTENIDA EN MEDIO AGAR MELAZA DE CAÑA

Compuestos Hidrocar- bonados	Formación	Número de Determinaciones				
		1	2	3	4	5
Glucosa	Ácido	A	A	A	A	A
	Gas	+	+	+	+	+
Maltosa	Ácido	-	-	-	-	-
	Gas	-	-	-	-	-
Sucrosa	Ácido	A	A	A	A	A
	Gas	+	+	+	+	+
Lactosa	Ácido	-	-	-	-	-
	Gas	-	-	-	-	-

CLAVES UTILIZADAS: - Significa ausencia de gas.

A Significa presencia de ácidos, por lo que hay un cambio de pH (7.2 a 6.0).

TÁBLA

ASIMILACION DE COMPUESTOS HIDROCARBONADOS POR LEVADURA CÁNDDIDA UTILIS

Compuestos Hidrocar- bonados	Número de Determinaciones				
	1	2	3	4	5
Galactosa	-	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-
Maltosa	+	+	+	+	+
Rafinosa	+	+	+	+	+
Sucrosa	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+

CLAVE UTILIZADA: + Abundante crecimiento

- Escaso crecimiento

TABLA V

ANALISIS PROMEDIO DE LEVADURA CANDIDA UTILIS
 OBTENIDA A PARTIR DE MELAZA DE CAÑA
 CALCULO EN BASE SECA EXPRESADO EN %(+)

Alimento	Humedad Gms.%	Materia Seca Gms.%	Proteínas Gms. %
CANDIDA UTILIS 42°C	12.03	87.98	42.33
CANDIDA UTILIS 46°C	10.39	89.61	51.02

TABLA VI

RENDIMIENTO OBTENIDO

Volumen total	Gms. de Melaza	Gms. de Leva- dura CANDIDA UTILIS	Levadura %
1000 ml.	100 Gms.	15	15

Cálculo:

$$\% \text{ de levadura obtenida} = \frac{\text{Gms. de levadura húmeda}}{\text{Gms. de Melaza}} \times 100$$

(+) Análisis realizado en la Dirección General de Ganadería.

TABLA VII

PORCENTAJE DE PROTEINAS PRESENTES EN LEVADURA CANDIDA UTILIS
(Materia Prima) OBTENIDA EN AGAR MELAZA DE CAÑA

Número de Determinaciones	Ml. de NaOH 0.1N Consumidos	% de Proteínas
1	27.2	47.60
2	27.1	47.42
3	27.1	47.42
4	27.2	47.60
5	27.1	47.42
6	27.2	47.60
7	27.2	47.60
\bar{x}	27.15	47.52

TABLA V
 PORCENTAJE DE PROTEINAS PRESENTES EN CADA
 TABLETA DE CANDIDA UTILIS

Peso promedio/Tableta 506.48 mg.
 Cantidad de Levadura
 Presente/Tableta 250.7076 mg.

Número de Determinaciones	Ml. de NaOH 0.1N Consumidos	% de Proteínas/Tableta
1	27.1	11.77
2	27.1	11.77
3	27.1	11.77
4	27.1	11.77
5	27.1	11.77
6	27.1	11.77
7	27.1	11.77
8	27.1	11.77
9	27.1	11.77
10	27.1	11.77
11	27.1	11.77

TABLA IX
 TABLA DE COMPARACION ENTRE RATONES ALIMENTADOS CON LEVADURA CANDIDA UTILIS
 M.S TORTILLA Y RATONES ALIMENTADOS CON PURINA

Ratones alimentados con tabletas de Levadura CANDIDA UTILIS+agua y Tortilla		Ratones alimentados con Purina+Agua			
Tiempo (Días)	Nº tabletas Consumidas	Peso Ratón en Gms.	P	Peso Ratón	ΔP
1	0	32.00	0.4	37.00	0.55
3	3	32.40	0.3	31.55	0.55
4	4	32.70	0.2	31.60	0.3
5	2	32.90	0.9	31.90	0.3
8	6	33.80	0.2	32.20	0.18
10	4	34.00	0.16	32.30	0.19
11	3	34.16	0.05	32.57	0.56
12	2	34.21	0.79	32.64	0.56
15	6	35.00	1.20	33.20	0.90
19	6	36.20	0.40	34.00	0.40
23	8	36.60	0.90	34.90	1.40
26	5	37.00	0.80	35.30	5.02
30	8	38.30		35.70	
Incremento (Δ)					
Total en Peso			5.1		5.02

DISCUSIÓN

Los resultados en las tablas III y IV muestran que los patrones de fermentación y asimilación de productos hidrosolubles de la levadura *Candida utilis* cultivada con fines industriales en el medio agar - melaza de caña, son idénticos a los de la cepa original; o sea que el procedimiento de cultivo no induce mutaciones que alteren las propiedades fisiológicas.

En la tabla V podemos observar que la levadura, cuando es secada a diferentes temperaturas varía su valor determinado de proteínas, esto es debido a que el contenido de agua influye en la pesada de la muestra, lo cual constituye un factor de error, de tal manera que la levadura secada a 42°C tiene mayor porcentaje de humedad y menor porcentaje de proteínas, mientras que la levadura secada a 46°C tiene menor porcentaje de humedad y mayor porcentaje de proteínas. Es conveniente hacer notar que la temperatura óptima de secado es de 46°C , ya que si se incrementa dicha temperatura la proteína tiende a desnaturalizarse.

Analizando la tabla VI podemos observar que al utilizar 100 gms. de melaza para cada litro de medio de cultivo, se obtienen 15 gms. de levadura seca, lo cual constituye un 15% de rendimiento.

En la tabla VII se especifica a la par del número de cada determinación, el volumen de NaOH 0.1N consumido en la valoración y su correspondiente porcentaje de proteínas calculado para la materia prima; -- al analizar los resultados podemos decir que existe reproducibilidad de datos, lo cual nos indica que el método es confiable.

Al analizar los resultados de la tabla VIII podemos observar que el -- porcentaje de proteínas presente en cada tableta de Cándida utilis -- es el mismo para todas ellas, lo cual nos está indicando que la levadura quedó uniformemente distribuida cuando se elaboró el lote.

En la tabla IX encontramos las variaciones de peso, tanto en los ratones alimentados con tabletas de levadura y tortilla, como de los -- alimentados con purina, los cuales fueron pesados periódicamente durante 30 días. Se pudo observar que al cabo de ese tiempo hubo un -- ligero aumento (0.08 gms.) en el peso de los primeros.

Las dosis diarias recomendada para humanos de Cándida utilis son de -- 10 mg. 4 veces al día.

En América Latina se ha producido la levadura Cándida utilis, tanto a escala industrial como semi-industrial y a nivel de planta piloto. 1/ En Chile, la Industria Azucarera Nacional, S.A. la obtuvo utilizando como sustrato miel de remolacha azucarera, con un valor nutricional de 52.8% de proteína cruda con 8.9% de lisina. Su utilización --

para humanos se encuentra bajo investigación en el Laboratorio de Enfermedades Pediátricas, Escuela de Medicina, de la Universidad de Chile.

En Costa Rica, la empresa Sarchi obtuvo utilizando como substrato productos de desperdicios agrícolas, especialmente, pulpa de café, teniendo un valor nutricional de un 50 a 56% de proteínas, el cual fue analizado por la Universidad de Costa Rica.

En Brasil, en una planta adjunta a la fábrica de ron en el estado de Pernambuco y en la planta situada en Alagoas se produce levadura *Torula utilis* usando residuos líquidos de la fermentación alcohólica (vinazas). Esta producción brasileña es a escala industrial, en Pernambuco se produce 1 tonelada diaria, en Alagoas 9 toneladas diarias y en Cabo 12 toneladas diarias. Esta levadura ha sido investigada en el Instituto de Antibióticos de Recife. Se ha usado principalmente en la preparación de alimentos para aves de corral.

En una planta industrial de la Compañía de Fomento Industrial de Puerto Rico se produjo a escala semi-industrial durante 11 años, - media tonelada diaria, utilizando como medio de propagación miel de purga. Se investigó en la Escuela de Medicina Tropical de la Universidad de Puerto Rico, con un contenido de proteínas de un 50.7%.

La levadura que se obtuvo en el presente trabajo contiene un porcen

taje de proteínas (47.52%) comparable al de la levadura producida en los países anteriormente citados.

Sin exageración de ninguna clase podemos afirmar que los métodos sintéticos de producción de alimentos empleando microorganismos, son los únicos que pueden introducir un cambio cuantitativo en la alimentación del mundo actual donde prevalecen los pueblos desnutridos, mediante la producción masiva de los factores básicos de crecimiento y nutrición que son: proteínas, grasas, aminoácidos esenciales y vitaminas, presentes en la levadura. 1/

El empleo de estos métodos para la producción masiva de levadura, puede justificarse si comparamos los períodos de generación de varios animales y microorganismos: el ganado y cerdo 7 años, porcino 1 año, conejos 9 meses, aves 3 meses, hongos 5 horas, levadura 2 horas y bacterias 1 hora; contendiéndose por período de generación el tiempo que un ser vivo necesita para reproducirse y formar un organismo nuevo. 2/, 3/.

1/ Victor R. Santocmarino Guerr. Estado Actual de la Industria de Fermentación y Estado y Orientaciones de la Industria Alimenticia Moderna. Tab. no. Universidad de La Habana, 1958 (Tecnología, 6a Ingeniería Química No. 1, Ab. 196) p. 15.

2/ *Ibid*, p. 15.

3/ Alon Ferg. Estudios sobre Nutrición, su Importancia en el Desarrollo Económico. Trad. por Guadalupe Escerra Peruggia. Linusa, México, 1975, p. 167.

Si partimos del hecho de que la alimentación de origen animal es la principal fuente nutricional, podemos apreciar la importancia de los métodos biosintéticos industriales que pueden, empleando microorganismos, producir en unas horas la misma cantidad de proteínas, grasas y aminoácidos esenciales, para lo cual una res y un cerco requieren 2.5 y 1.0 años, respectivamente. Los métodos sintéticos tienen a su favor las ventajas de una producción industrial eficiente, controlada y automatizada, frente a la producción animal que es más compleja. 1/

La mayor dificultad para la introducción de productos alimenticios sintéticos es el sabor, ya que por costumbre nuestro pueblo encuentra más agradable ingerir proteínas contenidas en un trozo de carne que ingerir polvo de levadura, aún mezclada con cereales, leche, pastas. Sin embargo, la grasa microbiana no se diferencia en sabor de la animal y lo mismo puede decirse de las vitaminas y aminoácidos que se ingerirían como suplemento de una dieta basada en carbohidratos y deficiente en los factores esenciales ya mencionados.

La importancia de las levaduras en la síntesis proteica, es que tienen la propiedad de transformar el nitrógeno inorgánico en aminoácidos y proteínas, esto se hace evidente aún más en el ejemplo si-

1/ Santamarina Guerra. Op. Cit. p. 16.

guientes: una fábrica que produce 20 toneladas diarias de levadura -- con un contenido proteínico asimilable del 45%, produciría, en 300 días de operación anuales, 4,000 toneladas de esta proteína, empleando 640 toneladas de nitrógeno.

Asumiendo que la melaza de caña tiene un 50% de carbohidratos asimilables por la levadura y que en condiciones industriales eficientes el 45% del peso de esos carbohidratos se convierte en levaduras de las cuales el 45% de su peso seco son proteínas, las 4,000 toneladas de proteínas asimilables pueden ser producidas con las 40,000 toneladas de melaza que constituyen el subproducto de la fabricación de 134,000 toneladas de azúcar crudo. 1/

Single Cell Protein o simplemente SCP, es el nombre dado a una variedad de sustancias usadas como alimento, producidas por microorganismos mediante técnicas de fermentación. 2/ Los SCP contienen de 45% a 55% de proteínas de alta calidad. Cuando son adecuadamente producidos, estos materiales resultan satisfactorios como ingredientes proteínicos en la alimentación humana y animal. Los factores que afectan aspectos comerciales en la producción de SCP son: su costo de producción, su aprobación y, finalmente, su aceptación por parte del consumidor. El uso de microorganismos como alimento es

1/ Ibid, p. 16

2/ Berg. Op. Cit. p. 166

bien conocido, ya que desde hace mucho tiempo se ha usado la levadura para la fabricación de pan, cerveza, yogurt, y la costumbre de usar tales organismos se ha incrementado actualmente. Sin embargo, el primer esfuerzo moderno para la manufactura de estos alimentos fue en Alemania, durante la Primera Guerra Mundial, donde se obtuvo levadura torula (+) en gran cantidad. Esta producción fue continuada durante los años de guerra habiendo alcanzado un nivel por encima de 15,000 toneladas por año.

La historia moderna de SCP comenzó recientemente en 1950, cuando la industria del petróleo inició experimentos sobre el uso de microorganismos para remover residuos de resina y azufre del aceite crudo. Estos organismos contienen más del 50% de proteínas de alta calidad, y se han administrado mezclados con cereales, macarrones, chocolates, salchichas, budines, sorbetes, etc. Así, cuando nos hablen acerca del uso de SCP para alimentos, no será una innovación como podría parecerlo.

Cuando está en forma bruta, la proteína es normalmente determinada por la medida del contenido de nitrógeno total; de acuerdo a ese contenido la proteína bacteriana es comparable a la harina de pescado, mientras que la proteína de levadura se asemeja a la harina de soya. 1/

1/ D. D. MacLaren. Single-Cell Protein - An Over View. CUBMTECH, 1975, p. 594.

En 1957, una organización de investigación microbiológica fue fundada en Levere con el objeto de estudiar la posibilidad de usar microorganismos para el aprovechamiento de desechos de petróleo. Estas investigaciones pronto demostraron que una gran variedad de microbios eran capaces de vivir y reproducirse eficazmente a expensas de hidrocarburos, no solamente en cultivos de laboratorio, sino también en el fondo de tanques de almacenamiento, en los bancos de incubación de refinerías, en suelos saturados con aceite y aún bajo superficies de carreteras asfaltadas. 1/

Muchos laboratorios de la industria petrolera se han preocupado en asociar el proceso de desparafinación con la producción de "Alimentos Microbianos", con el objeto de obtener proteínas en gran escala. La diezmilésima parte de la producción actual de petróleo crudo produciría proteínas celulares para un millón de personas. 2/

La tecnología para aplicación en los alimentos ha progresado enormemente hasta el punto que existen grandes fábricas, tales como la operada por British Petroleum en Levere, Francia, que produce 20,000 toneladas al año. 3/ 4/

1/ Champagnat, Vernet, Laine and Filosa. Op. Cit. pp. 13, 14.

2/ Da Silva, Looz. Op. Cit., p. 122-123.

3/ MacLaren. Op. Cit. p. 594.

4/ Berg. Op. Cit. p. 164

En agosto de 1966, la "Shell International Petroleum" anunció el descubrimiento de un proceso de crecimiento de células en gas natural y petróleo crudo, sugiriendo que ésta sería la manera de resolver el déficit de proteínas.

La "Esso Research and Engineering Company", de Linden, New Jersey, y la "Nestlé" de Suiza, se asociaron en 1966 para el mismo fin. Actualmente están construyendo plantas piloto en Suiza y Estados Unidos.^{1/}

Existen fábricas experimentales en la Unión Soviética, Checoslovaquia, Taiwán, India y China Continental. En el hemisferio occidental, la fábrica experimental más grande que existe es la Nestlé-Esso, en el complejo Nestlé Helvético. ^{2/ 3/}

La diversidad de tecnología se puede demostrar por el rango de substratos y la variedad de organismos que pueden ser usados (Tabla X).

^{1/} De Silva Leca. Op. Cit. p. 23

^{2/} Berg. Op. Cit. p. 169

^{3/} Behar y Bressani, Op. Cit. p. 130.

TABLA X
 COMPAÑIAS QUE PROCESAN SCP

Substrato	Organismo	Compañías Involucradas
M-Petrolin	Yeast o (Bacteria)	British Petroleum Dainippon Tokai-Kanaguchi. Japochemicals USSR
Gas oil	Yeast o (Bacteria)	British Petroleum Chinese Petroleum USSR
Metanol	Bacteria	ICI
Ethanol	Yeast Bacteria o Yeast	Amoco Kojetin Brenn-Nettlé
Metano	Bacteria (no dióscultivo)	Shell
Azúcares	Hongos	Tate and Lyle
Almidón y Car- bohidratos	Hongos	Rank, Hevis Lodougal-De Pont
Galactosa	Bacteria o (Yeast)	Paulding y Pulia General Electric LTA-Rechtel
CO ₂	Algas	IBM Sosa Texcoco

CONCLUSIONES

Después del estudio de la levadura (*Candida utilis*) se llegó a las siguientes conclusiones:

- 1.- La levadura *C. utilis* es un ingrediente alimenticio satisfactorio para propósitos dietéticos.
- 2.- El método empleado para determinar el porcentaje de proteínas presentes en la levadura seca, demostró ser excelente, ya que se encontró un 47.52% de proteínas y en cada tableta con un peso promedio de 506.48 mg. se encontró 11.77%.
- 3.- El crecimiento de *C. utilis* en melazo de caña es excelente, ya que por cada litro de medio se recolectaron 39.12 gms. de levadura húmeda, es decir 15 gms. de levadura seca.
- 4.- El agua utilizada en el medio puede reutilizarse lavándolo con agua corriente y de esta manera hay ahorro en los materiales.
- 5.- La levadura seca cultivada en agua melazo de caña es de un color dorado, es de sabor agradable parecido al de los nueces ligeramente tostadas.
- 6.- En forma de tabletas la levadura ayudaría enormemente a solucionar el problema nutricional, ya que constituye una forma estable, de fácil administración.

- 7.- La tableta se recubrió con una película, para evitar la oxidación y garantizar la estabilidad. Se escogió un color llamativo como es el rojo usado en los caramelos para facilitar su aceptación por el consumidor.
- 8.- El control riguroso de las condiciones estériles y sanitarias en todo el proceso, son absolutamente indispensables para la obtención de un producto final de alta pureza y calidad.

R E C O M E N D A C I O N E S

- 1.-- El uso de melazas para la producción de levadura es sin duda la alternativa más prometedora, pues el rendimiento es magnífico y éstas pueden almacenarse durante todo el año y trabajar con ellas cuando se desee. Por otra parte, si bien es cierto que las melazas tienen algún valor monetario, nunca se compara con el valor que se puede obtener usándolas como sustrato de levadura para la obtención de proteínas.
- 2.-- Es un hecho comprobado en El Salvador la existencia de abundantes desechos agrícolas e industriales provenientes de los beneficios de café y de los ingenios azucareros, respectivamente, lo cual propiciaría las posibilidades de producción de levadura a costo mínimo y ayudaría a solucionar el problema de contaminación de los ríos, en donde actualmente se descargan toneladas de pulpa de café. Con respecto al uso de la pulpa de café, no habría ningún inconveniente, una fábrica podría trabajar 6 meses con pulpa de café y el resto del año con melaza de caña.
- 3.-- La levadura incluida en la forma farmacéutica de tabletas, por ser fáciles de envasar, transportar y administrar, podría ser utilizada como un suplemento alimenticio destinado a elevar la dieta de proteínas.
- 4.-- Estas tabletas podrían utilizarse en programas gubernamentales, distribuyéndolas a escolares, instituciones hospitalarias, asi-

los de ancianos.

- 5.- La levadura *C. utilis* puede ser usada para la fabricación de pan, galletas, comida para terneros, pastas, carnes enlatadas, salsas, sopas, pudines, cereales, alimentos dietéticos, sorbetes, refrescos, dulces.
- 6.- Resultaría conveniente se investigara a corto plazo la disponibilidad de otras fuentes de proteínas y calorías para nuestra población, ya que estudios sobre disponibilidad futura de alimentos indican que si la producción de éstos continúa escaseando a medida que el incremento demográfico continúa a su velocidad actual, las deficiencias proteínicas, si no es que aumentan, por lo menor prevalecerán en un grado semejante a las que hoy en día existen en el país.
- 7.- En el presente trabajo se diseñó la tableta, y se llegó a obtener una fórmula mediante la cual su presentación fue aceptable, según el (FDA) puede ser usada sin riesgo en alimentos, toda vez que el contenido de ácido fólico de la levadura no exceda a 0.04 mg/ga de levadura (aproximadamente 0.08 mg. de Acido Pteroylglutámico/ga. de levadura). Esto podría ser objeto de futuros trabajos de investigación, así como también la determinación del contenido de vitaminas y aminoácidos en la misma.

A P E N D I C E

COLORACION B.

CRISTAL VIOLETA

Solución A

Cristal violeta (80%) de colorante	0.4 gms.
Alcohol Etílico, 95%	20 ml.

Solución B

Oxalato de amonio	0.8 gms.
Agua destilada	80 ml.

Para usarse, mezclar partes iguales de Solución A y B.

A UL DE METILENO:

A ul de metileno	0.3 gms.
Alcohol 95%	30 ml.
Agua destilada	100 ml.

Disolver el colorante en el alcohol, agregar el agua destilada y filtrar por papel filtro.

MEDIOS DE CULTIVO.

MEDIO AGAR DEXTROSADO DE SAPOURIN DA

Glucoza	40 gms.
Peptona	10 gms.
Agar	35 gms.
Agua destilada	1000 cc.

Disolver por agitación y ebullición. Dispensar en tubos. Esterilizar a 15 lbs. por 15 minutos. Inclinarse los tubos para formar bisel.

AGAR SANGRE:

Medio base para agar sangre	40 gms.
Agua destilada	1000 cc.
Agar	5 gms.
Sangre estéril	50 cc.

A. Suspender el medio base para agar sangre y el agar en 1000 cc de agua destilada. Déjelo en reposo por 5 minutos. Luego colóquelo, agitando con frecuencia hasta que esté bien disuelto. Esterilice a 121°C por 15 minutos.

B. Deje enfriar el medio estéril a 45°C o 50°C en un baño de maría, agregue 50 cc. de sangre estéril (5%) mezcle y vacíelo en placas estériles aproximadamente 15 cc. en cada placa. Esto debe realizarse en un cuarto cerrado y en el frío del mechero para evitar contaminación de las placas.

CALDO DEXTROSADO DE SABOURAUD:

Glucosa	40 gms.
Peptona	10 gms.
Agua destilada	1000 cc.

Disolver por agitación, dispensar en tubos. Esterilizar a 15 libras por 15 minutos.

MEDIO AGAR HARINA DE MAIZ (Corn Meal Agar)

Infusión harina de maíz	50 gms.
Agar	15 gms.

Para rehidratar el medio, suspender 17 gms. en 1000 cc. de agua destilada, calentar hasta hervir para disolver el medio. Luego esterilizar durante 15 minutos a 15 libras de presión. El medio se vaía en placas estériles en condiciones asépticas.

MEDIO AGAR MELAZA DE CAÑA:

Melaza de caña	100 ml.
Agar	30 g
Sulfato de amonio dibásico	4 g
Agua destilada c.s.p.	1000 cc

MEDIOS PARA LA FERMENTACION DE AZUCARES POR LEVADURA:

Caldo de Extracto de Carne:

Para usar en las pruebas de fermentación de carbohidratos por levaduras.

Extracto de carne de buey	3 g
Peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Agua destilada	900 ml
Indicador	100 ml

Ajuste el pH a 7.2, dispénselo en tubos en cantidades de 10 ml., esterilícelo a 120°C por 15 minutos.

Solución Indicadora para uso en las Pruebas de Fermentación de Carbohidratos por Levadura Cándida utilis:

Azul de bromo timol	0.04 gms.
Agua destilada	100 ml.

Añada una pequeña cantidad de hidróxido de sodio 1N para hacer una solución alcalina (azul). Déjelo en reposo por toda la noche. Añada ácido clorhídrico 1N hasta alcanzar el punto exacto de neutralidad, cuando una gota de ácido o base causa un cambio completo de color.

Solución de los Azúcares:

Preparar solución al 20% de los carbohidratos que se van a utilizar en las pruebas de fermentación: dextrosa, maltosa, lactosa, y sucrosa. Estas soluciones deben ser esterilizadas por filtración. Añada 0.5 ml. de solución de azúcar al 20% a los tubos - con el caldo.

MEDIOS PARA LA ASIMILACION DE AZÚCARES POR LA LEVADURA:

a. Yeast nitrogen base	6.7 g.
Agua destilada	100 ml.

Esterilizar por filtración.

- b. Azúcares en concentración al 20%. Disolver por agitación, esterilizar por filtración, preparar soluciones de dextrosa, galactosa, lactosa, maltosa, rafinosa y sucrosa.

c. Agar	2 g.
Agua destilada	100 cc.

Disolver por calentamiento. Dispensar en tubos de ensayo 7 ml. en cada tubo. Esterilizar a 15 lbs. por 15 minutos. Enfriar a 50°C. A cada tubo con agar añadir 1 ml. de yeast nitrogen base y 0.5 ml. de azúcar. Mezclar por rotación. Inclinarse los tubos y dejar que solidifiquen.

FORMULA DEL GRANULADO LACTOSA ALMIDON:

Polivinil pirrolidina al 5% en alcohol al 70%	
Lactosa	70%
Almidón	30%

Se disuelve el PVP en alcohol y se va agregando poco a poco en la mezcla lactosa-almidón hasta dar consistencia pirular. Pasar por tamiz #2 y luego por tamiz #2.1/2. Poner a secar el granulado a 50°C.

FORMULA DE PELICULA PARA CUBIERTAS DE TABLETA

Polivinil Pirrolidina al 5% en alcohol	
Polietilenglicol 600 al 2%	
Glicerina al	5%
Color rojo para dulces al 10%	
Etanol al 70% csp	100 cc.

En las últimas capas agregar Shelac al 10%.

B I B L I O G R A F I A

- Ajello, L.J. K. Georg, Kaplan, W. and Korfman, L. Laboratory Manual for Medical Mycology, U.S. Department of Health, Education and Welfare. Public Health Service Communicable Disease Center, Atlanta 1966.
- Berg, A. Estudio sobre Nutrición, su Importancia en el Desarrollo Económico. Trad. por Guadalupe Becerra Perusquia. -- Limusa, México, 1975.
- Bohar, Moisés y Bresciani, Ricardo. Recursos Proteínicos en América Latina (Memoria) INCAP, Guatemala, 1970.
- Carpenter, P. Microbiología. Trad. por José Rafael Blengio. 2a. Edic. Editorial Intersamericana, México 1969.
- Champagnat, Vernot, C. Lainé, B. and Filosa, J. Biosynthesis of Protein Vitamin Concentrates from Petroleum Nature 197 (4862). 1963. pp. 13-14.
- Da Silva Lacaz, Carlos. Manual de Micología Médica. 2a. Edición, Sao Paulo, Brasil 1965. pp. 5-6.
- Da Silva Lacaz, Carlos. O Grande Mundo Dos Fungos. pp.120-123
- Davis P. Single Cell Protein. London Academic Press, 1971
- Frazier, M.C. Microbiología de los Alimentos, Acribia-Lara - gosa, España. 1976. pp. 35-43, 363, 405-407.
- Frobisher, M. Sc. D. Fundamentals of Microbiology W. B. Saunders Co. 1967.

- Gómez López, Gloria. Películas para Cubiertas de Tabletas. Tesis de Grado. Facultad de Química y Farmacia. El Salvador, 1967. pp. 7, 11, 18, 19.
- Guillón M., M. de. Estudios Preliminares sobre el Estudio de -- Una Levadura. Tesis de Grado. Instituto Politécnico Nutricional. México 1970.
- Horwitz, W. ed. AOAC, 12th Ed. Washington 1975, pp. 15, 192, 952, 953, 954.
- Heeneberg, W. Demeter, J. K. y Elbert Abagon, H. Elementos de Microbiología Lactológica. Acribia Zaragoza, España, 1971, pp. 26-30, 58-64.
- Herman Kretzschmar, Levaduras y Alcoholes y otros productos de fermentación. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, Buenos Aires México 1961. pp. 41-151.
- Kapsiotis, G. D. Los Alimentos Obtenidos a Partir de Residuos y Consideraciones Nutricionales. Alimentación y Nutrición. 3: 11-14 (1977).
- Litchfield, John H. Microbial Cells on Your Menu. CIENTECH April 1978. pp. 218-223.
- Lodder, H. The Yeast, A Taxonomic Study, North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1970, pp. 1064-1065-1066.
- Lachman, L. Lieber Mann, H. A. and Kaming, J. L. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. Webiger, Philadelphia, 1970 pp. 311-321.

- Matkovsky, Valentin. Levadura *Torula* Producida de la Pulpa de Café y Alternativamente de la Melaza de Caña de Azúcar. Guatemala, Asociación Guatemalteca de Microbiología, 1971 p.116.
- MacLaren, D. D. Single Cell Protein an Overview, *Chemtech* -- October 1975 pp. 594-597.
- Mena, A. L. Levaduras Alimenticias, Fuentes Importantes de Proteínas y Vitaminas del Complejo B. Tesis de Grado, Facultad de Química y Farmacia, El Salvador, 1971.
- Marcano Rivas, J.J. Utilización de las Aguas Hiclos del Café y el Extracto de la Pulpa del Café como Medio para Producir Levaduras. Tesis de Grado. Facultad de Ingeniería, El Salvador 1971.
- Prescott, S.C. and Dunn, C.C. *Industrial Microbiology*, McGraw Hill Book Co., 1969.
- Peleczar, M.J. *Microbiología*. 2a. Edición, Madrid España, Ediciones Castilla S.A. 1966 p. 215.
- Thodes, A. y Fletcher, D.L. *Principios de la Microbiología Industrial*, Acribia, España 1969.
- Remington's *Pharmaceutical Sciences* 14 Ed. Easton, Mack Publishing, 1970, pp. 1043-1667.
- Santamarina Guerra, Víctor R. Estado actual de Fermentación y Estado y Orientación de la Industria Alimenticia Moderna. Habana, Universidad de La Habana, 1968, (*Tecnología 6: Ingeniería Química* #1, Abril 1968) p. 15.

-- The Pharmacopoeia of the United States of America U.S.P. XIX,
Nineteenth Revision Easton. Mack Publishing Company. Julio
1975, p. 758.

- The Pharmacopoeia of the United States of America U.S.P. XV,
Fifteenth Revision Easton. Mack Publishing Company, Do. 15,
1955 p. 790-791 -- 909-936-945.