

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**”PRODUCCION DE PROTEINA UNICELULAR, UTILIZANDO AGUA DE
COCIMIENTO DE MAIZ COMO MEDIO DE CULTIVO Y ESTUDIO
CINETICO DEL CRECIMIENTO DE “Candida utilis” .”**

**TRABAJO DE GRADUACION
PRESENTADO POR**

**VICTOR HUGO RIMBAUD CASTELLANOS RODRIGUEZ
JUAN MANUEL CHICAS VASQUEZ**

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA

MARZO 2003

SAN SALVADOR,

EL SALVADOR,

CENTRO AMERICA



© 2001, DERECHOS RESERVADOS

**Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador**

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTORA

Dra. María Isabel Rodríguez

SECRETARIA GENERAL

Licda. Lidia Margarita Muñoz Vela

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

Licda. María Isabel Ramos de Rodas

SECRETARIA

Licda. Ana Arely Cáceres Magaña

ASESORES

Ing. María del Carmen Guillén de Medrano

Lic. Julio César Valle Valdéz

JURADO

Licda. María Elsa Romero de Zelaya

Licda. María Cristina Seoane de Rodríguez

Lic. José Danilo Ramírez Martínez

AGRADECIMIENTOS

- Dedicamos nuestro triunfo académico, en primer lugar: A Dios Todopoderoso, por su inspiración y constante orientación,
- A nuestros padres, hermanos y demás familiares, por su permanente apoyo e indeclinable confianza.
- A nuestros asesores Ing. María del Carmen Guillén de Medrano y Lic. Julio César Valle Valdéz, por su valiosa ayuda en la laboriosa tarea de estructuración y revisión del trabajo, así como a su disponibilidad en todo momento para orientarnos.
- Al Sr. Gerardo Coreas, por el apoyo incondicional, durante el trabajo en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Al personal del Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, específicamente a Lic. Alcira Méndez.
- A nuestro jurado calificador: Licda. María Elsa Romero de Zelaya, Licda. María Cristina Seoane de Rodríguez y Lic. José Danilo Ramírez Martínez, por su valioso apoyo y colaboración.
- A todas aquellas personas que directa o indirectamente colaboraron con el presente trabajo.

Víctor Hugo Rimbaud Castellanos Rodríguez y Juan Manuel Chicas Vásquez

DEDICATORIA

- **A DIOS TODOPODEROSO**
por permitirme finalizar este trabajo.
- **A MI QUERIDA ESPOSA**
Liz, por ser la inspiración para el desarrollo de este trabajo y por recibir de ella todo el apoyo, amor y comprensión...gracias mi amor.
- **A MIS PADRES**
Ana Gladis y Francisco Antonio, por el sacrificio realizado, por inculcarme el hábito del estudio, y por darme todos esos momentos de felicidad junto a ellos...los quiero mucho.
- **A MIS HERMANOS**
Francisco Antonio y Carlos Vladimir, por permitirme quererlos infinitamente, apoyándonos y protegiéndonos mutuamente.
- **A MI ABUELA DEL ALMA**
María Leoncia (Q.D.D.G.) por haber dejado esa huella imborrable de amor en mi vida.
- **A MI DEMAS FAMILIA**
Quienes han contribuido de una u otra forma, a alcanzar objetivos como este.
- **A MI COMPAÑERO DE TESIS**
Víctor Hugo, por los objetivos alcanzados durante todos estos años de Colegio y Universidad, alcanzando una sólida amistad
- **AL PERSONAL DE LA UTMIM**
Por las muestras de amistad y compañerismo cotidiano.
- **A AQUELLOS AMIGOS**
Quienes se encuentran formando parte de este logro...gracias

Juan Manuel Chicas Vásquez

DEDICATORIA

- **A DIOS TODOPODEROSO**
En primer lugar, a Dios, que fue mi constante compañía en las horas de estudio y será siempre fuente de inspiración en mi carrera profesional,
- **A MIS PADRES**
Gloria Esperanza y Santiago, manantial constante de apoyo a lo largo de mi trayectoria estudiantil y fuerza decisiva para culminar mi carrera,
- **A MIS HERMANOS**
Claudia Carolina y Carlos Vladimir, cuyo cariño fraterno me brindó fuerzas para salir adelante,
- **A MIS SOBRINOS**
Gabriela, Vladimir y Josue, cuya sana alegría me irvió asimismo de inspiración
- **A MI TIA**
Quelita, por su apoyo, porque siempre ha creído en mí y cuya confianza agradezco.
- **A MIS ABUELOS**
Arturo (Q.D.D.G.), Margarita (Q.D.D.G.), Santiago (Q.D.D.G.), Jesús, por su cariño y comprensión.
- **A MI COMPAÑERO DE TESIS**
Juan Manuel, por compartir los mismos objetivos y por su invaluable amistad de muchos años.
- **AL PERSONAL DE CORPORACIÓN BONIMA**
Por su ayuda
- **A AQUELLOS AMIGOS**
Gerardo y Alfredo por todo el esfuerzo que dedicamos para alcanzar

Víctor Hugo Rimbaud Castellanos Rodríguez

INDICE

	N° de Página
Introducción	i
Objetivos	3
CAPITULO I	
ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	5
1. Hambre y mala nutrición	
1.1 Generalidades	5
1.2 Alimentación en El Salvador	7
2. Microorganismos como fuente de alimento	9
3. Proteína Unicelular	18
4. Levaduras	22
4.1 <i>Generalidades</i>	22
4.2 <i>Historia de las levaduras</i>	24
4.3 <i>Productos alimenticios de las levaduras</i>	25
4.4 <i>Identificación de levaduras</i>	29
5. Candida utilis	32
5.1 <i>Generalidades</i>	32
5.2 <i>Clasificación</i>	33
5.3 <i>Usos</i>	34
6. Sustratos utilizados por los Microorganismos	35
6.1 <i>Utilización de residuos agroindustriales</i>	37
6.2 <i>Generación del Agua de cocimiento de maíz</i>	40
6.3 <i>Valor nutricional del agua de maíz</i>	42
7. Cinética de crecimiento microbiano	43
7.1 <i>Medición del crecimiento microbiano</i>	44
7.2 <i>Cinética de crecimiento microbiano de un cultivo por lotes</i>	48
7.3 <i>Evaluación de la cinética del crecimiento microbiano</i>	50

CAPITULO II PROCESO EXPERIMENTAL

8.1	<i>Obtención del sustrato</i>	54
8.2	<i>Preparación del inóculo</i>	54
8.3	<i>Preparación del bioreactor</i>	55
8.4	<i>Preparación de la fuente de oxígeno</i>	55
8.5	<i>Preparación del medio de cultivo</i>	56
8.6	<i>Producción</i>	56
8.7	<i>Tratamiento de muestras</i>	57

CAPITULO III RESULTADOS

9.	Resultados de la evaluación del crecimiento microbiano en el proceso de producción de proteína unicelular	65
10.	Resultados de la aplicación del Método de Fenol-Sulfúrico para la cuantificación de azúcares totales durante el proceso de producción de Proteína Unicelular	68

CAPITULO IV ANALISIS DE RESULTADOS

11.	Análisis de Resultados	72
11.1	<i>Cálculo de la velocidad específica de crecimiento por el método turbidimétrico</i>	79
11.2	<i>Cálculo del Tiempo de duplicación(Método Turbidimétrico)</i>	79
11.3	<i>Cálculo de la Velocidad específica de consumo de sustrato</i>	90
11.4	<i>Cálculo de la Velocidad específica de formación de producto</i>	94
11.5	<i>Cálculo del rendimiento específico de producto sobre sustrato</i>	97
11.6	<i>Cálculo del rendimiento específico de biomasa sobre sustrato</i>	100

CAPITULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones	103
Recomendaciones	105

BIBLIOGRAFIA

107

ANEXOS

INDICE DE TABLAS

N° de Tabla		Páginas
1	<i>Composición de algunas fuentes de proteína</i>	14
2	<i>Contenido de algunos aminoácidos en varias fuentes de proteína</i>	15
3	<i>Composición vitamínica de levaduras cultivadas en fuentes de carbono y la levadura comercial</i>	16
4	<i>Análisis próximoal de varias levaduras</i>	17
5	<i>Rendimientos aeróbicos del algunos microorganismos cultivados en glucosa</i>	36
6	<i>Concentración de sacarosa: 100 ug/mL</i>	62
7	<i>Resultados de la Curva Estándar de Patrones Mcfarland</i>	65
8	<i>Resultados del análisis de muestras por el Método Turbidimétrico durante el proceso de Producción de Proteína Unicelular</i>	66
9	<i>Resultados de análisis de muestras por el Método de Peso Seco durante el proceso de producción de Proteína Unicelular.</i>	67
10	<i>Curva Estandar de sacarosa</i>	68
11	<i>Resultados del análisis de muestras por el Método de Fenol Sulfúrico para la cuantificación de azúcares totales durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular</i>	69
12	<i>Porcentaje de Producto (Proteína) obtenida durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular</i>	70

13	<i>Resultados del Análisis de pH en muestras durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular</i>	71
14	<i>Aplicación de Regresión Lineal a la Curva Estándar de Patrones Mcfarland</i>	73
15	<i>Resultados del Análisis de Muestras por el Método Turbidimétrico durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular</i>	75
16	<i>Aplicación de Regresión Polinomial a los resultados del Análisis de Muestras por el Método Turbidimétrico durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular</i>	77
17	<i>Aplicación de Regresión Polinomial a los resultados del Análisis de Muestras por el Método de Peso seco, durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular</i>	80
18	<i>Aplicación de Regresión Polinomial a los resultados del Análisis de Muestras por el Método de Peso Seco durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular</i>	82
19	<i>Aplicación de Regresión Lineal a la Curva Estándar de Sacarosa</i>	84
20	<i>Resultados del Análisis de Muestras por el Método de Fenol Sulfúrico, para la cuantificación de Azúcares Totales durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular</i>	86
21	<i>Aplicación de Regresión Polinomial a los resultados del Análisis de Muestras por el Método de Fenol Sulfúrico, para la cuantificación de Azúcares Totales durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular</i>	88
22	<i>Aplicación de Regresión Polinomial a los resultados del Porcentaje de Proteína de muestras, durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular</i>	92
23	<i>Aplicación de Regresión Lineal a los resultados del Análisis de pH en muestras, durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular</i>	101

INDICE DE GRAFICOS

N° de Tabla		Páginas
1	<i>Curva de Crecimiento de un Cultivo por Lotes</i>	49
2	<i>Curva Estándar de Patrones Mcfarland</i>	74
3	<i>Curva de Turbidimetría (Muestras)</i>	76
4	<i>Cálculo de la Velocidad Específica de Crecimiento</i>	78
5	<i>Curva de Peso Seco</i>	81
6	<i>Curva de Peso Seco</i>	83
7	<i>Curva Estándar de Sacarosa (Método de Fenol Sulfúrico)</i>	85
8	<i>Curva de Consumo de Sustrato(Método de Fenol Sulfúrico)</i>	87
9	<i>Cálculo de la Velocidad Específica de Consumo de Sustrato</i>	89
10	<i>Curva de Formación de Producto (% de Proteína)</i>	91
11	<i>Cálculo de la Velocidad Específica de Formación de Producto</i>	93
12	<i>Curva de Rendimiento de Producto sobre Sustrato</i>	95
13	<i>Cálculo de Rendimiento específico de Producto sobre Sustrato</i>	96
14	<i>Curva de Rendimiento de Biomasa sobre Sustrato</i>	98
15	<i>Cálculo de Rendimiento específico de biomasa sobre Sustrato</i>	99
16	<i>Curva de pH</i>	102

Introducción

El objetivo de la presente investigación fue determinar el aprovechamiento del agua de cocimiento de maíz para la producción de proteína unicelular; lo que implicó establecer un estudio cinético para evaluar la eficacia del proceso.

Uno de los problemas principales que afronta nuestro país, es la carencia de alimentos en cantidad y calidad adecuadas, de tal forma que es necesario desarrollar e implementar tecnologías que tengan como objetivo la obtención de productos que puedan ser utilizados en la preparación de alimentos con un alto valor nutricional. Por esto es necesario la búsqueda de nuevos sustratos para la propagación de microorganismos. De éstos, la *Cándida utilis* constituye una de las levaduras más importantes (desde el punto de vista técnico y nutricional).

La propagación industrial de microorganismos para su utilización posterior en la alimentación humana y animal es un proceso perfectamente establecido desde principios de siglo; es así como nace el término “Proteína Unicelular”, con el cual se identifica a los alimentos derivados de microorganismos utilizados con fines alimenticios por su alto contenido de proteínas.

En todo proceso de producción de proteína unicelular se requiere la medición de parámetros cinéticos del crecimiento microbiano y que, al final, determinan el grado de eficiencia del proceso de producción. El conocimiento de la cinética de un cultivo permite la predicción del transcurso de la fermentación, la evaluación de velocidades de crecimiento microbiano, de consumo de sustrato, de formación de producto, rendimientos y productividades, además proporciona información útil para establecer estrategias de producción y optimización del proceso de obtención de proteína unicelular.

La modalidad utilizada en este estudio es la denominada cultivo por lotes, la cual se define como aquella que se realiza sin intercambio de materia con los alrededores, salvo lo referente a los gases (aireación, producción de dióxido de carbono). En esta modalidad de cultivo se adicionan inicialmente los nutrientes y luego se inócula con una cantidad de células viables.

En el capítulo I comenzamos con una investigación bibliográfica, en la cual se abordan diferentes temas como son la importancia de la producción de alimentos con elevada calidad nutricional, la utilización de microorganismos como fuente de alimento, la utilización de residuos agroindustriales como sustrato y el estudio cinético de poblaciones microbianas. En el capítulo II se establece el proceso experimental utilizado; en el capítulo III se detallan los resultados obtenidos, mientras que el análisis de los mismos se reportan en el capítulo IV el último capítulo contiene las conclusiones y recomendaciones de la investigación desarrollada.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar el proceso de producción de proteína unicelular, mediante la utilización de agua de cocimiento de maíz como medio de cultivo, para obtener datos experimentales de la cinética de crecimiento de *Candida utilis*.

1.2. Objetivos Específicos

1.2.1 Identificar los factores físicos, químicos y biológicos que influyen en el proceso de producción de proteína unicelular, a partir de *Candida utilis*.

1.2.2 Proponer mejoras en la producción de proteína unicelular, mediante el análisis de datos cinéticos, obtenidos experimentalmente durante el proceso de producción de esta proteína.

1.2.3 Elaborar curvas de crecimiento microbiano que permitan identificar y analizar las diferentes etapas del ciclo de vida microbiano.

1.2.4 Determinar la velocidad de crecimiento microbiano durante el proceso de producción.

1.2.5 Evaluar la velocidad de consumo de nutrientes presentes en el medio de cultivo utilizado en el proceso.

1.2.6 Cuantificar, a través de técnicas apropiadas, la proteína unicelular obtenida al final del proceso.

1.2.7 Establecer el rendimiento global obtenido durante el proceso de producción de Proteína Unicelular.

1.2.8 Determinar, mediante el método de micro-Kjeldahl, el porcentaje de proteína presente en una muestra determinada.

1. HAMBRE Y MALA NUTRICION

1.1 GENERALIDADES

Con una población que alcanzó unos 6400 millones para el año 2000, la búsqueda mundial de fuentes abundantes y económicas de proteína se hace urgente. La producción de proteína mediante el cultivo de microorganismos está siendo usada en escala cada vez mayor. Los microorganismos son una excelente fuente de aminoácidos y vitaminas solubles en agua. Su cultivo en cantidades lo bastante grandes como para suplir una buena parte de los requerimientos proteicos del mundo, sólo se puede hacer usando sustratos que contengan fuentes de carbono.



Figura N°1: El hambre, uno de los mayores problemas a nivel mundial.

1.2 ALIMENTACION EN EL SALVADOR

El caso de El Salvador es muy particular; actualmente se estima que la población ha alcanzado la cifra de 7,4 millones de habitantes, que vive en una extensión de 21146 kilómetros cuadrados, o sea, que hay una densidad demográfica de 350 personas por kilómetro cuadrado.



Figura N°2: La deficiencia en la nutrición afecta el desarrollo de infantes.

Se estima que más del 50 % de la población salvadoreña sufre deficiencia calórico – proteica, la cual es especialmente peligrosa en niños, ya que si existen deficiencias proteicas en la alimentación durante la infancia entre los 0 y 4 años, es ha afectado el desarrollo normal de la persona.

Entre los principales componentes del alimento (carbohidratos, grasas, proteínas, vitaminas y minerales) son las proteínas el componente que más escasea. La diferencia entre la producción y las necesidades de proteína del mundo se estima en unos 2,6 millones de toneladas de proteína animal por año.

El problema de la escasez de alimentos no significa únicamente hambre. Junto a poblaciones que carecen de alimentos, que padecen hambre, existen otras que, aún satisfaciendo sus requerimientos calóricos mínimos, manifiestan una serie de enfermedades debido a la carencia de algún componente esencial en su dieta; es decir, su alimentación no está balanceada. Para que el hambre y la mala nutrición fueran eliminadas, la producción mundial de proteínas tendría que aumentar por lo menos un 45 por ciento.

1.2 SOLUCIONES AL PROBLEMA DEL HAMBRE

Existen actualmente varios procedimientos para aumentar los recursos alimenticios. Los que se sugieren con más frecuencia son los siguientes:

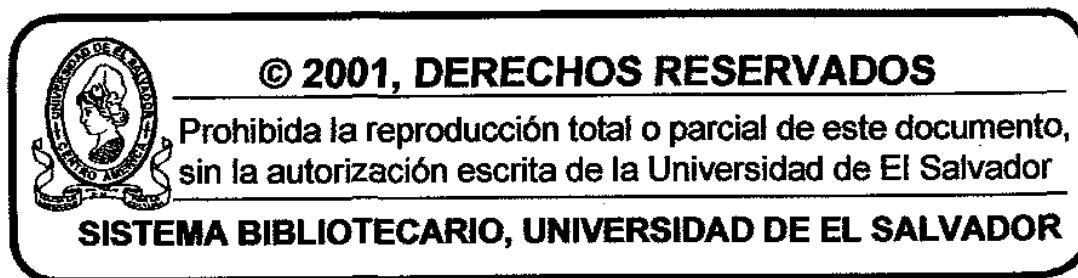
- Aumento del rendimiento de la agricultura.
- Utilización de alimentos disponibles pero poco usados.
- Producción de nuevos alimentos.

1.2.1 Aumento del rendimiento de la agricultura. Elevar el rendimiento de las tierras cultivadas es básicamente el objetivo de la agricultura moderna, para ello se idean mejores sistemas de riegos y drenajes, se recurre a la fertilización, se hacen mejoras genéticas de semillas y plantas, se controlan las plagas con productos cada vez más efectivos (insecticidas, fungicidas, herbicidas), se mejoran las prácticas de manejo de los cultivos y hasta se emplean programas de computación, limitando la producción por el área de cultivo.

1.2.2 Utilización de alimentos poco usados. Esta segunda solución al problema del hambre y mala nutrición consiste en la utilización de recursos alimenticios disponibles. El cultivo de los océanos por técnicas nuevas, recurriendo a productos “pocos usuales”, tales como algas y peces de desecho, el cultivo de peces bajo condiciones de laboratorio en estuarios, lagos, lagunas y ríos; el uso de la proteína de pescado en la alimentación de animales y de seres humanos.

1.2.3 Producción de nuevos alimentos. La tercera solución al problema de la escasez de recursos alimenticios es la fabricación de alimentos nuevos. Aquí se incluye la producción de proteína unicelular, celulosa y almidón. La producción de proteínas a partir de hojas e incluso la síntesis química completa de aminoácidos y polipéptidos.

Normalmente, las hojas de los vegetales no son utilizadas por el hombre como fuente de proteína, debido a su elevado contenido en celulosa, que las hace indigeribles para el ser humano. Las proteínas foliares tienen que ser trasladadas a otras partes de las plantas, tales como raíces, frutos o semillas, para poder servir de alimento humano. Las proteínas foliares se extraen por maceración de hojas y precipitación, por procedimientos bioquímicos, de la proteína del “jugo” de hojas así preparado. El cultivo de células vegetales en fermentadores continuos es una fuente promisoría de proteína, ya que el producto es completamente comestible y no contiene celulosa ni hemicelulosa, como las hojas.



Se pueden obtener proteínas sintéticas cultivando hongos, por ejemplo: *Penicillium notatum*, en almidón de desechos de productos de panadería, papas, yuca u otros vegetales.

Finalmente, se puede producir proteína cultivando microorganismos en desechos agroindustriales como el agua de cocimiento de maíz.⁴

2. MICROORGANISMOS COMO FUENTE DE ALIMENTO

Los microorganismos útiles para el hombre constituyen solamente una proporción muy pequeña de una amplia variedad de especies que existe en la naturaleza. El papel que desempeñan algunos de ellos en la fabricación de la cerveza, el pan y el vino fue descubierto en forma accidental hace mucho tiempo. Por ejemplo, la transformación que sufre el jugo de la uva y la masa para hacer el pan. Hoy en día se sabe que se debe a las levaduras. Microorganismos bien conocidos también son las bacterias, que acidifican la leche o los hongos microscópicos que le confieren su carácter tan particular a los quesos.

Es difícil clasificar los microorganismos en útiles y no útiles, o en buenos y malos, ya que todos participan en el reciclaje de las moléculas del mundo orgánico conservando la ecología. De tal forma que los microbios no sólo son útiles sino indispensables para la vida como la

⁴ Revista de la Facultad de Agronomía, “Producción de Proteínas a partir del Petróleo”. Universidad del Zulia, Maracaibo. Venezuela.

conocemos actualmente. Algunos son nocivos para los animales o plantas, pero en proporción son muy pocos.

Existe un buen número de microorganismos que está siendo utilizado en la industria. Esto se debe a que producen un compuesto de alto valor que no puede ser obtenido de una manera tan sencilla o tan económica por las técnicas químicas usuales. En algunos otros casos, los microorganismos son cultivados por su valor intrínseco, como es el caso de la levadura de panadería.

Las levaduras industriales son microorganismos facultativos que pueden respirar o fermentar de acuerdo a las condiciones en que se les cultive. El metabolismo anaeróbico, como la fermentación, es menos eficiente que la respiración, ya que la primera no aprovecha toda la energía de las moléculas como los azúcares. Algunos productos, como por ejemplo el alcohol etílico, son excretados por la levadura como producto de desecho, ya que en ausencia de oxígeno este producto no puede ser aprovechado en su totalidad.

Las vías bioquímicas de la fermentación que conducen a la formación de productos útiles son diversas. Estas vías son de dos tipos: las homofermentarias, que son las que conducen a un producto principal, y las heterofermentarias, que dan dos o más productos. Así pues, algunos bacilos lácticos heterofermentarios producen ácido láctico a partir de azúcares.

Por otra parte, el crecimiento aeróbico que llevan a cabo algunos microorganismos es más eficiente para la producción de biomasa (número de organismos obtenidos a partir de una cantidad dada de nutrientes), ya que estos organismos degradan completamente las moléculas nutritivas y les extraen el máximo de energía. Esto quiere decir que si la meta de la producción industrial es mejorar los sistemas de obtención de grandes cantidades de organismos, como es el caso de la levadura *Cándida utilis* para la producción de proteína unicelular, es ventajoso trabajar con el organismo en condiciones aeróbicas ya que de esta forma se utilizan los sustratos al máximo por respiración y, por lo tanto, se obtendrán muchas más levaduras por cantidad de nutrientes.⁵

Las levaduras fueron explotadas durante miles de años para la elaboración de bebidas alcohólicas y de pan. Estó ocurrió antes de que se identificara a las levaduras como un microorganismo y de que se conociera la verdadera naturaleza de la fermentación de la cerveza. Casi 200 años después, en 1876, Louis Pasteur presentó sus ideas sobre la fermentación, en las cuales postula que los microorganismos viven en condiciones anaeróbicas son capaces de crecer y vivir sustituyendo el proceso de respiración por la fermentación. Este proceso convierte azúcares en alcohol y bióxido de carbono, el proceso de fermentación se detiene y es sustituido por la respiración o consumo de oxígeno, proceso que sí degrada el azúcar hasta bióxido de carbono y agua, y no produce alcohol. La fermentación es muy importante socialmente, ya que mediante ella se producen las bebidas alcohólicas que

⁵ <http://www.verema.com/opinamos/tribuna/articulos/levaduras02.htm>

han tenido un papel importante en la historia. Actualmente, las levaduras y las bacterias metilotróficas son los principales organismos que se han utilizado para producir el producto microbiano como es la proteína unicelular.



Fotografía N°3: Luis Pasteur es el creador de la microbiología, estudió las fermentaciones.

Los azúcares más comúnmente utilizadas por las levaduras durante su crecimiento son la glucosa y la fructosa, que contienen 6 átomos de carbono. Sin embargo, existen otros compuestos con mayor o menor número de átomos de carbono y que son de interés en algunas industrias. La levadura *Sacharomyces lipolítica* puede romper cadenas lineales de hidrocarburos de 10 a 16 átomos de carbono; existe una instalación piloto que ha logrado hacer crecer esta levadura con buenos resultados en presencia de una fracción purificada de petróleo, el cual, como se sabe, es un hidrocarburo. Esta levadura, al crecer, produce ácido cítrico como producto de desecho, el que a su vez es utilizado en otra serie de procesos industriales. Asimismo, una variedad limitada de levaduras puede crecer en presencia de

metanol (un alcohol con un solo átomo de carbono). Esto es posible ya que tales levaduras llevan a cabo un proceso metabólico novedoso que involucra unos organelos especializados llamados microcuerpos. Lo anterior se ha aprovechado, ya que el cultivo utilizando metanol es muy barato y la producción de biomasa de las levaduras es tan abundante que se utiliza como complemento para la alimentación de animales.

Otra levadura que ha sido muy útil desde tiempos remotos es la cepa denominada *Sacharomyces cerevisiae*. Esta ha sido utilizada en la elaboración de vino, cerveza y, hoy en día, para la producción de alcohol.



Figura N°4: La fabricación del vino es un ejemplo de la importancia de los procesos fermentativos.



Figura N°5: La producción de queso implica la utilización de microorganismos.

En cuanto a la *Cándida utilis*, esta es utilizada en la industria alimenticia, puede crecer metabolizando azúcares de cinco átomos de carbono (pentosas) y permite la formación de un producto rico en proteína, utilizado como suplemento en la alimentación animal, e incluso depurando el proceso de obtención puede ser empleada en la alimentación humana.

En la alimentación humana y animal han sido siempre las proteínas las más difíciles de suplir. En la tabla 1 se observa la comparación de las células microbianas con la de otras fuentes de proteína y se observa que la carne ha sido siempre la fuente de proteína animal preferida por el hombre, contiene dos veces más nitrógeno y aminoácidos esenciales que la harina de soya, la fuente de proteína vegetal de mayor uso en el mundo. Las bacterias y levaduras son similares en su composición a la harina de soya. El mayor contenido de nitrógeno en las bacterias que en las levaduras es debido a su contenido relativamente alto de ácidos nucleicos. Los hongos son inferiores a las bacterias y levaduras en cuanto a su contenido en nitrógeno y aminoácidos esenciales. Además, debido a los problemas reológicos que su micelio ocasiona, hacen difícil la aeración, los hongos no son considerados como una fuente promisoría de proteínas.

TABLA 1. Composición de algunas fuentes de Proteínas

Fuente de Proteína	Nitrógeno %	Aminoácidos esenciales % de la proteína	Relación aminoácidos/N
Bacterias	11	26	2,4
Levaduras	8	28	3,5
Hongos	6	11	1,8
Harina de soya	8	22	2,8
Carne	15	48	3,2

Fuente: Revista de la Facultad de Agronomía, "Producción de Proteínas a partir del Petróleo". Universidad del Zulia, Maracaibo. Venezuela.

La tabla 2 muestra una comparación del contenido en algunos aminoácidos esenciales de algunas fuentes proteicas usadas en la fabricación de alimentos concentrados para animales, con el de levaduras cultivadas en desechos agroindustriales.

TABLA 2. Contenido de algunos aminoácidos en varias fuentes de proteína

Fuente de Proteína	Harina de pescado	Harina de soya	Harina de ajonjolí	Levaduras	Carne
Aminoácido					
% de la Proteína					
Arginina	3,38	3,75	4,85	5,00	-
Lisina	5,00	3,16	1,35	7,8	10,0
Metionina	1,90	0,73	1,42	1,6	3,2
Cistina	0,70	0,74	0,62	0,9	-
Triptófano	0,75	0,74	0,79	1,3	1,4

Fuente: Revista de la Facultad de Agronomía, “Producción de Proteínas a partir del Petróleo”. Universidad del Zulia Maracaibo. Venezuela.

Puede observarse que las levaduras se comparan favorablemente con las harinas de pescado, soya y ajonjolí.

Además de su contenido en aminoácidos, los microorganismos son excelentes como fuente de vitaminas solubles en agua. En la tabla 3 se compara la composición vitamínica de levaduras cultivadas en fuentes de carbono con la de una levadura comercial, que es la fuente corriente de vitaminas en los concentrados para animales.

TABLA 3. Composición vitamínica de las levaduras cultivadas en fuentes de carbono y la levadura comercial

Levadura Aminoácido	Levadura (Francia) gas-oil	Levadura comercial
mg/kg		
Tiamina	4,7	3-5
Riboflavina	142	20-90
Piridoxina	15	60
Vitamina B12	0,007	-
Acido nicotínico	275	190-500
Pantotenato de Calcio	100	100-190
Acido fólico	4	3-30
Inositol	780	3000
Cloruro de colina	1340	210

Fuente: Revista de la Facultad de Agronomía, "Producción de Proteínas a partir del Petróleo". Universidad del Zulia Maracaibo. Venezuela.

Como el principal uso de las levaduras producidas por fermentación es la fabricación de alimentos para animales, en la tabla 4 se presenta el análisis proximal de varias levaduras obtenidas por fermentación.

TABLA 4. Análisis proximal de varias levaduras

Levadura Parámetro	Japón n- parafinas	BP n- parafinas	BP gas-oil	Torula comercial
%				
Humedad	4,5	4,2	5,0	5,0
Proteína	54,1	65,0	68,5	50,5
Grasa	2,8	8,1	1,6	7
Fibra	3,6	-	-	-
Ceniza	7,1	6,0	7,9	6

Fuente: Revista de la Facultad de Agronomía, “Producción de Proteínas a partir del Petróleo”. Universidad del Zulia Maracaibo.Venezuela.

Aunque por su composición en aminoácidos y vitaminas los microorganismos son un excelente alimento, hay que considerar su posible toxicidad, es así que con el objeto de evitar la vía indirecta microorganismo-animal-hombre, en algunos países se hacen intentos de purificar la proteína de microorganismos, de modo que pueda ser incorporada a alimentos humanos. Con esta purificación se remueven en particular, los ácidos nucleicos, los cuales ocasionan

trastornos digestivos en los seres humanos, si su dieta contiene cantidades relativamente elevadas de microorganismos.⁶

3. PROTEINA UNICELULAR

Durante las últimas dos décadas, se han desarrollado varios procesos para la producción de microorganismos útiles como fuentes de proteína para alimentación animal y humana. El término de proteína unicelular (SCP) ha sido empleado durante las últimas tres décadas para referirse a microorganismos tales como bacterias, levaduras, algas y hongos filamentosos, que son empleados con fines alimenticios, principalmente por su alto contenido de proteínas.

El hombre ha consumido, desde hace muchos siglos, los microorganismos que se encuentran presentes en alimentos fermentados. Por ejemplo, quesos, yogurt y más recientemente ha empleado para alimentación humana y animal microorganismos que se derivan de la producción de cervezas y destilerías de alcohol.

La fabricación de (SCP) para la alimentación humana y animal se ha llevado a cabo a partir de la Segunda Guerra Mundial, debido a la rápida velocidad de propagación de los microorganismos, a la diversidad de sustratos que se pueden emplear y a que su producción no depende de las condiciones climáticas. No obstante estos atributos, el alto costo de producción de la (SCP) sólo ha permitido a ésta competir con proteínas de origen vegetal, con

⁶ http://lectura.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/43/htm/SEC_8.html

base a su contenido proteico, bajo circunstancias especiales, o bien debido a sus propiedades funcionales y organolépticas.

Los microorganismos crecen rápidamente, una comparación tradicional es que un toro de 500 kg. puede producir 0.5 kg. de proteína/día, mientras que en el mismo tiempo, 500 kg de levadura pueden producir 50 gramos de proteína. Esta es quizá una de las razones más importantes que determinan el interés en su producción industrial

Las bacterias, principalmente de los géneros *Methylomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Aerobacter* recibieron en los años 60 un interés especial como fuentes potenciales de SCP debido a que son capaces de duplicarse en un período de 20 a 30 minutos y a su alto contenido de proteínas que puede llegar hasta un 85 % en base seca. No obstante estas cualidades, el incremento en el costo durante las últimas dos décadas de algunos sustratos considerados para su propagación como metano, metanol, etanol o hidrocarburos, ha limitado su aplicación.

En contraste, ciertas especies de levaduras, como *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces fragilis*, han sido aceptadas durante largo tiempo tanto en alimentación animal como humana, y se han producido continuamente a partir de la Segunda Guerra Mundial. Los hongos filamentosos y algas tienen la desventaja de crecer más lentamente que las bacterias y

levaduras; sin embargo, en la actualidad se producen comercialmente hongos *Gliocladium deliquescens*, *Paecilomyces varioti* y *Fusarium graminearum* y las algas *Spirulina*.

En el caso de las algas, su producción es en algunos aspectos similar a la agricultura convencional, en donde no se aplican características de alta productividad, pocos requerimientos de terreno y a la no dependencia de condiciones climáticas que prevalecen en procesos de producción de (SCP) a partir de bacterias, levaduras y hongos.

Los diferentes microorganismos pueden ser propagados bajo condiciones asépticas o no asépticas, dependiendo del microorganismo y tecnología empleada, en medios de cultivo que contienen una fuente de carbono y energía; una fuente de nitrógeno (amoníaco o sales de amonio), una fuente de fósforo (ácido fosfórico o sales de fósforo) y minerales (hierro, magnesio, manganeso, potasio, etc).

En cuanto al sustrato principal, la atención inicial se centró en hidrocarburos y otros derivados del petróleo, (metanol y etanol. Más recientemente el interés se ha derivado hacia recursos renovables como residuos agrícolas y subproductos industriales. En particular, los residuos agrícolas, que constituyen el más grande suministro mundial de recursos renovables, así como los azúcares derivados de la caña de azúcar y almidones provenientes de los desperdicios de papas, granos y yuca son aquellos con mayores perspectivas en el futuro.

El empleo de procesos de producción de proteína unicelular para disminuir la demanda bioquímica de oxígeno de efluentes industriales como licores sulfíticos, licores de procesamiento de maíz y efluentes del procesamiento de papas ha tenido cierta importancia industrial. En estos procesos, el objetivo principal es el tratamiento del efluente y la proteína unicelular es un subproducto que por su valor hace más atractivo el sistema de tratamiento.

En muchos casos, los sustratos requieren de un pre-tratamiento físico, químico o enzimático previo a la fermentación. Los residuos agrícolas y forestales, por ejemplo, deben ser hidrolizados a azúcares simples o sometidos a una deslignificación parcial para que puedan ser fácilmente accesibles a los microorganismos. Otros sustratos como melazas y los licores sulfíticos de la industria papelera, requieren de pretratamientos más simples para eliminar impurezas que puedan inhibir el crecimiento de microorganismos.



Figura N°5: Fermentadores donde se produce proteína unicelular.

En síntesis, se puede afirmar que el interés por la producción de proteína unicelular fue estimulado por muchas publicaciones relacionadas con la salud, la alimentación y la agricultura acerca de una escasez de proteína a nivel mundial. En los países subdesarrollados los problemas de nutrición han originado una creciente demanda de proteínas de alta calidad para alimentación animal, estas son preparados para satisfacer los requerimientos nutricionales totales del animal. La SCP podía ser una alternativa válida a algunas de estas fuentes tradicionales, reduciendo el flujo de cereales hacia la alimentación animal. El uso de SCP podría hacer estos productos más accesibles para consumo humano. La producción a gran escala de SCP haría la producción animal menos dependiente de proteínas importadas.⁷

4. Levaduras

4.1 Generalidades

Levadura es el nombre genérico dado a un grupo de hongos Ascomicetes pertenecientes al orden Endomicetales. Las levaduras son microhongos que se encuentran generalmente en forma de células únicas y que se reproducen mediante gemación. Algunas levaduras están formadas únicamente por células individuales y a veces cadenas cortas, mientras otras se encuentran con un cierto rango de formas celulares, incluyendo diversos tipos de filamentos. Una característica de la población en crecimiento de las células de las levaduras es la

⁷ GARCIA GARIBAY, Mariano. QUINTERO RAMIREZ, Rodolfo. LOPEZ-MUNGUIA CANALES, Agustin. "Biotecnología Alimentaria". 1^{ra}. Edición. México: Editorial Noriega, 1993.

presencia de yemas, producidas cuando la célula se divide. La célula hija comienza siendo una pequeña yema, que va creciendo hasta que alcanza un tamaño similar al de la madre y entonces se separa. Para la reproducción sexual forman ascas.

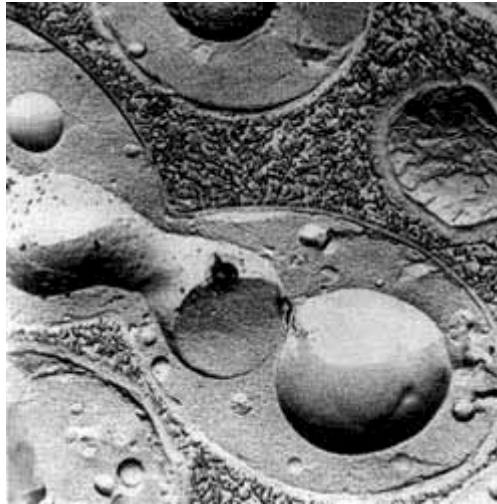


Figura N°6: Una levadura en proceso de división, vista al microscopio de barrido de electrones.

La membrana celular consta de polisacáridos y muy poca quitina. Tiene glucógeno como sustancia de reserva y contiene también numerosas vitaminas. Provocan la fermentación alcohólica de las masas de harina y de los líquidos azucarados, y mucha de ellas se utilizan para obtener bebidas y elaborar pan y otros productos.

La levadura es un anaeróbico facultativo, transformando azúcar a la misma velocidad la levadura aeróbica produce dióxido de carbono, agua y una producción relativamente alta de nueva levadura, mientras que la levadura crecida anaeróbicamente tienen una velocidad

relativamente lenta de crecimiento, que ahora se acopla a una alta conversión de azúcar en alcohol y dióxido de carbono.

4.2 Historia de las levaduras

Las levaduras han alimentado a los animales por más de 100 años. En forma de levadura fermentaron subproductos de la levadura de cervecerías o de destilerías, o productos comerciales de la levadura producidos específicamente para alimentación animal (pienso).

Las levaduras son abundantes a través del ambiente. Pueden ser encontradas en los granos de cereal, subproductos del grano, heno y están incluso presentes en el suelo y el agua. Se les dan nombres latinos que representan su género y especies, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae* o *Candida utilis*. Las especies se diferencian de su morfología o forma celular, cómo metabolizan diversos sustratos y cómo se reproducen. Mientras que hay casi 50 000 especies de hongos, hay solamente 60 diversos géneros de levaduras que representan cerca de 500 diversas especies. La mayoría de las levaduras son saprofitas benignas y se ha probado que no son dañinas al hombre.

Muy pocas especies de la levadura se utilizan comercialmente. La *saccharomyces cerevisiae*, también conocida como levadura del pan, es una de las especies más extensamente comercializadas. Es también la levadura usada por las cervecerías para hacer la cerveza, por

las destilerías para hacer alcoholes destilados y el alcohol para hacer vinos. La *Candida utilis*, conocida como levadura tórula, es importante porque puede utilizar los azúcares de cinco átomos de carbono. Una tercera levadura es la *Kluyveromyces fragilis*. Esta levadura es llamada del “suero”, ya que puede utilizar el azúcar de leche o lactosa como sustrato.

Anteriormente, las fermentaciones fueron realizadas sembrando la pasta del pan, el mosto o el puré del maíz con las porciones conservadas de una fermentación anterior. En esta forma siempre se conservaba una porción de pasta del pan de la fermentación para mezclarse con pasta fresca el día siguiente. La levadura fue llevada de pasta en pasta en un ciclo perpetuo. Si existía algún tipo de contaminación bacteriana, una semilla nueva podía ser preparada humedeciendo la harina y esperando una fermentación espontánea.

Hoy, los cultivos puros de levaduras crecen específicamente para ser utilizados en cervecerías, destilerías, panaderías y para el uso casero.⁸

4.3 Productos alimenticios de las levaduras

Las células de la levadura han contribuido al valor alimenticio de alimentos fermentados, como los panes y las cervezas. En algunas sociedades, las cervezas “nubladas” hacen una contribución importante a las necesidades alimenticias diarias. El sedimento nublado de las células de la levadura proporcionan las vitaminas, los minerales y los aminoácidos esenciales.

⁸ <http://www.canal-h.net/webs/sgonzalez002/Micologia/LEVADURAS.appt.htm>

Durante la Edad Media, a menudo se alimentó a los infantes con el sedimento de la cerveza nublada para mantenerlos sanos y para evitar deficiencias alimenticias.

Las levaduras son una buena fuente de proteínas o aminoácidos. Aproximadamente el 40 % del peso de la levadura seca consiste en proteína. La calidad de la proteína de la levadura es equivalente a la proteína de la soya. Ambas son ricas en lisina y por lo tanto son excelentes suplementos para cereales bajos en lisina. La proteína de la levadura es baja en aminoácidos que contienen el ión sulfuro, pero la adición de 0,5 % de metionina a la levadura seca puede incrementar su calidad como proteína. Sin embargo, hay un límite en cuanto a la utilización de la levadura como fuente de alimento, ya que cerca del 20 % del nitrógeno de la proteína cruda está en forma de ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos pueden causar problemas dando lugar a niveles altos de ácido úrico en la sangre. Los altos niveles de ácido úrico tienden a cristalizarse en diversas articulaciones del cuerpo como empalmes y hombros, causando gota, artritis e incluso piedras renales.

Mientras que el valor alimenticio de la levadura fue reconocido tempranamente, la identificación de los factores alimenticios que curaron ciertas enfermedades alimenticias no ocurrió hasta el siglo veinte, cuando las vitaminas fueron descubiertas. Varias de estas vitaminas primero fueron extraídas y caracterizadas de la levadura, incluyendo biotina,

niacina, ácido pantoténico y tiamina. La levadura se ha reconocido como fuente rica en vitaminas naturales.⁹

4.3.1 Levadura irradiada

Aunque la levadura no es una fuente de vitamina D, contiene un esteroide, el ergosterol, que se convierte en la vitamina D₂ (Ergocalciferol) cuando es irradiado con luz ultravioleta. En el pasado, la levadura seca irradiada sirvió como fuente importante de la actividad de la vitamina D, hasta que fue creada una forma sintética de esta vitamina (Colcalciferol).

4.3.2 Levadura del selenio

La levadura es una buena fuente del selenio dietético. El selenio en la levadura está generalmente en la forma de selenometionina, que es una molécula del aminoácido de la metionina que contiene selenio. El selenio se requiere para la activación de un sistema enzimático que produce efectos protectores en el hígado y otros tejidos finos. El selenio previene el daño oxidativo de la membrana de la célula y del envejecimiento prematuro subsecuente de la célula.

El selenio de la levadura utilizada en los procesos de fabricación de cerveza desempeñó un papel importante en la nutrición animal, especialmente en la fabricación de alimentación animal para consumo doméstico. El hecho de que la levadura de los cerveceros contiene

⁹ http://lectura.ilce.edu.mx:3000/sites/3milenio/biotec/html/sec_4.htm

cantidades apreciables de vitaminas y de selenio, se consideró para la inclusión en muchas formulaciones para alimentación del ganado. Fue utilizada con frecuencia como una fuente natural del selenio antes de que se utilizara extensamente el selenito de sodio.

Las levaduras comerciales que contiene altas cantidades de selenio, que se conocen como levaduras del “selenio alto”, son manufacturadas y vendidas a través de almacenes de alimento natural y agregadas a veces a las tabletas de suplemento de vitaminas. Mientras que la levadura de los panaderos pueden contener una o dos partes por millón de selenios, las levaduras comerciales del “selenio alto” están disponibles conteniendo selenio en cantidades de dos partes por millón.

4.3.3 Levadura del Cromo

El cromo en la levadura está presente en la forma orgánica llamada “el factor de la tolerancia de la glucosa” y es importante en la regulación del metabolismo del azúcar. Consiste en el cromo trivalente y parece actuar conjuntamente con la insulina para facilitar el metabolismo eficiente de carbohidratos. Aunque no se sabe exactamente cómo trabaja, los estudios indican que los individuos que consumen el cromo en forma orgánica tienen una reducción en la dependencia de azúcar, de la insulina de la sangre, una reducción en el colesterol y los triglicéridos. Los ensayos recientes de la investigación indican que el cromo orgánico puede reducir la tensión en ganados.

4.3.4 Levadura seca activa

La levadura seca activa (materia seca al 95 %) es la levadura disponible para la industria de la alimentación. Aunque la levadura con un alto contenido de humedad (torta mojada), es utilizada extensivamente por la industria de panadería, la levadura seca activa es la forma de levadura utilizada para alimentación animal.

4.4 Identificación de Levaduras

Las pruebas de identificación de levaduras pueden agruparse en dos categorías:

4.4.1 Pruebas morfológicas

Aspecto de las colonias: Las colonias de las levaduras suelen ser de color blanco crema, más o menos lisas, o de aspecto seco o plegadas, y de tamaño variable. Por ello, el aspecto morfológico de la colonia no representa habitualmente un carácter distintivo importante.

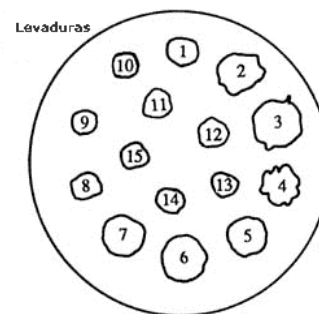
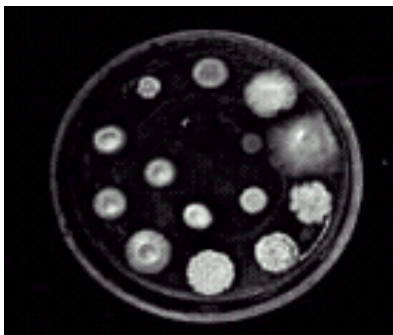


Figura N°7:Levaduras; 1. *Saccharomyces cerevisiae* 2. *Candida utilis* 3. *Aureobasidium pullulans* 4. *Trichosporon cutaneum* 5. *Saccharomycopsis capsularis* 6. *Saccharomycopsis lipolytica* 7. *Hanseniaspora guilliermondii* 8. *Hansenula capsulata* 9. *Saccharomyces carlsbergensis* 10. *Saccharomyces rouxii* 11. *Rhodotorula rubra* 12. *Phaffia rhodozyma* 13. *Cryptococcus laurentii* 14. *Metschnikowia pulcherrima* 15. *Rhodotorula pallida*.

4.4.2 Morfología microscópica de levaduras

Esta práctica consiste básicamente en preparar un cultivo de levaduras sobre medios adecuados para esporulación y germinación de estos hongos. Existen dos posibilidades según se empleen portaobjetos cubiertos con medio de cultivo o placas de Petri convencionales. Los medios de cultivos más adecuados son medios a base de cereales, sin aporte extra de glucosa ni otras sustancias nutritivas. La incorporación de Tween 80 a este tipo de medios reduce la tensión superficial y favorece notablemente la germinación, filamentización y esporulación de las levaduras.

Los cultivos van cubiertos con un cubreobjetos, lo cual facilita la observación posterior al microscopio.

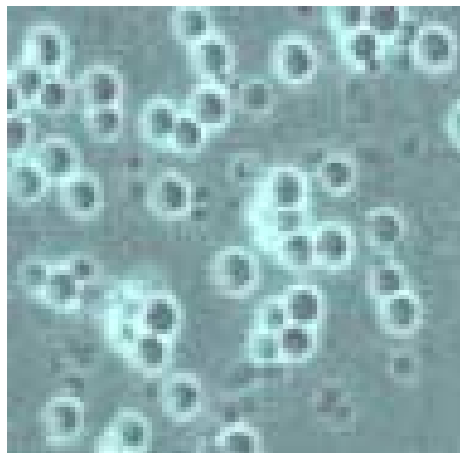


Figura N°8: Morfología microscópica de Cándida utilis.

4.4.3 Pruebas Fisiológicas de identificación de levaduras

Las levaduras contienen sistemas enzimáticos específicos que determinan su capacidad para utilizar un hidrato de carbono como única fuente de carbono en un medio de cultivo adecuado. En la práctica la capacidad de utilización de ciertos compuestos orgánicos como única fuente de carbono en crecimiento aerobio, es una de las pruebas más utilizadas para la identificación de levaduras.

Los compuestos empleados son fundamentalmente azúcares, ácidos orgánicos. Estas pruebas se denominan pruebas de asimilación y se usan para valorar la capacidad de cada levadura para usar estos compuestos de crecimiento aerobio. En función del número de levaduras testadas o cultivos de colección, esta prueba permite la diferenciación entre un elevado número de especies. Para la diferenciación entre las especies de levaduras de origen clínico, es suficiente con un escaso número de sustancias (normalmente 6-7 azúcares).

Existen dos alternativas, según se realicen en medio líquido o en medio sólido. Este último caso se conoce con el nombre de auxanograma y es el más empleado. Las levaduras son inoculadas (por incorporación al medio fundido) en un medio que contiene todos los requerimientos nutritivos excepto una fuente de carbono. Las sustancias que hay que probarse disponen en la superficie del agar desde donde difunden a la zona adyacente. El crecimiento de

una levadura en esta zona indica la capacidad de utilización de esta sustancia como única fuente de carbono.

La utilización aerobia de los hidratos de carbono se pone de manifiesto por el crecimiento de la levadura alrededor del disco correspondiente.¹⁰



Figura N°9: La identificación de levaduras puede realizarse por la capacidad de utilización de azúcares.

5. *Candida utilis*

5.1 Generalidades

Si bien la levadura de cervecería y destilería suele ser la *Saccharomyces cerevisiae*, la levadura propagada específicamente para la alimentación de los animales es, en general, la *Candida utilis* (levadura de tórula o levadura forrajera). La levadura de tórula se emplea

¹⁰ R.DIAZ."Manual Práctico de Microbiología". 2da. Edición. España. Editorial Manson S.A., 1999.

porque crece rápidamente y puede cultivarse sobre una gran diversidad de materiales. Entre los materiales que se emplean como sustrato para la producción de levadura forrajera figuran el licor de prensa, obtenido de la fabricación de la pulpa de la naranja desecada; melaza, licor residual de sulfito de la industria papelera, madera sacarificada (tanto hexosas como pentosas), y residuos de frutos (granos de café, manzanas, etc.). La levadura de tórula crece mejor con un pH de 4. El nitrógeno y el fósforo tienen que añadirse al medio de cultivo: alrededor de 0.4 kg de sulfato amónico y 0.13 kg. de fosfato trisódico por cada kg. de levadura producida. Para fomentar el rápido crecimiento de la levadura y reducir al mínimo la producción de alcohol, hay que proporcionar aire en abundancia. El aire se introduce en el fondo del fermentador y se dispersa mediante un propulsor o mediante un disco de cerámica porosa.

5.2 Clasificación

Según Lodder J. (1970) y Frazier W.C. (1976).

Nombre Científico	:	<i>Cándida utilis</i>
División	:	Hongos
Filum	:	Eumicetos
Clase	:	Deutoromicetos
Orden	:	Criptococales
Familia	:	Criptococaceas
Sub-familia	:	Criptococoideas

Género : Cándida

Especie : utilis

Sinónimos :

Torula utilis : Hennenber 1926

Torulopsis utilis : (Hennenberg) Lodder 1934

Cryptococcus utilis : (Hennenberg) Anmderson Lodder, 1942

Cándida guillermondi : Langeran et Gierra Var (Cast)

Torulopsis utilis : (Henenberg) Lodder Majar Thaysen et Morris, 1943.

5.3 Usos

La levadura seca es valiosa como fuente de proteína de gran calidad y no tiene el sabor amargo de la levadura de la cervecería que, sin embargo, suele tener mayor valor biológico. La levadura forrajera tiene abundantes minerales y vitaminas B y, si se irradia, aporta también vitamina D. La levadura seca puede incluirse en piensos mixtos para toda clase de ganado. Normalmente, la levadura es rica en purinas (8 %) y en piridinas (4 %). Estas sustancias no tienen prácticamente ningún valor nutritivo y se incluyen en la fracción de proteína bruta en el análisis cuantitativo. Cuando el costo de la levadura es bajo, puede suministrarse a los bovinos, como fuente de proteína, en cantidades de 1-2 kg. diarios. Se ha informado que las vacas de gran producción lechera rinden más aún cuando se alimentan con levadura, lo que puede deberse a que la propia producción de vitaminas B del animal no basta para un elevado

rendimiento lechero. Para los terneros, las vitaminas B de la levadura tiene valor y, por consiguiente, algunas veces se incluyen a razón de 3-5 % en las raciones de partida para terneros, así como los piensos para los terneros en crecimiento. Los cerdos toleran bien hasta un 5 % de levadura en la ración total. Algunas veces, cuando se cuenta con otras fuentes más baratas de vitaminas y de proteínas, se añaden pequeñas cantidades de levadura para aportar factores de crecimiento no identificados. Se ha informado que, cuando se suministra levadura a las cerdas durante la gestación y lactación (100-400 gramos al día), mejora el crecimiento de lechones, y hay una menor mortalidad. La levadura puede sustituir el aceite de soja, en igualdad de peso, en las raciones de las aves de corral hasta un total del 9 % de la ración para pollos, y, por lo menos, un 23 % para las hembras. Para obtener resultados óptimos, se deben emplear cantidades mucho menores, alrededor de 3 gramos diarios por ave. Hay que hacer una distinción entre la levadura seca corriente y la extraída en la producción de extracto de levadura, ya que esta última sólo contiene la mitad de proteína que la primera, y es pobre en vitaminas.¹¹

6. Sustratos utilizados por los microorganismos

Para que los microorganismos sean una fuente de proteína que contribuya a aliviar los problemas de hambre y mala nutrición en el mundo, su producción debe ser abundante y barata.

¹¹ <http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/afris/espanol/document/tfeed8/Data/493.HTM>

TABLA 5. Rendimientos aeróbicos de algunos microorganismos cultivados en glucosa

Organismo	Rendimiento Gramos de células por gramo de sustrato
<i>Candida utilis</i>	0,51
<i>Escherichia coli</i>	0,505
<i>Aerobacter clocae</i>	0,51
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,38

Fuente: Revista de la Facultad de Agronomía, “Producción de Proteínas a partir del Petróleo”.
Universidad del Zulia Maracaibo. Venezuela.

Aunque las levaduras y bacterias pueden cultivarse con rendimientos altos en varios sustratos, la elección del sustrato es una cuestión de naturaleza económica. El sustrato debe ser abundante y barato, de modo que la proteína microbiana pueda competir con otras fuentes de proteína usadas en la alimentación de animales domésticos, principalmente de no-rumiantes. La proteína no requerida en escala mundial para este propósito es una cantidad muy superior a la requerida para la nutrición humana. Se fija la atención en la producción mundial de proteínas en relación con los requerimientos humanos. La producción de proteína está muy por arriba de las necesidades mundiales. Pero una gran parte de esta proteína es consumida por animales y, además, la cantidad de proteína usada por el hombre es muy grande en algunos

países y muy pequeña en otros. Para que una fuente de proteína contribuya apreciablemente a los recursos mundiales, su producción debería ser, por lo menos, de unas 5 a 10 millones de toneladas. De ahí que los residuos que contienen azúcares (melaza, agua de maíz, etc.) son fuentes suficientes para la producción de proteína microbiana.

6.1 Utilización de Residuos Agroindustriales

Los residuos derivados de la normal actividad del hombre, son uno de los principales problemas en la actualidad. Estos provocan una progresiva degradación de nuestro entorno que puede llegar a ser, en algunos casos, irreversible. Por ello se hace necesario la búsqueda de procesos que permitan la eliminación controlada de los mismos y su utilización, no sólo su eliminación efectiva e inocua, debido a que esta posibilidad además de evitar trastornos medioambientales, crean nuevas fuentes de riqueza que aportan una mayor rentabilidad al proceso industrial.

Sin embargo, es un hecho evidente que, a pesar de todas estas ventajas de tipo económico, social, medioambiental, etc., que ocasionaría el aprovechamiento industrial de los residuos, estas no se corresponden con el nivel de investigación y desarrollo existente en este campo a nivel mundial .

Aunque los residuos pueden provenir de cualquier actividad, desde el punto de vista de su utilización industrial, los más importantes son los que poseen un origen animal o vegetal y que se agrupan bajo el término de biomasa residual.

La biomasa no es más que materia orgánica no fósil, en que la radiación solar ha reducido el hidrógeno y el carbono mediante el proceso básico de la fotosíntesis, permitiendo que pueda tener un aprovechamiento de tipo químico-industrial y, sobre todo, energético.

Esta biomasa, debido a los procesos de conversión a los que se ve sometida, origina una serie de materiales a los que se consideran residuos debido a que en el contexto en el que son generados no poseen valor económico alguno.

Los productos que integran esta biomasa residual pueden clasificarse en varios grupos que son:

6.1.1 Residuos agrarios

Están formados por aquellos residuos que tienen su origen en las actividades agrícolas y ganaderas, así como por los generados en los procesos de aprovechamiento forestal.

6.1.2 Residuos Industriales

Se consideran como tales a los procedentes de sectores de la industria que generan una gran cantidad de desechos de naturaleza orgánica y cuya eliminación de estos residuos resulta muy difícil y su costo muy elevado, debido a la alta demanda bioquímica que implica este proceso.

6.1.3 Residuos urbanos

Proceden de la actividad humana en los núcleos de población. Su tratamiento y eliminación son un problema cada vez mayor, debido a su continuo crecimiento. Se pueden dividir en dos tipos: residuos urbanos sólidos y aguas residuales.

Existen dos estrategias para el aprovechamiento de la biomasa residual. La primera consiste en desarrollar, a partir de ella, derivados que se puedan insertar en las cadenas de producción y mercados ya existentes. La segunda implica el desarrollo de nuevas tecnologías de aprovechamiento del propio residuo como tal.

Basándose en estas dos estrategias pueden considerarse cinco directrices básicas:

- a) Obtención de energía.
- b) Obtención de productos químicos.
- c) Devolución a la producción agraria.
- d) Utilización en la alimentación ganadera.

e) Utilización en la alimentación humana.

El agua residual derivada del proceso de nixtamalización del grano de maíz puede ser aprovechada en la alimentación ganadera, tomando en cuenta factores como digestibilidad, composición de la proteína obtenida, presencia de sustancias contaminantes y los problemas que implica su conservación. En la alimentación humana la proteína unicelular puede utilizarse como aditivo en la industria alimentaria.

Todo lo anteriormente expuesto, junto al encarecimiento de alimentos que experimenta nuestro país, exige que se dedique un considerable esfuerzo hacia la búsqueda de nuevas fuentes de alimentación, y que parte de dicho esfuerzo esté encaminado hacia el mejor aprovechamiento de los subproductos derivados de la industria de la alimentación. Para ello es necesario el conocimiento de todos aquellos parámetros físicos y químicos que afecten el valor nutritivo del producto.¹²

6.2 Generación del Agua de Cocimiento de Maíz

Diversos investigadores han descrito el modo en que se cocina el maíz en las zonas rurales de los países consumidores de tortillas. Illescas (1943) fue el primero en describir el proceso tal como se lleva a cabo en México. Consiste en mezclar una parte de maíz integral con dos

¹² http://www2.uca.es/dept/quimica_organica/byprodlinea.htm

partes de una solución de cal a aproximadamente el 1 por ciento. La mezcla se calienta a 80°C durante un lapso de 20 a 45 minutos y luego se deja reposar toda la noche. Al día siguiente, se decanta el líquido cocido y el maíz, denominado entonces nixtamal; se lava dos o tres veces con agua para eliminar las cubiertas seminales, las pilorizas, la cal sobrante y las impurezas del grano. La añadidura de cal en las fases de cocción y de remojo contribuye a eliminar las cubiertas seminales; los subproductos se desechan o bien sirven para alimentar ganado porcino.

La generación de agua de cocimiento de maíz a nivel industrial es un proceso que puede derivarse de dos maneras. En las zonas urbanas hay dos variantes: la primera consiste en pequeñas industrias caseras de propiedad familiar que siguen el procedimiento descrito anteriormente. Esta pequeña industria puede utilizar harina industrial para tortillas o maíz integral, en cuyo caso la masa se cuece en receptáculos de grandes dimensiones. La otra variante es la transformación industrial a gran escala del maíz en harina instantánea precocida para tortillas. El procedimiento, que ha sido descrito por diversos investigadores (p. ej. Deschamps, 1985), se basa en el método utilizado tradicionalmente en las zonas rurales. El maíz se selecciona según su contenido de humedad, se eliminan todas las impurezas, como suciedad, y hojas. Una vez limpio, el maíz se envía a los silos y depósitos para su almacenamiento. De ahí se transporta a las instalaciones de elaboración para su cocción en agua de cal, convirtiéndolo en nixtamal, ya sea en tandas o mediante un procedimiento de elaboración continua. Tras su cocción y macerado, el maíz tratado en agua de cal se lava con

agua a presión o pulverización y se tritura hasta que forme una masa que se lleva a un secador y se convierte en harina basta.



Figura N°11: Piedra donde se muele el nixtamal (maíz cocido)

6.3 Valor nutricional del agua de maíz

La reutilización de las aguas residuales derivadas del proceso de nixtamalización, se basa por una parte en que estas aguas residuales contienen sobrantes propios del maíz, así como restos de cal que fue usada durante la cocción. Esta materia orgánica e inorgánica es una fuente de contaminación desde el punto de vista ambiental. Por otra parte, la utilización del agua de cocimiento de maíz tiene por objeto aprovechar una buena cantidad de sustancias orgánicas incluyendo las proteínas, carbohidratos y lípidos liberados del grano de maíz, durante el

proceso de cocción y que dan por resultado un medio orgánico rico. La aplicación del estudio cinético de crecimiento microbiano permitirá evaluar si este medio favorece el desarrollo de la *Cándida utilis*.¹³

7. Cinética de crecimiento microbiano

La microbiología comprende el estudio de una amplia variedad de sistemas vivientes “inferiores” que incluyen virus, bacterias, algas, hongos simples como las levaduras y los mohos, así como los hongos superiores altamente diferenciados más grandes como las “setas”.

En un medio de apoyo para el crecimiento adecuado, los microorganismos unicelulares aumentan de tamaño y, por último, se dividen en dos por un proceso de fisión binaria o gemación. De hecho, una célula microbiana no viable se define como aquella que incubada en medio de apoyo para el crecimiento por un período suficientemente largo, es incapaz de aumentar su tamaño o de multiplicarse, una célula que aparentemente no crece, aún puede ser viable, pero el medio es incapaz de apoyar el crecimiento debido a la disminución de un nutriente esencial, la presencia o producción de materiales tóxicos o un cambio en el medio físico, como la disminución de oxígeno, pH o temperatura. A menudo las células pueden vivir en este estado sin crecimiento, particularmente como esporas o quistes, por períodos largos.

¹³ <http://www.fao.org/docrep/T0395S/T0395S02.htm#Aplicaciones%20del%20maiz>

Las células microbianas requieren un alto grado de adaptabilidad para responder a cambios tanto en el medio físico como en el químico. A diferencia de las formas de vida diferenciadas, multicelulares, los organismos unicelulares responden a cambios en el medio al exhibir un conjunto diferente de actividades metabólicas. Los organismos unicelulares son capaces de existir en una variedad de estados fisiológicos y pueden cambiar rápidamente de un estado a otro.

El crecimiento se puede considerar como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de un organismo, lo cual, para los organismos unicelulares, conduce a un aumento en el número de individuos en la población. Se puede considerar el crecimiento al nivel de individuos dentro de una población (ciclo celular) o el crecimiento de poblaciones celulares (ciclo de crecimiento). El crecimiento de las poblaciones celulares se puede subdividir en sistemas cerrados, como el cultivo intermitente, y en sistemas abiertos, como el cultivo alimentado por lotes y el cultivo continuo.

7.1. Medición del Crecimiento Microbiano

Existen varios métodos para medir el crecimiento de células microbianas, entre los cuales tenemos: Peso seco celular, absorción, peso húmedo, volumen de células empacadas, número de células, masa de un componente celular, etc.

7.1.1 Peso seco celular

El método más usado para medir el crecimiento microbiano es secar volúmenes conocidos de cultivo celular lentamente hasta obtener un peso constante. Cuando se trata de células que sedimentan rápidamente, como levaduras, esto usualmente implica centrifugación ($4,6 \times 10^3$ rpm). Luego las células concentradas se colocan en una estufa a 90°C o a 105°C hasta obtener un peso constante. El peso de las células secas usualmente se expresa en términos de g/l.

En las determinaciones de peso seco celular existen fuentes de error importantes debido a la absorción de humedad atmosférica por las células secas y los tubos de centrífuga o las membranas durante el enfriamiento. Esto se puede evitar al enfriar en un desecador o mediante la determinación de la cantidad de agua absorbida por las membranas o tubos y con la corrección adecuada del peso medido.

7.1.2 Absorción

A menudo se obtiene ventaja del hecho de que en una celda espectrofotométrica, las células microbianas desvían la luz, de modo que la cantidad de ésta que llega al detector del espectrofotómetro está relacionada directamente con el número de células presentes en la muestra del cultivo de acuerdo a la Ley de Beer. Por lo general, se emplean longitudes de onda alrededor de 600 nm. Es importante entender que como la absorbancia es afectada por el

tamaño y la forma de las células, la relación entre la absorbancia y el número de células cambia si el tamaño o la forma de éstas cambia durante el crecimiento del cultivo.

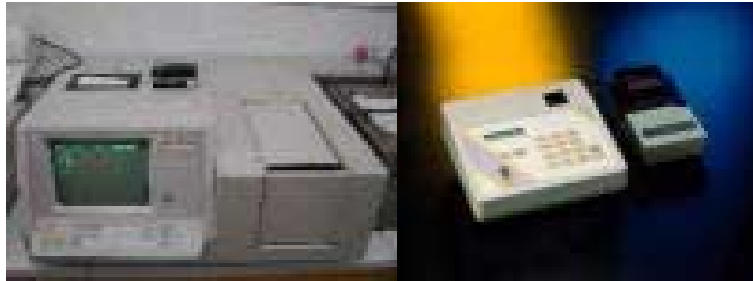


Figura N°12: Dos diferentes equipos, a la izquierda, el Espectrofotómetro y a la derecha el nefelómetro. Son utilizados para la medición del crecimiento de microorganismos.

7.1.3 Peso húmedo

Este quiere decir simplemente la centrifugación o filtración del cultivo seguida por el pesado directo. Aunque es un método extremadamente rápido, es importante estandarizar correctamente el procedimiento, ya que se mide el agua tanto intracelular como extracelular, lo cual puede causar errores considerables.

7.1.4 Volumen de células empacadas

Mediante la centrifugación de muestras del cultivo en tubos de centrífuga graduados se puede determinar rápidamente el volumen de células empacadas. Este método es muy inexacto, especialmente cuando se miden pequeños cambios en la población celular.

7.1.5 Número de células

El crecimiento se puede determinar también en términos de número de células por litro. El número total de células se puede medir colocando muestras de cultivo adecuadamente diluidas sobre portaobjetos de microscopios graduados como los de Herber o los hematocitómetros y contando el número de células con la ayuda de un microscopio.

Aunque este método es relativamente rápido y exacto no distingue entre células viables y no viables, también muy agotador; sin embargo, se cuenta con contadores de células automáticos.

7.1.6 Masa de un componente celular

En los casos donde se dificulte el uso de otros métodos, la cantidad de un componente celular, la cual es una cantidad constante del peso seco total, se puede usar para estimar la concentración de células o de biomasa. Se han usado componentes como el nitrógeno, proteína, RNA, DNA y ATP celulares. Pueden surgir dificultades, ya que varía la cantidad de estos componentes en la célula, a menudo considerablemente, durante el crecimiento de las células, especialmente cuando las condiciones de éste son diferentes.

7.1.7 Mediciones Físicas

El crecimiento de las células microbianas va acompañado siempre de generación de calor. Recientemente se demostró que hay una relación directa entre la cantidad de calor producido

y la concentración de biomasa. Este método es directo, no requiere de muestreo y es instantáneo, pero es más adecuado para biorreactores a gran escala, puesto que la cantidad de calor generado en escala pequeña puede ser demasiado pequeña para ser adecuada.

Para cultivos aeróbicos es posible medir la rapidez de captación de oxígeno, ya que se ha demostrado que está directamente relacionada con la concentración de biomasa. Es obvio que este método no es adecuado para cultivos anaeróbicos.

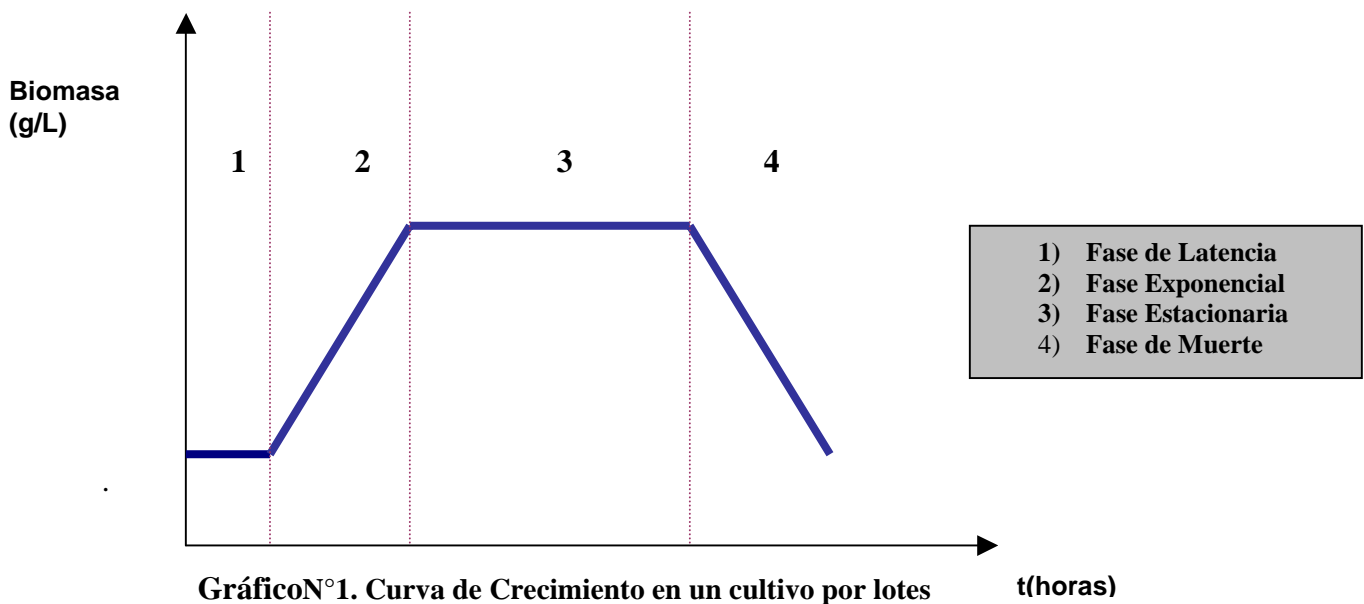
7.2 Cinética de Crecimiento Microbiano de un Cultivo por Lotes

El conocimiento de la cinética y producción de metabolitos es fundamental en el tratamiento cuantitativo de los procesos de fermentación. El conocimiento de la cinética de un cultivo permite la predicción del transcurso de la fermentación, la evaluación de velocidades, rendimientos y productividades y entrega información útil para establecer las estrategias de producción y optimización del proceso.

El comportamiento cinético de una población está determinado por un conjunto de factores genéticos y ambientales. Entre estos últimos destacan las condiciones de operación (composición del medio, temperatura, pH y otras) y la modalidad de cultivo entre las que distinguimos el cultivo por lotes y el cultivo por lotes alimentados o semicontinuo.

El cultivo por lotes se define como aquel que se realiza sin intercambio de materia con los alrededores, salvo lo referente a los gases (aireación, producción de dióxido de carbono y

otros) que se suministran y retiran del sistema en forma continua. En esta modalidad de cultivo se adicionan inicialmente los nutrientes y luego se inocula con una determinada cantidad de células viables, que produce una serie de eventos característicos denominada Curva de Crecimiento, la cual se representa por una gráfica del peso seco celular o biomasa (x), (g/L) contra el tiempo de incubación en horas (h), tal como se muestra en la figura



1) Fase de latencia: Se produce inmediatamente después de la inoculación. En ella no hay iniciación de replicación de ADN ni separación de nuevas células. Se produce el reacomodo de la composición macromolecular al nuevo ambiente en que se encuentran las células inoculadas.

2) Fase de crecimiento exponencial o logarítmico: Las células se reproducen a una velocidad que es la máxima de todas las fases de crecimiento, por no existir limitación de nutrientes.

3) Fase estacionaria: Se alcanza cuando se agota un nutriente, razón por la cual se detiene el crecimiento.

4) Fase de muerte: Esta fase se presenta en aquellos cultivos en los que se inducen enzimas autolíticas en condiciones de inanición.¹⁴

7.3 Evaluación de la Cinética de Crecimiento Microbiano

La evaluación de la cinética de crecimiento microbiano de un cultivo por lotes implica la medición del crecimiento de los microorganismos, consumo de nutrientes y formación de productos.

¹⁴ CRUEGER, Wulf. CRUEGER, Anneliese. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. 1ra. Edición. España: Editorial Acribia S.A., 1989.

7.3.1 Crecimiento de Microorganismos

Velocidad Volumétrica de generación de células microbianas

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} = \frac{d \ln x}{dt}$$

Donde:

X= Densidad celular en gramos/litro

t= tiempo en minutos

Velocidad Específica de generación de células microbianas.

$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt}$$

Donde:

X= Densidad celular en gramos/litro

t= tiempo en minutos

7.3.2 Consumo de nutrientes (Utilización de sustrato)

Velocidad volumétrica de consumo de sustrato

$$Q_s = \frac{S_2 - S_1}{t_2 - t_1} = -\frac{ds}{dt}$$

Donde:

S = Concentración de azúcares totales en gramos/litro o microgramos/mililitro

t = tiempo en horas

Las unidades son:

gramos de sustrato consumidos
litro x hora

Velocidad específica de consumo de sustrato

$$q_s = \frac{-1}{x} \cdot \frac{ds}{dt}$$

Donde:

S= Concentración de azúcares totales en gramos/litro o microgramos/mililitros

t= tiempo en horas

X= Densidad celular en g/L

Las unidades son:

$$\frac{\text{gramos de sustrato consumidos}}{\text{gramos de biomasa x hora}}$$

7.3.3 Formación de productos

Velocidad volumétrica de formación de productos

$$Q_p = \frac{P_2 - P_1}{t_2 - t_1} = dp/dt$$

Donde:

P = gramos de producto formado

t = tiempo en horas

Las unidades son:

$$\frac{\text{gramos de producto formado}}{\text{Litro x hora}}$$

Velocidad específica de formación de productos

$$qp = \frac{1}{x} \cdot \frac{dp}{dt}$$

Donde:

X = Densidad celular en gramos/litro

P = gramos de producto formado

t = tiempo en horas

Las unidades son:

gramos de producto formado
gramos de biomasa x hora

7.3.4 Rendimientos en el cultivo

Rendimientos de biomasa ($Y_{x/s}$)

$$Y_{x/s} = dx / ds$$

Las unidades son :

gramos de biomasa
gramos de sustrato consumido

7.3.5 Rendimiento de producto ($Y_{p/s}$)

$$Y_{p/s} = dp / ds$$

Las unidades son:

gramos de producto
gramos de sustrato consumido¹⁵

¹⁵ SCRAGG. Alan. Biotecnología para Ingenieros. Sistemas biológicos en procesos tecnológicos. 1^{ra}. Edición. México, Editorial Noriega, 1996.

8.1 Obtención del Sustrato

El sustrato que se obtiene es el agua residual que se deriva del cocimiento de maíz, si previamente ha sido eliminada la cal añadida durante el proceso de cocción. Este tipo de agua fue proporcionada por tortillerías artesanales del municipio de Ayutuxtepeque.

8.2 Preparación del inóculo

8.2.1 El microorganismo a utilizar será la *Candida utilis* Y 900. Antes de iniciar el proceso de producción, es necesario asegurar el estado puro de la cepa, para ello se realizará una preparación fresca para ser vista al microscopio a una magnitud de 100X. El objetivo de esta preparación es observar la morfología de las colonias de *Candida Utilis Y 900*, las cuales se presentan como colonias de forma circular de color café.

8.2.2 Después de asegurar el estado puro de la levadura, se sembrarán sobre 5 tubos que contienen agar inclinado Saboraud y se incubarán a temperatura ambiente por un período de 24 horas.

8.2.3 Se sembrará la levadura desarrollada en el agar inclinado Saboraud en 100 mL de agua de cocimiento de maíz estéril, contenidos en un matraz de 250 mL también estéril; este se incubará con agitación a temperatura ambiente durante 48 horas.¹⁶

8.2.4 Con el objetivo de obtener mayor cantidad de inóculo, se tomarán 30 mL de la suspensión de microorganismos y se sembrará sobre otro matraz de 250 mL estéril. Este proceso se realizará dos veces más, de tal forma que al final se obtengan tres fuentes de inóculo, es decir, tres matraces con suspensión de *Candida utilis* Y 900.

8.3 Preparación del Bioreactor

8.3.1 Lavar con agua y jabón el bioreactor de 7 litros de capacidad.

8.3.2 Enjuagarlo con agua hirviendo.

8.3.3 Limpiar su interior con alcohol isopropílico; dejar evaporar el alcohol.

8.3.4 Agregar agua destilada estéril para eliminar los restos de alcohol isopropílico.

8.3.5 Dejarlo escurrir hasta que este completamente seco.

8.4 Preparación de la Fuente de Oxígeno

8.4.1 Lavar con agua y jabón la bomba de oxígeno.

8.4.2 Enjuagarlo con agua hirviendo.

8.4.3 Limpiar con alcohol isopropílico y dejar evaporar el alcohol.

8.4.4 Agregar agua destilada estéril para eliminar los restos de alcohol isopropílico.

8.4.5 Dejarlo escurrir hasta que este completamente seco.

8.5 Preparación del Medio de Cultivo

8.5.1 Incorporar a 5 litros de agua de cocimiento de maíz las sales inorgánicas de nitrógeno y fósforo.

8.5.2 Ajustar el pH del medio de cultivo a un valor entre 4 ó 5 utilizando ácido clorhídrico 1N.

8.5.3 Esterilizar en autoclave los 5 litros de agua de cocimiento de maíz con las sales inorgánicas ya disueltas y con un pH de 4 o 5, La esterilización se realizará a una temperatura de 115 °C por un tiempo de 15 minutos.

8.6 Producción

8.6.1 Colocar en el bioreactor estéril 5 litros de agua de cocimiento de maíz ya preparados.

8.6.2 Incorporar las suspensiones de levadura contenidos en los tres matraces de 250 mL, preparados.

8.6.3 Mantener las condiciones a temperatura ambiente y con oxigenación permanente.

8.6.4 Cuando el medio de cultivo esté suficientemente homogéneo; con una pipeta volumétrica estéril de 25 mL tomar una muestra por duplicado; esta muestra se utilizará para determinar los parámetros de biomasa, azúcares totales y pH al inicio del proceso.

8.6.7 Tomar dos muestras por duplicado de 25 mL diariamente durante 5 días, utilizando una pipeta volumétrica de 25 mL y almacenarlas en refrigeración a una temperatura de 10 °C para su posterior análisis.

8.7 Tratamiento de Muestras

8.7.1 Determinación de Biomasa por el Método de Peso Seco

8.7.1.1 Secar una porción de papel filtro a una temperatura de 75 °C por 2 horas y enfriar en un desecador por un tiempo de 30 minutos.

8.7.1.2 Pesar el papel filtro que ha sido previamente secado.

8.7.1.3 Filtrar los 25 mL de la muestra recolectada durante el proceso de producción y recibir el filtrado en un matraz estéril de 125 mL.

8.7.1.4 Lavar el papel filtro con tres porciones de 5 mL de agua destilada estéril y recibir los lavados en un vaso de precipitado de 100 mL.

8.7.1.5 Colocar el papel filtro ya pesado sobre un vidrio de reloj y someterlo a una temperatura de 75 °C durante dos horas; enfriar en un desecador por un período de 30 minutos.

8.7.1.6 Pesar el papel filtro en balanza analítica y, por diferencia de peso, determinar la biomasa, la cual representará en cada muestra el crecimiento o decrecimiento microbiano.

8.7.2 Determinación de biomasa por el Método Turbidimétrico

8.7.2.1 Tarar un tubo de ensayo a 10 mL.

8.7.2.2 Tomar una alícuota de 10 mL dos veces al día por un período de cinco días del medio fermentado en el bioreactor y colocarla en el tubo de ensayo que ha sido previamente tarado a 10 mL.

8.7.2.3 Centrifugar el tubo de ensayo que contiene la alícuota de 10 mL del medio fermentado por un período de 15 minutos.

8.7.2.4 Colocar el sobrenadante en un vaso de precipitado de 50 mL y guardarlo para el posterior análisis de pH.

8.7.2.5 Resuspender el paquete celular con 10 mL de agua destilada y centrifugar nuevamente durante quince minutos; repetir esta operación dos veces más.

8.7.2.6 Adicionar al centrifugado final 5 mL de agua estéril, resuspenderlo y aforar a 10 mL.

8.7.2.7 Leer la solución aforada en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 610 nm; si la turbidez es muy alta se realizarán diluciones.

8.7.3 Determinación de azúcares por el Método de Fenol-Sulfúrico

La determinación de azúcares totales se realizará en el filtrado obtenido en la determinación de biomasa por peso seco.

8.7.3.1 Tomar 5 mL del filtrado utilizando una pipeta volumétrica de 5 mL, colocarlos en un tubo de ensayo, adicionar 0,5 mL de una solución de sulfato de zinc al 10 % y 0,5 mL de hidróxido de sodio 0,5 N, utilizando para ello pipetas mohr de 1 mL.

8.7.3.2 Mantener en reposo el tubo de ensayo del paso anterior durante 15 minutos a temperatura ambiente.

8.7.3.3 Centrifugar durante 15 minutos y utilizar el sobrenadante obtenido para la cuantificación de azúcares.

8.7.3.4 Tomar una alícuota de 0,5 mL del sobrenadante del paso anterior.

8.7.3.5 Adicionar 1,5 mL de agua destilada al tubo que contiene 0,5 mL del sobrenadante utilizando una pipeta mohr de 5 mL, luego, utilizando una pipeta mohr de 1 mL, adicionar 0.1 mL de fenol al 80 %, sumergir los tubos en baño de agua fría y adicionar lentamente 5 mL de ácido sulfúrico concentrado utilizando una pipeta volumétrica de 5 mL.

8.7.3.6 Agitar y mantener en reposo los tubos durante 30 minutos exactos, manteniéndolos a temperatura ambiente.

8.7.3.7 Leer las muestras tratadas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm.

8.7.3.8 Los valores encontrados interpolarlos en una curva estándar de sacarosa.

8.7.3.9 Elaboración de la curva estándar de sacarosa

8.7.3.9.1 Pesar 10 mg. de sacarosa grado reactivo, en una balanza analítica.

8.7.3.9.2 Colocar la sacarosa pesada en un balón volumétrico de 10 mL.

8.7.3.9.3 Adicionar al balón de 100 mL, 30 mL de agua destilada y agitar hasta su completa disolución.

8.7.3.9.4 Aforar con agua destilada la solución de sacarosa en el balón volumétrico de 100 mL, obteniéndose una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$.

8.7.3.9.5 Preparar a partir de la solución que posee una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ de sacarosa, las soluciones que se detallan en el siguiente cuadro:

Tabla N° 6. CONCENTRACIÓN DE SACAROSA: 100 ug/mL

Tubo	Solución de sacarosa (mL)	Agua Destilada (mL)	Fenol 80% (mL)	Acido Sulfúrico concentrado (mL)
1	0,0	2,0	0,1	5,0
2	0,1	1,9	0,1	5,0
3	0,2	1,8	0,1	5,0
4	0,4	1,6	0,1	5,0
5	0,6	1,4	0,1	5,0
6	0,8	1,2	0,1	5,0
7	1,0	1,0	0,1	5,0

8.7.4 Determinación de pH

8.7.4.1 Utilizar el sobrenadante obtenido en la determinación de biomasa por el método turbidimétrico y establecer el valor de pH utilizando un potenciometro.

8.7.5 Determinación de Nitrógeno y Proteína cruda

8.7.5.1 Pesar 30-40 mg de muestra de la proteína unicelular previamente secada en un frasco de digestión, agregar 1.0 g. de la mezcla catalítica y 30 mL de ácido sulfúrico.

8.7.5.2 Digerir la muestra durante 40 minutos o hasta que aclare; enfriar y agregar una mínima cantidad de agua destilada para disolver los sólidos remanentes.

8.7.5.3 Transferir esta digestión al aparato de destilación, lavar los residuos con una alícuota de agua destilada de 10 mL.

8.7.5.4 En un matraz de 125 mL colocar 8 mL de solución de ácido bórico y de 3-4 gotas de solución indicadora de rojo de metilo en verde de bromocresol, tener cuidado en poner el matraz, que el extremo del condensador quede bajo la superficie de la solución de ácido bórico.

8.7.5.5 Agregar en el menor tiempo posible al balón de destilación, 10 mL de solución de hidróxido de sodio al 45% y destilar inmediatamente hasta obtener unos 50 mL de destilado.

8.7.5.6 Titular con ácido sulfúrico 0,02 N hasta la primera aparición de un color verde violeta.

8.7.5.7 Llevar un blanco usando los mismos reactivos, el mismo tiempo de digestión y el mismo volumen de destilación que en la muestra.¹⁷

8.7.5.8 Se procederá a calcular el porcentaje de proteínas según la fórmula que se detallan a continuación.

¹⁷ CABELLO VELASCO, A. Microbiología Industrial: Manual de Laboratorio. 1^{ra}. Edición. México: Elaborado en el Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, 1989.

% de Proteína en muestra (base húmeda):

FORMULA:

$$\frac{(\text{mL de H}_2\text{SO}_4 \text{ gastados en la muestra} - \text{mL de H}_2\text{SO}_4 \text{ gastados en el blanco}) \times 0.014 \times N \text{ H}_2\text{SO}_4 \times 6.25}{\text{Peso de muestra}}$$

9. Resultados de la Evaluación del Crecimiento Microbiano en el Proceso de Producción de Proteína Unicelular.

TABLA N°7. Resultados de la Curva Estándar de Patrones Mcfarland

Escala de Mcfarland	BaCl al 1% (mL)	H₂SO₄ al 1% (mL)	Valor de Absorbancia	UFC/mL (x10⁸)
1	0,1	9,9	0,2711	3
2	0,2	9,8	0,5636	6
3	0,3	9,7	0,9312	9
4	0,4	9,6	0,9623	12
5	0,5	9,5	1,2319	15
6	0,6	9,4	1,4981	18
7	0,7	9,3	1,6689	21
8	0,8	9,2	1,7967	24
9	0,9	9,1	1,9810	27
10	1,0	9,0	2,0658	30

TABLA N°8. Resultados del Análisis de Muestras por el Método Turbidimétrico durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular.

N° de Muestra	Tiempo (horas)	Valor de Absorbancia
1	0	0,7905
2	7,45	0,8032
3	16,10	1,5647
4	23,40	1,6906
5	39,60	1,9602
6	45,80	1,9807
7	59,80	2,0100
8	67,70	1,9755
9	82,0	1,9243
10	85,0	1,8958

TABLA N°9. Resultados del Análisis de Muestras por el Método de Peso Seco durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular.

N° de Muestra	Mx Seca (g/25mL)	Mx Seca (mg/mL)	Ln Mx seca
2	0,0418	0,37	-0,99
3	0,0653	1,31	0,27
4	0,0698	1,49	0,40
5	0,0742	1,67	0,51
6	0,0702	1,51	0,41
7	0,0732	1,53	0,42
8	0,0740	1,66	0,51
9	0,0735	1,64	0,49
10	0,0723	1,59	0,46

10. Resultados de la Aplicación del Método de Fenol Sulfúrico para la Cuantificación de Azúcares Totales durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular.

TABLA N°10. Curva Estándar de Sacarosa

N° de Estándar	ML de Solución de Sacarosa	mL de Agua Destilada	mL de Fenol al 80%	mL de H ₂ SO ₄	Valor de Absorbancia	Concentración (mg/mL)
1	0,0	2,0	0,1	5,0	0	0
2	0,1	1,9	0,1	5,0	0,1502	0,0053
3	0,2	1,8	0,1	5,0	0,1551	0,0106
4	0,4	1,6	0,1	5,0	0,3209	0,0212
5	0,5	1,5	0,1	5,0	0,4218	0,0265
6	0,6	1,4	0,1	5,0	0,4822	0,0318
7	0,8	1,2	0,1	5,0	0,6729	0,0424
8	1,0	1,0	0,1	5,0	0,8038	0,053
9	1,5	0,5	0,1	5,0	1,2504	0,0754
10	2,0	0,0	0,1	5,0	1,5817	0,106

TABLA N°11. Resultados del Análisis de Muestras por el Método de Fenol Sulfúrico, para la Cuantificación de Azúcares Totales durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular.

N° de Muestra	Tiempo (horas)	Valor de Absorbancia
1	0	3,2119
2	7,45	2,6157
3	16,10	2,5955
4	23,40	2,5796
5	39,60	2,5115
6	45,80	2,4870
7	59,80	2,4176
8	67,70	2,2600
9	82,0	1,9600
10	85.0	1,9203

TABLA N°12. Porcentaje de Producto(Proteína) obtenida durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular.

34.04 mg de Proteína en 100 mg de Biomasa (Según certificado de análisis del anexo 8)

N° de Muestra	Tiempo (horas)	Porcentaje de Proteína
1	0	0,44
2	7,45	0,57
3	16,10	0,89
4	23,40	0,95
5	39,60	1,01
6	45,80	0,96
7	59,80	1,00
8	67,70	1,01
9	82,0	1,0
10	85,0	0,98

TABLA N°13. Resultados del Análisis de pH en Muestras durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular.

N° de Muestra	Tiempo (horas)	Valor de pH
1	0	4,79
2	7,45	4,50
3	16,10	4,77
4	23,40	4,76
5	39,60	4,42
6	45,80	4,25
7	59,80	4,28
8	67,70	4,52
9	82,0	4,20
10	85,0	4,23

11. Análisis de Resultados

Para el análisis de los resultados obtenidos durante el proceso de producción de proteína unicelular, se hizo uso del programa Equation Grapher Versión 3.2 1996-1998 (MFSost International).

Este es un paquete de dos programas integrados: analizador de la regresión y graficador de la ecuación.

El analizador de la regresión es un programa que analiza y grafica la mejor curva para datos experimentales. El programa maneja los modelos generalmente de la regresión tales como linear, logarítmica, exponencial. También proporciona modelos polinómicos y regresiones múltiples.

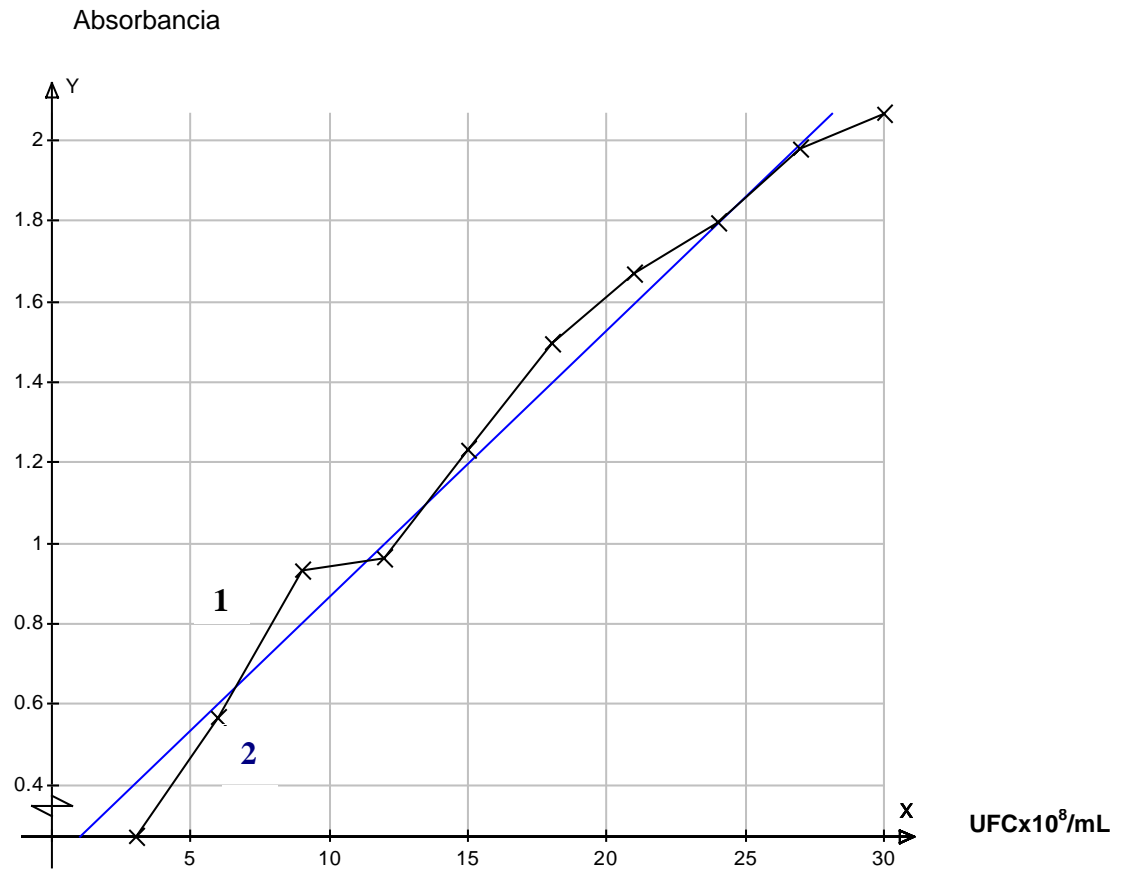
El programa graficador de la ecuación traza y analiza las curvas obtenidas en el programa analizador de la regresión, encuentra automáticamente tangentes, raíces, máximos/mínimos, las intersecciones, etc. Puede también calcular y obtener áreas de la integración. Para el análisis de los resultados obtenidos experimentalmente, el programa es útil porque grafica rectas tangentes que representan velocidades o rendimientos en diferentes tiempos, sin embargo, el grosor de la recta tangente hace notar aparentemente que el gráfico es cortado. No obstante, todo lo anterior es propio del programa Equation Grapher.

TABLA N°14. Aplicación de Regresión Lineal a la Curva Estándar de Patrones Mcfarland

Ecuación Linealizada: $Y = 0.0662X + 0.204$

Escala de Mcfarland	BaCl al 1%(mL)	H₂SO₄ al 1% (mL)	Valor de Absorbancia	UFC/mL (x10⁸)
1	0,1	9,9	0,4026	3
2	0,2	9,8	0,6012	6
3	0,3	9,7	0,7998	9
4	0,4	9,6	0,9984	12
5	0,5	9,5	1,197	15
6	0,6	9,4	1,3956	18
7	0,7	9,3	1,5942	21
8	0,8	9,2	1,7928	24
9	0,9	9,1	1,9914	27
10	1,0	9,0	2,1900	30

Gráfico N° 2. Curva Estándar de Patrones Mcfarland



- La **Curva N° 1** se obtiene graficando los resultados obtenidos experimentalmente.
- La **Curva N° 2** se obtiene aplicando el método de regresión lineal a los resultados obtenidos experimentalmente.

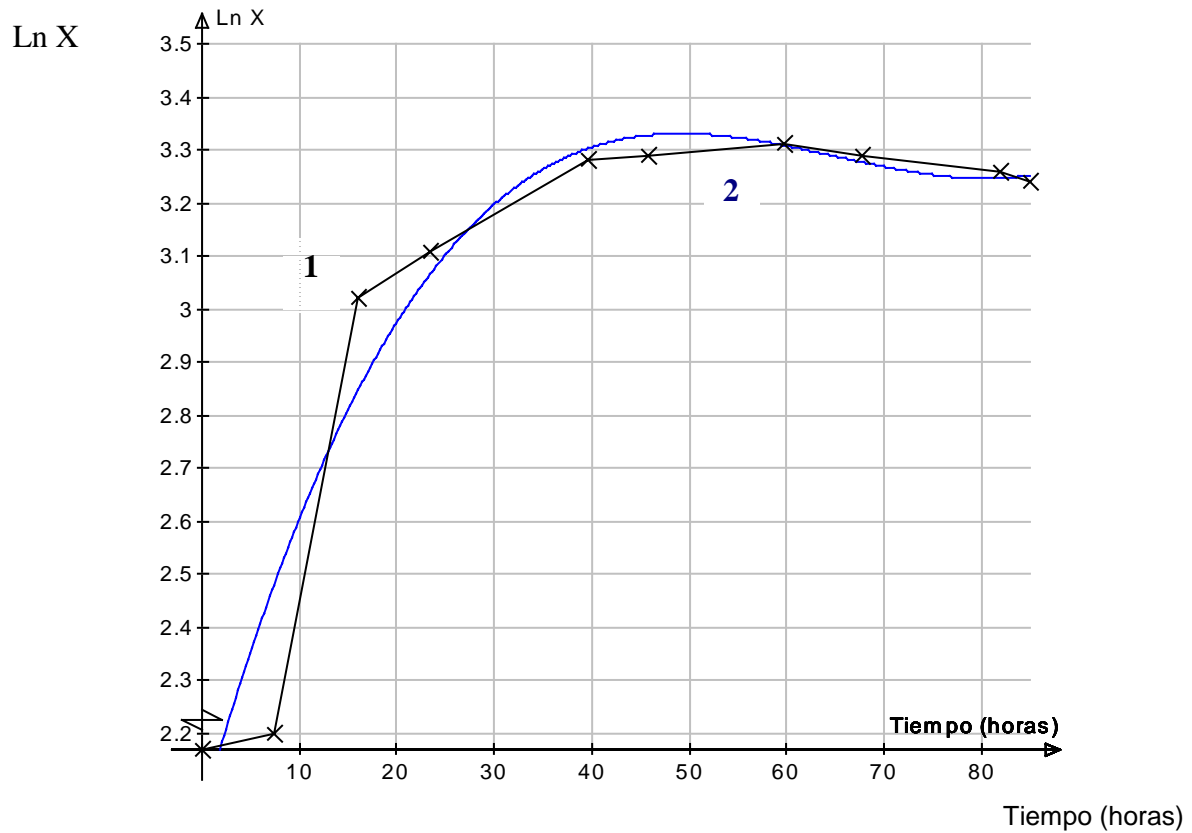
Ecuación: $Y=0.0662X+ 0.204$ es el resultado de la aplicación del método de regresión lineal a los estándares de patrones mcfarland obtenidos experimentalmente

TABLA N°15. Resultados del Análisis de Muestras por el Método Turbidimétrico durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular.

N° de Muestra	Tiempo (horas)	Valor de Absorbancia	*X(UFC10⁸/mL)	Ln X
1	0	0,7905	8,73	2,17
2	7,45	0,8032	9,05	2,20
3	16,10	1,5647	20,55	3,02
4	23,40	1,6906	22,46	3,11
5	39,60	1,9602	26,53	3,28
6	45,80	1,9807	26,84	3,29
7	59,80	2,01	27,28	3,31
8	67,70	1,9755	26,76	3,29
9	82,0	1,9243	25,99	3,26
10	85,0	1,8958	25,56	3,24

*Los valores de concentración fueron determinados en la ecuación de la regresión lineal de la Curva Estándar de patrones mcfarland.

**Gráfico N° 3. Curva de Turbidimetría (Muestras)
Concentración vs. Tiempo**



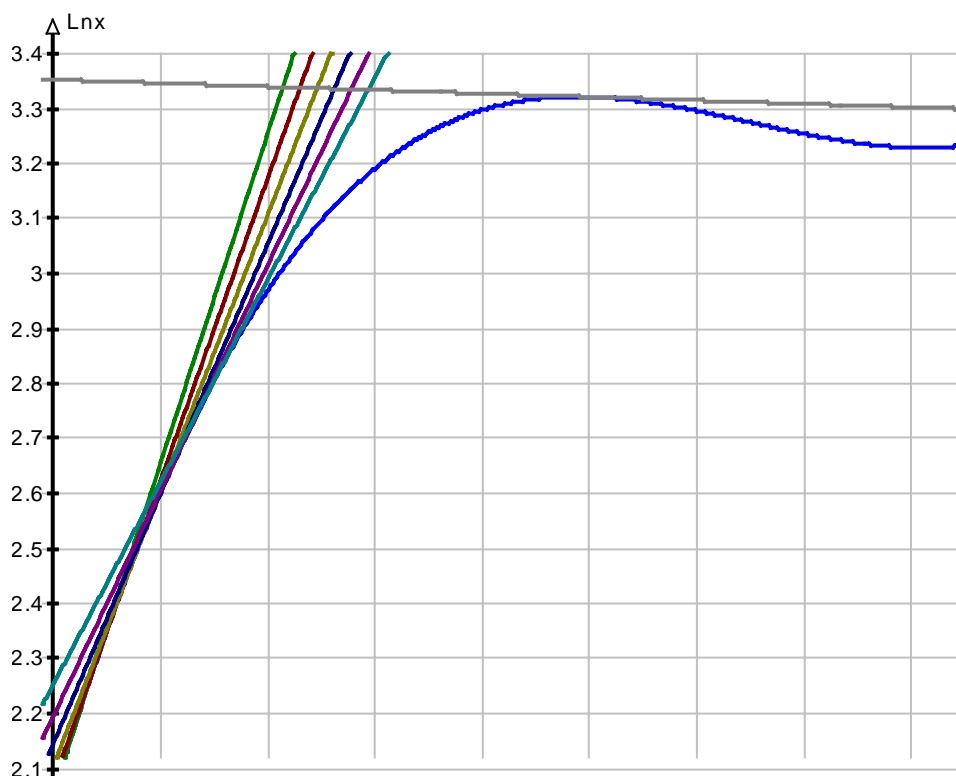
- La **Curva N° 1** se obtiene calculando la concentración $CUFC \times 10^8 / \text{mL}$ de las muestras en la ecuación lineal de la curva estandar de patrones mcfarland.
- La **Curva N° 2** se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados de las muestras obtenidas en la ecuación lineal de patrones mcfarland.

TABLA N°16. Aplicación de regresión Polinomial a los resultados del Análisis de Muestras por el Método Turbidimétrico, durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular.

$$\text{Ecuación: } Y = 2.05 + 0.0652x - 0.00107x^2 + 5.94E - 6x^3$$

Tiempo (horas)	Valor de LnX
0	2,05
10	2,60
20	2,97
30	3,20
40	3,33
50	3,38
60	3,39
70	3,41
80	3,46

**Gráfico N° 4. Cálculo de la Velocidad Específica de Crecimiento
(Método Turbidimetrico)
Concentración vrs Tiempo**



μ = La Velocidad específica de crecimiento puede calcularse en el gráfico N° 4, trazando rectas tangentes en diferentes tiempos, el valor de la pendiente de cada recta tangente representa esta velocidad (UFCx10⁸/mL) en un tiempo específico.

Tiempo (horas)	Valor de la Pendiente de las Rectas Tangentes	μ (h ⁻¹)
2,5	0,05995	0,05995
5,0	0,05491	0,05491
7,5	0,05008	0,05008
10,0	0,04545	0,04545
12,5	0,04102	0,04102
15,0	0,03681	0,03681
50,0	-0,00275	-0,00062

11.1 Cálculo de la Velocidad Específica por el Método Turbidimétrico

En el gráfico N° 4 puede observarse la tendencia de una curva de un cultivo por lotes en la cual pueden determinarse tres fases de crecimiento: exponencial, estacionaria y muerte. La máxima velocidad de crecimiento se alcanza a las 2.5 horas y se mantiene aproximadamente constante hasta las 10 horas; a partir de este tiempo comienza a disminuir, a tal punto que al llegar a las 70 horas el proceso de crecimiento microbiano ha entrado a la fase de muerte .

11.2 Cálculo del Tiempo de Duplicación (Método Turbidimétrico)

$$\text{Fórmula: } T_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Donde:

T_d = Es el tiempo entre dos duplicaciones sucesivas de una población microbiana.

μ = Velocidad específica de crecimiento durante la fase exponencial (Velocidad a las 2.5 horas en la curva del cálculo de la velocidad específica de crecimiento del gráfico N° 4).

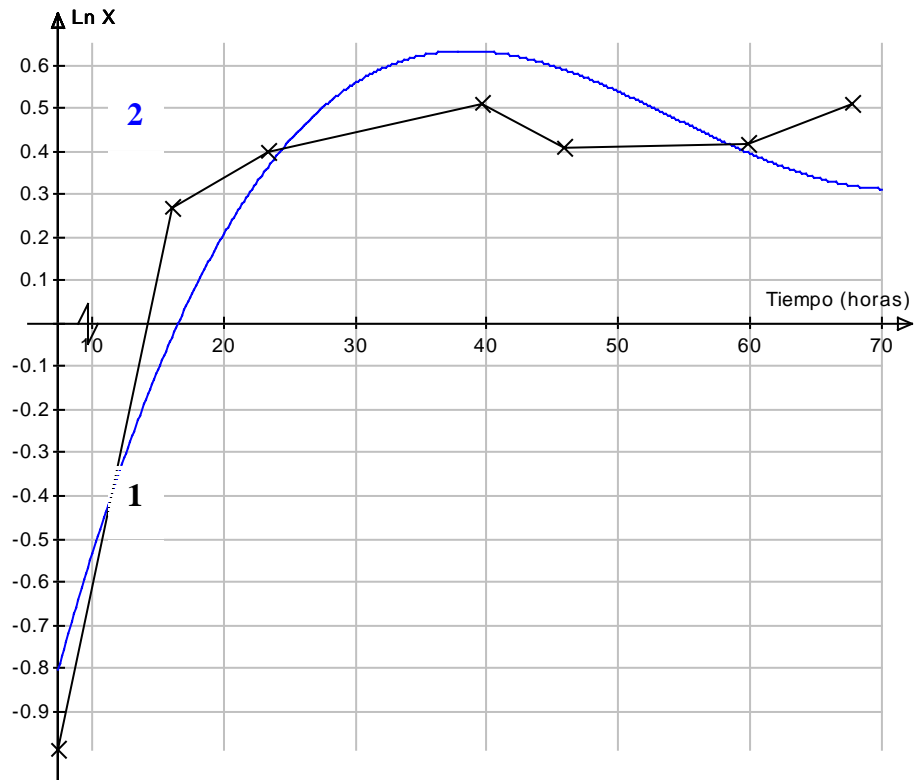
$$T_d = \frac{\ln 2}{0,05995} = 11.56 \text{ horas}$$

TABLA N°17. Aplicación de regresión Polinomial a los resultados del Análisis de Muestras por el Método de Peso seco, durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular.

$$\text{Ecuación: } Y = -1.79 + 0.154x - 0.0031x^2 + 1.9E - 5x^3$$

Tiempo (horas)	Valor de LnX (mg/mL)
10	-0,541
20	0,202
30	0,553
40	0,626
50	0,535
60	0,394
70	0,317
80	0,418

**Gráfico N°5. Curva de Peso Seco (Muestras)
Concentración vrs. Tiempo**



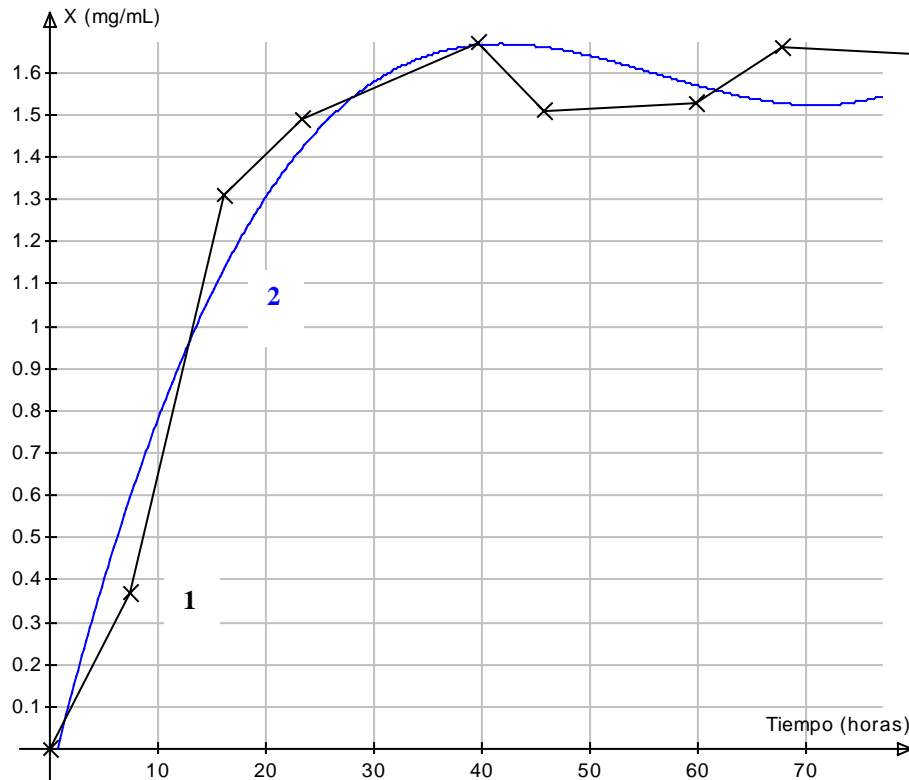
- La **Curva N° 1** se obtiene graficando los resultados obtenidos experimentalmente.
- La **Curva N° 2** se obtiene aplicando el método de Regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente.

TABLA N°18. Aplicación de regresión Polinomial a los resultados del Análisis de Muestras por el Método de Peso seco, durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular.

$$\text{Ecuación: } Y = -0.0639 + 0.103x - 0.00197x^2 + 1.17E - 5x^2$$

Tiempo (horas)	Valor de X (mg/mL)
0	0,00
10	0,781
20	1,30
30	1,57
40	1,65
50	1,62
60	1,55
70	1,51
80	1,56

**Gráfico N° 6. Curva de Peso Seco (Muestras)
Concentración vs. Tiempo**



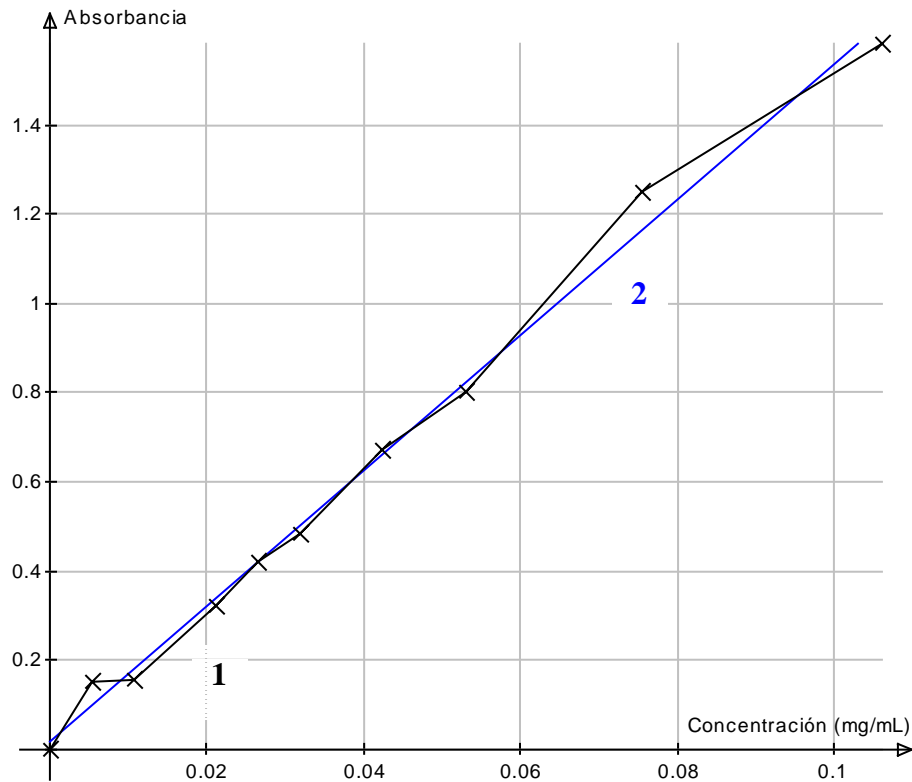
- La **Curva N°1** se obtiene graficando los resultados obtenidos experimentalmente.
- La **Curva N°2** se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente.

TABLA N°19. Aplicación de Regresión Lineal a la Curva Estándar de Sacarosa

Ecuación: $Y = 15.2X + 0.0188$

N° de Estándar	mL de Solución de Sacarosa	mL de Agua Destilada	mL de Fenol al 80%	mL de H₂SO₄	Valor de Absorbancia	Concentración (mg/mL)
1	0,0	2,0	0,1	5,0	0,0188	0
2	0,1	1,9	0,1	5,0	0,0994	0,0053
3	0,2	1,8	0,1	5,0	0,1799	0,0106
4	0,4	1,6	0,1	5,0	0,3410	0,0212
5	0,5	1,5	0,1	5,0	0,4216	0,0265
6	0,6	1,4	0,1	5,0	0,5022	0,0318
7	0,8	1,2	0,1	5,0	0,6633	0,0424
8	1,0	1,0	0,1	5,0	0,8244	0,0530
9	1,5	0,5	0,1	5,0	1,1656	0,07545
10	2,0	0,0	0,1	5,0	1,6300	0,1060

Gráfico N° 7. Curva Estándar de Sacarosa (Método de Fenol-Sulfúrico)



- La **Curva N° 1** se obtiene graficando los resultados de los estándares de sacarosa obtenidos experimentalmente.
- La **Curva N° 2** se obtiene aplicando el método de regresión lineal a los resultados de los estándares de sacarosa obtenidos experimentalmente.

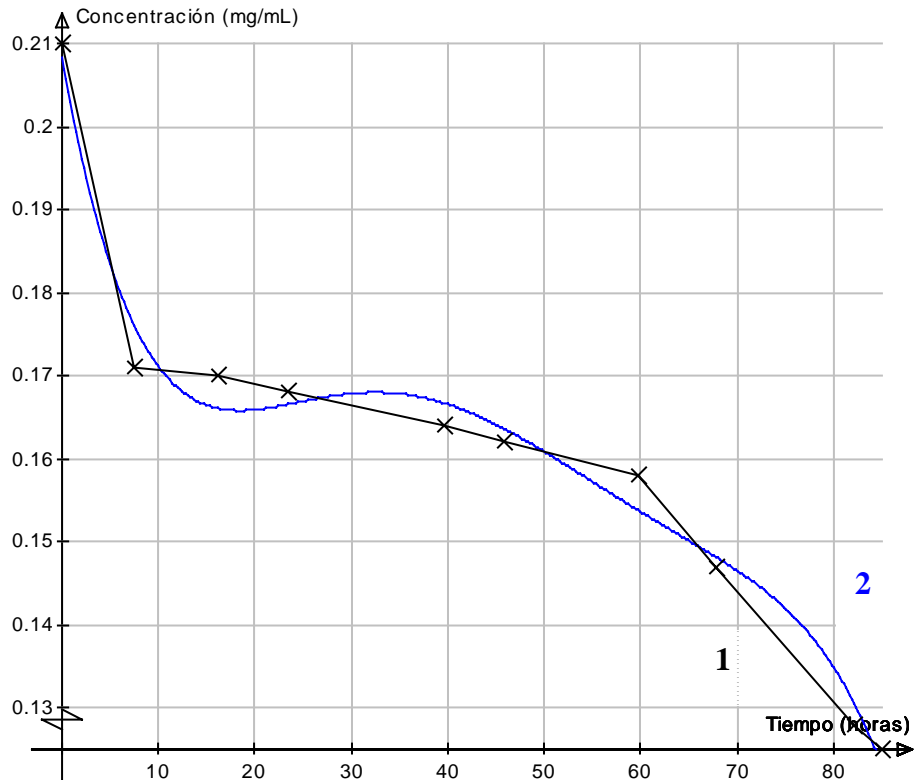
Ecuación: $Y=15.2X+ 0.0188$ es el resultado de la aplicación del método de regresión lineal a los estándares de sacarosa obtenidos experimentalmente

TABLA N°20. Resultados del Análisis de Muestras por el Método de Fenol Sulfúrico, para la Cuantificación de Azúcares Totales durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular.

N° de Muestra	Tiempo (horas)	Valor de Absorbancia	*Concentración (mg/mL)
1	0	3,2119	0,210
2	7,45	2,6157	0,171
3	16,10	2,5955	0,170
4	23,40	2,5796	0,168
5	39,60	2,5115	0,164
6	45,80	2,4870	0,162
7	59,80	2,4176	0,158
8	67,70	2,2600	0,147
9	82,0	1,9600	0,128
10	85.0	1,9203	0,125

*Los valores de concentración fueron determinados en la ecuación de la regresión lineal de la Curva Estándar de Sacarosa.

Gráfico N° 8. Curva de consumo de sustrato (Método de Fenol-Sulfúrico)
Concentración de sustrato vrs. Tiempo



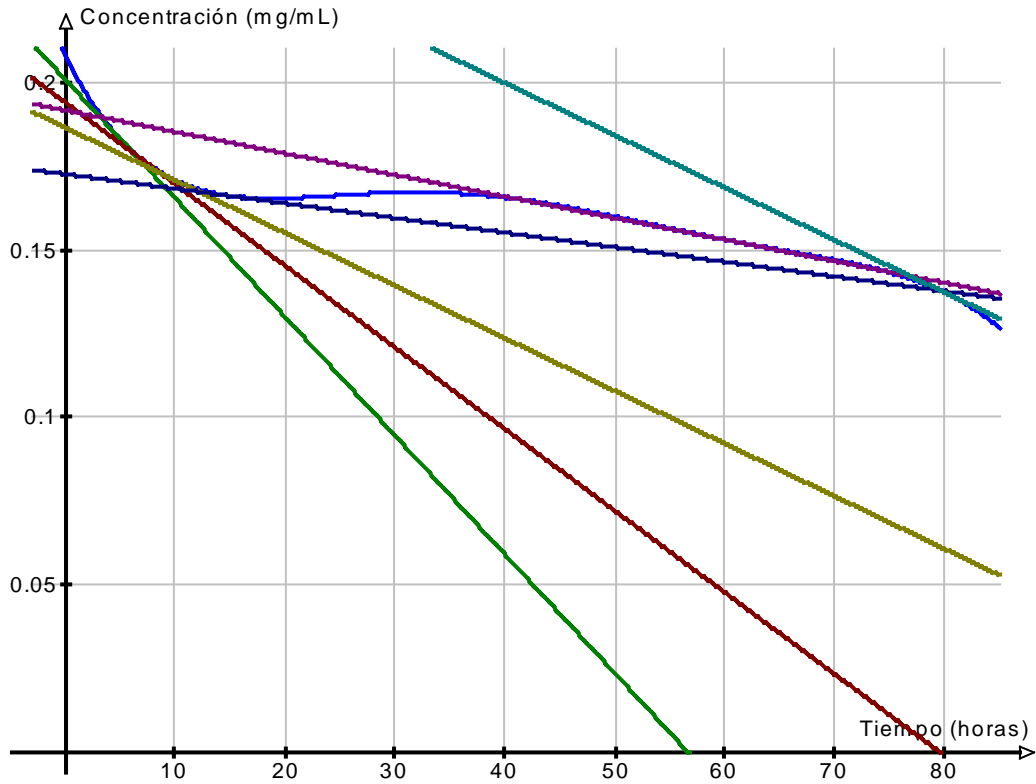
- La **Curva N° 1** se obtiene graficando los resultados obtenidos experimentalmente.
- La **Curva N° 2** se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente.

TABLA N°21. Aplicación de regresión Polinomial a los resultados del Análisis de Muestras por el Método de Fenol Sulfúrico, para la Cuantificación de Azúcares Totales durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular.

Ecuación: $Y = 0.208 - 0.00662x + 0.000372x^2 - 9.29E - 6x^3 + 1.04E - 7x^4 - 4.35E - 10x^5$

N° de Muestra	Tiempo (horas)	Concentración(mg/mL)
1	0	0,208
2	10	0,171
3	20	0,165
4	30	0,167
5	40	0,166
6	50	0,160
7	60	0,153
8	70	0,147
9	80	0,137

**Gráfico N° 9 Cálculo de la Velocidad Específica de Consumo de sustrato
Concentración de sustrato vrs Tiempo**



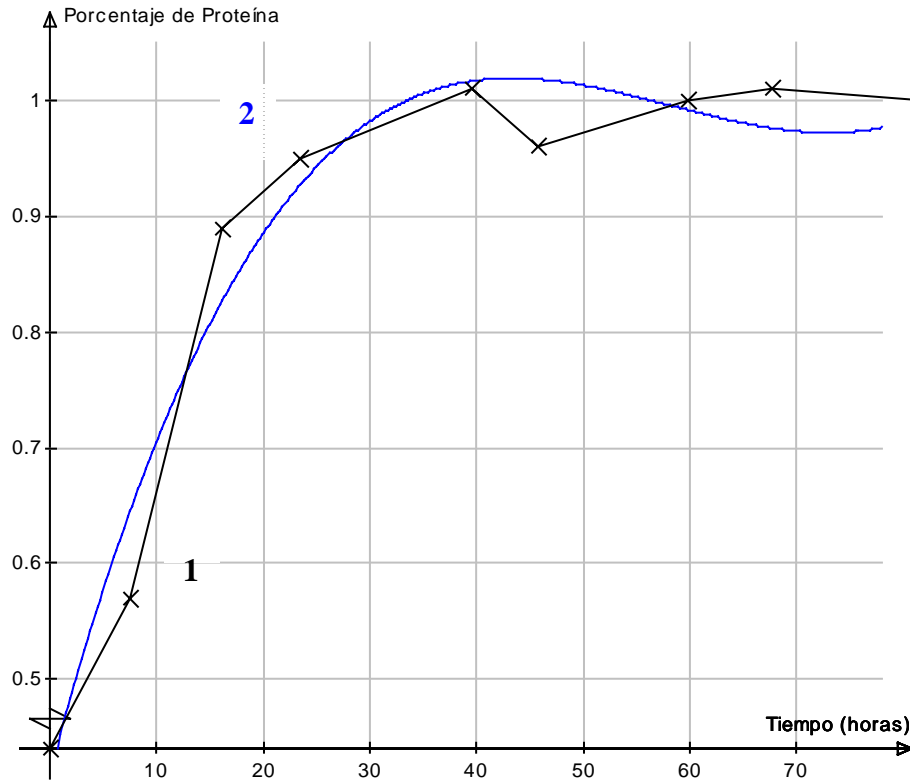
S = La Velocidad específica de consumo de sustrato puede calcularse en la gráfica N° 9, trazando rectas tangentes en diferentes tiempos, el valor de la pendiente de cada recta tangente multiplicada por el valor inverso de peso seco en este tiempo, representa esta velocidad (mg de sustrato consumidos/mg de biomasa que se forman en un litro de medio de cultivo).

Tiempo (horas)	Pendiente de las Rectas Tangentes	Valor de 1/X (mg/mL)	qs (mg de sustrato/mg biomasa x L)
5	-0,0035	2,48	-0,00868
7.5	-0,0024	1,66	-0,00398
10	-0,0016	1,28	-0,00205
15	-0,0004	0,93	-0,00037
60	-0,0006	0,65	-0,00039
80	-0,0015	0,64	-0,00096

11.3 Cálculo de la Velocidad Específica de consumo de sustrato

En el gráfico N° 9 puede determinarse el comportamiento que experimenta el consumo de sustrato durante el proceso de producción de proteína unicelular. La máxima velocidad de consumo de sustrato se obtiene a las cinco horas de haber iniciado el proceso y se mantiene aproximadamente constante hasta las diez horas. Debido a que el crecimiento microbiano entra en la fase estacionaria, la velocidad de consumo de sustrato disminuye de una manera mucho más lenta. Este fenómeno se desarrolla entre las diez y sesenta horas. Finalmente, en la fase de muerte, se observa que la disminución del consumo de sustrato es mucho más rápida que en la fase estacionaria.

**Gráfico N° 10. Curva de Formación de Producto (% de Proteína)
Porcentaje de Proteína vrs. Tiempo**



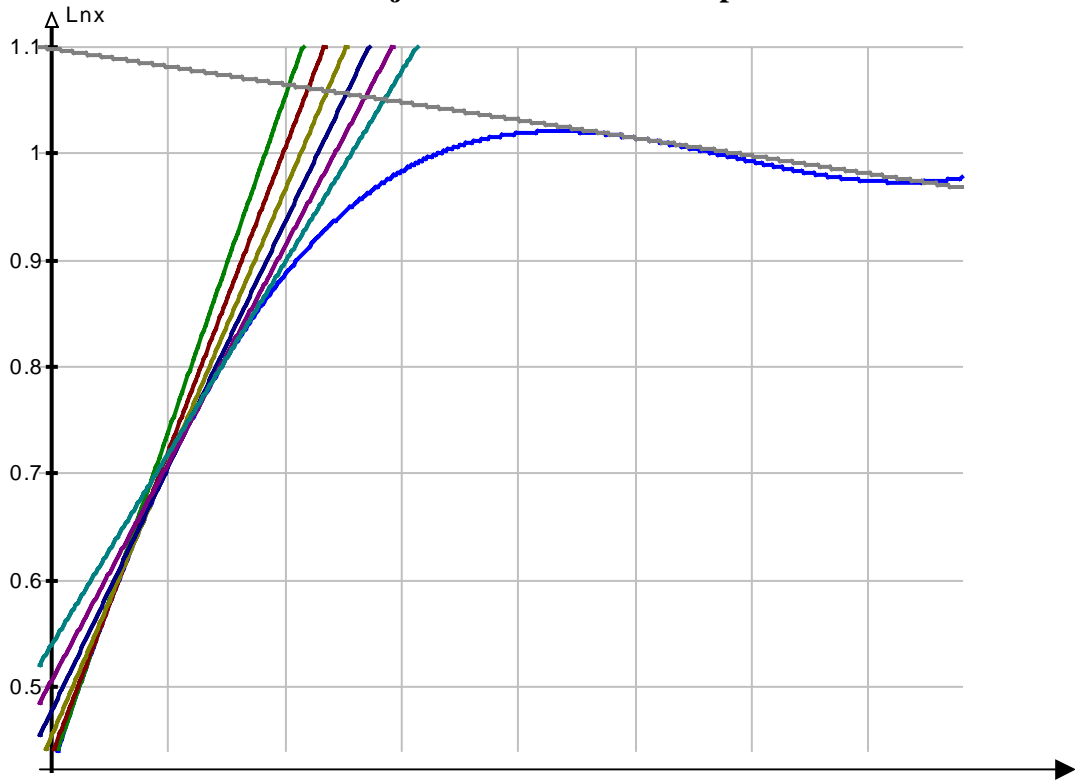
- La **Curva N° 1** se obtiene graficando los resultados obtenidos experimentalmente.
- La **Curva N° 2** se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente.

TABLA N° 22. Aplicación de regresión Polinomial a los resultados del Porcentaje de Proteína de muestras, durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular.

$$\text{Ecuación: } Y = 0.421 + 0.0345x - 0.00063x^2 + 3.63E - 6x^2$$

Tiempo (horas)	Porcentaje de Proteína
0	0,421
10	0,706
20	0,886
30	0,983
40	1,02
50	1,01
60	0,993
70	0,974
80	0,982

**Gráfico N° 11. Cálculo de la Velocidad Específica de Formación de Producto
Porcentaje de Proteína vs. Tiempo**



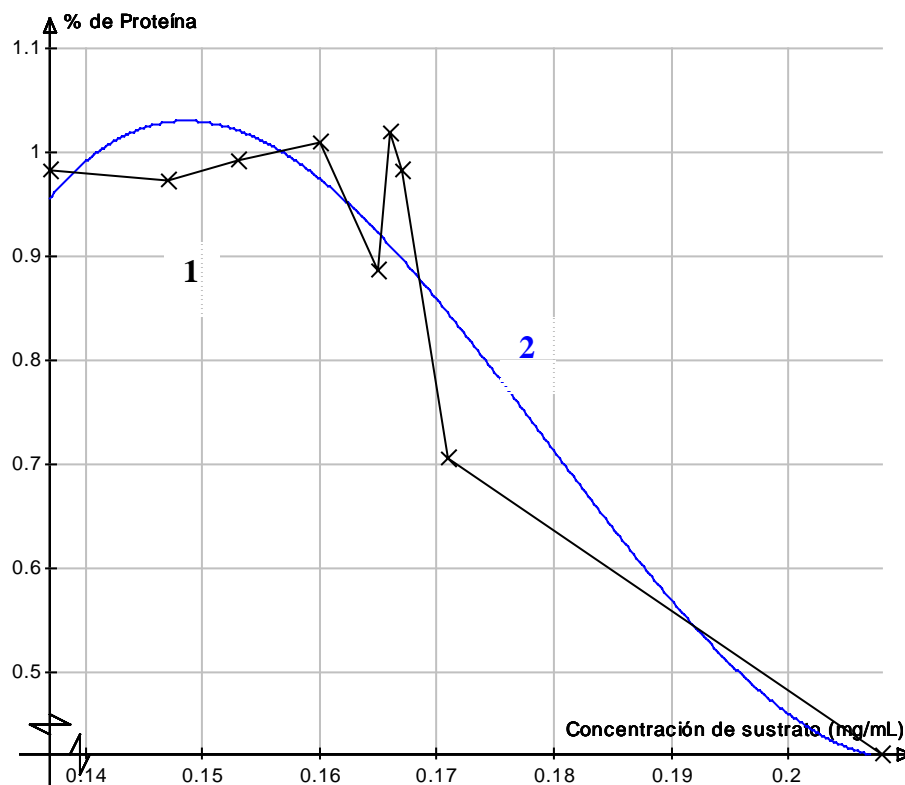
qp = La Velocidad específica de formación de producto puede calcularse sobre el gráfico N°11, trazando rectas tangentes en diferentes tiempos, el valor de la pendiente de cada recta tangente multiplicada por el inverso del valor de peso seco en ese tiempo, representa esta velocidad (mg de Proteína/mg de biomasa).

Tiempo (horas)	Pendiente de las Rectas Tangentes	Valor de 1/X (mg/mL)	qp (mg de Proteína/mg biomasa x L)
2,5	0,03140	5,52	0,1733
5,0	0,02843	2,48	0,0705
7,5	0,02560	1,66	0,0425
10,0	0,02291	1,28	0,0293
12,5	0,02035	1,06	0,0216
15,0	0,01793	0,93	0,0167
50,0	-0,00167	0,62	-0,0010

11.4 Cálculo de la Velocidad Específica de Formación de Producto

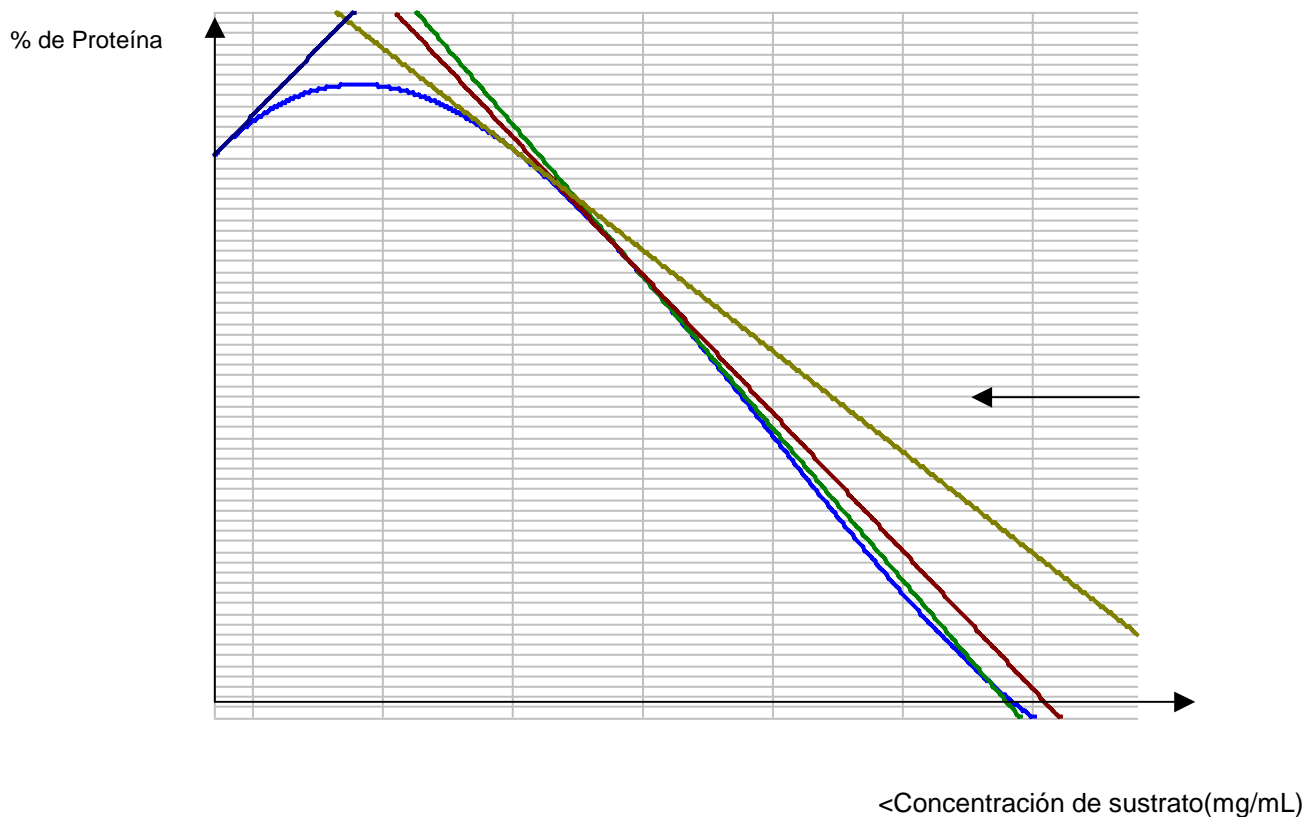
En el gráfico N° 11 puede determinarse el comportamiento que experimenta la formación de producto durante el proceso de producción de proteína unicelular. La tendencia del gráfico establece que la producción de proteína está asociada al crecimiento de *Cándida utilis*. La máxima velocidad específica de formación de producto se produce durante la fase exponencial, fase desarrollada durante las primeras diez horas de haber iniciado el proceso de producción. En la fase estacionaria prácticamente no existe formación de proteína, de ahí que la velocidad en esta fase sea aproximadamente cero. En la fase de muerte la velocidad sigue disminuyendo debido a que la capacidad de reproducción de las células microbianas es menor en relación a la cantidad de células que están en lisis celular.

**Gráfico N° 12. Curva de Rendimiento de Producto sobre Sustrato
Concentración de Sustrato vrs. Porcentaje de Proteína**



- La **Curva N° 1** se obtiene mediante la aplicación de regresión polinomial a los resultados de porcentaje de proteína formada y consumo de sustrato (mg/mL).
- La **Curva N° 2** corresponde a la tendencia idealizada de la relación del porcentaje de proteína formada y consumo de sustrato (mg/mL).

**Gráfico N° 13. Cálculo de Rendimiento específico de Producto sobre sustrato($Y_{p/s}$)
Porcentaje de Proteína vrs. Concentración de sustrato**



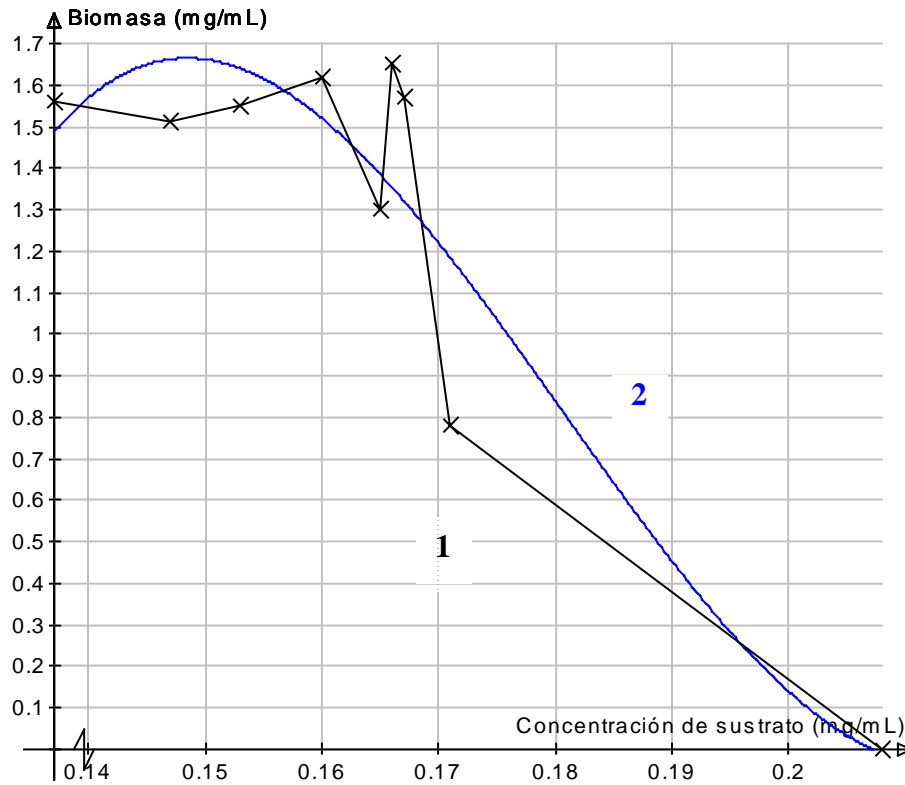
$Y_{p/s}$ = El rendimiento específico de formación de producto sobre consumo de sustrato puede calcularse en el gráfico N° 13, trazando rectas tangentes en diferentes tiempos, el valor de la pendiente de cada recta tangente representa este rendimiento (mg de proteína formada por mg de sustrato consumido) en un tiempo específico.

Tiempo (horas)	Valor de Pendiente de las Rectas Tangentes	$Y_{p/s}$ (mg de proteína/mg sustrato)
10	-14,6	-14,6
30	-13,3	-13,3
50	-9,7	-9,7
80	13,0	13,0

11.5 Cálculo de Rendimiento de Producto sobre Sustrato Y p/s

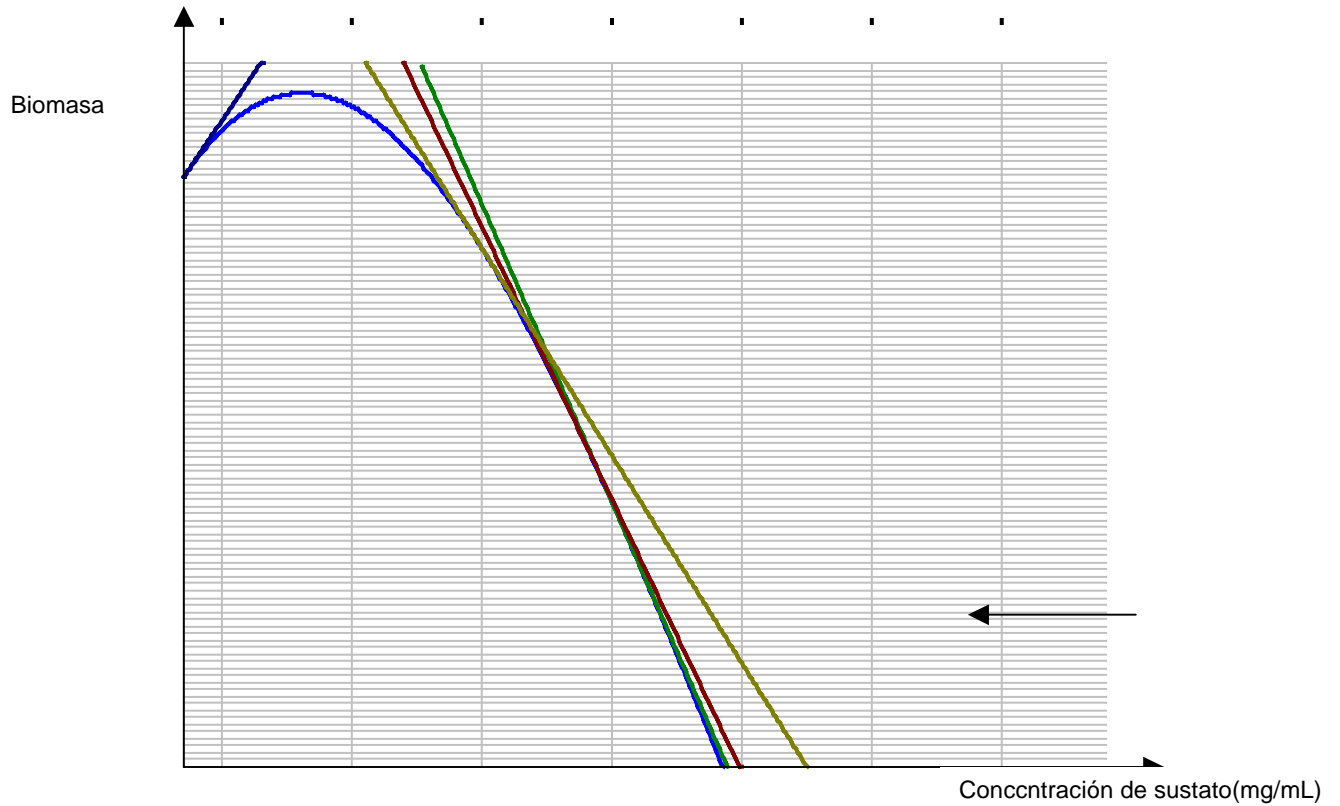
En el gráfico N° 13 puede observarse el comportamiento que existe entre la cantidad de proteína que se está formando en relación con la cantidad de sustrato que se consume. La tendencia del gráfico permite establecer cómo, a medida que el sustrato disminuye, la cantidad de proteína producida aumenta. El máximo rendimiento específico se produce durante la fase exponencial. Los rendimientos poseen valores negativos hasta antes de las 80 horas, ya que es mayor la cantidad de sustrato que se está consumiendo en relación con la cantidad de proteína que se forma. Esta relación cambia cuando el proceso de producción alcanza las 80 horas, ya que en este tiempo es mayor la cantidad de proteína que se ha producido en relación con la cantidad de sustrato que se consume, de ahí que a este tiempo el valor del rendimiento sea positivo.

Gráfico N° 14. Curva de Rendimiento de Biomasa sobre Sustrato
Biomasa vrs. Consumo de sustrato



- La **Curva N° 1** se obtiene mediante la aplicación de regresión polinomial a los resultados de biomasa formada y consumo de sustrato (mg/mL).
- La **Curva N° 2** corresponde a la tendencia idealizada de la relación de biomasa formada y consumo de sustrato (mg/mL).

**Gráfico N° 15. Cálculo de Rendimiento específico de biomasa sobre sustrato(X/S)
Porcentaje de Proteína vrs. Concentración de sustrato(mg/mL)**



$Y_{x/s}$ = El rendimiento específico de formación de biomasa sobre consumo de sustrato puede calcularse en el gráfico N° 15, trazando rectas tangentes en diferentes tiempos, el valor de la pendiente de cada recta tangente representa este rendimiento (mg. de biomasa formada por mg. de sustrato consumido) en un tiempo específico.

Tiempo (horas)	Valor de Pendiente de las Rectas Tangentes	$Y_{x/s}$ (mg biomasa/mg sustrato consumido)
10	-42,3	-42,3
30	-38,7	-38,7
50	-29,4	-29,4
80	27,2	27,2

11.6 Cálculo de Rendimiento Específico de Biomasa sobre Sustrato Y_x/s

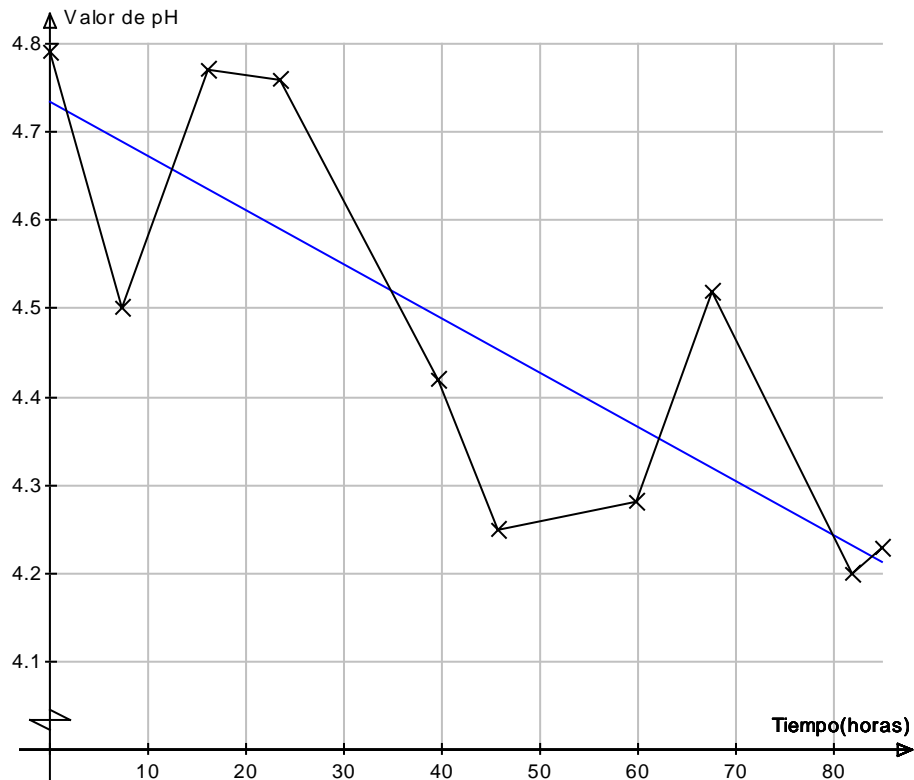
En el gráfico N° 15 puede observarse el comportamiento que existe entre la cantidad de biomasa que se está formando en relación con la cantidad de sustrato se consume. La tendencia de este gráfico es similar al rendimiento de Producto sobre sustrato. El gráfico entrega información útil, ya que permite observar cómo la cantidad de sustrato disminuye a medida que la cantidad de biomasa aumenta. Los rendimientos poseen valores negativos hasta antes de las 80 horas, puesto que es mayor la cantidad de sustrato que se está consumiendo en relación con la cantidad de biomasa que se forma. Esta relación cambia cuando el proceso de producción alcanza las 80 horas, ya que en este tiempo es mayor la cantidad de biomasa que se ha formado en relación a la cantidad de sustrato que se consume, de ahí que a este tiempo el valor del rendimiento sea positivo.

TABLA N° 23. Aplicación de la regresión lineal a los Resultados del Análisis de pH en Muestras durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular.

Ecuación: $Y = -0.0061214X + 4.737634$

N° de Muestra	Tiempo (horas)	Valor de pH
1	0	4.,73
2	7,45	4,69
3	16,10	4,63
4	23,40	4,59
5	39,60	4,49
6	45,80	4,45
7	59,80	4,37
8	67,70	4,32
9	82,0	4,23
10	85,0	4,21

Gráfico N°16 Curva de pH
Valor de pH vrs Tiempo



- La **Curva N° 1** se obtiene utilizando los resultados obtenidos experimentalmente.
- La **Curva N° 2** se obtiene aplicando el método de regresión lineal a los resultados obtenidos experimentalmente.

Conclusiones

-La utilización de agua de maíz como sustrato, hace más atractiva la producción de proteína unicelular, tomando en cuenta que esta ofrece ventajas tales como abundancia, bajo costo, alto contenido de sustancias orgánicas y, a la vez, su uso evita la contaminación del medio ambiente, considerando que este tipo de agua se caracteriza por presentar una alta demanda bioquímica de oxígeno.

-La evaluación del crecimiento microbiano puede realizarse a través de diferentes métodos, siendo los más utilizados, el método turbidimétrico y el de peso seco, de estos, el primero proporcionó resultados más representativos. La representatividad de estos resultados, se vio reflejada en la tendencia de la curva de crecimiento microbiano, en la cual pudo identificarse las diferentes etapas del desarrollo de *Cándida utilis* en un cultivo por lotes.

- El método de fenol-sulfúrico, para la cuantificación de azúcares totales, permite evaluar claramente el aprovechamiento de los nutrientes disueltos en el sustrato, por parte de la *Cándida utilis*.

- La facilidad de propagación de la *Cándida utilis* en el agua de cocimiento de maíz, está influenciado por la adición de fuentes de nitrógeno (Fostato de Amonio), fuentes de fósforo (Fostato de amonio) , minerales y por la riqueza de fuente de carbono propia de este sustrato.

-La levadura *Cándida utilis*, es uno de los microorganismos que ofrece mayores ventajas durante el desarrollo de los procesos de producción de proteína unicelular, estas ventajas incluyen su facilidad de aislamiento, identificación y propagación en sustratos con un alto contenido de azúcares y su elevado valor nutricional.

-La evaluación de parámetros cinéticos como son las velocidades de crecimiento, consumo de sustrato y formación de producto; así como los rendimientos específicos de biomasa sobre sustrato y producto sobre sustrato determinaron que el proceso de producción de proteína unicelular es eficaz durante las diez primeras horas, ya que durante este tiempo se producen las mayores velocidades y rendimientos.

- El control de los parámetros físico-químicos y la adecuada manipulación durante la toma de muestras a lo largo del proceso de producción de proteína unicelular constituyen factores críticos que aseguran la calidad de la proteína producida, con esto se evita la posible inhibición del crecimiento de la levadura así como la contaminación del medio de cultivo.

Recomendaciones

-La producción de proteína unicelular a partir de *Cándida utilis*, es una alternativa que permitiría la elaboración de suplementos proteicos, que podrían ser incluidos en la dieta básica de la alimentación de los infantes, contrarrestando de esta forma, los problemas de desnutrición que actualmente experimenta el país.

-Desarrollar procesos de producción de proteína unicelular utilizando residuos agroindustriales que se produzcan en cantidades suficientemente grandes, para hacer práctico este proceso desde el punto de vista técnico y económico. Un ejemplo de este tipo de residuos podría ser la pulpa del café o la melaza de caña.

-Para obtener mejores rendimientos de proteína unicelular, es necesario eliminar los restos de cal añadidos durante la cocción del maíz, con esto se facilita la regulación del pH del medio y evita posibles interferencias con la biomasa obtenida al final del proceso de producción.

- El desarrollo de procesos de producción de proteína unicelular deben ir acompañados de un estudio cinético de crecimiento microbiano, ya que este estudio permite la evaluación de velocidades de crecimiento, de consumo de sustrato, de formación de productos así como el establecimiento de rendimientos. La evaluación de estos parámetros es una herramienta útil al momento de implementar procesos de producción a nivel industrial.

-El aumento de la eficiencia, en el desarrollo de los procesos biotecnológicos, como es la producción de proteína unicelular, no sólo se alcanza considerando aspectos referentes a la calidad del medio de cultivo y a la cepa microbiana a utilizar, sino también implica la evaluación de factores físicos, químicos, microbiológicos, como son el pH, aireación del medio, agitación, adición de sustancias nutritivas, condiciones asépticas que evitan la contaminación del medio de cultivo con microorganismos no deseados.

BIBLIOGRAFIA

ALVAREZ ZELAYA, Margarita. SUNCIN ZALDIVAR, Reina Guadalupe. “Determinación de Biomasa del cultivo de levaduras de *Cándida utilis*, *Kluyveromyces fragilis* y *Sacharomyces cerevisiae* en agua de coco , suplementada con dos fuentes de Nitrógeno. El Salvador. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Escuela de Biología.1993.

BARRIENTOS DIAZ, Ricardo Antonio. ESCOLERO PORTILLO, Zenia Maribel. “Producción e identificación de enzimas proteasas a partir de levadura *Cándida utilis*, utilizando como medio de cultivo melaza de caña de azúcar. Biotecnología”. El Salvador: Facultad de Química y Farmacia, Universidad Nacional de El Salvador (UES). 1996.

CABELLO VELASCO, A. Microbiología Industrial: Manual de Laboratorio.1^{ra}. Edición. México. Elaborado en el Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, 1989.

CAMPOS FIGUEROA, L.A. “Producción de biomasa a partir de la Malanga”. El Salvador. Facultad de Ingeniería, Universidad Centroamericana “José Simeón Cañas”(UCA). 1982.

CRUEGER, Wulf. CRUEGER, Anneliese. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. 1^{ra}. Edición. España: Editorial Acirbia S.A., 1989.

DIAZ R.”Manual Práctico de Microbiología”. 2da. Edición. España.Editorial Manson S.A.1999.

DURAN de BAZUA, C. "Una nueva tecnología para la extrusión alcalina de maíz y sorgo”. Monografía Tecnológica 2. Universidad Nacional Autónoma de México. México.1988.

FIGUEROA, Vilda. “Experiencias cubanas en el uso de las mieles de caña para la alimentación porcina”. Cuba. Instituto de Investigaciones Porcinas.1989.

GARCIA GARIBAY, Mariano. QUINTERO RAMIREZ, Rodolfo. LOPEZ-MUNGUIA CANALES, Agustin: “Biotecnología Alimentaria”. 1^{ra} . Edición. México: Editorial Noriega, 1993.

HERNANDEZ GUERRERO Guillermo, MENDOZA Juan Antonio.“Proceso para la producción de *Cándida utilis* y *Sacharomices cerevisiae* bajo condiciones de cultivo bien caracterizadas”. México. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. 1990.

ILLANES, Andres. V Curso Latinoamericano de Biotecnología: Cinética enzimática. 1^{ra}. Edición. Chile: Escuela de Ingeniería Bioquímica. Universidad Católica de Valparaíso, 1996.

JAGNOW G. DAWID W. Biotecnología: Producción con experimentos modelos..1^{ra}. Edición. España: Editorial Acribia S.A., 1991.

LIU J.G., LI G.X., LIU, H., and ZHOU, X.K.: Purification and Properties of Uricase from *Candida* Sp and Its Application in Uric Acid Analysis in Serum. 1994.

LOPEZ, Ana María del Carmen.. RIVAS NUÑEZ, Marina Elizabeth. "Elaboración de tabletas masticables de proteína (*Cándida utilis*) reforzadas con calcio". El Salvador: Facultad de Química y Farmacia, Universidad Nacional de El Salvador (UES). 1995.

PEDRAZA ORDOÑEZ, Gloria Ximena. "Aplicación de la Biotecnología apropiada para la producción de Proteína Unicelular a partir de *Spirulina máxima*. Colombia. Fundación Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria.1992.

PEDROZA, R. "Estudios de la degradación biológica de los efluentes de nixtamalización". Tesis de maestría, Universidad Iberoamericana. Mexico D.F., México. 1985.

Revista Colombiana de Química. Febrero 1997; vol. 26 N° 2.

Revista de la Facultad de Agronomía de Maracaibo, Venezuela. "Producción de Proteínas cultivo continuo de la levadura en suero de leche desproteínizado". Marzo, 1979.

Revista de la Facultad de Agronomía, "Producción de Proteínas a partir del Petróleo". Universidad del Zulia, Maracaibo.Venezuela.

SCRAGG. Alan. Biotecnología para Ingenieros: Sistemas biológicos en procesos tecnológicos. 1^{ra}. Edición. México: Editorial Noriega, 1996.

TINAKON Tantikamol. Growth Kinetic of *Cándida utilis* under Aerobic Batch Cultivation. Tailandia. Departamento de Biotectonología. Facultad de Agro-Industria.1981.

http://lectura.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/43/htm/SEC_8.html

<http://www.verema.com/opinamos/tribuna/articulos/levaduras02.htm>

<http://www.canal-h.net/webs/sgonzalez002/Micologia/LEVADURAS.appt.htm>

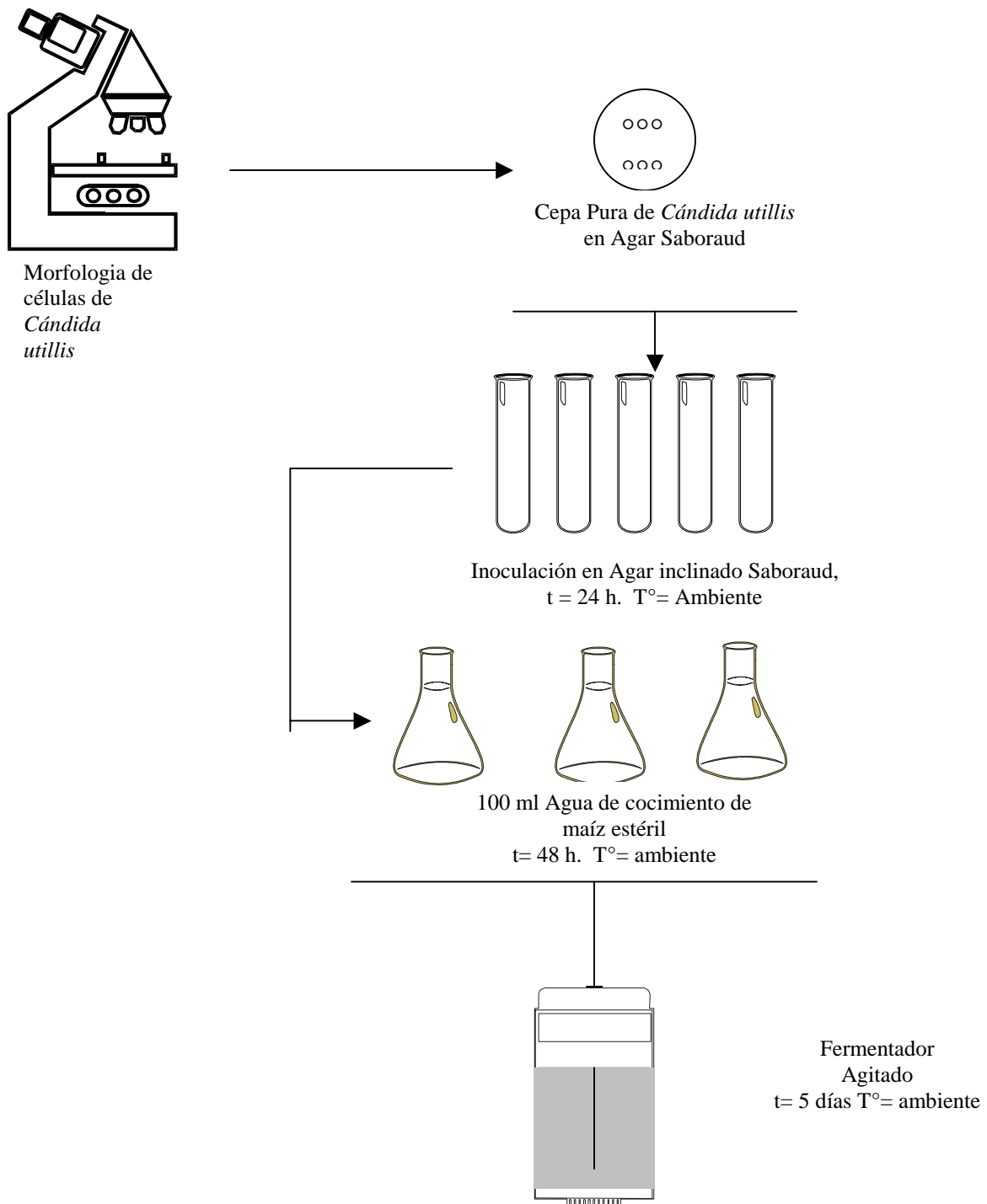
http://lectura.ilce.edu.mx:3000/sites/3milenio/biotec/html/sec_4.htm

<http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/afri/espanol/document/tfeed8/Data/493.HTM>

http://www2.uca.es/dept/quimica_organica/byprodlinea.htm

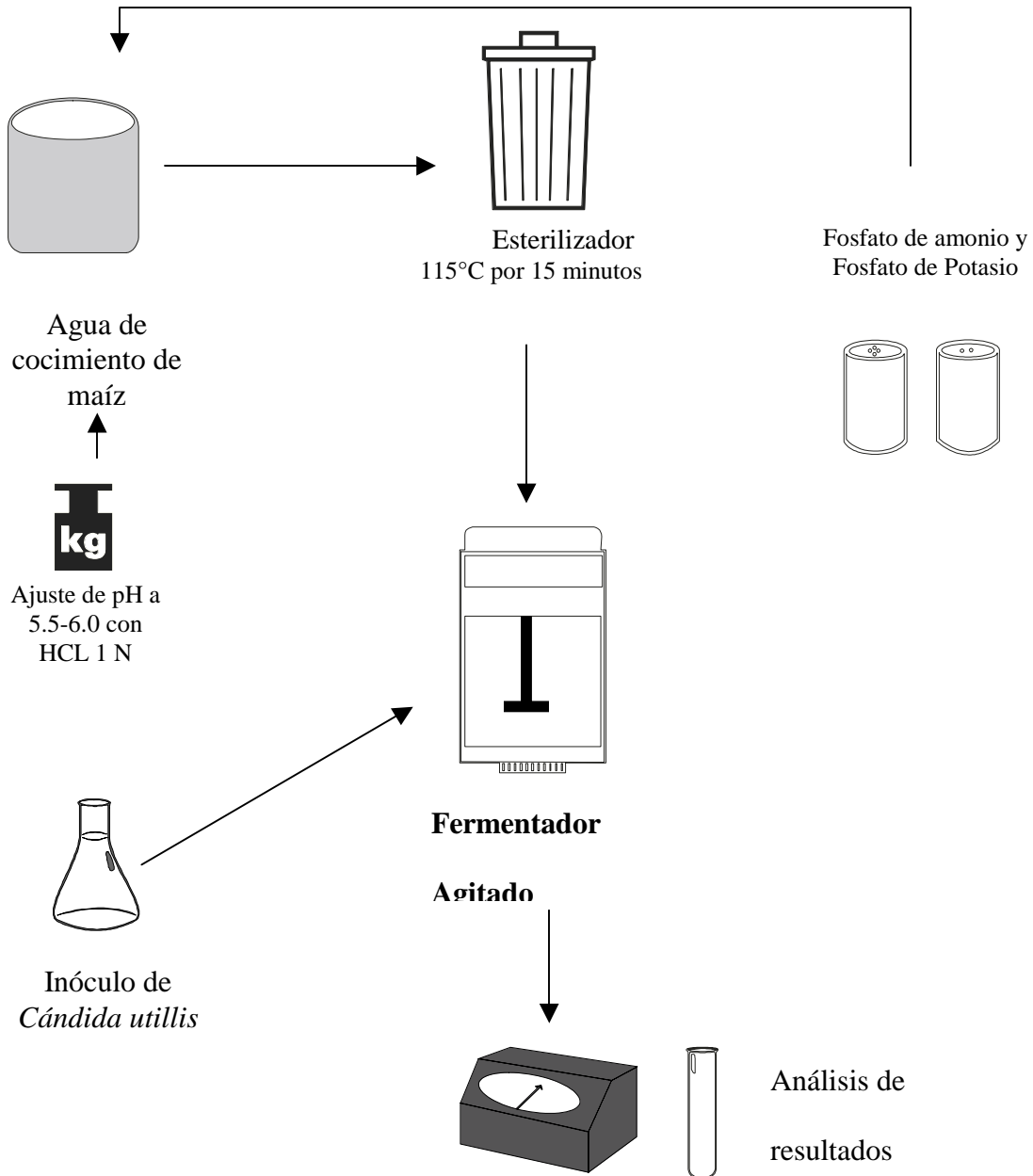
<http://www.fao.org/docrep/T0395S/T0395S02.htm#Aplicaciones%20del%20maiz>

ANEXO 1

ESQUEMA DE LA PREPARACION DEL INOCULO DE *Cándida utilis*

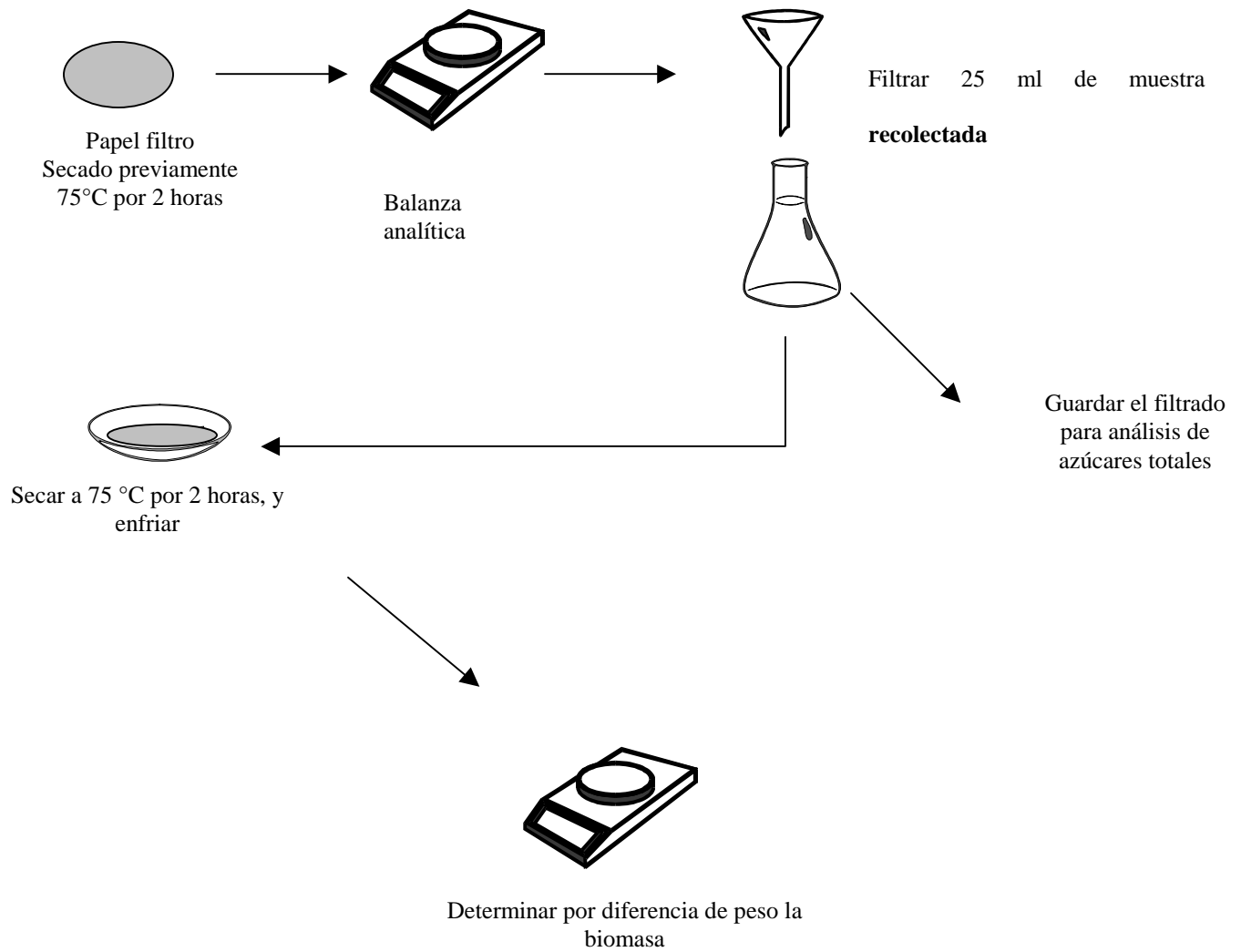
ANEXO 2

FLUJOGRAMA DEL PROCESO DE PRODUCCION DE PROTEINA UNICELULAR



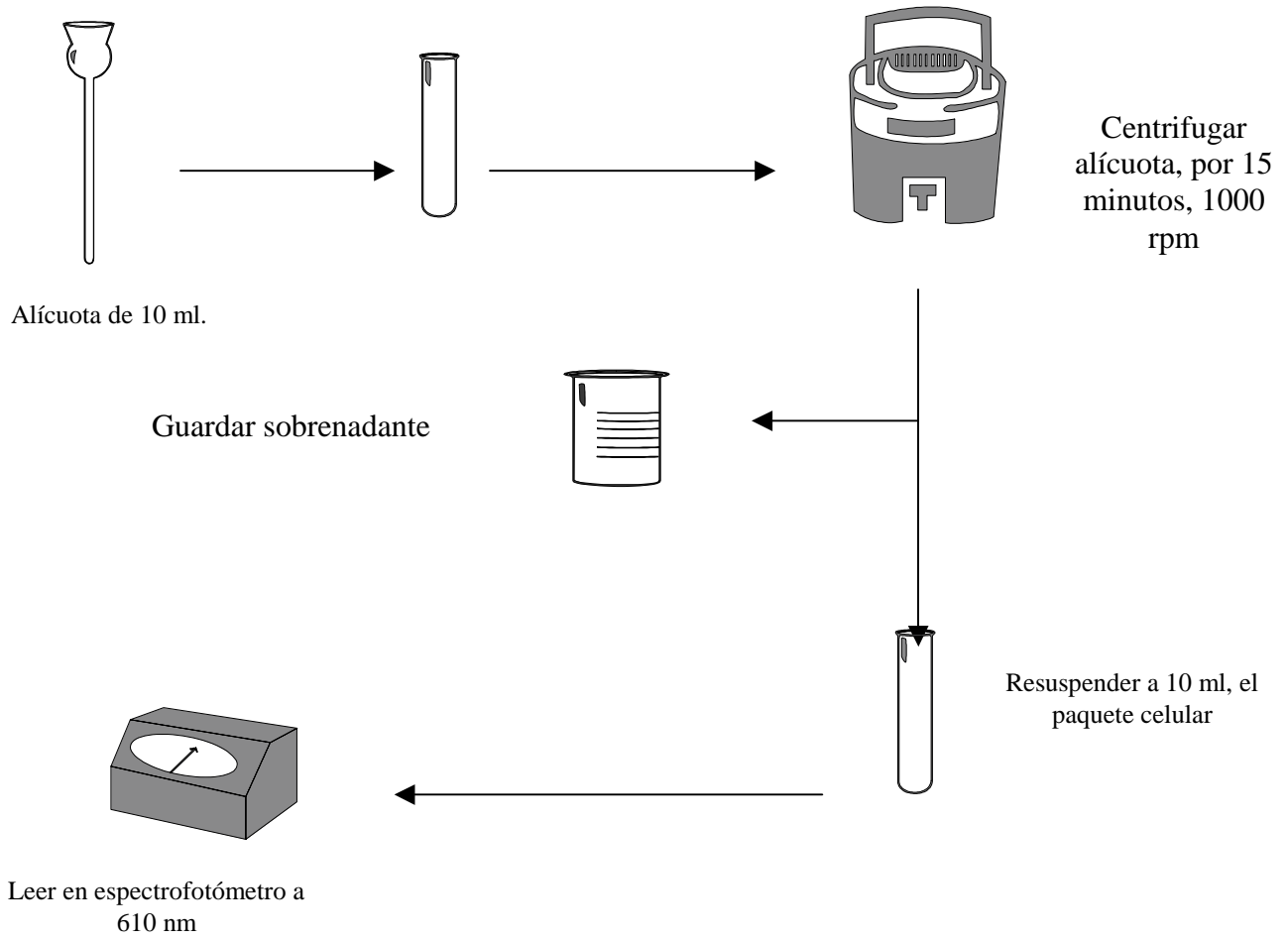
ANEXO 3

DETERMINACION DE BIOMASA POR EL METODO DE PESO SECO



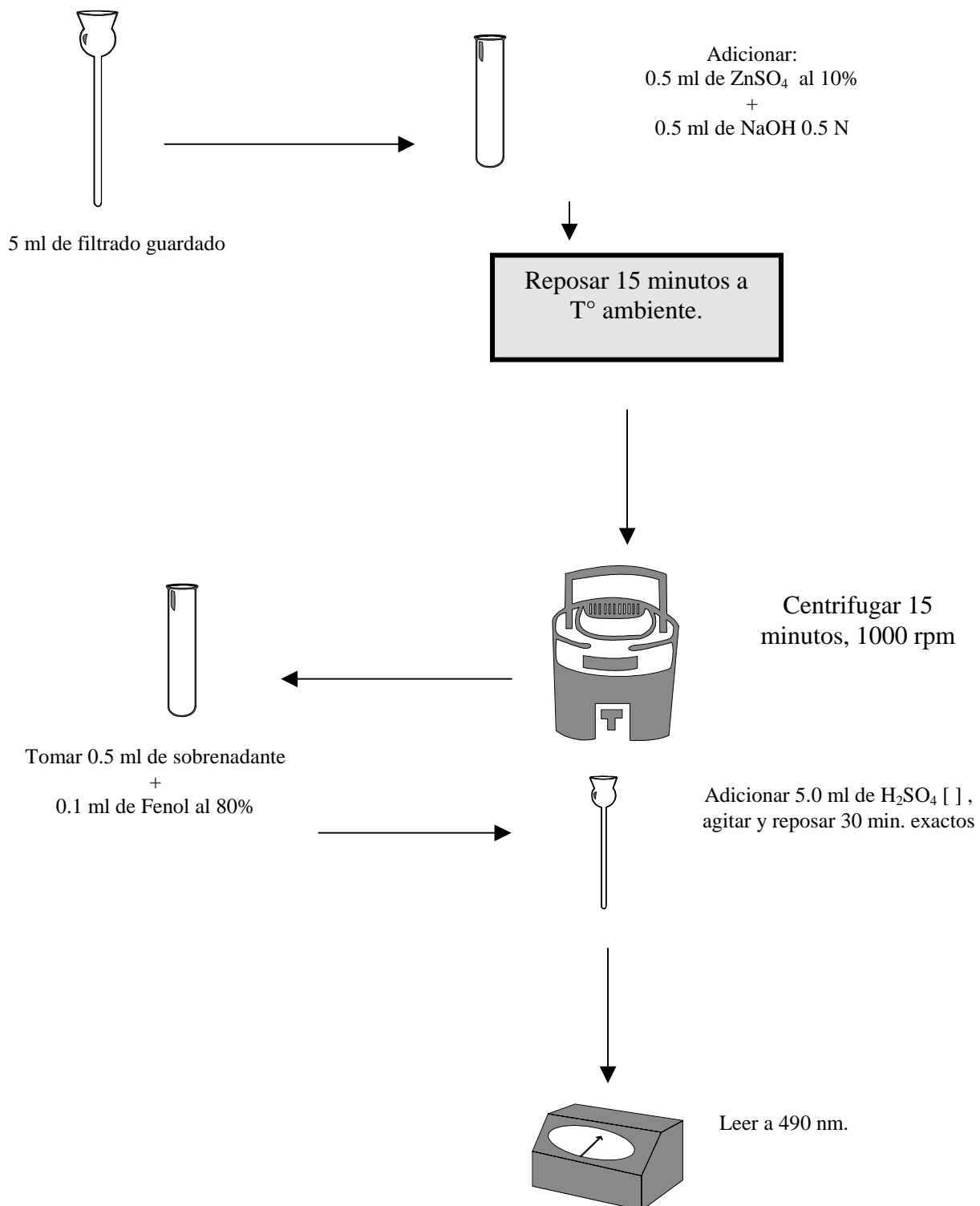
ANEXO 4

DETERMINACION DE BIOMASA POR EL METODO TURBIDIMETRICO



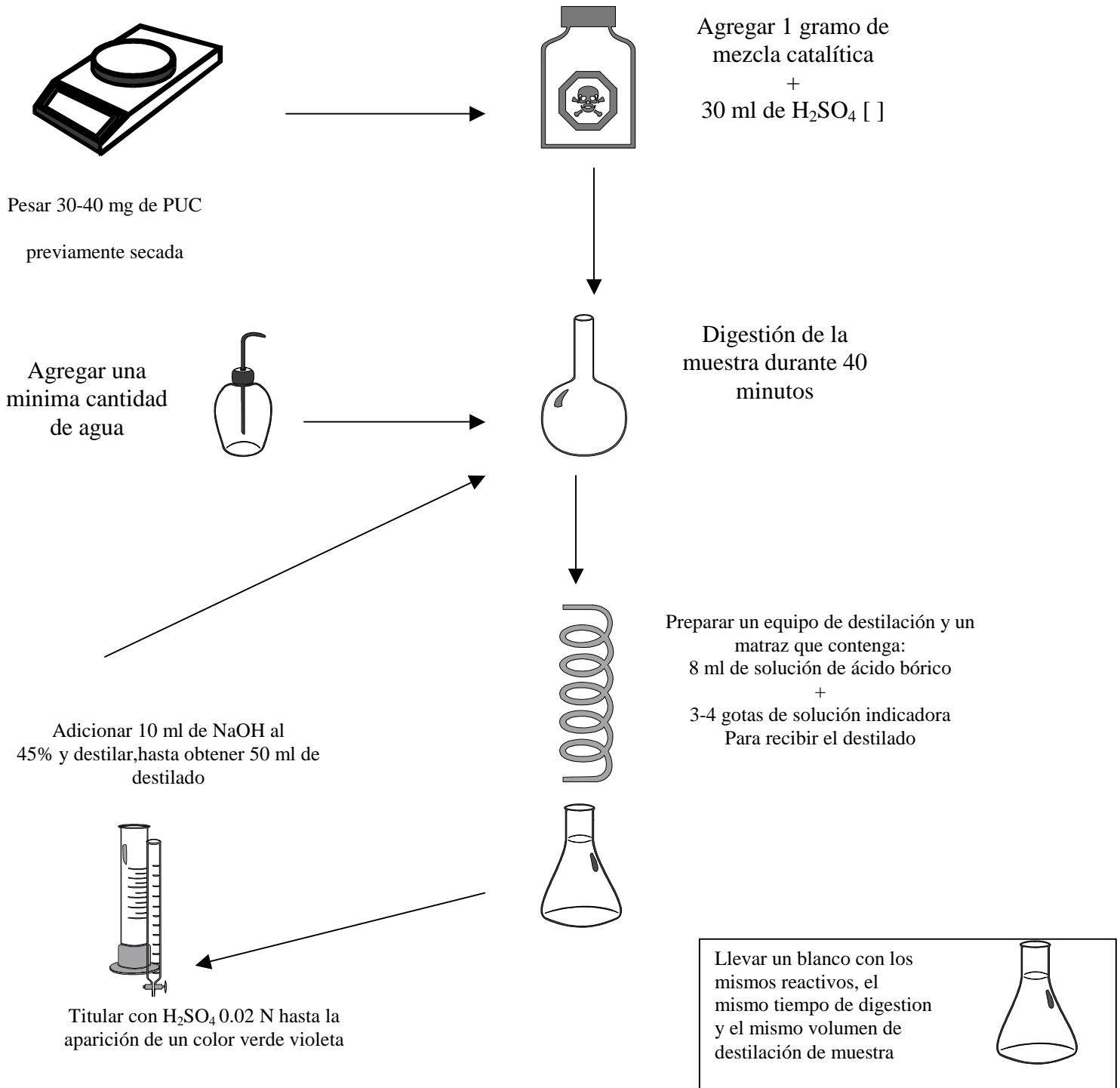
ANEXO 5

DETERMINACION DE AZUCARES POR EL METODO DE FENOL-SULFURICO



ANEXO 6

DETERMINACION DE NITROGENO Y PROTEINA CRUDA



ANEXO 7

Material, equipo y reactivos

Material y equipo

- 3 Matraces de 250 mililitros
- 1 Autoclave
- 1 Incubadora
- 1 Microscopio
- Portaobjetos
- 1 Bioreactor
- 20 Pipetas volumétricas de 25 mililitros
- 1 Refrigeradora
- 1 Fuente de oxígeno para peceras
- 10 Porciones de papel filtro
- 10 Embudos de vidrio
- 10 Vasos de precipitado de 100 mililitros
- 10 Vidrios de reloj
- 1 Desecador
- 2 Balanzas analíticas
- 25 Tubos con tapón de rosca
- 1 Centrifugadora

10 Vasos de precipitado de 50 mililitros

12 Pipetas volumétricas de 5 mililitros

5 Pipetas mohr de 1 mililitro

2 Pipetas mohr de 5 mililitros

1 Espectrofotómetro (Spectronic)

1 Espátula

1 Balón volumétrico de 100 mililitros

5 Matraces de 1000 mililitros

3 Pipeteadoras

3.2 Reactivos:

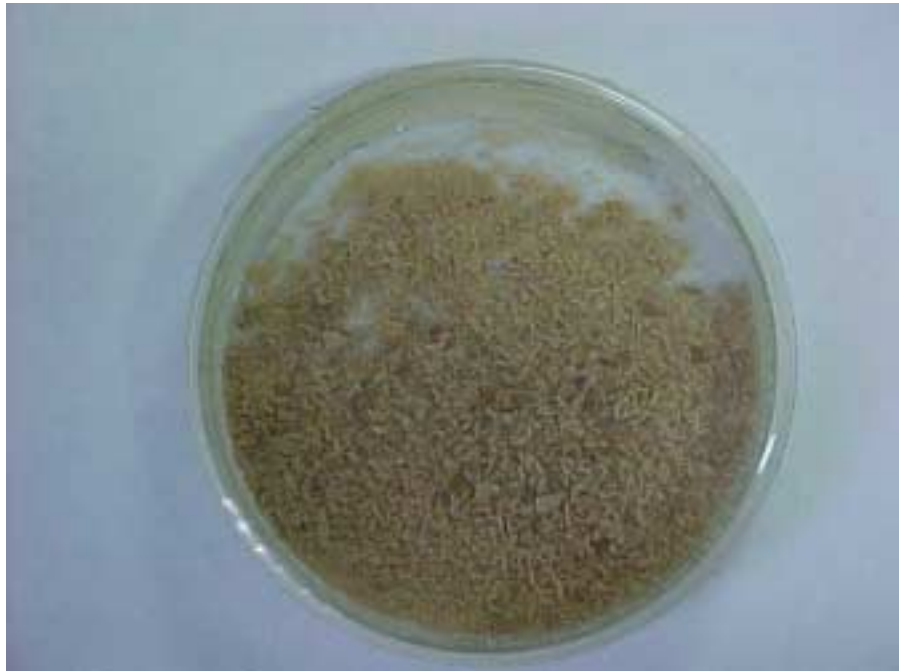
Medios de Cultivo:

Agar Sabouraud

Agua de cocimiento de maíz

ANEXO 9

PROTEINA UNICELULAR OBTENIDA



Proteína Unicelular obtenida durante el Proceso de Producción de Proteína Unicelular