

31

2 E/11



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**DESARROLLO DE LEVADURAS DEL AGUAMIEL
Y PULQUE EN DIFERENTES SUSTRATOS
ORGANICOS DE DESECHO**



EXAMENADO Y APROBADO
EN LA FACULTAD DE QUIMICA

TESIS MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N :

JOSE EMANUEL ENRIQUEZ FREIRE
MARIA DE LA LUZ GONZALEZ MARQUEZ
LORENA EULALIA URBINA SANCHEZ

Mexico, D. F.

1985



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

CAPITULO I.-	<u>INTRODUCCION</u>	1
CAPITULO II.-	<u>OBJETIVOS</u>	4
CAPITULO III.-	<u>GENERALIDADES</u>	5
	1. AGUAMIEL Y PULQUE	5
	1.1. Definición y características	5
	1.2. Pasos en la producción tradicional del pulque	6
	1.3. Microbiología	6
	1.4. Composición Química	7
	1.5. Importancia Económica y Social del Consumo del Pulque	8
	1.6. Usos del Aguamiel	9
	2. CLASIFICACION Y CARACTERISTICAS DE LAS LEVADURAS	9
	2.1. Clasificación	9
	2.2. Características Estructurales	18
	2.3. Características Morfológicas	33
	2.4. Características Reproductivas	36
	2.5. Requerimientos Nutricionales	44
	2.6. Características Metabólicas	48

3.	LA PROTEINA MICROBIANA	81
3.1.	Definición y Aspectos Generales	81
3.2.	Importancia de la Proteína de Origen Microbiano	91
3.3.	Métodos para la reducción del contenido de Acidos nucleicos en la Proteína Mi- crobiana	102
3.4.	Fuentes de Carbono y Energía utilizadas en su producción	104
CAPITULO IV.- <u>MATERIAL Y METODOS</u>		
4.1.	Material	111
4.2.	Equipo	111
4.3.	Medios de Cultivo	112
4.4.	Métodos	120
4.5.	Diagrama de trabajo	130
CAPITULO V.- <u>RESULTADOS</u>		
CAPITULO VI.- <u>DISCUSION DE LOS RESULTADOS</u>		
CAPITULO VII.- <u>RESUMEN Y CONCLUSIONES</u>		
CAPITULO VIII.- <u>BIBLIOGRAFIA</u>		

CAPITULO I.- Introducción

La crítica escasez de proteínas que existe, y que está prevista - mundialmente para el futuro, ha creado la necesidad en muchos lugares de actuar con urgencia para ampliar el suministro de proteínas destinadas a la alimentación del hombre y los animales; también ha estimulado las investigaciones y la aplicación de sus resultados - a la agricultura y la industria de muchos países, con objeto de satisfacer tal necesidad (37).

Lo peor del problema de la alimentación del mundo es la escasez -- de proteínas. Ya en 1838, un químico holandés, Mulder, describió a estas sustancias como el material orgánico conocido más importante. "Sin él", escribió Mulder, "la vida no parece posible es nuestro planeta... por conducto de estos materiales es que se producen los principales fenómenos de la vida". Aunque estas palabras eran quizás un poco exageradas, hoy sabemos que el cuerpo humano es, en realidad, una inmensa acumulación de proteínas.

Es conocido que un déficit de proteínas, o la ingestión de una dieta con baja calidad proteica, conlleva a un estado de malnutrición que afecta la salud del ser humano principalmente a los niños, en los cuales se han detectado trastornos en su desarrollo físico y - en ocasiones mental, así como una escasa resistencia a enfermedades o infecciones (34, 35, 36).

Graves complicaciones durante el embarazo, en el parto y después - del parto pueden estar motivadas por aberraciones en la nutrición de las mujeres durante la gestación. La falta de proteínas en los últimos meses de gestación de una mujer, y en los seis primeros meses de vida de un niño, pueden producirle a éste daños cerebrales irreversibles (42). Esta situación así como una elevada tasa de mortalidad infantil, los cuadros clínicos de Kwashiorkor, y el marasmo causados por la malnutrición, prevalecen en los países subdesarrollados sobretodo en los que tienen una gran población (37).

Se ha estimado que en los países en desarrollo actualmente hay - 1500 millones de individuos que no tienen un régimen de alimentación adecuado y 300 a 500 millones ni siquiera tienen alimentos su ficientes (36). Desde hace algunas décadas, se trabaja en la obtención de diferentes alimentos protéicos a partir de fuentes no - convencionales, con fines nutricionales, principalmente a base de concentrados protéicos de soya, semilla de algodón y harina de pescado (5, 11, 93).

Dentro de las fuentes no convencionales, las más prometedoras actualmente, son aquellas que derivan de la proteína unicelular, y - por ello han merecido un especial interés de parte de institucio- nes mundiales dedicadas a la investigación en este campo, y cuyos logros parecen ser promisorios. En el estado actual de las inves- tigaciones, los problemas técnicos a resolver son: disminuir el al to contenido de ácidos nucleicos, quitar el sabor desagradable de

algunos productos, mejorar el contenido de aminoácidos esenciales y aumentar la asimilación de los productos, problemas a los cuales se han avocado un número cada vez mayor de investigadores, con la finalidad de que a futuro, si no constituye la panacea al problema alimentario mundial, si constituya un paso importante para el mejoramiento de la nutrición a nivel mundial.

CAPITULO II.- Objetivos

- 2.1. Aislar e identificar a partir de muestras de aguamiel y pulque, las levaduras: Pichia membranaefaciens (Hansen), Saccharomyces cerevisiae (Hansen), Candida parapsilosis (Ashford, Langeron et Talice) y Candida valida.

- 2.2. Conocer la concentración de nutrientes esenciales y los parámetros adecuados para el óptimo desarrollo de las levaduras aisladas.

- 2.3. Lograr el desarrollo masivo de las levaduras aisladas en medios de cultivo no convencionales.

- 2.4. Determinar si existe alguna correlación entre la composición química de una levadura y el sustrato utilizado para su desarrollo.

CAPITULO III.- Generalidades

1. ASPECTOS GENERALES SOBRE EL AGUAMIEL Y EL PULQUE.

1.1. DEFINICION Y CARACTERISTICAS DEL AGUAMIEL Y PULQUE.

El pulque, (ocotli o huitztle) del náhuatl poliuhqui (echado a perder); es la bebida nacional de México obtenida por fermentación espontánea del "aguamiel", savia dulce de varias especies de "magueyes pulqueros", principalmente Agave atrovirens Karw y Agave americana (31, 45, 90).

El aguamiel de los magueyes mansos (Agave atrovirens Karw) - es un líquido azucarado, incoloro, ligeramente ácido, límpido y transparente; posee un olor herbáceo especial y un sabor dulce agradable, aunque irritante para las mucosas. Los aguamieles de otros magueyes son opalinos o más o menos amarillentos, algunas veces blanquecinos y mucilaginosos, el sabor dulce disminuye y en las clases inferiores se vuelve casi insípido (80).

El pulque obtenido por fermentación controlada técnicamente y distribuido bajo las marcas: Miel-Mex, Xóchitl, Jícara, Malinche y Magueyín, es una bebida alcohólica blanca, viscosa, ácida y con una gradación alcohólica menor de 6°GL (90).

Por definición oficial, su lectura en el refractómetro es de 25 a 30 (a 20°C) y su índice de refracción es de 1.3365 a 1.338. Otras características adicionales incluyen: pH 3.5 a

4.0, alcohol 4 a 6% v/v, acidez total (como ácido láctico)- 0.4 a 0.7g%, acidez fija (como ácido láctico) 0.2 a 0.4g% y azúcares reductores totales 0.2 a 0.5g% (86, 87).

1.2. PASOS EN LA PRODUCCION TRADICIONAL DEL PULQUE.- El sustrato para la elaboración del pulque es el jugo de agave, denominado aguamiel o tlachique, el cual es extraído de las plantas maduras (8 a 10 años de edad), después de haber practicado - el corte del órgano floral (orimordio), en una operación descrita como "castración" del bohordo floral.

El jugo se acumula gradualmente en una cavidad (cajete) de donde es removido diariamente por succión oral por medio de una calabaza seca o acocote, para después transportarlo a los tinacales o contenedores abiertos en donde se lleva a cabo la fermentación, adicionándole la "semilla" la cual es un inóculo natural no controlado, proveniente de una fermentación previa.

La fermentación dura de 8 a 30 días, dependiendo de la temperatura, cambios estacionales y otros factores no controlados (88, 90).

1.3. MICROBIOLOGIA DEL AGUAMIEL Y DEL PULQUE.- En el aguamiel y el pulque se encuentran dos clases de microorganismos: bacterias y levaduras, variando la proporción de las mismas en el aguamiel y el pulque, siendo mayor la cantidad de levadu-

ras en el pulque que en el aguamiel; donde se tienen cuentas del orden de 0.8×10^9 a 1.5×10^9 bacterias/ml y 3×10^9 a 6×10^9 levaduras/ml (80).

En la tabla 1.3 se enlistan los microorganismos aislados del pulque, según Herrera y Ulloa.

TABLA 1.3. MICROORGANISMOS AISLADOS DEL PULQUE (45).

MICROORGANISMOS	REFERENCIA
1. BACTERIAS	
<u>Acetobacter aceti</u>	(Pasteur) Beijerinck
<u>Bacillus teres</u>	(Neide)
<u>Lactobacillus bucheri</u>	(Hennenberg) Bergey et al.
<u>Leuconostoc dextranicum</u>	(Beijerinck) Hucker y Pederson
<u>Leuconostoc mesenteroides</u>	(Tsenkovskii) van Tiegem
<u>Micrococcus candidus</u>	Cohn
<u>Micrococcus luteus</u>	(Schroeter) Cohn
<u>Micrococcus roseus</u>	Fluegge
<u>Sarcina flava</u>	de Bary
<u>Zymomonas mobilis</u>	(Lindner) Kluyver y van Niel
<u>Lactobacillus plantarum</u>	Sánchez-Marroquín y Hope
<u>Lactobacillus brevis</u>	Sánchez-Marroquín y Hope
2. LEVADURAS	
<u>Candida parapsilosis</u>	(Ashford) Langeron y Talice
<u>Rhodotorula incarnata</u>	Ruiz-Oronoz
<u>Torulopsis aquamellis</u> (a)	Ruiz-Oronoz
<u>Pichia membranaefaciens</u>	(Hansen)
<u>Saccharomyces cerevisiae</u> (b)	(Hansen)
<u>Kloeckera apiculata</u> (c)	(Rees emend. Kloecker) Janke

(a) Inicialmente clasificada como Pichia barraganii Ruiz-Oronoz (82)

(b) Inicialmente clasificada como Saccharomyces carbajali Ruiz-Oronoz (81, 87).

(c) Inicialmente clasificada y aislada por Herrera y Ulloa como Kloeckera corticis var pulquensis (44, 102).

1.4. COMPOSICION QUIMICA DEL AGUAMIEL Y EL PULQUE.- Los únicos da-

tos químicos del aguamiel y del pulque son aquellos reportados por Cravioto y colaboradores, Massieu y colaboradores y Sánchez-Marroquín y se muestran en la tabla 1.4 (40, 86, 87).

TABLA 1.4. COMPOSICION QUIMICA DEL AGUAMIEL Y DEL PULQUE.

BEBIDA	HUME- DAD g%	CENI- ZAS g%	PRO- TEINA g%	CAL- CIO mg%	P mg%	Fe mg%	TIA- MINA mg%	RTBO- FLAVI NA mg%	NIA- CINA mg%	VIT. C mg%
PULQUE	97	0.2	0.44	10	10	0.7	0.02	0.02	0.3	6.2
AGUAMIEL	94	0.4	0.3	20	9	---	0.02	0.03	0.4	6.7
CERVEZA	94.5	0.14	0.29	11	33	0.58	0.01	0.03	0.79	---
PULQUE ENVASADO	95	0.35	0.5	--	--	---	0.03	0.035	0.63	---

1.5. IMPORTANCIA ECONOMICA Y SOCIAL DEL CONSUMO DEL PULQUE.- En la época prehispánica el pulque tenía un significado religioso, ya que constituía una ofrenda a los dioses, particularmente Mayahuel, la divinidad azteca del pulque. Después del colapso del imperio azteca, la bebida perdió su predominancia en los rituales religiosos, aunque su consumo permanecía en el gusto popular.

Actualmente el consumo del pulque en la Ciudad de México es de 1×10^6 litros/día, observándose un patrón de consumo característico; ya que, el mayor consumo corresponde a las clases de menor ingreso, y un consumo esporádico en la clase media (90).

Por tradición, se han atribuido propiedades medicinales al pulque, y su uso como tal es, entre otros, en casos de desór

denes gastrointestinales, anorexia, astenia, infecciones renales y disminución de la segregación de leche materna.

Según el Instituto Nacional de la Nutrición, los niños de familias pobres, reciben pulque tres veces al día el cual les provee del 2.2 al 12.4% de sus calorías y del 0.6 al 3.2% de sus requerimientos protéicos diarios (51).

1.6. USOS DEL AGUAMIEL.- Además de servir de medio de fermentación para la elaboración del pulque, el aguamiel tiene entre otros usos los siguientes:

- a). Obtención de levadura: alimenticia, forrajera, medicinal y seca viable para la panificación.
- b). Producción de dextrana: usos industriales y clínicos.
- c). Obtención de otros productos: ácidos láctico y cítrico, concentrados de vitaminas y aminoácidos, enzimas y concentrados de aguamiel para industrias de la alimentación (89).

2. CLASIFICACION Y CARACTERISTICAS DE LAS LEVADURAS

2.1. CLASIFICACION.- La taxonomía de las levaduras comprende una nomenclatura de aproximadamente 350 especies. Para asignarle un nombre apropiado a estos organismos, es necesaria la existencia de un sistema de clasificación bien definido con el cual puedan ser bien agrupadas; sin embargo, transcurrieron muchos años antes de que se lograra establecer este sistema

en una forma adecuada.

2.1.1. DATOS HISTORICOS.- Fue en el año de 1680 cuando Antonio van Leeuwenhoeck observó y describió por vez primera la existencia de seres vivos microscópicos a los que les dió el nombre de "animálculos" y a los que, mas tarde, se les reconocería como bacterias, hongos, levaduras y protozoarios. A partir de este descubrimiento y con el perfeccionamiento del microscopio compuesto, un gran número de investigadores realizan estudios sobre las características morfológicas y de reproducción de las levaduras (tabla 2.1) mientras tanto, se les agrupa mediante una clasificación artificial que surge como una rama de la micología. Es hasta el año de 1896 cuando Hansen publica el primer Sistema Científico de Clasificación de levaduras basado en los trabajos de Linneaus sobre taxonomía vegetal y animal; esta clasificación no definía totalmente las bases sobre las cuales estaba elaborada y es por esto que, durante varios años, Lodder y otros investigadores se dedican a continuar los estudios sobre las bases adecuadas de clasificación, hasta lograr, en 1952, darle un orden y una unidad al Sistema de Clasificación Científica. Por otro lado, Wickerham estudia y propone nuevas técnicas para la caracterización y en base a esto, en 1970, Lodder, Kreger van Rij y otros investigadores actualizan el sistema (25, 77).

TABLA 2.1. Algunos eventos en la historia de las levaduras.

PERIODO DE LA PRE-CIENCIA	
1590	Janssen perfecciona el microscopio compuesto
1680	Van Leeuwenhoek observa y describe a las levaduras
1753	Linneaus propone una nomenclatura binomial y aplica el Sistema a plantas y animales
EPOCA DEL SURGIMIENTO DE LA ZIMOLOGÍA Y LA MICROBIOLOGÍA	
1822	Persoon y Fries consideran a las levaduras como hongos
1825	Schwann y colaboradores observan la generación de las levaduras
1857	Pasteur prueba el origen microbiano de la fermentación y explica su naturaleza anaeróbica
1866	de Bary observa el ciclo de vida de las levaduras
1870	Rees observa las ascosporas de levaduras y su germinación
1881	Hansen inicia el estudio de cultivos puros de levaduras
1896	Hansen publica un Sistema Científico de Clasificación de levaduras
EPOCA MODERNA	
1920	Guillermond amplía el método de Hansen de clasificación
1952	Stelling, Dekker, Lodder, Didens y otros investigadores dan unidad y orden a la taxonomía de las levaduras
1956	Winge y Satava descubren la alternancia de fases de las levaduras. Wickerham avanza en la caracterización de las levaduras con nuevas técnicas
1970	Lodder, Kreger van Pij y un grupo internacional de investigadores actualizan la clasificación de levaduras

2.1.2. BASES DE LA CLASIFICACION.- Para facilitar el reconocimiento de un determinado organismo, existen tres códigos de nomenclatura: el vegetal, el animal y el bacteriano; las levaduras, caen dentro del código botánico más que dentro del bacteriano y para darles un nombre específico deben cumplirse los requerimientos que el código impone: los dos más importantes son: 1. Que el nombre dado consista de dos componentes, uno que representa el nombre del género y otro que es el epíteto específico o nombre de la especie y 2. Que el nombre dado vaya siempre acompañado de una descripción completa del organismo Para clasificar a una levadura, es decir, para asignarle un género y una especie, se utilizan diferentes características que son típicas en cada organismo; entre estas características se encuentran las siguientes:

2.1.2.1. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.- Entre estas se consideran:

- a. Forma de las células
- b. Tamaño de las células
- c. Aspecto de las colonias en medios sólidos
- d. Formación de pseudomicelio
- e. Forma de reproducción sexual
- f. Forma de reproducción asexual

2.1.2.2. CARACTERISTICAS FISIOLOGICAS.- Las principales características fisiológicas que deben tomarse en cuenta son: (25, 39, 74)

- a.- Aspectos de los cultivos en medios líquidos
 - b.- Asimilación de los compuestos de Carbono
 - c.- Asimilación de compuestos de Nitrógeno
- Otras características fisiológicas que se consideran de valor secundario son (25,77):
- d.- Presencia de compuestos carotenoides
 - e.- Degradación de arbutina y otros β -glucósidos
 - f.- Producción de ácidos
 - g.- Requerimientos vitamínicos
 - h.- Degradación de grasas
 - i.- Actividad de la ureasa

2.1.2.3. CARACTERÍSTICAS EVOLUTIVAS.- Aquí se consideran las características naturales de los organismos y sus procesos de evolución, entre las que se encuentran (18,74):

- a.- Asociación con diferentes organismos superiores
- b.- Diferencias estructurales de la pared celular
- c.- Diferencias estructurales de las enzimas respiratorias

2.1.2.4. CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA NUCLEAR.- Se consideran (74,77):

- a.- Estudio detallado de la reproducción sexual
- b.- Composición básica del DNA (Guanina + Citosina)
- c.- Hibridizaciones de ácidos nucleicos

En la mayoría de los casos es suficiente con la aplicación de los dos primeros puntos; sin embargo, en ocasio-

nes se hace necesaria la utilización del resto de ellos aunque son considerados como de valor secundario.

En la determinación de cada una de las características - se han empleado una gran cantidad de técnicas entre las que se encuentran: los métodos de análisis numérico del DNA (18, 19), los métodos de Resonancia magnéticas de -- Protones (19, 74) y las pruebas serológicas (19, 77); -- sin embargo, estas técnicas tienen validez limitada debido a la variabilidad de sus resultados.

2.1.3. SISTEMAS DE CLASIFICACION.- El primer sistema de clasificación de levaduras que fue aceptado universalmente es el de Lodder (1952) que está basado principalmente en - las características morfológicas y fisiológicas de las levaduras; las primeras dan lugar a los grandes taxones (clases, órdenes, familias y géneros) y las últimas son utilizadas para determinar la especie.

En este sistema, las levaduras se incluyen dentro del - grupo de las talofitas y se encuentran divididas en tres familias:

A. Familia ENDOMYCETACEAE: Perteneciente a la clase de - los ascomicetos y se caracteriza por la producción de esporas endógenas llamadas ascosporas dentro de una célula portadora llamada asca.

B. Familia SPOROBOLOMYCETACEAE: perteneciente a la clase de los Basidiomicetos y se caracteriza por la producción de esporas exógenas sobre pedúnculos llamados esterigmas.

C. Familia CRYPTOCOCCACEAE: perteneciente al orden Cryptococcales y a la clase de los Deuteromicetos y se caracteriza por la falta de esporas en su ciclo de vida.

En este sistema se incluyen 29 géneros, algunos de ellos no están considerados como levaduras propiamente dichas sino que, solamente tienen semejanza con ellas (25, 39, 77).

El sistema de clasificación actualizado, propuesto por Lodder en 1970, considera a las levaduras divididas en 4 grupos principales que comprenden 39 géneros representantes de 349 especies (Tabla 2.2) y actualmente se considera un incremento de 185 especies aceptadas y más de 10 géneros nuevos a partir de su publicación (74, 77).

2.1.4. APLICACIONES DEL SISTEMA DE CLASIFICACION.- Una vez que se han realizado toda una serie de pruebas que determinan las características de las levaduras con las que se está trabajando, se les debe agrupar dentro de los taxones correspondientes de acuerdo a los resultados de las pruebas de sus características morfológicas y dentro de una especie determinada por los resultados de sus características fisiológicas.

En la literatura profesional, los nombres de las levaduras pueden ser seguidos por el nombre del investigador responsable de la descripción original del organismo y además también puede ser agregado el año de la publicación; por ejemplo: Schizosaccharomyces octosporus Beijer-

rink 1894. Ocasionalmente, una levadura puede ser transferida a un género diferente del que inicialmente se le había dado debido a que ocurren nuevos conocimientos que justifican tal decisión; si esto sucede, el nombre del género cambia y el de la especie se conserva a menos que el nuevo género ya contenga una especie con el mismo epíteto específico.

Algunas levaduras presentan reproducción de tipo sexual y asexual a la vez; en estos casos, ambos tipos de levaduras presentan las mismas características morfológicas y fisiológicas, por lo que solamente, se consideran las últimas como una variedad de las primeras: sin embargo, en la clasificación se les dan nombres diferentes y se hace la aclaración respectiva sobre sus especies equivalentes (Tabla 2.3).

TABLA 2.2. Clasificación de las levaduras (Lodder, 1970) (74)

REINO		VEGETAL	
DIVISION		EUMYCOTA	
SUBDIVISION	ASCOMYCOTINA	BASIDIOMYCOTINA	DEUTEROMYCOTINA
CLASE	HEMIASCOMYCETES	TELIOMYCETES	DEUTEROMYCETES
ORDEN	ENDOMYCETALES		MONILIALES
FAMILIA	ENDOMYCETACEAE		SPOROBOLOMYCETACEAE
GENEROS	EREMASCUS*	LEUCOSPORIDIUM	SPOROBOLOMYCES
	ENDOMYCES*	PHODOSPORIDIUM	BULLERA
		FILOBASIDIUM	
		FILOBASIDIELLA	
FAMILIA	SACCHAROMYCETACEAE		CRYPTOCOCCACEAE
SUBFAMILIA B	SACCHAROMYCETOIDEAE		
GENEROS	DEKKERA		CRYPTOCOCCUS
	SACCHAROMYCOPSIS		RHODOTORULA
	ARTHROASCUS		PHAFFIA
	SACCHAROMYCES		PITYROSPORUM
	KLUYVEROMYCES		KLOECKERA
	SCHWANNIOMYCES		TRIGONOPSIS
	DEBARYOMYCES		BRETTANOMYCES

	PICHIA	TORULOPSIS
	HANSENULA	CANDIDA
	LODDEROMYCES	TRICHOSPORON
	WICKERHAMIELLA	STERIGMATOMYCES
	WINGEA	SYMPODIOMYCES
	PACHISOLEN	SCHIZOBLASTOSPORION
SUBFAMILIA A	SCHIZOSACCHAROMYCETOIDEAE	
GENEROS	SCHIZOSACCHAROMYCES	
SUBFAMILIA C	NADSONIOIDEAE	
GENEROS	NADSONIA	
	HANSENIASPORA	
	SACCHAROMYCODES	
	WICKERHAMIA	
SUBFAMILIA D	LIPOMYCETOIDEAE	
GENEROS	LIPOMYCES	
FAMILIA	SPERMOPHTHORACEAE	
GENEROS	NEMATOSPORA	
	COCCIDIASCUS	
	METSCHNIKOWIA	
	ASHBIA*	
	EREMOTHECIUM*	

* No comprenden levaduras propiamente dichas

TABLA 2.3. Algunas levaduras ascosporógenas y sus especies asexuales equivalentes (77).

LEVADURAS ASCOSPOROGENAS	ESPECIES ASEXUALES
<u>Saccharomyces exiguus</u>	<u>Torulopsis bolmil</u>
<u>Saccharomyces telluris</u>	<u>Torulopsis bovina</u>
<u>Pichia kudriavzevii</u>	<u>Candida kruzei</u>
<u>Pichia membranaefaciens</u>	<u>Candida valida</u>
<u>Pichia fermentans</u>	<u>Candida lambica</u>
<u>Kluyveromyces fragilis</u>	<u>Candida pseudotropicalis</u>
<u>Dekkera bruxelensis</u>	<u>Brettanomyces bruxelensis</u>
<u>Debaryomyces bansenii</u>	<u>Torulopsis candida</u>
<u>Hansenula capsulata</u>	<u>Torulopsis molischiana</u>
<u>Hanseniaspora valbyensis</u>	<u>Kloeckera apiculata</u>
<u>Endomycopsis lipolytica</u>	<u>Candida lipolytica</u>

2.2. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE LAS LEVADURAS.- Para definir la estructura de una célula de levadura y para determinar su función y organización, actualmente se han expandido un gran número de técnicas entre las que se encuentran: Microscopía Electrónica, Microscopía de Contraste de fases, Microscopía de fluorescencia, Cromatografía, Serología de Inmunofluorescencia, Lisis de Paredes Celulares y Aislamiento de Ultraestructuras Citoplásmicas, entre otras.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la aplicación de estas técnicas, se ha determinado que, la capacidad biológica de una célula de levadura, reside en un singular cuerpo vegetativo en donde, una pared celular o anillo semi-rígido encierra el contenido protoplásmico que a su vez, se encuentra protegido por una membrana plasmática. Existe, además, un fluido, la matriz citoplásmica, en donde se encuentran incluidos un núcleo, mitocondrias, vacuolas cuerpos refráctiles, gránulos de polifosfatos, gránulos de lípidos, ribosomas, otras estructuras menores y biorrículas. La descripción de cada una de las estructuras mencionadas se da a continuación.

2.2.1. PARED CELULAR.- La pared celular es una estructura semejante a un tegumento que, generalmente, se encuentra en desarrollo activo, logrando un diámetro aproximado de 150 nm. Ocupa del 6 al 27% del peso seco de la célula y éste porcentaje se incrementa cuando se pasa de la fase logarítmica

ca a la estacionaria.

Esta estructura es una organización compleja de enzimas, - es también el locus de la reproducción vegetativa y además, funciona como un filtro que pasa micromoléculas, de peso molecular abajo de 4500, hasta los sitios de absorción (77).

Al microscopio electrónico, muestra una masa densa de microfibrillas o masa fibrilar (63, 72), una cicatriz de nacimiento y numerosas cicatrices de brotes (17, 60).

La composición química promedio de la pared celular de las levaduras se encuentra resumida en la tabla 2.4. Entre los componentes de la pared celular que se han caracterizado, se encuentran:

2.2.1.1. CARBOHIDRATOS.- Son tres los principales carbohidratos -- presentes en las levaduras: glucanas, mananas y quitina a. GLUCANAS: También llamadas "Celulosa de levaduras", - las glucanas forman parte del total de carbohidratos presentes en la pared celular de las levaduras; ocupan aproximadamente del 30 al 35% de los sólidos de esta estructura.

Las glucanas, presentes en la capa interna de la estructura, le imparten rigidez pero conservando cierta elasticidad.

Son dos los polisacáridos de glucosa que se agrupan bajo el nombre genérico de glucanas de levaduras; el primero,

considerado como el principal, consiste de unidades lineales de glucosa con enlaces $\beta(1,3)$ y con algunas ramificaciones unidas mediante enlaces $\beta(1,6)$, misma que forma una capa fibrilar interna que está recubierta por el segundo polisacárido componente cuya estructura está formada por unidades lineales de glucosa con predominio de enlaces $\beta(1,6)$ y con cadenas laterales unidas por enlaces $\beta(1,3)$

Ambas estructuras están reopresentadas en la figura 2.1 - (17, 63).

TABLA 2.4. Composición química aproximada de la pared celular de las levaduras.

COMPUESTO	% EN PESO SECO
CARBOHIDRATOS	83.00
PROTEINAS	10.00
LIPIDOS	3.00
ESTEROLES	0.45
RNA	0.30
DNA	0.04

b. MANANAS: Las mananas, otro componente del total de carbohidratos de la pared celular de las levaduras, también conocidas como "Goma de levaduras" ocupan aproximadamente el 30% del peso seco de la estructura.

Muchos investigadores se han dedicado al estudio de este componente ya que además de formar parte de la estructura de la pared celular, se ha encontrado que es el componen

te inmunodominante de las células de levaduras. Cuando se utilizan células intactas de levaduras con sus antisueros específicos, estas dan reacciones positivas de aglutinación y precipitación; cuando se extraen las mananas de la pared y se hacen reaccionar con los mismos antisueros, dan las mismas reacciones que las células intactas, de esta manera se deduce que son las mananas -- las responsables de la actividad antigénica de las levaduras (17, 19).

Las mananas tienen dos tipos de funciones: una estructural (y responsable de la actividad antigénica) y otra - de otro tipo (ver más adelante). Las mananas estructurales se encuentran, principalmente, en la superficie - externa de la pared aunque es probable que se encuentren junto con las glucanas, inmersas en las capas intermedias de esta estructura (13, 17, 73)

La estructura química de las mananas varía según la especie de levaduras, pero en general, se puede decir que son polisacáridos de manosa que contienen N-acetilglucosamina y cantidades variables de fosfatos. Una parte - de la manosa es un polisacárido largo con enlaces $\alpha(1,6)$ y con algunas cadenas cortas laterales con enlaces - $\alpha(1,2)$ y $\alpha(1,3)$ (figura 2.2). Otra porción de la manosa es una cadena corta, probablemente de la misma estructura química de las cadenas cortas del polisacárido largo; esta cadena corta parece estar unida directamente -

a un péptido a través de enlaces glucosídicos a la serina y treonina (figura 2.2) (13, 17, 19, 73, 77).

c. QUITINA: Otro polisacárido que integra la pared celular de las levaduras es la quitina; ocupa aproximadamente el 1% del peso seco total de esta estructura (77).

La quitina se encuentra localizada exclusivamente en las cicatrices de brote y áreas adyacentes. Su estructura química corresponde a la de un polisacárido lineal de moléculas de N-acetilglucosamina unidas entre sí por enlaces $\alpha(1,4)$ glucosídicos (figura 2.3). La síntesis de quitina durante la gemación se lleva a cabo mediante la intervención de 3 factores: zimógeno de quitina sintetasa, factor activante y factor inhibidor del factor activante (16, 17, 73, 77).

Existen especies de levaduras que no presentan este polisacárido, estas corresponden a aquellas que se reproducen vegetativamente por fisión, particularmente Schizosaccharomyces octosporus; en estos organismos se ha comprobado que una de las estructuras que se forman al inicio de la fisión, desaparece al final y tal vez ésta sea la causa de que no se detecte la quitina (73, 77).

Las levaduras filamentosas, es decir, aquellas que son capaces de formar pseudomicelio, presentan mayor cantidad de quitina que aquellas que no lo forman; también se ha comprobado que aquellas que presentan deficiencia en el contenido de mananas, sintetizan una mayor cantidad de quitina que las células normales (13, 16, 17).

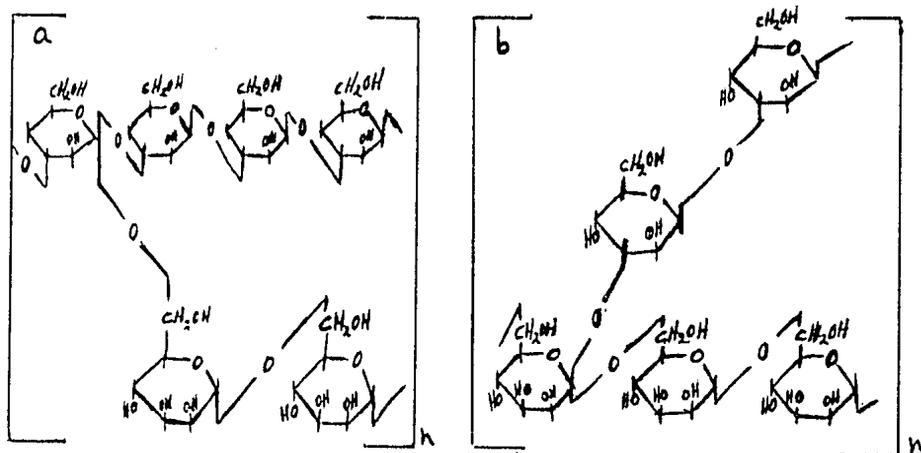


FIGURA 2.1 Estructura química de las glucanas de levaduras
a. componente principal b. componente secundario
(67, 73).

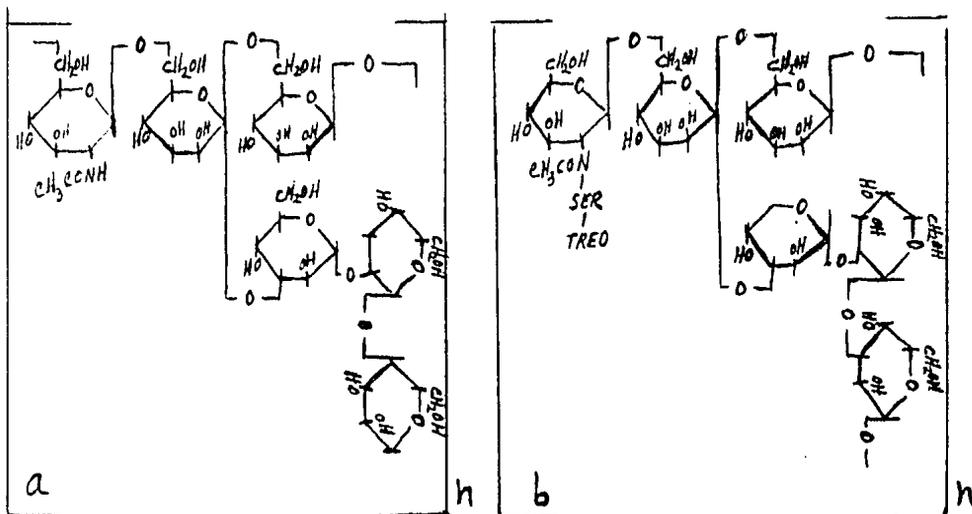


FIGURA 2.2. Estructura química de las mananas de levaduras
a. cadena larga b. cadena corta (73).

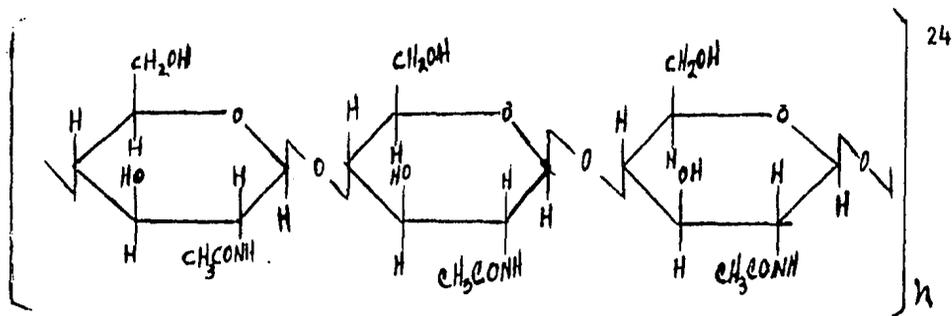


FIGURA 2.3. Estructura química de la quitina de las levaduras.

2.2.1.2. LIPIDOS: La cantidad de lípidos presentes en la pared celular de las levaduras, se ha determinado como del 3% del total de su peso seco; sin embargo, actualmente se sabe que esta proporción es variable para cada especie. Varios investigadores han realizado estudios sobre este tema y han encontrado que para S. cerevisiae, los lípidos se encuentran libres en un 8.5% y enlazados a fósforo en una cantidad muy pequeña. Utilizando técnicas de mayor resolución se observa que, los lípidos libres se incrementan hasta un 13.5% y los fosfolípidos hasta un 0.5%; a pesar de estos resultados, existen especies de *Saccharomyces* -- que solamente presentan 2% de lípidos libres (también algunas especies de *Candida*) y otras que presentan hasta -- 6.9% de fosfolípidos (73, 77).

El contenido de lípidos en la pared celular está relacionado directamente con la forma que presentan las células; de esta forma, las células elípticas presentan menor contenido y las triangulares mayor contenido de lípidos. Los componentes lipídicos también determinan la tendencia, de algunas especies, para formar películas en medios líquidos (13, 17, 67, 73).

2.2.1.3. PROTEINAS: El valor promedio del contenido de proteínas de la pared celular de las levaduras, es del 10% (tabla 2.4); sin embargo, existen variaciones que dependen de la especie estudiada. Los valores promedio reportados son: 10% para levaduras floculantes; 7% para células de forma elipsoidal; 14.6% para células de forma triangular. El contenido de proteínas, también varía con la edad del cultivo (73).

Las proteínas de la pared celular de levaduras se caracterizan por su alto contenido de enlaces disulfuro y por la alta concentración de ácidos glutámico y aspártico; estas características, le confieren propiedades ácidas, variando con la concentración de oxígeno presente en el medio de crecimiento (77).

El análisis de estas proteínas revela que se encuentran formando parte de dos fracciones: a. un complejo de glucano-proteínas y b. un complejo de manano-proteínas. Se cree que tal vez existe una tercera fracción que corresponde a un complejo de glucomanano-proteínas pero, hasta la fecha su presencia se ha considerado incierta (17, 73).

2.2.2. ESPACIO PERIPLASMICO: El espacio libre localizado entre la pared celular y el plasmalema, es conocido como espacio periplásmico. Esta no es una estructura propiamente dicha; sin embargo, en este espacio libre se encuentran localizadas un gran número de enzimas enlazadas, probablemente, a través de enlaces disulfuro (17).

Algunas de estas enzimas, se encuentran enlazadas a polisacáridos, principalmente a mananas, pero no -- tienen función estructural sino que presentan actividad enzimática. La enzima que más se ha estudiado es la invertasa, pero se sabe que existen otras como la fosfatasa ácida.

La invertasa no se encuentra en forma libre, se encuentra englobada dentro de partículas llamadas vesículas y a través de ellas, es como la enzima puede ser transportada del interior al exterior de la célula. Dentro del espacio periplásmico también se han detectado otras partículas que transportan proteínas, diferentes de las enlazadas a mananas, cuya principal función es la síntesis de paredes celulares (17, 73, 77).

2.2.3. MEMBRANA PLASMÁTICA: Junto a la superficie interna de la pared celular y separada por el espacio periplásmico, está unida una capa que mide aproximadamente 9nm de espesor; esta capa es conocida como membrana plasmática, membrana citoplásmica o plasmalema (67, 74).

La función del plasmalema es regular el intercambio de nutrientes y metabolitos por mecanismos de permeabilidad selectiva.

La estructura química de esta estructura se ha definido a través de un modelo llamado "Modelo de mosaico fluido" (95) en el que se propone que la membra-

na plasmática está constituida por tres tipos de componentes: proteínas, lípidos y oligosacáridos.

2.2.3.1. PROTEINAS: Las proteínas de la membrana se encuentran divididas en dos categorías: las proteínas periféricas y las proteínas integrales; las primeras son aquellas que se encuentran en la parte externa de la membrana y no tienen función estructural propiamente dicha. Las proteínas integrales son las que en realidad intervienen en la estructura de la membrana; estas proteínas, presentan un alto contenido de estructuras de α -hélice pero, la mayor parte (60%) tienen estructura globular con los grupos hidrofóbicos embebidos en el interior y los hidrofílicos expuestos tanto en la superficie interna como la externa de la membrana.

2.2.3.2. LIPIDOS: Los lípidos que componen a la membrana plasmática son principalmente, ácidos grasos unidos a fósforo. Estos lípidos se encuentran formando una doble capa con los grupos hidrofílicos colindando con la superficie interna y externa de la membrana y los hidrofóbicos en el interior de la bicapa. Esta doble capa no es continua sino que presenta espacios, en donde probablemente, están inmersas las proteínas integrales. Existe una porción de lípidos que se encuentra fuertemente ligada a las proteínas (lipoproteínas) y otra porción que no presenta este enlazamiento; de igual forma,

existen proteínas que se encuentran unidas a oligosacáridos (glicoproteínas), pero no en su totalidad.

Con estos componentes, el Modelo de Mosaico Fluido, propone una bicapa de lípidos como parte fundamental de la estructura de la membrana, con espacios libres ocupados por proteínas globulares que forman protuberancias en la parte externa de la estructura. La capa interna, es decir, la matriz de la membrana, está formada principalmente por los grupos hidrofóbicos, tanto de los lípidos como de las proteínas y éstos le confieren a la membrana cierta elasticidad o fluidez, que es característica y esencial para el transporte de sustancias a uno y otro lado de la membrana. Si la matriz de la membrana estuviese formada exclusivamente por uno de los dos componentes, especialmente por las proteínas (Modelo del sandwich), esto ocasionaría una alta rigidez que impediría las reacciones de traslocación (94, 95).

2.2.4. NUCLEO: Dentro de la membrana plasmática, contenido en el citoplasma, se encuentra el núcleo: éste organelo, que está relacionado directamente con la división celular, es un cuerpo redondo con un diámetro aproximado de 0.5 a 1.5 μ m. En células de levaduras y en la mayoría de las células eucarióticas, el núcleo está formado por una membrana nuclear cuya composición química es similar a la de la membrana plasmática.

Dentro de la membrana nuclear, se encuentran contenidas

dos fracciones: a. una fracción densa a los electrones que corresponde al nucleolo y b. una fracción hialina - que corresponde al nucleoplasma; dentro de ésta última fracción, se encuentran algunos otros componentes: un gránulo pequeño y denso íntimamente relacionado con la división nuclear, comúnmente llamado fibra intranuclear y que en el momento de la división, dará lugar a una paca de duplicación en forma de huso con fibras o microtúbulos que alcanzan una longitud de hasta $5\mu\text{m}$ (63,78) además, en el nucleoplasma, también se observan gránulos o fibrillas que en conjunto, semejan gránulos, que corresponden a la cromatina, complejo de proteínas y ácidos nucleicos que está implicado en la reproducción (74,78). A pesar de la importancia de este organelo, no existe mucha información acerca de su constitución química y de su función.

2.2.5. MITOCONDRIAS: En las levaduras, las mitocondrias son cuerpos que están embebidos en el citoplasma y que presentan forma esférica o elipsoidal y que alcanzan un diámetro de 0.3 a $1\mu\text{m}$. Generalmente, las mitocondrias se encuentran distribuidas cerca del plasmalema y el número por células varía según la especie; de esta forma, hay especies que presentan solamente 4 y hay otras que pueden presentar hasta 24. La composición química de las mitocondrias no está bien definida, se sabe que contienen altas concentraciones de lípidos (25%) y fosfolípidos (12.8%) y que además, contienen bajas cantidades de ergosterol y DNA (56,77).

Parte de estos componentes se encuentran formando parte de la membrana mitocondrial, principalmente el ergosterol y los ácidos grasos insaturados; ambos componentes forman la membrana externa y la matriz de la mitocondria (56).

Las mitocondrias, además de encontrarse fuertemente relacionadas con la respiración celular, también llevan a cabo procesos de síntesis de proteínas a través de mecanismos que son independientes de la síntesis de proteínas en el citoplasma. La tabla 2.5 muestra algunas de las diferencias encontradas en el sistema sintetizador de proteínas de las mitocondrias con respecto al del citoplasma (12, 24, 47, 56, 91).

TABLA 2.5. Algunas diferencias encontradas en el sistema sintetizador de proteínas de la mitocondria y citoplasma.

MITOCONDRIA	CITOPLASMA
Resistente a cicloheximida	Resistente a cloranfenicol
Sensible a cloranfenicol	Sensible a cicloheximida
Semejante al de bacterias	Semejante al de organismos superiores
Presenta ribosomas 70 S	Presenta ribosomas 80 S
Necesita concentraciones bajas de iones magnesio	Necesita concentraciones altas de iones magnesio
Presenta 26 a 37% de G + C	Presenta 50 a 55% de G + C
No se sintetiza en la fase S	Se sintetiza en la fase S
La RNA polimerasa es resistente a amanitina	La RNA polimerasa es sensible a la amanitina

2.2.6. VACUOLAS: Dentro del citoplasma de las levaduras, se encuentran uno o más cuerpos esferoidales de medida varia

ble llamados vacuolas y que se caracterizan por su fuerte movimiento browniano.

Poco se conoce acerca de la estructura química de estos organelos; se sabe, que presentan una membrana cuya biosíntesis probablemente, se lleva a cabo en otras regiones de la célula y que su composición química es semejante a la de la membrana plasmática. Dentro de esta membrana se han encontrado diversas cantidades de gránulos de polifosfatos (volutina) con una cantidad total de fósforo de $39.2 \pm 6\%$ con respecto al 100% de fósforo total de la célula; además, presentan $6 \pm 1.8\%$ de orto-fosfato y $2.1 \pm 1.3\%$ de fósforo estable o ácido soluble.

Estos polifosfatos son sintetizados en el citoplasma y luego transferidos hasta la vacuola en donde quedan almacenados hasta que la célula activa los requiera. Además de estos componentes químicos, se han encontrado otros, principalmente proteínas con función enzimática en los procesos de síntesis y degradación de componentes celulares (48, 49, 50, 73).

2.2.7. VESICULAS.- En el área de superficie externa del plasma-
lema, en el espacio periplásmico, se encuentran numerosas vesículas o sacos pequeños con un diámetro aproximado de 15nm (67, 74).

Su composición química dominante son mananas y proteínas aunque presentan lipoproteínas y glicoproteínas en su membrana.

Estos organelos generalmente se encuentran acumulados en las regiones en donde se lleva a cabo la reproducción vegetativa y se sugiere, para ellos, una función de acarreadores de materiales al sitio de síntesis de nuevos componentes celulares (60).

Se cree que una vesícula puede formarse a partir de la fisión de una vacuola o bien, puede formarse por la fusión de dos o más vacuolas (74, 77).

2.2.8. MATRIZ. Además de los organelos y estructuras visibles al microscopio, que se encuentran insertados en el citoplasma, existe un fluido citoplásmico llamado "matriz" o "grandes sustancias citoplásmicas". Esta matriz comprende a los carbohidratos, ribosomas y enzimas encontradas en el citoplasma.

2.2.8.1. CARBOHIDRATOS: Son dos los carbohidratos que se encuentran formando parte de la matriz: el glucógeno y la tentalosa.

a. Glucógeno: Es el carbohidrato distribuido en mayor cantidad en el citoplasma y en el nucleoplasma de las levaduras.

Este componente es un polisacárido de alto peso molecular, ramificado, de residuos de D-glucopiranososa. Es sintetizado por las levaduras durante su desarrollo y acumulado como gránulos, en las células maduras, distribuidos en todo el citoplasma; estos gránulos pueden alcanzar diámetros hasta de 40 nm y son utilizados por la célula

durante su fase estacionaria (54, 74).

b. Tetralosa: Este carbohidrato es un disacárido no reducido de α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosido. Se le encuentra en forma libre, ocupando casi el 15% del peso seco de la célula. Parece estar localizado dentro de vacuolas o vesículas siempre unidas al plasmalema y se propone que su función es la de reserva de energía (54,74,77).

2.2.8.2. ENZIMAS. Otro de los componentes de la matriz citoplásmica, son las enzimas. Entre las que se han detectado en esta fracción se encuentran: la tetralasa, la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa, la alcohol deshidrogenasa y otras más, relacionadas con los procesos de fermentación (74,77).

2.2.8.3. RIBOSOMAS. A estas estructuras se les considera como componentes de la matriz citoplásmica; en las células de levaduras existen dos tipos de unidades ribosomales; unas, de tipo 70S, localizadas en las Mitocondrias y otras, de tipo 80S, localizadas en la matriz citoplásmica. Estas estructuras, de tipo 80S, ocurren abundantemente en el citoplasma como partículas diminutas de unidades ribosomales ricas en proteínas y RNA. Los dos tipos de estructuras están directamente relacionadas con la síntesis de proteínas tanto en la mitocondria como en el citoplasma (12, 56).

2.3. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LAS LEVADURAS. La conjugación de todas las estructuras mencionadas da lugar a la

formación de células de levaduras que exhiben formas características, determinadas principalmente, por la estructura de su pared celular. La forma que se presenta comunmente en la mayoría de las levaduras es la elipsooidal; sin embargo, pueden presentarse formas ovales, redondas, triangulares y en ocasiones pueden ser también filamentosas. Estas formas están determinadas también por las condiciones de desarrollo, por la forma de reproducción y por la edad del cultivo (67).

En cultivos jóvenes en medios líquidos, se observan mezclas de células vegetativas, translúcidas, inmóviles y aisladas; algunas veces, se pueden observar células con brotes, células hijas en desarrollo, a veces en pares, en cadenas cortas o en racimos de células (17,56).

La medida de células de levaduras, en cultivos activos, es de 4 a 8 μm de diámetro y de 5 a 16 μm de longitud pero éstas pueden variar dependiendo de la especie estudiada; en ocasiones se encuentran rangos de 2.5 a 10 μm de diámetro y de 4.5 a 21 μm de longitud; las especies de forma filamentosas pueden tener una longitud de hasta 30 μm (56, 77).

Conforme la edad del cultivo aumenta pueden presentarse células más grandes y elongadas; esto puede suceder también cuando se les cultiva en medios deficientes en nutrientes. Las células también pueden disminuir su tamaño, sobretodo cuando se les aumenta la concentración de oxígeno en el medio de desarrollo (74).

En medios sólidos y semisólidos, las levaduras se encuentran formando colonias que presentan el aspecto que les confiere la naturaleza e individualidad de las células aisladas. La forma de las colonias depende tanto de la especie como de las condiciones de desarrollo y de la edad del cultivo; pueden sufrir numerosos cambios en la textura, brillantez, diámetro y configuración cuando se altera algunos de los factores esenciales para su desarrollo; así, la disminución en la concentración de oxígeno da lugar a colonias con diámetro menor; la edad avanzada del cultivo o las resiembras sucesivas ocasionan un cambio en la textura de las colonias tornándolas rugosas (25, 74, 77).

2.4. CARACTERISTICAS REPRODUCTIVAS DE LAS LEVADURAS. La forma más común de reproducción de las levaduras es la mitosis proceso asexual que puede ocurrir a través de dos mecanismos: la gemación y la fisión. Otro proceso reproductivo más avanzado es la meiosis, forma de reproducción sexual que ocurre sólo en aquellas levaduras capaces de formar ascosporas. En base a la forma de reproducción de las levaduras, se han clasificado en dos formas: las ascosporógenas (que llevan a cabo la reproducción sexual) y las anascosporógenas (que se reproducen exclusivamente por la forma asexual). En la reproducción asexual, la progenie presenta características idénticas a las de los padres (excepto por mutaciones) y en la sexual, la

nogenie puede ser diferente a sus padres, ya que a través de este proceso, pueden ocurrir variaciones, evoluciones potenciales por mutación, hibridización y segregación (67, 77).

2.4.1. REPRODUCCION VEGETATIVA O ASEXUAL. La mayoría de las levaduras se reproducen vegetativamente por gemación, unos pocos géneros lo hacen por fisión y sólo 3 géneros lo hacen a la vez por ambos procesos.

2.4.1.1. GEMACION. Este proceso puede ocurrir en diferentes formas:

A. Monopolar: Esta forma es característica del género Pi tyrosporum; en ella ocurren repetidas generaciones exclusivamente en un polo de la célula. Cada gemación deja en la célula madre una cicatriz de brote y después de varias generaciones, se forma un collar por la acumulación de cicatrices en un mismo sitio.

B. Bipolar: se refiere a la formación de brotes en los dos polos opuestos de la célula; se le conoce también como "gemación en base ancha" por el amplio espacio que tiene la célula para producir sus brotes. En este caso, también se forman collares por la acumulación de cicatrices de brotes en dos zonas de la célula. Esta forma de gemación da lugar a células en forma de limón o apiculadas (Nadsonioideae).

C. Multipolar: cuando los brotes se presentan en diferen

tes sitios de la superficie celular, la gemación se refiere como multilateral o multipolar y es la forma de reproducción asexual más común. También se le conoce como "gemación en base angosta" porque el espacio para la emergencia de cada brote es reducido. Las levaduras que presentan este tipo de gemación, generalmente, presentan formas redondas, ovales o elipsoidales.

D. Esterigmal: Esta forma de reproducción asexual está restringida al género *Sterigmatomyces*. Nunca forman ni brotes ni micelio verdadero; se caracteriza por la formación de una conidia sobre un esterigma parecido a un tubo (25, 67, 77).

El proceso de la gemación ha sido ampliamente estudiado y puede resumirse como sigue: (figura 2.4)

1. Acumulación de vesículas en la región de emergencia del brote y ablandamiento de la pared celular de la célula madre, por la acción de las enzimas contenidas en las vesículas (a).
2. Formación de una placa de duplicación en forma de huso.
3. Acumulación de vesículas en el citoplasma y pandeamiento de la pared celular de la célula madre (b).
4. Acumulación de organelos, diferentes de las vesículas y del retículo endoplásmico, en la zona del brote, a través de la placa de duplicación que se encuentra dirigida hacia la zona del brote (c).
5. Incremento en el grosor de la pared celular materna

por iniciación de la incorporación de mananas y glucanas en la zona más lejana de la unión con la célula materna.

6. Maduración de la célula hija con la medida y la forma de la célula madre.

7. Iniciación de la separación de las células.

8. Formación de un disco pequeño, la septa primaria, por la incorporación de quitina y acumulación de vesículas - en esta zona (d - g).

9. Engrosamiento de la septa primaria, primero con glucanas y después con mananas (septa secundaria) (h - i).

10. Separación de las dos células. La septa primaria se queda en la célula madre formando la cicatriz de brote y la septa secundaria pasa a la célula hija formando la cicatriz de nacimiento (J) (17,25,60,77,94).

2.4.1.2. FISION. La segunda forma de reproducción asexual de las levaduras es la fisión, un proceso poco estudiado debido a que son muy pocas las especies que lo llevan a cabo. Antiguamente se creía que la fisión ocurría a través de un proceso totalmente diferente al de la gemación; sin embargo, se ha observado que los eventos iniciales de - ambos procesos son los mismos (figura 2.4), incluyendo la formación de la septa primaria y la secundaria aunque su composición química, hasta la fecha, es desconocida. La diferencia entre los dos procesos estriba en que la - septa primaria o rudimento anular (llamado así en la fisión) desaparece, tal vez por digestión enzimática antes

de que las dos células se separen (25,39,60,94).

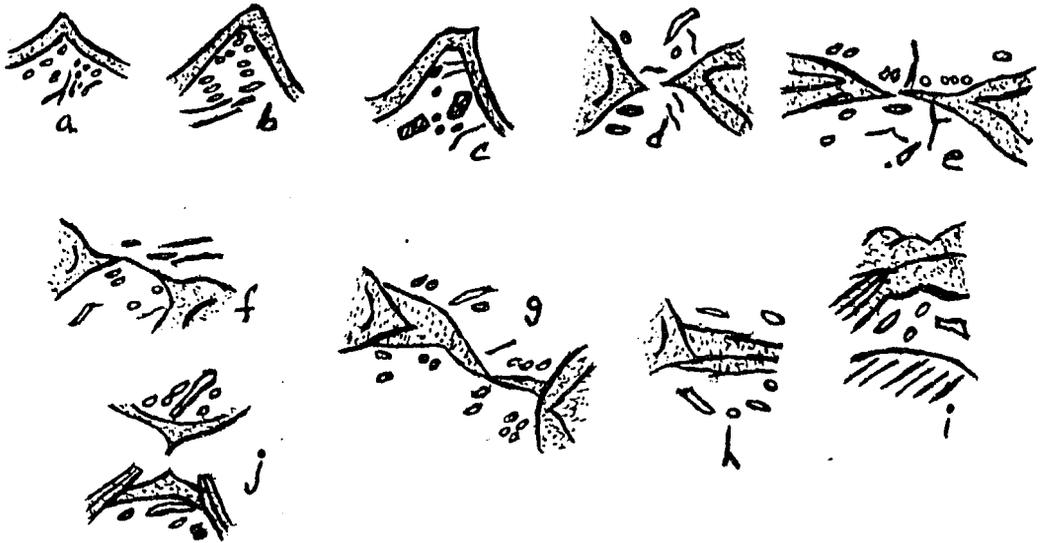


FIGURA 2.4. Eventos ocurridos durante el proceso de gemación de las levaduras (17, 94).

2.4.1.3. FORMACION DE PSEUDOMICELIO. Las levaduras que llevan a cabo la reproducción asexual, ya sea por gemación o por fisión, además de ocurrir como células aisladas, tienen la tendencia a formar pseudomicelio. La forma del pseudomicelio puede ser muy parecida a la de un micelio verdadero pero su origen es diferente ya que el primero, surge de células que llevan a cabo fisión o gemación. En estos casos, las células, al reproducirse, quedan en contacto formando pares; puede suceder también, que al dividirse antes de la separación de las células, la célula hija inicie una nueva división y que esto ocurra tantas veces como sea necesario hasta que se logre la -

formación de cadenas largas de células que son las que al final, darán la apariencia del pseudomicelio en las colonias de que forman parte (25,74).

La formación del pseudomicelio constituye una característica importante para la diferenciación de las levaduras anascosporógenas y para su estudio se requieren condiciones especiales de desarrollo (25,67,74).

2.4.1.4. CICLO CELULAR. Hasta ahora, se han mencionado los cambios estructurales que ocurren desde la emergencia del brote, en una célula madre, hasta la separación de la célula hija de su progenitora; sin embargo, para que estos eventos puedan ocurrir, es necesaria la ocurrencia de otros eventos previos o paralelos a los primeros.

El patrón repetido de eventos que ocurre entre la formación de una célula, a partir de la división de la célula madre, y el tiempo en que ésta se divide, se conoce como ciclo celular.

La figura 2.5 describe la secuencia de eventos ocurridos durante este ciclo. Estos eventos están divididos en 4 fases principales: 1. Fase G_1 : considerada como el tiempo entre la citocinesis y la iniciación de la síntesis de DNA; 2. Fase S: considerada como la fase de síntesis de DNA; 3. Fase G_2 : considerada como el tiempo entre la síntesis de DNA y la fase M y 4. Fase M: considerada como el período de mitosis. En cada una de las fases mencionadas ocurren otros eventos descritos en la figura 2.5 (6,96). Para determinar la secuencia en la que ocurren los eventos

durante el ciclo celular de las levaduras se utilizaron mutantes y de esta forma se determinó que existen dos - fases que son independientes entre sí pero que convergen en un punto, la citocinesis. Cada ruta por separado es dependiente, es decir, para que ocurra un evento, es necesaria la ocurrencia del evento anterior (figura 2.6).

Como se observa en la figura 2.6, el ciclo celular presenta una sola ruta que es común al ciclo celular de todos los organismos eucarióticos (ISD, SD, DN, CC, SC) - pero presenta además, las fases de emergencia del brote y la migración nuclear que, según se ha comprobado, son fases exclusivas del ciclo celular de las levaduras. Estas dos fases se presentan en forma independiente del resto de los eventos pero son esenciales para que la complementación del ciclo se lleve a cabo (43,96).

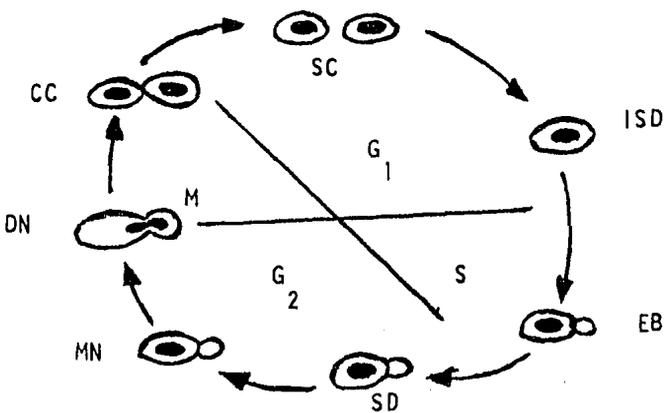


FIGURA 2.5 Ciclo celular de las levaduras: ISD, iniciación de la - síntesis de DNA; EB, emergencia del brote; SD, síntesis de DNA; MN, migración del núcleo; DN, división nuclear; CC, citocinesis y SC, separación de las células.

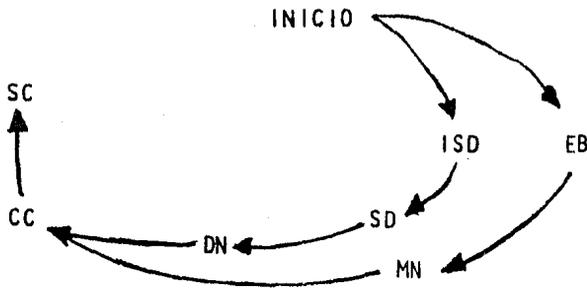


FIGURA 2.6. interdependencia de eventos en el ciclo celular de las levaduras. Ruta I.- comprende: Inicio-ISD-SD-DN-CC-SC. - Ruta II.- comprende: Inicio-EB-MN-CC-SC. Ambas rutas son independientes entre sí pero presentan puntos de dependencia que son: Inicio y CC.

2.4.2. REPRODUCCION SEXUAL.- Las levaduras que se reproducen sexualmente son aquellas capaces de formar ascosporas; por lo tanto, la esporulación es una fase sexual de la vida de las levaduras. En esta fase, se forman esporas (ascosporas) encerradas dentro de una estructura semejante a un saco (asca) por un proceso de reducción nuclear y división, la meiosis (25,74).

En las clases típicas de levaduras, las células vegetativas son diploides ($2n$ cromosomas) y son capaces de formar ascosporas haploides (n cromosomas). El proceso de reproducción sexual puede resumirse como sigue:

- 1.- Incremento en el movimiento protoplásmico y en el volumen celular.
- 2.- Fragmentación de vacuolas.
- 3.- Nuevas vacuolas agrandadas y unidas.
- 4.- Aparición de pequeños gránulos y desaparición de vacuolas.

cuolas.

5.- Ensanchamiento de los gránulos y condensación con el núcleo.

6.- Formación de una placa de duplicación en forma de huso.

7.- Inicio de la división nuclear (meiosis) con la elongación del núcleo.

De esta forma se obtienen cuatro núcleo hijos que reemplazan al núcleo original; cada núcleo es encerrado por una pared doble dando lugar entonces, a la formación de 4 ascosporas o esporas sexuales encerradas en un asca. Las ascosporas entran a una fase de maduración en la que se incrementa el volumen citoplásmico y los materiales residuales son utilizados.

El número de esporas formadas es variable; algunas especies pueden presentar 4 esporas y otras presentan hasta 16. Cuando estas esporas se encuentran dentro de un medio favorable, germinan, dando lugar a células vegetativas haploides que, por conjugación con otra célula haploide, darán lugar a células vegetativas diploides.

Los eventos que ocurren durante la alternancia de fases en las levaduras (diplófase-haplofase-diplófase) se conciben como "Ciclo de vida" y se encuentran esquematizados en la figura 2.7 (25,67,72,77).

2.5. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE LAS LEVADURAS.- Las levaduras, como muchos otros seres vivos, son consideradas

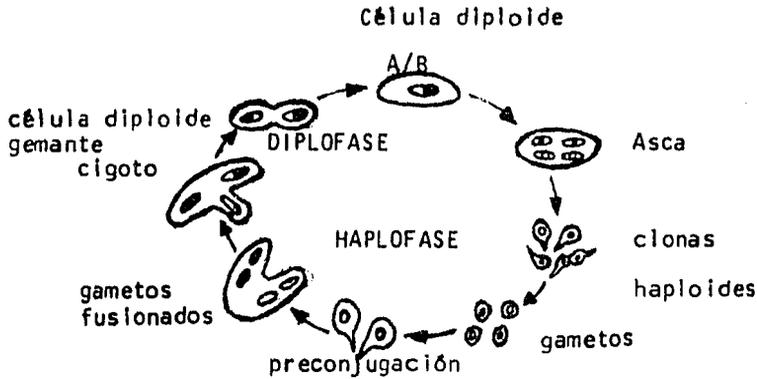


FIGURA 2.7. Ciclo sexual de las levaduras. Alternancia de fases.
Núcleo A ● Núcleo B ◐

como organismos heterótrofos; este tipo de organismos, no pueden utilizar directamente el CO_2 atmosférico para sus funciones metabólicas y por lo tanto, requieren de una fuente de carbono reducida como la glucosa. A las levaduras también se les considera organismos quimiótrofos, es decir, son organismos capaces de obtener su energía solamente a través de reacciones de oxidación-reducción.

La unión de estas dos características las hace llamarse organismos quimiorganótrofos que son los que requieren una fuente de carbono orgánico y una fuente de energía producida por reacciones de óxido-reducción (25,74).

De acuerdo a las características nutricionales de las levaduras, para lograr su óptimo desarrollo, es necesario, cuando se les cultiva bajo condiciones de laboratorio, suplirles de los compuestos químicos básicos para su desarrollo. Los requerimientos usuales para el desarrollo de las levaduras incluyen; 1.- compuestos de carbono orgánico; 2.- compuestos de nitrógeno orgánico o -

inorgánico o ambos; 3.- Compuestos minerales y elementos traza y 4.- compuestos vitamínicos (74, 77).

Estos compuestos pueden ser suplementados a través de la utilización de dos tipos de medios de cultivo: los complejos y los sintéticos.

2.5.1. MEDIOS DE CULTIVO COMPLEJOS.- Para las levaduras, -- son dos los medios de cultivo complejos más utilizados:

A.- Extracto de malta: conocido también como mosto de cerveza; se elabora a base de malta diastásica, por conversión enzimática del almidón y las proteínas a azúcares fermentables y péptidos y aminoácidos respectivamente.

B.- Extracto de levadura: este medio complejo es un autolisado de estos organismos que se obtiene por calentamiento a 55°C durante 3 días; este medio no contiene fuente de carbono fermentable y por lo tanto, es necesario agregarla.

2.5.2. MEDIOS DE CULTIVO SINTETICOS.- Son los más utilizados debido a su relativa facilidad de preparación. La tabla 2.6 muestra la composición química de uno de los más utilizados.

Para la preparación de estos medios se adicionan los componentes básicos: fuente de carbono, fuente de nitrógeno, sales minerales, aminoácidos y vitaminas.

La concentración utilizada, para cada componente, puede variar según la especie que se utilice dependiendo de sus propias necesidades de desarrollo (67,74).

TABLA 2.6. Composición química de un medio sintético definido para levaduras (por litro de agua destilada) (74).

INGREDIENTE	CANTIDAD	INGREDIENTE	CANTIDAD
D-glucosa	10.00 g	MnSO ₄ .H ₂ O	400 µg
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.00 g	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	200 µg
KH ₂ PO ₄	1.00 g	ZnSO ₄ .7H ₂ O	400 µg
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.50 g	Biotina	2 µg
NaCl	0.10 g	Pantotenato de	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.10 g	calcio	400 µg
L-histidina	10.00mg	Acido fólico	2 µg
DL-metionina	20.00mg	Inositol	2000 µg
DL-triptofano	20.00mg	Niacina	400 µg
H ₃ BO ₃	500 µg	Acido p-amino	200 µg
CuSO ₄ .5H ₂ O	40 µg	benzoico	
KI	100 µg	Piridoxina	400 µg
FeCl ₃ .6H ₂ O	200 µg	Riboflavina	200 µg
HCl-tiamina	400 µg		

2.5.2.1. FUENTES DE CARBONO.- La fuente de carbono que se emplea comunmente es la glucosa; sin embargo, existen otros -- compuestos de carbono que pueden ser utilizados; entre ellos se encuentran: a. otras hexosas diferentes de la glucosa; b. di, tri y polisacáridos; c. pentosas; d. al coholes alifáticos; e. alcoholes de azúcares; f. ácidos orgánicos y g. compuestos aromáticos.

2.5.2.2. FUENTES DE NITROGENO.- La fuente de nitrógeno más utili

zada por las levaduras es el sulfato de amonio; en -- pruebas de asimilación, pueden utilizarse otros com--- puestos nitrogenados tales como: a. aminoácidos sim--- ples; b. purinas y pirimidinas; c. aminas; d. urea y - e. nitratos y nitritos.

Cuando el medio sintético mencionado es utilizado para pruebas de asimilación de nitrógeno, la concentración de los aminoácidos debe disminuirse 10 veces para no - interferir con los resultados de las pruebas (25,67).

2.5.3. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES ESPECIALES.- Algunas espe- cies de levaduras, además de los requerimientos nutri- cionales mencionados, necesitan de compuestos químicos especiales para su desarrollo; como éstos no son comu- nes a todas las especies, se refieren para cada espe- cie en particular. Algunos ejemplos de estos requeri- mientos no usuales son: S. cerevisiae presenta mutantes que requieren de adenina; S. pombe presenta mutantes - naturales para adenina; P. amethionina requiere aminoá- cidos sulfurados; S. cerevisiae, en condiciones anaeró- bicas requiere de ergosterol y ácido oleico; S. rouxii y S. bisporus requieren de altas concentraciones de azúcares (67,77).

2.6. CARACTERISTICAS METABOLICAS DE LAS LEVADURAS.- Metabóli- camente, las levaduras son organismos predominantemen- te anaerobios facultativos, es decir, son organismos - capaces de desarrollar tanto en ausencia (fermentación) como en presencia (respiración) de oxígeno.

El metabolismo de las levaduras, al igual que para todos los seres vivos, consiste de dos tipos de mecanismos: 1. generadores de energía o degradativos (catabolismo) y 2. consumidores de energía o rutas biosintéticas (anabolismo). El desarrollo es el resultado del equilibrio entre los dos tipos de mecanismos, ya que parte de la energía obtenida por el catabolismo, se utiliza en la biosíntesis de los componentes celulares (74,77).

2.6.1. METABOLISMO DE COMPUESTOS DE CARBONO.- Las levaduras -- pueden metabolizar muchos mono y oligosacáridos, ya sea que sean suplementados en el medio de cultivo o que se encuentren como reservas en el interior de las células (glucógeno y tetralosa).

Los azúcares que se utilizan comúnmente son: glucosa, - manosa, fructosa, galactosa, maltosa, sacarosa, lactosa melibiosa, tetralosa y rafinosa. (13,17).

Algunos de estos azúcares pueden ser utilizados directamente, pasando intactos al interior de la célula, otros, tienen que ser hidrolizados en el exterior para después entrar a la célula y ser utilizados; una vez que se encuentran dentro de la célula, ésta los utilizará ya sea por la vía de la respiración o fermentándolos o ambas cosas.

Cualquiera que sea la forma en que estos azúcares sean absorbidos, al final, darán lugar, por transformaciones enzimáticas, a intermediarios que entrarán a las vías degradativas centrales para la obtención de energía necesaria para la célula; la glucosa es la molécula prin-

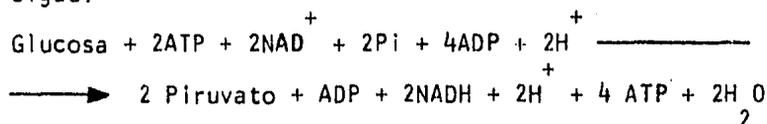
cial de las vías metabólicas centrales de las levaduras y ésta puede ser utilizada a través de dos mecanismos o vías principales, que dependen de las condiciones de aereación en las que las levaduras estén desarrollando.

De esta forma, la glucosa puede ser utilizada anaeróbicamente cuando la concentración de oxígeno en el medio sea de 0 a 50 mmol O₂ / l/h o bien, aeróbicamente, cuando la concentración de oxígeno sea superior a 50 mmol de O₂ / l/h (10,67,74,77).

2.6.1.1. METABOLISMO ANAEROBICO.- Conocido comunmente como fermentación, el metabolismo anaeróbico es uno de los mecanismos mediante los cuales, las levaduras obtienen su energía a través de la degradación del componente energético.

La fermentación se inicia con la entrada de la glucosa a la célula, bajo el control de enzimas y coenzimas libres, dispuestas en la matriz citoplásmica; una vez dentro, la hexosa, inicia la vía central de degradación anaeróbica conocida como "Ruta de Embden-Meyerhof" La serie de reacciones que ocurren durante este proceso están resumidas en la figura 2.8.

La reacción global de este proceso se representa como sigue:

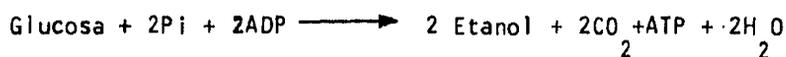


A través de esta serie de reacciones, la ganancia neta de energía es de 2 moléculas de ATP/molécula de glucosa y además se obtienen 2 moléculas de NADH que serán utilizadas posteriormente.

El punto de control más importante de esta vía es la reacción catalizada por la enzima alostérica fosfofructocinasa que interviene en la conversión de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-difosfato, en presencia de iones magnesio y ATP. La reacción es inhibida por citrato, altas concentraciones de ATP y por ácidos grasos de cadena larga y por lo tanto, es la reacción limitante de la velocidad de la glucólisis.

Otro punto de control del proceso es la reacción catalizada por la enzima hexocinasa que es inhibida por retroalimentación (10,22,54,74).

Para las levaduras fermentadoras, el producto final de la vía de Embden-Meyerhof, el ácido pirúvico sufre dos conversiones más (figura 2.9); la primera de ellas es la descarboxilación del piruvato para obtener acetaldehído y CO_2 y la segunda, que es la etapa final de la fermentación, involucra la reducción del acetaldehído a etanol en presencia de NADH (obtenido de la vía anterior). La ecuación general que representa a la fermentación alcohólica es (54):



2.6.1.1.1. INCORPORACION DE OTROS COMPUESTOS A LA VIA DE EMBDEN-MEYERHOF.- Cuando al medio de cultivo de las levaduras se agregan otras fuentes de carbono, diferentes de la

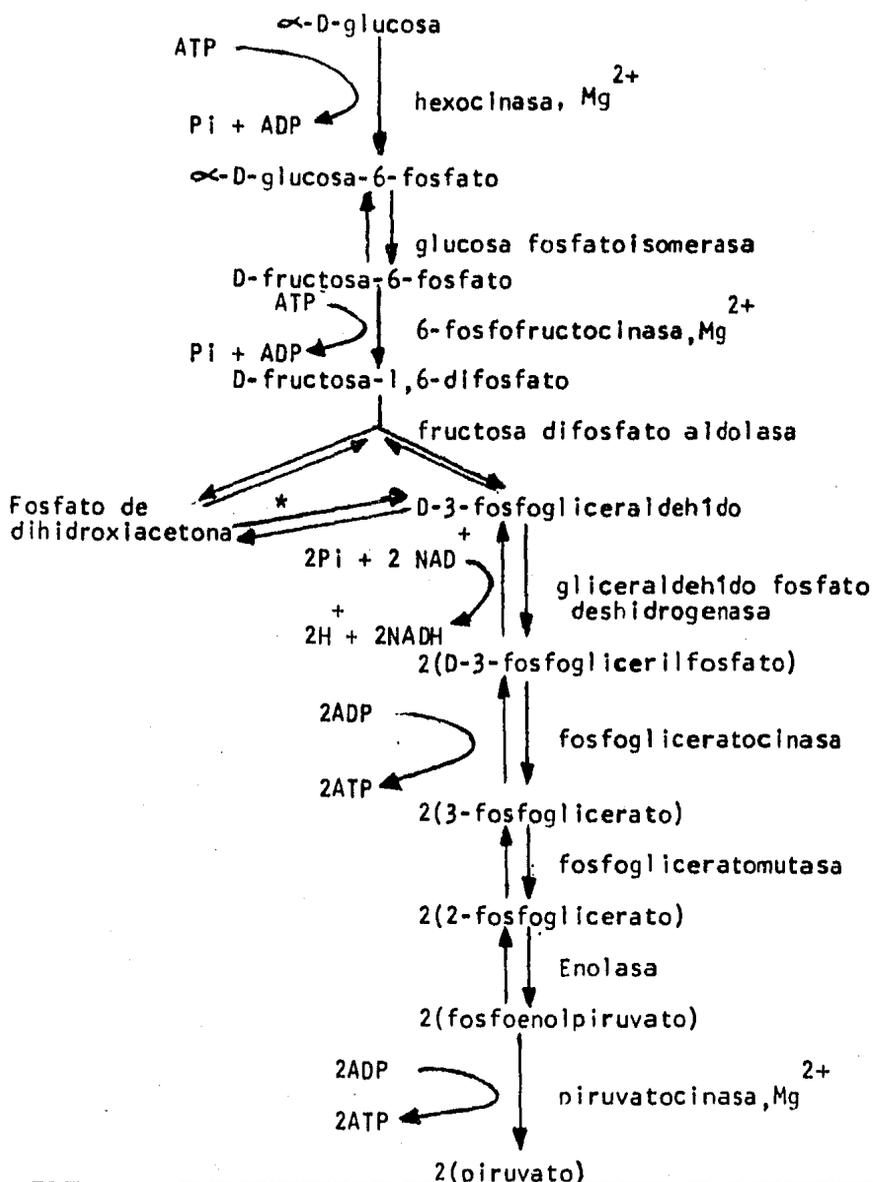


FIGURA 2.8. Diagrama de la vía glucolítica de Embden-Meyerhof

* La reacción se lleva a cabo mediante la enzima triosa fosfato isomerasa (10).

glucosa o bien, cuando éstas se ven precisadas a utilizar sus reservas energéticas, existen mecanismos median-

te los cuales pueden convertir el compuesto dado a moléculas de glucosa o a intermediarios que podrán entrar a la vía glucolítica normal. Algunas de las reacciones químicas involucradas en este proceso están esquematizadas en la figura 2.10 (10,54).

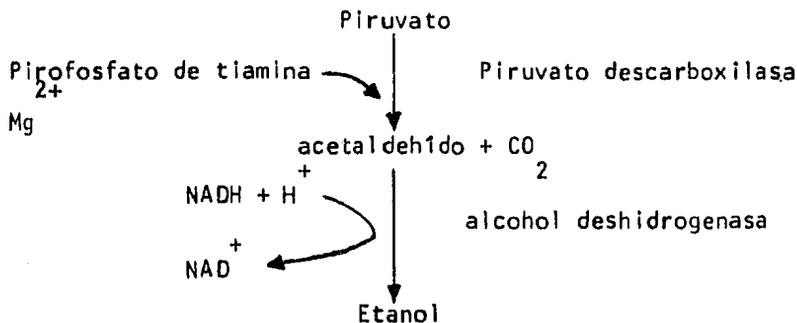


FIGURA 2.9. Conversión del piruvato a etanol en la fermentación alcohólica (10).

A través de estas reacciones, las levaduras pueden utilizar azúcares tales como: fructosa, galactosa, manosa y además, otros compuestos como la glicerina y el glucógeno.

2.6.1.1.2. INCORPORACIÓN DE PENTOSAS A LA VIA DE EMBDEN-MEYERHOF.-

Para la utilización de las pentosas, es necesaria la utilización de una vía auxiliar conocida como "ruta del fosfogluconato" ó "Derivación del Monofosfato de hexosa", éste es un mecanismo alternativo, utilizado escasamente por las levaduras y su principal función es la de proveer esqueletos de carbono esenciales para la síntesis de constituyentes celulares.

Esta ruta metabólica tiene como objetivo, generar potencial de óxido-reducción en el citoplasma extramito-

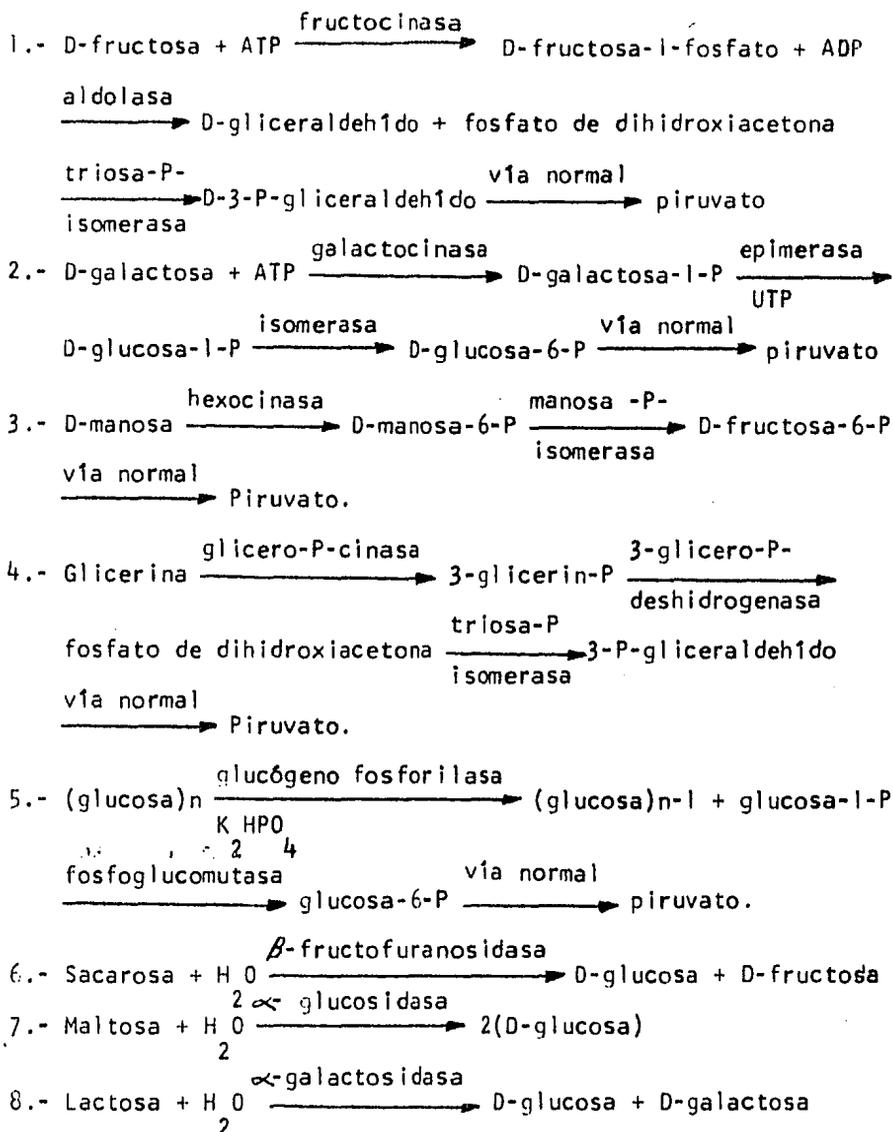


FIGURA 2.10. Reacciones de incorporación de compuestos de carbono, diferentes de la glucosa, a la vía de Embden-Meyerhof (10,67).

condrial en forma de NADPH y además, la conversión de hexosas a pentosas, particularmente la D-ribosa-5-fosfato, necesaria para la síntesis de ácidos nucleicos.

También puede ser utilizada para la degradación oxidante de las pentosas, mediante su conversión en hexosas - que pueden entrar en la secuencia glucolítica y hacer - posible la utilización de compuestos de 3,4,5,6 y 7 átomos de carbono que por la vía de Embden-Meyerhof, no - pueden ser utilizados.

La secuencia de reacciones que se lleva a cabo durante el proceso de derivación del monofosfato de hexosa, está resumida en la figura 2.11. En el esquema se observa como, en esta vía, pueden ser utilizados compuestos con diferente número de carbonos (3 a 7) y de esta forma, el número de sustratos utilizables, en condiciones anaeróbicas, se puede ampliar en una gran gama de compuestos (10,22,67,74).

2.6.1.2. METABOLISMO AEROBICO.- Para la mayoría de las levaduras, el metabolismo aeróbico o respiración, es el mecanismo predominante de rendimiento energético de la célula. En la serie de reacciones que ocurren se observan múltiples estados en la mitocondria, organelo de la célula responsable de la respiración de las levaduras. (47,56) La principal vía, sino es que la única, por la que la glucosa es utilizada aerobicamente, es el llamado "ciclo de los ácidos tricarbóxicos", descrito por Krebs (53).

La serie de reacciones enzimáticas implicadas en este proceso, se inicia con la activación del piruvato (producto de la glucólisis) por pirofosfato de tiamina y - la transformación a acetilcoenzima A; ésta última, ac-

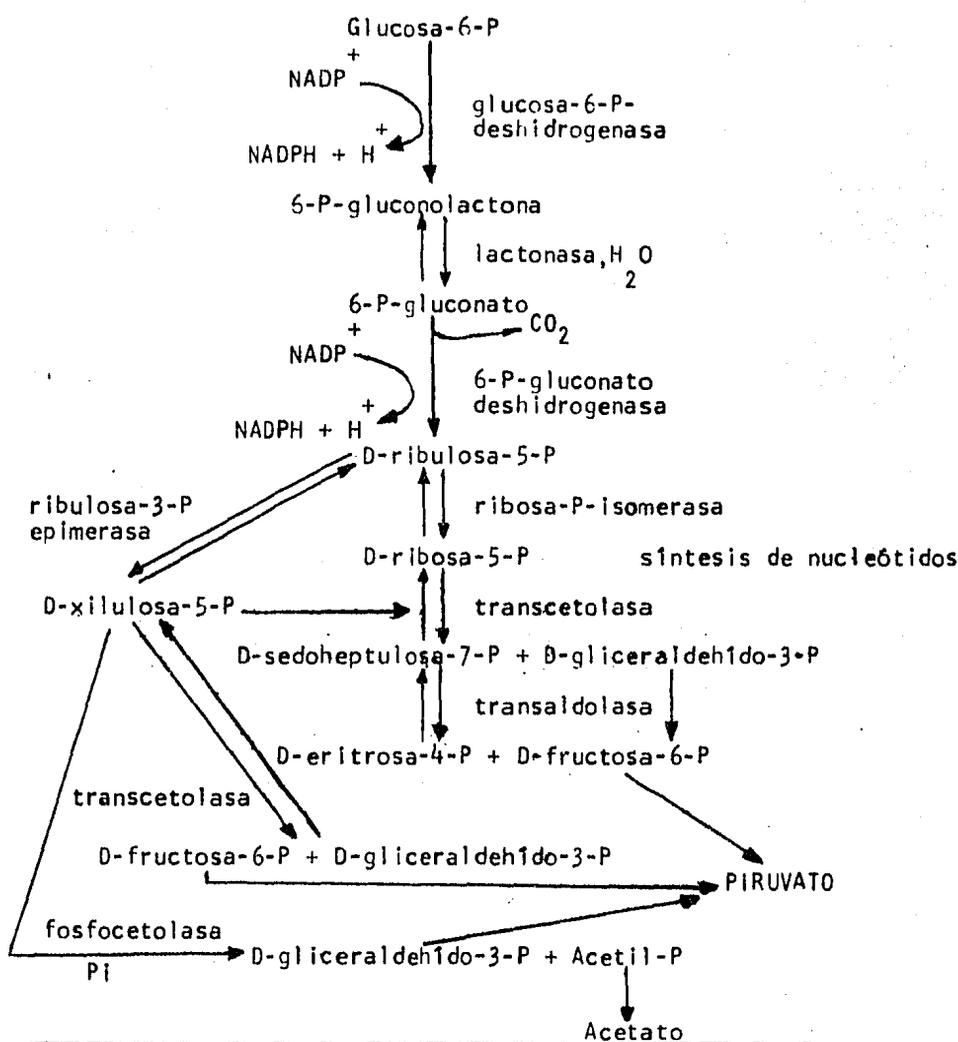
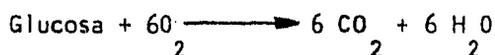


FIGURA 2.11. Derivación de la hexosa monofosfato (22,54).

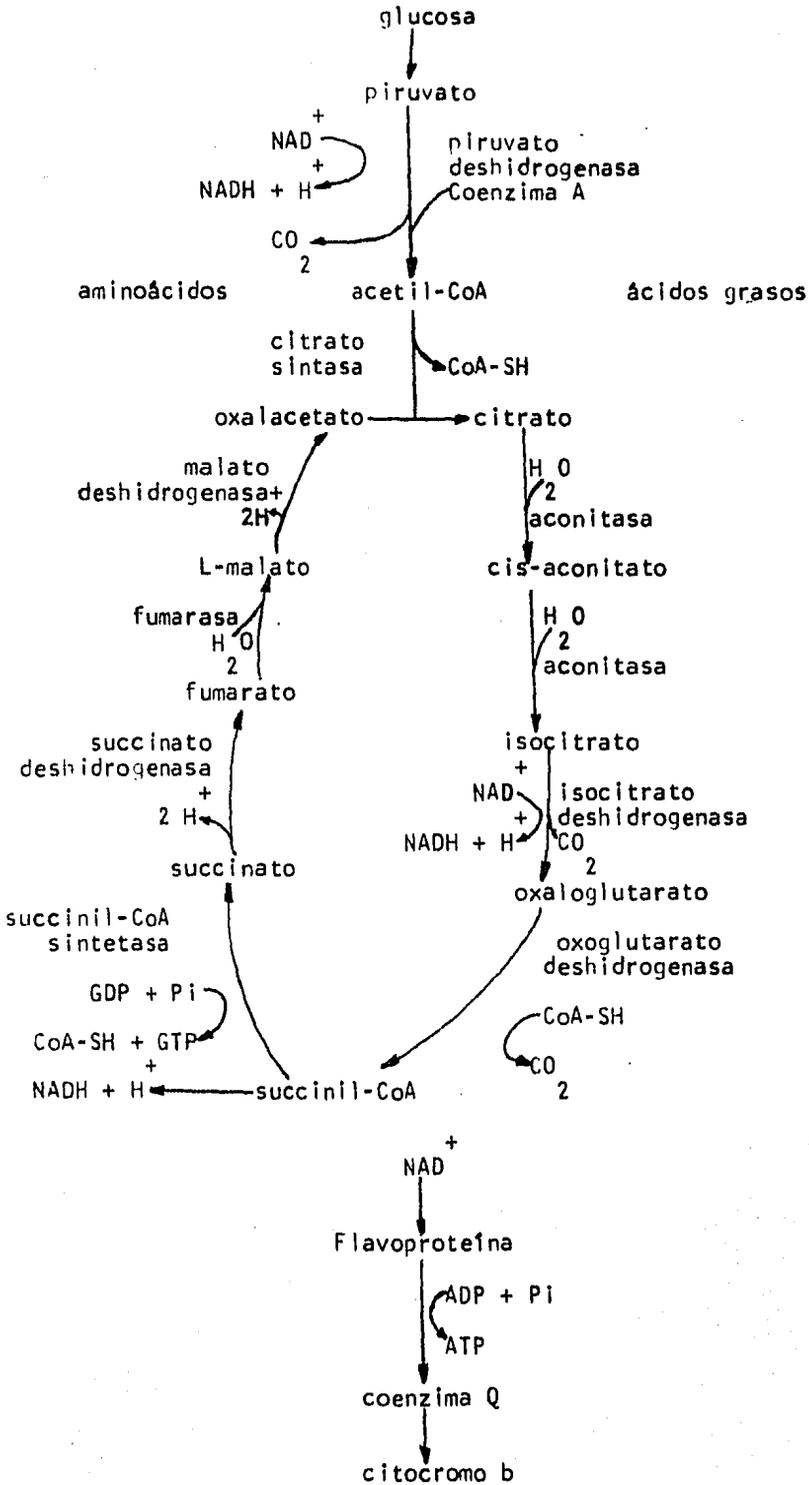
túa como un acarreador de unidades acetilo al ciclo de Krebs. La figura 2.12 esquematiza la serie de reacciones que ocurren a través del ciclo; las unidades de acetilo, no solamente se obtienen a partir de la glucosa sino que pueden haber otras fuentes de este compuesto.

El ciclo de Krebs se completa con 4 deshidrogenaciones y 2 descarboxilaciones y al final, la molécula acentora, el oxalacetato, es regenerada. Los 4 pares de Hidrógeno obtenidos en el proceso entran al sistema de transporte electrónico y a la fosforilación oxidativa en la que se producen un total de 36 moléculas de ATP por molécula de glucosa y además, el aceptor de electrones, el Oxígeno, forma 4 moléculas de H₂O (figura 2.12). La reacción global de la respiración, es la siguientes (2,7,20)



2.6.1.2.1. DESVIACIONES DEL CICLO DE KREBS.- Para oxidar compuestos de dos átomos de Carbono (acetato, etanol), algunas etapas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos son desviadas a través de una serie de reacciones llamadas "ciclo del ácido glioxílico". El objetivo principal de este ciclo, es permitir la utilización de los ácidos grasos o del acetato, en forma de acetil-CoA, como única fuente carbonada, para la biosíntesis de los carbohidratos o bien, para la obtención de energía a través de la conversión de los residuos acetilo a oxalacetato que puede ser utilizado en la ruta normal del ciclo de Krebs.

El ciclo elude, mediante un rodeo, las etapas de desprendimiento de CO₂ del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, con la finalidad de aprovechar todos los átomos



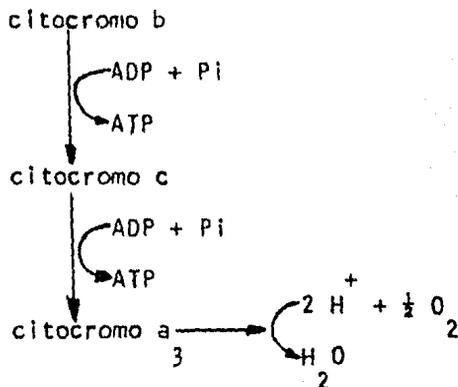
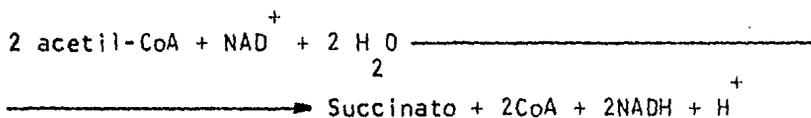


FIGURA 2.12. Ciclo de Krebs, transporte de electrones y fosforilación oxidativa (21,27).

de Carbono disponibles, en la producción de energía y de precursores metabólicos que serán utilizados principalmente, en la biosíntesis de componentes celulares (figura 2.13). En cada ciclo se usan dos moléculas de acetil-CoA y se produce una de succinato, precursores de la biosíntesis de aminoácidos y de la glucosa (10,22,74,77).

La reacción global del ciclo es:



2.6.1.3. COMPARACION DEL METABOLISMO ANAEROBICO Y AEROBICO.- El metabolismo de los compuestos de Carbono, tiene como objetivo principal, la producción de la energía necesi-

ria para que las células lleven a cabo sus funciones metabólicas; de esta forma, podemos comparar el rendimiento energético tanto del proceso anaerobio como del aerobio. En la fermentación alcohólica, es decir, en el metabolismo anaeróbico, la energía producida es de 196.65 KJ/mol y en la respiración, metabolismo aeróbico, la energía liberada es de 2870.29 KJ/mol. De acuerdo a estos datos, se observa que el proceso aeróbico tiene un rendimiento energético mucho más alto que el anaeróbico y así, las células utilizan el primero con la finalidad de obtener un mayor rendimiento energético que con el último, no lo lograrían (54, 67).

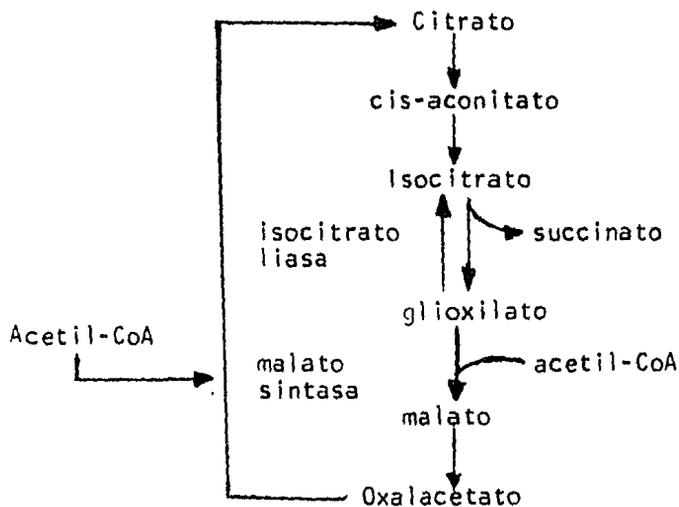


FIGURA 2.13. Ciclo del ácido glioxílico (77).

Estudios realizados sobre la extensión de cada uno de los procesos, con cultivos de levaduras que desarrollan activamente, han mostrado los siguientes resultados:

1.- Durante la respiración, del 58 al 60% de la glucosa suplementada en el medio de cultivo, fue asimilado en el interior de las células, mientras que, del 40 al 42% restante, fue metabolizado hasta CO_2 .

2.- Del 40 al 42% del CO_2 producido, cerca del 43% derivó del ciclo de Krebs; el 51% de la descarboxilación del piruvato y el 6% de la derivación del monofosfato de hexosa. La eficiencia de desarrollo fue del 49% y la concentración de etanol producido fue muy baja.

3.- Bajo condiciones anaeróbicas, con 15 mmol de O_2 /l/h, la eficiencia de desarrollo es del 31%; el CO_2 derivado del ciclo de Krebs es del 15%; el de la descarboxilación de piruvato es de 80% y el de la derivación del monofosfato de hexosa es de 5%. La concentración de etanol aumenta considerablemente.

4.- Cuando las condiciones anaeróbicas se tornan más drásticas, con 7 mmol O_2 /l/h, la eficiencia de desarrollo disminuye hasta un 10%; el CO_2 derivado del ciclo de Krebs es de 1% el derivado de la descarboxilación de piruvato es del 94% y el de la derivación del monofosfato de hexosa es del 5% (10,22,54,77).

Según los datos obtenidos en estos estudios, se observa que, bajo condiciones aeróbicas, la ruta predominante es la descarboxilación de piruvato, pero ésta reacción está encaminada directamente al ciclo de los ácidos tricarbónicos; además, se observa que en estas condiciones, la derivación del monofosfato de hexosa es utilizada en mayor proporción y esto comprueba que esta vía es

favorecida por las condiciones aeróbicas. El rendimiento de biomasa es más alto.

Bajo condiciones anaeróbicas, la vía de Embden-Meyerhof (descarboxilación de piruvato), es la preponderante y - su utilización va aumentando conforme la concentración de Oxígeno disminuye; la ruta aeróbica, el ciclo de --- Krebs, prácticamente no es utilizada en éstas condiciones y la derivación permanece constante, lo que comprueba que esta vía no está relacionada directamente con el rendimiento energético.

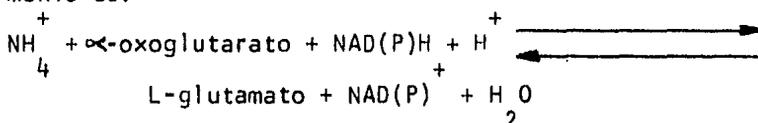
De esta forma, se determina la vía metabólica por la -- que las levaduras utilizarán sus componentes energéti--cos, según sea la concentración de Oxígeno presente en el medio de desarrollo (10,22,23,25,77).

2.6.2. METABOLISMO DE COMPUESTOS DE NITROGENO.- Las levaduras, como otros seres vivos, no pueden utilizar el Nitróge--no atmosférico para sus funciones metabólicas; sin em--bargo, pueden utilizar una gran variedad de compuestos nitrogenados, inorgánicos y orgánicos, que si pueden utilizar. La mayoría pueden utilizar el amonio como --- fuente de Nitrógeno y solo ciertas especies pueden utilizar otros compuestos como la urea, los aminoácidos, - las bases púricas y pirimídicas, los nitratos y los nitritos.

2.6.2.1. SALES DE AMONIO.- Las sales de amonio, como sulfatos o fosfatos, son los compuestos nitrogenados que utilizan

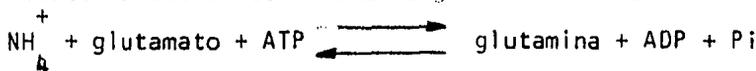
todas las levaduras como fuente de Nitrógeno. Cuando estas sales son transportadas al interior de la célula, su principal función es la biosíntesis de los aminoácidos no esenciales para las levaduras, es decir, aquellos aminoácidos que la célula puede sintetizar y que no han sido agregados al medio de cultivo.

La reacción química para que las células utilicen el amonio es:



La enzima que cataliza esta reacción es la L-glutamato deshidrogenasa. Esta reacción es de importancia fundamental en la biosíntesis de todos los aminoácidos ya que, se trata de la ruta principal para la formación de grupos α -amino directamente a partir del amonio. El grupo α -amino del L-glutamato es transferido a muchos α -oxoácidos, por reacciones de transaminación, produciendo los aminoácidos correspondientes (74,77).

Otra de las reacciones que involucra la utilización de los iones amonio, es la biosíntesis de la glutamina mediante la acción de la enzima glutamina sintetasa:



Esta reacción es importante porque la glutamina es otro de los precursores utilizados en la biosíntesis de los aminoácidos y otros compuestos nitrogenados (54,67).

Los aminoácidos que pueden ser sintetizados a partir de los compuestos mencionados y con la intervención de

enzimas y otros compuestos químicos, son: prolina, alanina, ácido aspártico (con NH_4^+ produce asparagina), serina (con tetrahidrofolato produce glicina y con metionina produce cisteína), lisina, valina, isoleucina, leucina, arginina, histidina, triptofano, tirosina y fenilalanina (54,77).

La regulación de la biosíntesis de aminoácidos se lleva a cabo por medio de dos mecanismos: la retroinhibición y la represión.

El hecho de que una especie de levadura pueda o no sintetizar los aminoácidos mencionados, a partir de sales de amonio, depende de sus características genéticas y por ésto es que debe de conocerse a la especie con la que se está trabajando para determinar qué aminoácidos deben de agregarse al medio de cultivo para el óptimo desarrollo del organismo en cuestión (12,24,25,77,91). Los aminoácidos resultantes de las reacciones biosintéticas mencionadas, son utilizadas por las células para la biosíntesis de proteínas requeridas para su desarrollo y para otros compuestos químicos esenciales para ellas como son: bases púricas y pirimídicas y algunos intermediarios del metabolismo de los compuestos del Carbono (25,67).

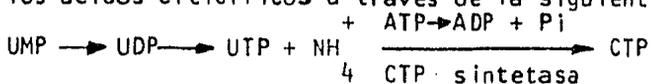
2.6.2.2. BASES PURICAS Y PIRIMIDICAS.- Algunas especies de levaduras requieren de la adición de bases púricas y pirimídicas en su medio de desarrollo porque carecen de los mecanismos enzimáticos adecuados para su biosíntesis

(generalmente por mutaciones); cuando éste es el caso -- estos compuestos son incorporados directamente a sus ácidos nucleicos, simplemente por mecanismos de transporte adecuados (74).

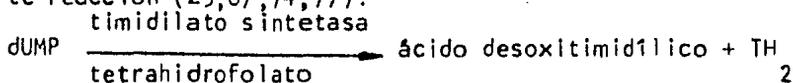
La mayoría de las levaduras poseen la capacidad para sintetizar sus propias bases purínicas y pirimidínicas y los mecanismos, a través de los cuales lo hacen, son los siguientes:

- 2.6.2.2.1. BASES PURICAS.- Las reacciones enzimáticas involucradas en el proceso de síntesis de bases purínicas, se inician con la incorporación del azúcar, D-ribosa-5-P (obtenida principalmente de la derivación del monofosfato de hexosa), a una serie de reacciones que darán lugar a la formación del ácido inosínico, utilizando como precursores al ácido glutámico, la glutamina, la glicina, el tetrahidrofolato y el ATP. El ácido inosínico resultante (IMP), es utilizado para producir tanto ácido adenílico (AMP) como ácido guanílico (GMP); la biosíntesis del primero requiere de GTP y ácido aspártico y la del segundo NAD^+ , ATP y glutamina o NH_4^+ . La figura 2.14 muestra algunas de las reacciones involucradas en el proceso (54,79).
- 2.6.2.2.2. BASES PIRIMIDICAS.- La ruta biosintética que conduce a los nucleótidos pirimidínicos es mucho más sencilla que para los purínicos. El primer paso de la ruta es la síntesis de moléculas de carbamil-fosfato cuyos precursores son: glutamina, CO_2 , H_2O y ATP; esta molécula se condensa con una molécula de ácido aspártico por medio de la enzima aspartato-carbamil-transferasa y el producto de -

esta reacción sufre una serie de transformaciones enzimáticas hasta dar lugar al ácido uridílico, precursor de los ácidos citidílicos a través de la siguiente reacción:



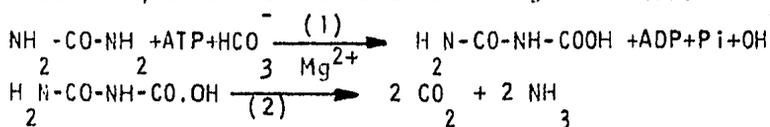
El ácido uridílico es precursor también de otro nucleótido pirimídico, el ácido timidílico (TMP), la biosíntesis de este compuesto se lleva a cabo a través de la siguiente reacción (25,67,74,77):



La biosíntesis de las bases púricas y pirimídicas conlleva a la polimerización de éstas en los ácidos ribonucleico y desoxiribonucleico que serán los encargados de que la célula lleve a cabo sus funciones metabólicas vitales y además, de que se logre la preservación de las especies, a través de la reproducción. La cantidad de bases presentes en una especie de levaduras, es característica de su propia especie.

La degradación de las bases púricas (figura 2.14), para el hombre, tiene como productos finales la urea y el ácido glioxílico (79). Existen algunas especies de levaduras que tienen la enzima ureasa y entonces, éstas son capaces de degradar la urea hasta amonio libre y CO_2 .

La enzima ureasa es un complejo formado por dos enzimas La urea carboxilasa (1) y la alofanatohidrolasa (2). La reacción que se lleva a cabo es la siguiente (79):



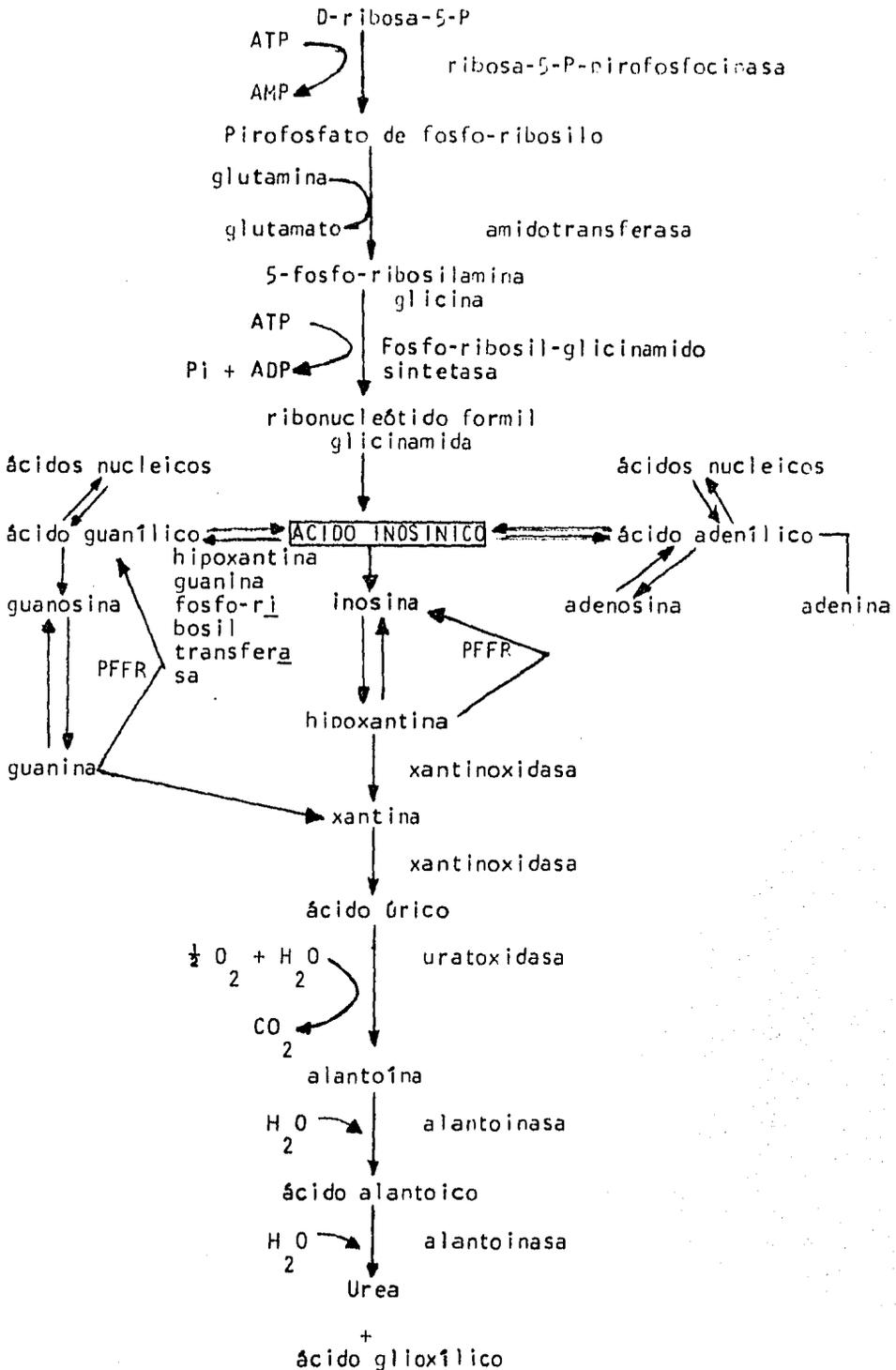


FIGURA 2.14 Síntesis y degradación de bases púricas (54,79).

La degradación de las bases pirimídicas tiene como producto final, amoníaco y urea; sus precursores son la citosina (que es convertida a uracilo por la enzima citosina desaminasa), el uracilo y la timidina. También, estas bases pueden ser utilizadas para la biosíntesis de -alanina y por tanto, para la de coenzima A, produciéndose de esta forma, además de la -alanina, amoníaco y CO_2 (74,77,79).

2.6.3. UTILIZACION DE VITAMINAS.- La mayoría de las levaduras necesitan de una fuente externa de vitaminas principalmente, las del complejo B; solamente algunas de ellas son capaces de sintetizar sus propios requerimientos (C. utilis y Hansenula anomala).

Todas las vitaminas utilizadas por las levaduras, ya sea que sean adicionadas al medio de cultivo o que ellas mismas las sintetizen; funcionan como catalizadores (excepto el meso-inositol), como parte de las coenzimas en su metabolismo.

Algunas de las vitaminas utilizadas, así como sus usos son:

a.- Biotina: es una de las vitaminas más comunmente utilizadas; está involucrada en las reacciones de carboxilación (asimilación de CO_2), en la asimilación de urea y en la conversión de piruvato, fosfoenolpiruvato vía oxalacetato.

b.- Niacina y Riboflavina.- Son componentes de las enzimas involucradas en las reacciones de oxidación reducción

como el ácido nicotín adenín dinucleótido (NAD) y el flavinadenín-dinucleótido (FAD).

c.- Acido Pantoténico: componente de la coenzima A, involucrada en las reacciones de acetilación.

d.- Tiamina: funciona como pirofosfato de tiamina en la descarboxilación de piruvato y en las reacciones de rearrreglo del ciclo de las pentosas.

e.- Piridoxina: actúa en reacciones de transaminación.

f.- Acido Fólico: como tetrahidrofolato, está relacionado con el metabolismo de fragmentos de un Carbono, como en la transmetilación y en la biosíntesis de nucleótidos

g.- Acido p-aminobenzoico: es un compuesto de la molécula de ácido fólico.

h.- Meso-Inositol: tiene una función estructural como componente de los fosfolípidos en la síntesis de membranas celulares.

Hasta la fecha no se conocen levaduras que requieran de vitamina B (50,67,74).

12

2.6.4. COMPUESTOS QUÍMICOS ESTIMULANTES DEL METABOLISMO.- Ciertos compuestos químicos, principalmente aminoácidos y minerales, tienen efectos estimulantes sobre el desarrollo de las levaduras, cuando éstos son adicionados en el medio de cultivo. El efecto que produzca un determinado compuesto, dependerá de la especie con la que se está trabajando, y de las condiciones en las que se está desarrollando. A continuación; se describen algunos de éstos compuestos y la reacción que producen al ser adicionados al medio de cultivo (10,22,49,56).

- A.- β -alanina: reemplaza al ácido pantoténico.
- B.- Acido Glutámico: incrementa la utilización de etanol.
- C.- Acido Oleico y Palmitoleico: favorecen el crecimiento en medios deficientes en biotina.
- D.- Calcio y Magnesio: estimulan el metabolismo anaeróbico.
- E.- Zinc: componente de la piruvato carboxilasa, estimula la fermentación.
- F.- Cobalto: influencia la síntesis de proteínas.
- G.- Manganeso, Yodo y Boro: efectos estimulantes variables.
- H.- Cloruro de Cromo: forma parte de un factor de tolerancia a la glucosa.

2.6.5. COMPUESTOS QUIMICOS INHIBIDORES DEL METABOLISMO.- Existen sustancias que poseen ciertas propiedades que, al estar en contacto con un cultivo de levaduras, inhiben su desarrollo por la inhibición de sus vías metabólicas normales.

La inhibición producida por éstas sustancias es diferente, según sean sus propias características y según sea la concentración utilizada; algunos ejemplos sobre el efecto de estas sustancias son: (6,24,25,47,48,91)

- A.- Antibióticos: todas las levaduras son sensibles a cicloheximida, antibiótico que interfiere en la síntesis de proteínas citoplásmicas. El cloranfenicol inhibe a las levaduras cuando se encuentran bajo condiciones aeróbicas, por la inhibición de la síntesis de proteínas mi-

tocondriales. La lomofungina inhibe la síntesis de RNA.
 (25) La tunicamicina inhibe la formación del complejo -
 de manano-proteínas de la pared celular de las levaduras
 (47).

B.- Ácidos orgánicos: El ácido sórbico se acopla con la
 coenzima A inhibiendo la respiración. El citrato ocasiona
 lisis celular por enlazamiento con receptores específicos
 de la membrana plasmática y también inhibe la res-
 piración en concentraciones altas.

C.- Ácidos grasos de cadena larga: inhiben la glucólisis.

D.- Gases: el dióxido de carbono y el dióxido de azufre
 ocasionan inhibición del metabolismo por el producto fi-
 nal el CO_2 .

E.- Detergentes: provocan lisis celular, principalmente
 los alquilbencensulfonatos aniónicos.

F.- Iodoacetato y Iodoacetamida: inhiben el metabolismo
 de la glucosa.

G.- Mostaza Fluorada y Etilenclorhidrina: inhiben las en-
 zimas tanto de la respiración como de la fermentación --
 impidiendo la formación de CO_2 .

2

2.6.6. EFECTOS REGULATORIOS DEL METABOLISMO.- Como se ha mencio-
 nado antes, existen muchas etapas en el metabolismo de -
 las levaduras que son reguladas a través de los propios
 productos obtenidos: sin embargo, entre los mecanismos -
 de regulación que presentan las levaduras, existen algu-
 nos a los que se les da mayor importancia debido a que -
 sus efectos son cruciales para mantener el desarrollo ce

lular o bien, para determinar la vía metabólica a seguir durante el desarrollo de estos organismos.

2.6.6.1. EFECTO PASTEUR.- Las células anaeróbicas facultativas, como las levaduras, poseen un sistema que integra a la fermentación con la respiración.

Cuando las células desarrollan en ausencia de Oxígeno, con glucosa como sustrato energético presentan una alta velocidad de degradación del sustrato para producir una cantidad suficiente de energía (2 ATP/molécula de glucosa); cuando se hace pasar una corriente de Oxígeno sobre este medio de desarrollo, la velocidad de degradación del sustrato sufre una notable disminución, produciendo altas concentraciones de CO_2 y H_2O y además, altos rendimientos energéticos (36 ATP/molécula de glucosa). A éste fenómeno se le conoce como "Efecto Pasteur" y se propone que se presenta debido a que la enzima alostérica fosfo-fructo-cinasa, que cataliza la conversión de fructosa-6-P a fructosa-1,6-diP, que regula la vía glucolítica de Embden-Meyerhof, es inhibida por altas concentraciones de ATP y por lo tanto, en presencia de Oxígeno, un cultivo que crecía en condiciones anaeróbicas, produce una gran cantidad de ATP y éste inhibe la secuencia que conlleva a la fermentación. La enzima también se ve afectada por altas concentraciones de citrato e isocitrato y éstos se producen cuando la célula se transfiere a condiciones aeróbicas.

El efecto Pasteur es entonces, un mecanismo cuya finalidad esencial es la de ajustar el grado de utilización -

de la glucosa a los requerimientos celulares de energía y compuestos intermediarios del metabolismo (53,54).

2.6.6.2. EFECTO CRABTREE.- Cuando los organismos anaerobios facultativos crecen con altas concentraciones de glucosa, presentan, bajo condiciones aeróbicas, una fuerte disminución de la respiración, desviando su metabolismo hacia la fermentación; a este fenómeno, muy común en las levaduras y que solo se presenta cuando el sustrato energético es la glucosa, se le conoce como "Contraefecto Pasteur" o "Efecto Crabtree" (67,74).

Los mecanismos por los que se presenta este fenómeno actualmente, están bien definidos; la inhibición de la respiración, en presencia de altas concentraciones de sustrato, se debe a la gran acumulación de energía (en forma de ATP) más que a la acumulación de metabolitos. La alta concentración de ATP en la célula inhibe la síntesis de citocromos a, b y c y esto ocasiona que el proceso de la respiración se inhiba casi totalmente y empieza a funcionar el mecanismo de la fermentación. En otras palabras, el efecto Crabtree es el mecanismo por el que la célula ajusta la cantidad de energía necesaria para sus funciones metabólicas pero el efecto es contrario del Efecto Pasteur, es decir, la célula impide la sobresaturación energética, por un cambio de metabolismo a un proceso en el que la cantidad de energía producida sea menor.

Si la célula, cuando ha cambiado a la fermentación, se

encuentra con que la concentración de sustrato ha disminuido y que la cantidad de energía producida ya no es suficiente para su metabolismo, entonces; hará de nuevo la conversión de la ruta metabólica, volviendo a la respiración a través de la desrepresión de la síntesis de citocromos a, b y c. De esta forma, se presentará el efecto Pasteur (29,30,74,77).

2.6.6.3. EFECTO PASTEUR NEGATIVO Y EFECTO CUSTERS.- El efecto Pasteur Negativo, se refiere a la fuerte represión de la fermentación alcohólica presentada por un cultivo joven suspendido en un amortiguador adecuado y bajo anaerobiosis comparada con la que presenta en condiciones aeróbicas. Probablemente, este efecto sea debido a que las células en estado joven, en la fase logarítmica de su crecimiento, necesitan de mayor cantidad de energía y de metabolitos necesarios para la biosíntesis de sus componentes celulares y al reprimir los mecanismos de la fermentación y dar lugar a los de la respiración, ellas pueden obtener sus requerimientos más fácilmente (67,77).

En el efecto Custers, el fenómeno que se presenta es muy poco común y solamente las levaduras del género Brettanomyces lo llevan a cabo. Se cree que éste fenómeno se debe a una mutación ocurrida en estos organismos y esta da lugar a que, bajo condiciones aeróbicas, fermenten glucosa en un grado más alto de lo que lo hacen en condiciones anaeróbicas y por lo tanto, la

aerobiosis estimula la fermentación alcohólica (77).

2.6.7. MECANISMOS DE TRANSPORTE.- Las regiones externas de la célula, la pared celular particularmente, tienen un papel indirecto en el transporte de moléculas o iones hacia el interior de la célula; el papel de la pared celular no es específico en los procesos de translocación. Es obviamente, la membrana plasmática la que posee todas las propiedades de enlace específico y activo en la comunicación del material entre la célula y su alrededor (17,67,53).

Los procesos por los que las levaduras pueden transportar material del exterior hacia el interior de las células o viceversa, están clasificados en dos tipos: la difusión simple y el transporte por acarreadores (67)

2.6.7.1. DIFUSION SIMPLE.- Se define como difusión simple, al proceso por el cual, ocurre un movimiento a través de la membrana, de moléculas o iones, que presenta las siguientes características: a. es no-específico; b. no saturable y c. no requiere de energía metabólica.

Existen 4 mecanismos por los que puede ocurrir la difusión simple:

1.- Involucra el transporte de moléculas de relativamente alta liposolubilidad en membranas lipídicas y su subsecuente distribución a ambos lados de la membrana; de acuerdo a su coeficiente de partición. Para la levaduras éste es el mecanismo de transporte para etanol y o-

tros alcoholes, ácidos orgánicos no disociados, ésteres orgánicos y la mayoría de las drogas; también, a través de éste proceso pueden transportarse hidrocarburos y pa rafinas.

2.- El segundo mecanismo aprovecha los llamados "nudos" o poros de la membrana plasmática, presentes en su estructura lipídica. Cada poro puede albergar varias moléculas o iones pequeños que son transportados de acuerdo a un gradiente de concentración. Aparentemente, este mecanismo es utilizado para el transporte de agua, urea, glicoles y pequeños alcoholes y también para otras moléculas pequeñas que sean solubles en agua.

3.- Este mecanismo depende de poros que contienen agua, formados por proteínas globulares integrales de la membrana. En este caso, no se trata de movimiento de molécula por molécula sino más bien, se trata de un flujo de solución. Probablemente, solo tenga lugar para el transporte de agua aunque también pueden transportarse de esta forma, compuestos disueltos en agua contenida en los poros de la membrana.

4.- El último mecanismo depende principalmente de la forma de las células ya que se lleva a cabo, solamente en membranas de forma circular o curvada, por un proceso de flexoelectricidad. De esta forma pueden ser transportadas agua y otras sustancias, principalmente cationes. Este mecanismo es ampliamente utilizado por las levaduras gemantes en donde los brotes jóvenes alcanzan su mayor curvatura (17,25,67,74,77).

2.6.7.2. TRANSPORTE POR ACARREADORES.- La gran mayoría de compuestos químicos importantes para las levaduras, usan proteínas específicas como vehículos para transportarse a través de la membrana plasmática. Estas proteínas específicas se conocen como acarreadores aunque, también pueden llamarse permeasas, traslocadores o portadoras. Existe una gran variedad de formas por las que un acarreador puede llevar a una molécula a uno y otro lado de la membrana; en general, se les puede clasificar en dos tipos principales:

1.- Aquellos en los que el sustrato pasa al interior o al exterior de la célula, según sea el caso, sin que su estructura química sea modificada y que utilizan una, dos o hasta tres proteínas acarreadoras e inclusive, pueden utilizar cofactores adicionales (74,77).

2.- Aquellos en los que el sustrato, durante el transporte; sufre una alteración en su estructura química y que para llevarse a cabo necesitan de la intervención de compuestos de tipo enzimático proporcionados por la membrana (54,67).

Cualquiera que sea el tipo de transporte por acarreadores que las células utilicen, para que se lleven a cabo necesitan de energía metabólica y además, se trata de mecanismos específicos y saturables.

Las sustancias que pueden ser transportadas por algunos de estos dos mecanismos son:

A.- Monosacáridos: los que comúnmente se transportan son: glucosa, galactosa y los azúcares tipo piranosa cualquiera que sea la posición de sus grupos hidroxilo

(axial o ecuatorial). Este mecanismo se ve afectado - adversamente por la aerobiosis.

B.- Disacáridos: el transporte depende del tipo de disacárido; algunos son degradados en el exterior de la célula antes de ser transportados (como la sacarosa) y otros son transportados intactos hacia el interior (como la maltosa). En estos casos puede ocurrir la acumulación de sustrato en el exterior de las células debido a que las proteínas acarreadoras correspondientes, tienen un tiempo de vida corto. Algunas especies no poseen la capacidad de sintetizar estas proteínas acarreadoras y por lo tanto no pueden transportar ciertos disacáridos y esto ocasiona que presente reacciones negativas para su asimilación y/o fermentación.

C.- Aminoácidos: el transporte de estos compuestos es unidireccional y para evitar el inundamiento de la célula con ellos, se lleva a cabo un proceso de inhibición por concentración que funciona cuando la concentración del aminoácido dentro de la célula es suficiente para sus necesidades primarias. La anaerobiosis reduce fuertemente el transporte de aminoácidos.

D.- Péptidos: en la mayoría de las especies de levaduras, los péptidos son transportados intactos al interior de la célula y ya adentro son hidrolizados.

E.- Bases Púricas y Pirimídicas: las bases de ácidos nucleicos son transportadas intactas por las levaduras; - estos organismos poseen dos sistemas de transporte: el primero es utilizado para la adenina, guanina, hipoxan-

tina y citosina y el segundo funciona para uracilo pero no para timidina. Este mecanismo es afectado por iones Sodio y Potasio (adversamente) y es estimulado por iones Hidrógeno.

F.- Vitaminas: La mayoría de las vitaminas son transportadas por mecanismos específicos para cada una y por lo tanto, si una levadura es capaz de utilizar una vitamina, esto no implica que sea capaz de utilizar otra.

G.- Ácidos Orgánicos: cuando se encuentran en forma no disociada, los ácidos orgánicos son transportados por difusión simple; cuando se encuentran disociados, necesitan de acarreadores para su transporte y el proceso es estimulado por iones Hidrógeno.

H.- Cationes: algunos cationes, sobre todo los monovalentes, son transportados a través de mecanismos de di fusión simple; sin embargo, no sucede así para los cationes divalentes como el Mg, Ca, Sr, Mn, Fe, Co y Ni. En estos casos, el transporte de cada catión divalente posee sitios específicos y se realiza a expensas del ATP. Este tipo de transporte se ve inhibido por el pH del medio y por competencia por cationes monovalentes.

I.- Aniones: el transporte de iones fosfato se lleva a cabo mediante dos sistemas: uno manejado por iones sodio, que es de alta afinidad y otro, de baja afinidad, manejado por iones potasio. El transporte de iones sulfato se lleva a cabo mediante un sistema dependiente de la concentración de glucosa en el medio de desa-

rrollo y es inhibido competitivamente por iones sulfuro, tiosulfato, cromato y otros aniones (25,67,77).

2.6.7.3. REGULACION DE LOS MECANISMOS DE TRANSPORTE.- Existe un gran número de interacciones directas e indirectas entre diferentes clases de compuestos durante los eventos de transporte; así, diversos cationes pueden ser intercambiados por un acarreador; los iones Hidrógeno o Sodio pueden acompañar a ciertos solutos enlazados a su acarreador, etc.

Debido a estos eventos, existen una gran gama de factores que pueden afectar la velocidad real de transporte algunos de estos factores, que son llamados factores regulatorios son:

1.- La posición de la célula dentro del ciclo celular o su fase de desarrollo en el cultivo, puede afectar el nivel de alguna proteína acarreadora.

2.- El estado fisiológico de la célula (inanición contra enriquecimiento con sustratos energéticos) afecta practicamente todos los transportes activos en levaduras anaerobias facultativas, probablemente por regulación en la biosíntesis de los componentes de la bomba de protones.

3.- La incubación con glucosa antes de que la célula desarrolle en su medio definitivo, la predispone para una síntesis más rápida de algunos sistemas de transporte de no-electrolitos específicos.

4.- La longevidad de los sistemas de transportes, particularmente los inducibles, pueden influenciar en el transporte de ciertos compuestos químicos (25,54,56,74,77,79).

3. LA PROTEINA MICROBIANA.

3.1. DEFINICION Y ASPECTOS GENERALES DE LA PROTEINA MICROBIANA.

3.1.1. DEFINICION.- El término PROTEINA UNICELULAR significa o identifica alimentos proteicos derivados de microorganismos unicelulares crecidos en cultivos sumergidos en diversas fuentes o desperdicios. También se le conoce como proteína microbiana, biomasa o SCP (Single cell protein)(76).

3.1.2. ASPECTOS GENERALES.- Existe hoy en día la necesidad de producir grandes cantidades de proteína para consumo humano y animal, pues las fuentes convencionales - agricultura, ganadería y pesca - no satisfacen totalmente la demanda, y se considera que muy probablemente el problema se agudice a medida que la población mundial aumente. La ausencia de un equilibrio entre el incremento de la población mundial y la producción de alimentos se ve notablemente afectada por la baja mortalidad y una distribución inadecuada de los alimentos (8,57).

3.1.3. MICROORGANISMOS MAS FRECUENTEMENTE UTILIZADOS EN LA PRODUCCION DE PROTEINA MICROBIANA - Los microorganismos representan una fuente potencial de alimentación debido a que contienen las proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales que son comunes y requieren muchas formas de vida (97).

Los grupos de microorganismos que han sido considerados como posibles fuentes de proteína son los siguientes: - bacterias, levaduras, hongos, algas y líquenes.

3.1.3.1. BACTERIAS.- Las bacterias han sido consideradas como posibles fuentes de SCP hasta hace relativamente poco tiempo. Roberts (1953) demostró que era posible obtener un suplemento del forraje a partir de E. coli. El hecho de que las bacterias sean capaces de crecer -- en hidrocarburos del petróleo como fuente de Carbono ha aumentado el interés de algunos investigadores sobre este grupo. Aunque solo se produzca a escala de laboratorio (97).

Si el metano es el sustrato a emplear, Pseudomonas methanica podría ser el organismo de elección; pero, si se utilizan hidrocarburos de cadena larga, tales como n-hexadecano o n-octadecano, podrían utilizarse especies de Nocardia, Mycobacterium, Micrococcus o aún Pseudomonas oleovorans (57,97).

Otros: Bacillus stearothermophilus (crece en n-parafinas a 70°C), Hydrogenomonas eutropha (8).

3.1.3.2. LEVADURAS.- De las decenas de géneros y centenas de especies de levaduras, pocas han sido utilizadas comercialmente y aún son menos las que han sido propuestas como posibles fuentes de proteínas. Dos especies en particular han sido utilizadas como alimento y proteína forrajera: Candida utilis y Saccharomyces carlsbergensis (97). Candida utilis crece bien en sustratos tales como licores sulfíticos e hidrolizados de celulosa. Y tiene como ventaja que no requiere de factores de crecimiento - accesorios para su desarrollo, así como la alta velocidad de desarrollo que presenta a las bacterias, por lo que la contaminación no es un problema serio cuando se está produciendo C. utilis.

Saccharomyces carlsbergensis es un claro ejemplo del uso de la levadura para un propósito secundario (la producción de SCP); ya que primariamente se usa para la producción de una bebida fermentada tipo cerveza.

Otras especies útiles: Candida tropicalis (crece en hidrocarburos), Candida intermedia, Candida linolytica (crecen en hidrocarburos C_{14} a C_{18}) y Saccharomyces fragilis (crecida en suero de queso Cottage) (57).

También han sido utilizadas Rhodotorula gracilis (lico- res sulfíticos) y Saccharomyces cerevisiae (melazas)(8)

3.1.3.3. HONGOS.- Algunos de los géneros empleados son: Fusarium, Aspergillus, y Rhizopus (8).

3.1.3.4. ALGAS.- Un alimento derivado de microorganismos autótrofos, por sus requerimientos de crecimiento en CO₂ atmosférico en vez de carbohidratos, sería ideal para la obtención de SCP. El gran interés en las algas se basa en los siguientes hechos: (1) sintetizan cantidades considerables de proteína de alta calidad; (2) pueden ser cultivadas en forma continua; (3) son una rica fuente de vitaminas C y del complejo B; (4) utilizan la energía solar más eficientemente que los vegetales; (5) acumulan cantidades considerables de carbohidratos y lípidos; (6) pueden utilizar CO₂ como fuente de Carbono; (7) no requieren cantidades excesivas de agua; (8) pueden utilizar los espacios no útiles a la agricultura (28).

Especies útiles: Scenedesmus acutus (crece en CO₂ y luz solar), Spirulina maxima (bicarbonato, CO₂ y luz solar) Chlorella ellinsoidea, Chlorella pirenoidosa.

Solo en el lejano oriente las algas han sido utilizadas como alimento humano. En el Japón, el alga Laminaria es conocida como kombu. Según Mitsuda (1967) Chlorella es utilizada como un aditivo para el yogurt, helados y productos relacionados. Porphyra ha sido también utilizada en un alimento a base de pescado conocido como sashi. También se ha utilizado en la elaboración de macarrón japonés, sopas y salsas. Lo mismo que Caulerpa racimosa y Spongeococcum (8,27,28).

3.1.3.5. LIQUENES.- Los líquenes son simbioses compuestas por la asociación alga-hongo y en caso extremo de mezcla de cultivos. Han sido utilizados como alimentos durante muchos años, remontándose hasta la época de los faraones egipcios, como un aditivo del pan. Una asociación muy utilizada según Pérez de LLano es Centraria islandica (8).

3.1.4.-CARACTERISTICAS DESEABLES DE LOS MICROORGANISMOS.- Ciertas características de un microorganismo deberían ser cuidadosamente evaluadas antes de considerarse para propósitos de alimentación. Estos requerimientos son los siguientes:

- a. Rápido crecimiento a partir de medios asequibles, es decir, de materiales nativos no costosos.
- b. Requerimientos nutricionales simples.
- c. Desarrollo en cultivo de superficie y continuo.
- d. Separación y cosecha sencillas.
- e. Resistencia a la contaminación y fermentación estable.
- f. Propiedades genéticas y fisiológicas conocidas y capacidad para mejorarlas genéticamente.
- g. Utilización eficiente de la fuente de energía.
- h. Propiedades no tóxicas y no alergénicas.
- i. Sabor agradable y obtención rentable.
- j. Contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos de alta calidad.
- k. Requerimientos sencillos de almacenamiento y empacado (8,27).

3.1.5. MODELOS MATEMATICOS DEL CRECIMIENTO MICROBIANO.- El término "modelos matemáticos" se define como una especificación matemática de las interrelaciones entre las partes de un sistema. La especificación toma la forma de una ecuación matemática. Un sistema puede definirse como el conjunto de objetos físicos o abstractos. El sistema modelo se logra haciendo suposiciones y generalizaciones acerca de la naturaleza del sistema microbiológico. Los resultados del análisis matemático son aplicables únicamente al sistema modelo. La aplicabilidad de los resultados al sistema biológico dependerá de la validez de las suposiciones (figura 3.1).

Los principales propósitos de los modelos matemáticos - pueden resumirse a continuación:

- A. La construcción de tales modelos provee una manera sistemática para el estudio del comportamiento de sistemas específicos con los datos experimentales que se dispongan. Esta aproximación permite ser riguroso en el planteamiento de definiciones. Términos tales como; biomasa producida, Oxígeno consumido, han de ser expresados en la forma de ecuaciones matemáticas las cuales no permiten ambigüedad en la interpretación.
- B. Los modelos proveen una guía útil para el diseño y operación de procesos en Microbiología Industrial. - Sobre todo en el control de los parámetros con el fin de optimizar los procesos.
- C. Pueden ser utilizados para predecir anroximadamente el comportamiento de una población, aunque éste no -

haya sido estudiado anteriormente (100,101).

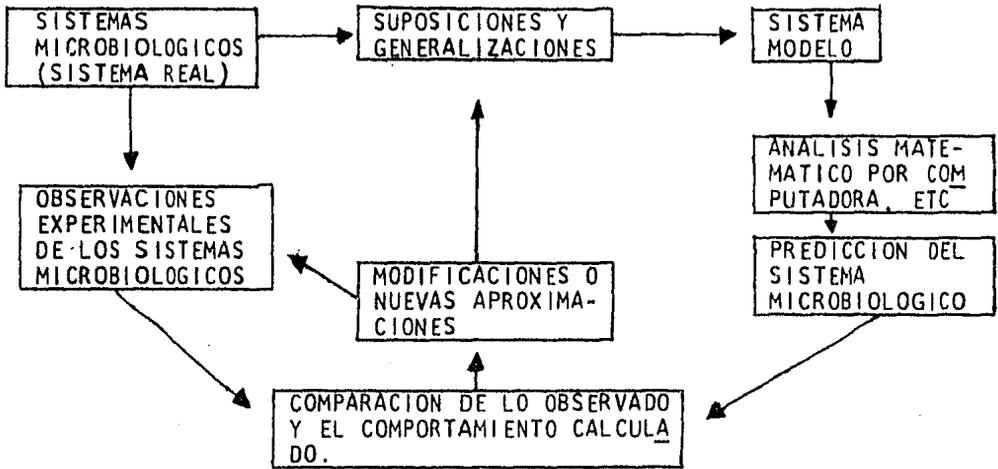


FIGURA 3.1 Pasos en la construcción de modelos.

Una útil clasificación de los modelos fue sugerida por Tsuchiya (1966) (figura 3.2).

La primera distinción la hace entre los modelos que toman en cuenta las interacciones entre los microorganismos y su ambiente y las que no la toman en cuenta. La segunda distinción toma encuenta las diferencias entre las células individuales (modelo segregado), es decir, las variaciones en su composición interna con la actividad metabólica y otros factores (descritos en términos del estado fisiológico). Y los modelos que no los toman en cuenta, denominados no segregados, los cuales tratan la masa celular del cultivo como una variable fundamental.

La tercera distinción divide los modelos en estructura

dos y no estructurados. Los estructurados dividen la biomasa en dos partes componentes: la masa-G, o masa de los ácidos nucleicos; y, la masa-D la cual incluye el resto de la biomasa (100,101).

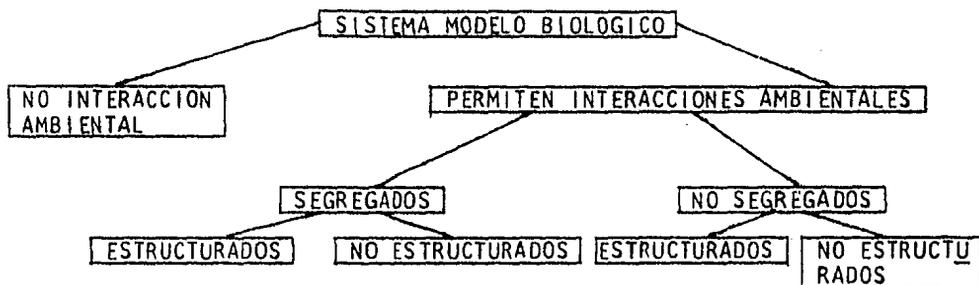


FIGURA 3.2. Clasificación de los modelos matemáticos según Tsuchiya.

3.1.5. EL CRECIMIENTO EXPONENCIAL Y LA ECUACION DE MONOD.- Al fi

nal de la fase lag los microorganismos se han adaptado al nuevo ambiente. Las células se multiplican rápidamente, y la masa celular o número de células vivientes, se duplica regularmente con el tiempo. Este comportamiento se describe por las ecuaciones siguientes:

$$dn/dt = \mu n; \quad 1/n \, dn = \mu dt$$

integrando la ecuación entre los límites n_0 (número de células en el inóculo) a n ; y, t_0 (tiempo de duración de la fase lag) a t , se obtiene:

$\ln n/n_0 = \mu(t - t_0)$; resolviendo esta ecuación, se obtiene:

$n = n_0 e^{\mu(t - t_0)}$; si se tiene el caso de que el número de células en el medio en un momento dado es el doble del número de células iniciales; el tiempo será el

tiempo de duplicación.

$$n = 2n_0 \quad \text{y} \quad t = t_d; \quad \text{entonces} \quad t_d = \ln 2 / \mu$$

Este modelo no toma en cuenta las interacciones debidas al medio en el que se tiene al microorganismo (4).

Cuando el crecimiento de un cultivo de lote solo está limitado por la cantidad inicial de sustrato, la curva de crecimiento puede expresarse en términos de los parámetros de crecimiento. La ecuación de Monod describe la relación entre la velocidad específica de crecimiento, μ , y la concentración del nutriente limitante, S , en cultivo microbiano.

$$f(S, n_0); \quad dn/dt = \mu n \quad (1)$$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S/K + S}{S} \quad (2)$$

$$n - n_0 = Y(S - S_0) \quad (3)$$

donde n_0 y S_0 son los valores iniciales de la concentración de biomasa y el sustrato limitante, respectivamente. Sustituyendo μ y S en la ecuación (1) se obtiene:

$$dn/dt = \mu_{\max} \left(\frac{YS_0 + n - n_0}{n} \right) \frac{n}{K Y + S_0 Y + n - n_0} \quad (4)$$

La ecuación (2) está representada en la figura 3.3 donde se grafica como función de la concentración de sustrato. El valor K se obtiene cuando $\mu = 0.5 \mu_{\max}$. La tabla 3.1 es una recopilación de las constantes de saturación para diversos sustratos (1,4,64,76).

3.1.5.2. OTROS MODELOS MATEMATICOS.- Otros modelos relacionados con la dependencia de la velocidad específica de creci-

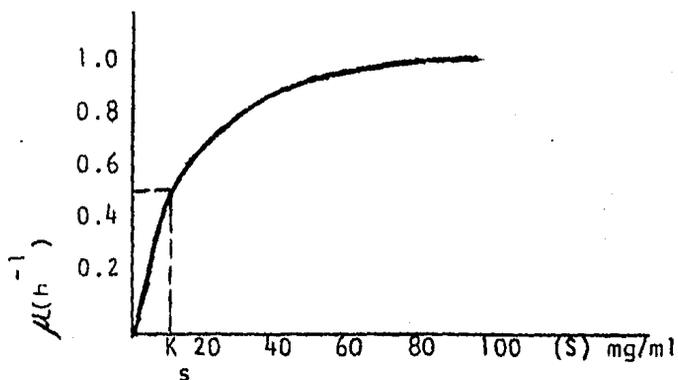


FIGURA 3.3. Ecuación de Monod.

TABLA 3.1. Constantes de saturación para diversos sustratos y microorganismos (64).

MICROORGANISMO	SUSTRATO LIMITANTE	K (mg/ml)
		s
Escherichia sp.	glucosa	6.8×10^{-2}
Escherichia sp.	glucosa	4.0×10^{-2}
Escherichia sp.	Manitol	2.0×10^{-2}
Candida sp.	Glicerol	4.5×10^{-1}
Candida sp.	Oxígeno	4.5×10^{-2}
Candida sp.	Oxígeno	4.2×10^{-2}
Saccharomyces sp.	Glucosa	25×10^{-2}
Aspergillus so.	Glucosa	5.0×10^{-1}
Klebsiella sp.	iones magnesio	5.6×10^{-1}
Klebsiella sp.	iones potasio	3.9×10^{-1}

miento se han propuesto para ejemplos en particular - porque dan mejores resultados para esos datos experimentales. Por ejemplo, Teisser, Moser y Contois sugie

ren los siguientes modelos:

$$\text{Teisser: } \mu = \mu_{\max} \left(1 - e^{-S/K} \right)$$

$$\text{Moser: } \mu = \mu_{\max} \left(1 + K S^{-1} \right)^{-1}$$

$$\text{Contois: } \mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{B + S} \right)^n$$

Von Bertalanffy sugiere la hipótesis de que el crecimiento representa el resultado de la competencia entre dos procesos antagónicos: la síntesis o asimilación y la degradación o metabolismo endógeno; y asume que la velocidad de degradación es proporcional a la masa del protoplasma de la célula. Por otra parte, asume que la asimilación es dependiente de las condiciones ambientales, es decir, de la concentración del sustrato limitante; y además, postula que la velocidad de la asimilación depende del área de contacto de la célula, o σ .

Quedando la expresión matemática como sigue:

$$dm/dt = V(C)\sigma - \mu_{cm}$$

donde m es la masa y t la edad del cultivo (4,101).

3.2. IMPORTANCIA DE LA PROTEINA DE ORIGEN MICROBIANO.

3.2.1. VENTAJAS DE LA PROTEINA MICROBIANA.- La idea de producir proteína utilizando microorganismos, no es nueva, pero hace solo unos cuantos años se reconoció que la proteína unicelular constituía la mejor esperanza como fuente de producción independiente del suelo y las condiciones agrícolas; la proteína unicelular tiene las siguientes ventajas:

A.- Los microorganismos no dependen de las condiciones a-

grícolas o de clima, sino que son cultivados en grandes fermentadores. En comparación con la agricultura tradicional el grado de control sobre las condiciones de crecimiento de la SCP es único. Los parámetros que son disponibles para el control del cultivo en lote o continuo son: concentración de los nutrientes, el pH, la temperatura, la concentración de Oxígeno y la concentración celular. La incertidumbre del ambiente, las plagas de la agricultura, las heladas, las lluvias, etc. no afectan la producción de SCP (8,27,97).

B. Los tiempos de duplicación de masa son cortos.

Los tiempos de duplicación de la proteína unicelular son del orden de minutos, comparados con períodos de días para plantas y semanas para animales (ver tabla 3.2) (76).

TABLA 3.2 Tiempo de duplicación de masa de diferentes organismos.

ORGANISMO	TIEMPO DE DUPLICACION DE MASA
Bacteria y levadura	10 a 120 minutos
Hongo y alga	2 a 6 horas
Pasto y algunas plantas	1 a 2 semanas
Pollos	2 a 4 semanas
Ganado porcino	4 a 6 semanas
Ganado vacuno	1 a 2 meses
Humanos	0.2 a 0.5 años

C. Posibilidad de experimentación genética. Uno de los aspectos interesantes de la proteína microbiana es la posibilidad de que el contenido proteico de las células, pueda ser cambiado por selección de mutantes adecuadas.

Un cambio genético que sustituya un aminoácido afecta muy poco el porcentaje de proteína total. Un cambio en un número mayor de aminoácidos para lograr un cambio sustancial en su contenido, podría significar la pérdida de viabilidad de la célula (97).

D. La producción no está limitada por la superficie o la luz solar, es decir, que la producción puede llevarse a cabo en pequeñas superficies, no útiles para la agricultura. La falta de luz solar solo afecta la producción de SCP a partir del alga.

E. Mayor eficiencia de conversión del sustrato. La tabla 3.3 presenta algunos ejemplos al respecto (76).

TABLA 3.3. Producción relativa de varios alimentos a partir de azúcar.

ALIMENTOS	g DE ALIMENTOS/100 g DE AZUCAR
Carne de res	8 a 12
Carne de pollo	10 a 15
Leche	15 a 20
Levadura	45 a 55
Licor azucarado	90 a 100

F. Requerimientos nutritivos simples.

G. Alto contenido de proteínas. La tabla 3.4 muestra el contenido proteico de algunas fuentes de proteína microbiana (103).

TABLA 3.4. Concentración de proteína cruda en levadura.

LEVADURAS	MEDIO DE CULTIVO	% EN PESO SECO
Torula sp.	Melaza de caña	57.8
Torula sp.	Jugo de ciruela	62.5
Saccharomyces sp.	Cerveza	47.8
Torula sp.	-----	51.5
Saccharomyces sp.	-----	48.8
Saccharomyces sp.	Melaza de caña	50.0
Torula sp.	Licor sulfítico	50.0 a 53.0
Torula sp.	Melaza de remolacha	58.4
Saccharomyces sp.	Melaza de remolacha	61.55

H. Alto contenido de vitaminas y minerales. (ver tabla 3.5) (97).

TABLA 3.5 Análisis aproximado de C. utilis crecida en licores sulfíticos.

COMPOSICION GRUESA (%)		VITAMINAS (g/g)	
Humedad	6	Biotina	2
Fósforo (P)	2	Acido fólico	21
Calcio (Ca)	1	Niacina	417
Grasa cruda	5	Acido pantoténico	37
Proteína cruda	47	Piridoxina.HCl	33
Cenizas	9	Riboflavina	45
Carbohidratos	27	Tiamina	5

3.2.2. DESVENTAJAS DE LA PROTEINA MICROBIANA.- La seguridad de la SCP como producto para su consumo es uno de los aspectos que más ha preocupado a los investigadores. La experiencia que de ello se tiene es de pruebas realizadas en pollos y ratas para determinar su toxicidad, el efecto en la reproducción y en los tejidos. Las desventajas que a continuación se describirán deberán ser lo suficientemente evaluadas (76).

A. Alto contenido de ácidos nucleicos. El metabolismo de las purinas de la dieta y de las sintetizadas en el organismo conduce a un producto de desecho: el ácido úrico. Normalmente alrededor de la mitad del ácido úrico total es eliminado por la vía urinaria. Su valor normal es de 2.5 a 7 mg/100ml en suero o plasma (99). Un exceso puede producir depósitos en el tracto urinario o en articulaciones (gota).

Edozien (32) encontró que una ingesta diaria de 32 g (5 a 6 mg/100ml de Ac. úrico en suero) de C. utilis, resultaba segura. Waslien (106) trabajando con individuos sanos y RNA de levaduras llegó a conclusiones semejantes (ver tabla 3.6).

B. Posible presencia de compuestos carcinogénicos. Esto se debe a la presencia de residuos contaminantes presentes en microorganismos crecidos en hidrocarburos, la cual es del rango de partes por billón (3).

C. Reacciones dérmicas adversas. Blackwell (1969) sugiere que este hecho se explica por el alto contenido de histamina y tiramina en algunos productos de SCP(9)

TABLA 3.6. Efecto de la ingestión de ácidos nucleicos sobre la uricemia y la uricosuria en individuos sanos.

DIETA	DIAS DEL EXPERIMENTO.	CONCENTRACION AC. URICO EN SUERO(mq/100ml)	CONCENTRACION AC. URICO EN ORINA (24h).	REF.
Control*	15	4.9	373	106
2 g PNA*	15	6.0	667	106
4 g PNA*	15	7.7	939	106
8 g PNA*	15	9.4	1393	106
Control**	16	4.5	510	32
45 g lev.**	9	7.2	1192	32
90 g lev.**	9	8.8	1853	32
135 g lev.**	9	9.4	1871	32

* más 75gde proteínas ** más 100 g de proteínas

C. Intolerancia humana. Waslien (1969) trabajando con voluntarios y alimentándolos con Hydrogenomonas eutropha y Aerobacter aerogenes en dosis de 6 a 17 g - por persona por día reportó los siguientes efectos - adversos: síntomas de vértigo, náusea, vómito y diarrea (105).

E. Necrosis hepática dietaria. Hock y Fink (1943) descubrieron este hecho en ratas alimentadas con proteína de levadura y lo atribuyeron al bajo contenido de aminoácidos sulfurados presentes en la dieta (tabla - 3.7). Este descubrimiento causó desconcierto y confusión durante 15 años. En 1949 György y Golblat señalaron que el daño hepático aparecía a los 120 días y también se producía con dietas bajas en caseína, y

en algunas dietas con levaduras no se presentaba (American brewers' yeast). Schwarz (1944) encontró que el alfa-tocoferol protegía contra la necrosis hepática dietaria. Y en 1951 descubrió en la caseína un compuesto orgánico de selenio que confería protección contra el daño hepático (2,26,41,97).

TABLA 3.7. Comparación de aminoácidos esenciales en microorganismos (2).

AMINOACIDO*	<u>C. utilis</u>	<u>Kloeckera</u>	<u>Chlorella</u>	<u>C. boidinii</u>	FAO
Cisteína	1.4	---	---	---	2.0
Isoleucina	7.9	5.1	3.6	4.0	4.2
Leucina	7.5	7.1	4.0	5.3	4.2
Lisina	8.7	7.5	7.8	6.0	4.2
Metionina	1.8	0.9	2.0	0.8	2.2
Fenilalanina	5.1	4.0	4.8	3.4	2.8
Treonina	5.5	5.1	3.4	4.4	2.8
Triptofano	1.4	---	1.5	---	1.6
Valina	6.3	5.3	5.8	4.6	4.2
Tirosina	---	---	2.9	---	4.2

* Todos los datos en gramos de aminoácido por 100 g de proteína.

3.2.3. USO DE LA PROTEINA MICROBIANA PARA LA ALIMENTACION ANIMAL.- Es en éste aspecto donde se encuentra más generalizado el uso de la SCP, y en donde se tienen mayores experiencias, sobre todo en el uso de formulaciones para la alimentación de vacas, caballos, cerdos y aves de corral.

De acuerdo a Carter y Phillips (1944) el consumo de le-

vaduras por las vacas, aumenta la producción de leche de alta calidad. También señala que la utilización de levaduras para la alimentación de cerdos es notablemente satisfactoria.

En experimentos llevados a cabo por la North American - Rockwell Corporation, se logró mejorar la pigmentación de la yema de huevo de gallina, introduciendo en el consumo de éstas, el alga Spongoecocum.

Oswald y Gouleke (1968) encontraron que un nivel del 10% de alga en una mezcla de alga y cebada era el adecuado para la alimentación de los cerdos, y un nivel mayor para las ovejas (8,103).

3.2.4. USO DE LA PROTEINA MICROBIANA PARA LA ALIMENTACION HUMANA.-

El uso de microorganismos para la elaboración de alimentos se encuentra muy difundido en el lejano oriente y algunos se conocen con los nombres de: kombu (alga Laminaria) sushi (alga Porphyra), dulce (a partir de una alga roja); así como alimentos fermentados con hongos como: tempoh entoeh, nano y sufu. En el norte de Europa, se han empleado bacterias para consumirlas como productos fermentados; yogurt, kefir, "pickles".

Clement (1968) señala que un alga verde-azul, Spiculina maxima, ha sido consumida desde tiempos inmemoriales en la isla de Chad.

Jorgensen y Convit (1961) califican el consumo de una alga en sopas de pacientes del hospital de leproso de Cabo Blanco, Venezuela, como: "agradable, nutritivo y beneficioso".

Según Locke (1945), los soldados alemanes consumieron - durante la Segunda Guerra Mundial Torula utilis, al nacer sin efecto tóxico aparente (8,27,29,97).

3.2.5. CONSIDERACIONES SOBRE EL COSTO DE PRODUCCION Y DISPONIBILIDAD DE LOS SUSTRATOS.- El costo de la producción es el factor más importante, pues de ello depende que el costo de la proteína sea competitivo o no. Cuando se le considera es necesario tener en perspectiva los otros usos que tiene el sustrato, ya que cualquier incremento en su uso aumentará su demanda, y lógicamente su precio. Se considera que la materia prima o sustrato - representa del 30 al 50% del costo total de la producción.

La cantidad y localización del sustrato es de importancia primordial, pues afecta el precio de la materia prima (almacenamiento, transporte) y a la vez puede determinar el tamaño máximo de la planta.

Reed y Lerner (1973) indican que es posible producir SCP a partir de metanol, a un costo de US\$300 por tonelada, siempre que se disponga de metanol a un precio menor de US\$0.08 por galón, se tenga una productividad de 2.5g/l/h y se obtengan 0.35g de células (seco) por gramo de metanol utilizado.

Fischer (1955) señala que el costo de producción de Chlorella es muy alto (US\$ 20 a 50 por libra) debido al uso de sistemas de control de temperatura costosos y equipos de mezclado (8,26,57,76).

3.2.6. VALOR NUTRICIONAL DE LA PROTEINA MICROBIANA.- Para la estimación del valor nutricional de una proteína, el Grupo Asesor de Proteínas (ONU) y el Science Advisory Comitee han establecido dos tipos de pruebas: in vivo e in vitro (norma 15, GAP, 1974).

METODOS IN VIVO.- Consisten en dietas experimentales su ministradas a ratas jóvenes en tres o más niveles que van del 10 al 50% del contenido total de proteínas de la dieta. Y se averigua el estímulo en el crecimiento y la retención de Nitrógeno cuando se administran como fuente de proteínas.

El Nitrógeno absorbido (A) puede ser calculado del Nitrógeno ingerido (I) como sigue:

$$A = I - \text{Nitrógeno fecal}$$

Y el Nitrógeno retenido (B) está dado por:

$$B = A - \text{Nitrógeno urinario}$$

La cantidad de Nitrógeno perdido en las heces y orina debería ser corregido por las pérdidas endógenas, es decir, el Nitrógeno que está siendo excretado al final de un período de prueba en una dieta no proteica. El Nitrógeno retenido por unidad de Nitrógeno absorbido B/A es denominado el valor biológico y el Nitrógeno absorbido por unidad de Nitrógeno ingerido A/I se denomina digestibilidad de la proteína.

La utilización proteica neta (NPU) es la proteína retenida por unidad de proteína ingerida B/I y también es equivalente al producto del valor biológico por la digestibilidad.

$NPU \delta B/I = B/A \delta BV \times A/I \delta D$

Otra medida de respuesta biológica es la razón de eficiencia proteica (PER) que es igual al cociente de los pesos ganados por unidad de peso de proteína ingerida.

MÉTODOS IN VITRO.- Son tres los principales métodos in vitro que se basan en métodos químicos:

a. Cómputo químico.- Se basa en comparar, utilizando la proteína de huevo entero como standard, la concentración de cada aminoácido esencial (corregido a 16g de Nitrógeno) en el alimento analizado, expresado como un porcentaje de la concentración del mismo aminoácido en el huevo entero. El valor más bajo obtenido es tomado como cómputo químico, ya que el aminoácido limitante determina el valor de la dieta proteica.

b. Índice integrado de Kuhnau.- Para esta estimación se utiliza como proteína de referencia la leche materna. Se suman los porcentajes de los aminoácidos esenciales más la cistina, arginina y tirosina, en la mezcla proteica de referencia y en la proteína de prueba. El valor del índice se expresa como la relación entre la suma en la proteína de prueba y en la de referencia.

c. Índice de aminoácidos esenciales de Oser. Este índice utiliza la proteína de huevo como standard y en su cálculo se incluyen los aminoácidos esenciales más la cistina, tirosina, histidina y arginina. La concentración de los aminoácidos se corrige a 16 g de Nitrógeno.

(38,62,103)

TABLA 3.8. Calidad proteica en productos de SCP (97).

SCP	ANIMAL	D(%)	PER	BV	TRATAMIENTO
<u>Chlorella</u> sp.	rata	65.4	1.25	54.3	secada
<u>Spirulina</u> sp.	rata	84.0	2.45	72.0	secada
<u>Micrococcus</u> sp.	rata	----	----	76.0	secada
<u>H. eutropha</u>	rata	83.8	----	77.6	liofilizada
<u>Fusarium</u> sp.	rata	----	----	72.5	secada
<u>Candida utilis</u>	rata	86.5	1.15	38.0	secada

3.3. METODOS PARA LA REDUCCION DEL CONTENIDO DE ACIDOS NUCLEICOS EN LA PROTEINA MICROBIANA.- Maul y Sinskey (1970) -- desarrollaron un método con el cual lograron una remoción del 80% de ácidos nucleicos y el cual consiste básicamente en: (a) choque térmico a 68°C durante 6 segundos (llevado a cabo sumergiendo el cultivo alojado dentro de un tubo de acero de 1/32 de pulgada de diámetro interno; en el baño y agitando vigorosamente); (b) incubación a 45°C durante 2 h y (c) incubación a 55°C durante 1 hora. Canepa y colaboradores al reproducir el método de Maul y Sinskey señaló que solo obtuvo un bajo nivel de remoción. Propusieron que el método de Maul y Sinskey se llevara a cabo en una solución de Na HPO_2 50mmol a pH alcalino y posterior diálisis contra agua destilada, con lo cual se logra la extracción de los productos de la desnaturalización de los ácidos nucleicos. Reportaron una razón de 50 a 60 (proteína-ácido nucleico) 10 veces mayor al ini-

cial para Saccharomyces cerevisiae.

La caracterización de los productos de degradación de los ácidos nucleicos por el Método de Maul y Sinskey fue realizada por Ohta y Maul. Inicialmente el 90% de los ácidos nucleicos se encontraba en una forma polimerizada (extraíble con ácido perclórico caliente). Después de 30 minutos de incubación, la mayor parte se había hidrolizado, aunque permanecía dentro de la célula (extraíbles con ácido perclórico frío). Después de 2 horas de incubación, la mayoría de los productos de hidrólisis habían sido liberados al medio y solo una pequeña porción permanecía dentro de la célula constituida por 3'-mononucleótidos, aunque eventualmente eran liberados de la célula.

El choque térmico inicia la hidrólisis enzimática de los ácidos nucleicos, varios mecanismos se han postulado. La activación enzimática puede ocurrir por desnaturalización térmica de un inhibidor de la ribonucleasa o por la liberación de la ribonucleasa desde un compartimiento subcelular.

Otro método para la reducción de ácidos nucleicos fue desarrollado por Castro y Sinskey y el cual consiste en: (a) choque térmico a 80°C por 30 segundos, (b) incubación con ribonucleasa A de pancreas bovino (0.1 microgramos/ml) a 55°C y pH 7.0, con una concentración no mayor de 0.001 mmol de iones Ca y Mg.

Con este método se logró una remoción del 2 hasta 9% del contenido de ácido nucleico en Candida utilis, sin

pérdida concomitante del contenido de proteínas (20,21, 61,68).

3.4. FUENTES DE CARBONO Y ENERGIA UTILIZADAS EN LA PRODUCCION DE PROTEINA MICROBIANA.- El crecimiento de un microorga nismo demanda en primera instancia de una fuente adecua da de Carbono, a partir de la cual y a través de las ru tas metabólicas centrales, construir el esqueleto carbó nado básico para la biosíntesis posterior y extraer la energía necesaria para ésta y otras reacciones metabóli cas.

Entre otros sustratos utilizados pueden mencionarse los siguientes:

3.4.1. SCP A PARTIR DE GAS NATURAL Y METANO.- Como puede ver-- se de la tabla 3.9 la mayoría de sus constituyentes son hidrocarburos de bajo peso molecular.

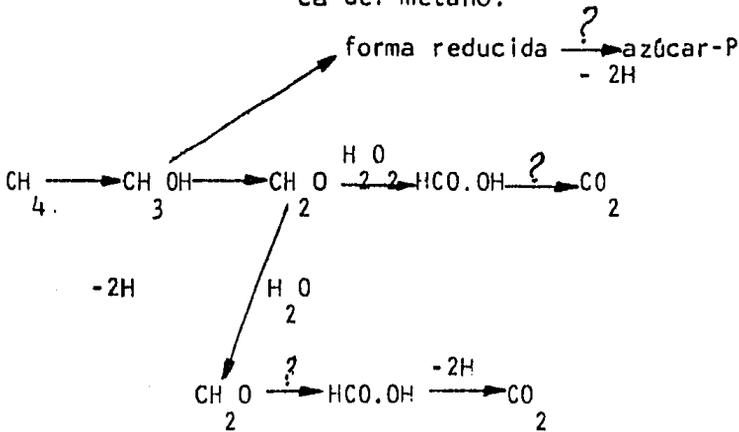
TABLA 3.9. Composición promedio del gas natural.

COMPONENTE	CONCENTRACION (%)
Metano	90 a 92
Etano	1.5
Butano	1.2
CO ₂ , N ₂	trazas

Actualmente se han detectado más de 50 especies capaces de metabolizar el metano, sugiriéndose diferentes rutas metabólicas, las que aparecen en síntesis en figura 3.4

Este sustrato tiene como principal inconveniente la posibilidad de explosiones si no se trabaja dentro de un rango permisible de valores (5 a 15% en mezclas con aire y 2 a 5.4% con Oxígeno).

FIGURA 3.4. Rutas metabólicas de oxidación microb*iológica* del metano.



Su utilización se encuentra limitada debido a que compete en su demanda como fuente energética (57,69,97).

3.4.2. SCP A PARTIR DE DESECHOS AGRICOLAS.- Los residuos agrícolas se miden actualmente en miles de millones de toneladas por año, lo que crea a su vez uno de los grandes problemas de la sociedad moderna, la contaminación. Los residuos celulósicos plantean aún una serie de incógnitas que no parece probable resolver en un futuro inmediato.

- El producto es insoluble y presenta altos porcentajes de lignina, sustancia no asimilable.
- La fermentación debe llevarse a cabo en medio sólido o semisólido, lo cual favorece bajas velocidades de cre

cimiento.

c. Su utilización está limitada a unas pocas bacterias del género Cellulomonas y una amplia variedad de hongos. Entre los que se encuentran los géneros Trichoderma, Aspergillus, Paecylomices y Chaetonium, mismos que presentan la desventaja debida a su baja velocidad de crecimiento (27,69).

3.4.3. SCP A PARTIR DE DESECHOS INDUSTRIALES.- Dentro de los residuos industriales, los de mayor importancia son licores sulfíticos, provenientes de la industria papelera los cuales tienen una demanda biológica de Oxígeno (BOD) entre 28000 y 50000 mg/l; y un contenido de azúcares -- reductores hasta del 3%. Su utilización como sustrato -- conlleva dos ventajas: se obtiene un producto útil y se evita una fuente contaminante. Antes de utilizarlo deben eliminarse los sólidos suspendidos y algunos compuestos volátiles inhibidores del crecimiento como el -- furfural, dióxido de azufre, etc.

En general se ha cultivado una variada gama de microorganismos, entre ellos C. utilis y P. varioti (69,97).

TABLA 3.10 Composición promedio de los licores sulfíticos (69).

COMPONENTE	PORCENTAJE
Lignosulfonatos	65 a 70
Hexosas y pentosas	20 a 30
Manosa	35 a 40

TABLA 3.10. Continúa.

COMPONENTE	PORCENTAJE
Glucosa	15 a 20
Galactosa	5 a 10
Pentosas (como xilosa)	4 a 6
Polisacáridos	6 a 10

3.4.4. SCP A PARTIR DE MIELES FINALES.- Las mieles tienen la ventaja de que no solo aportan la fuente de C y energía sino que adicionalmente, incorporan biotina y algunos e lementos traza.

Este sustrato contiene en promedio un 32% de sacarosa, - 14% de glucosa, 16% de levulosa, 3% de sustancias nitro genadas y 6% de iones. El rendimiento en biomasa/sustra to obtenido va del 45 al 50% (33).

3.4.5. SCP A PARTIR DE HIDROCARBUROS.- Las fracciones más utili zadas son las siguientes:

a. Crudos con alto contenido de ceras. En el mejoramiento de los crudos, se ha empleado la conversión microbiana de los n-alcanos que lo impurificaban. Se han utilizado con estos propósitos cepas de C. lipolytica, C. in termedia y C. tropicalis.

b. Gas Oil.- Esta fracción contiene grandes cantidades de hexadecano y en él se han cultivado tanto bacterias como levaduras y algunas especies de bacterias como Pseudomonas y Micrococcus muestran un rendimiento favo-

rable tanto con respecto al sustrato como al Oxígeno.

c. n-parafinas.- Este sustrato contiene n-alcanos purificados en un 90%. Su utilización está sujeta a condiciones asépticas y debido a esto, mas el costo de purificación, lo hacen poco económico.

d. Otras.- Se han realizado intentos de utilización de otros petroquímicos, tales como el fuel-oil y el queroseno, pero los resultados no han sido lo suficientemente atractivos como para justificar un estudio más profundo (69,97,104).

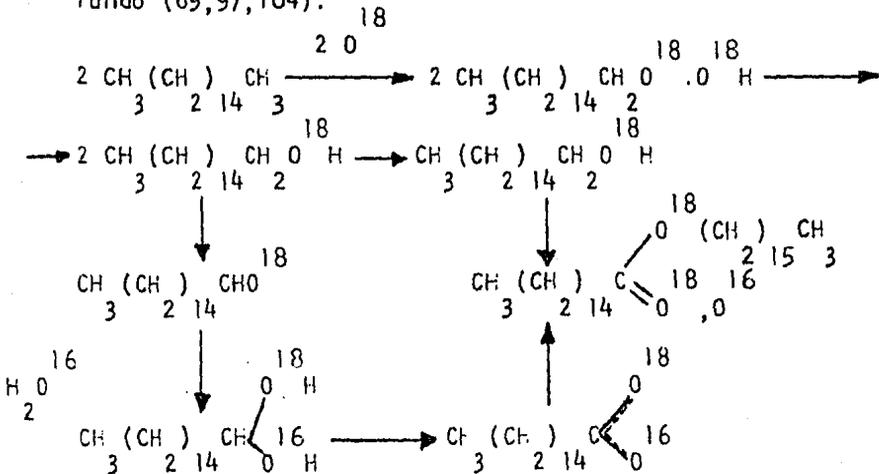


FIGURA 3.5 Mecanismo postulado por Stewart para el ataque de C₁₆ (97).

3.4.6. SCP A PARTIR DE ALCOHOLES INFERIORES.- Actualmente han ganado interés el metanol y el etanol en la búsqueda de nuevas fuentes de Carbono y energía.

a. Metanol.- Como sustrato el metanol presenta las siguientes ventajas: (1) bajo costo (US 1.7 a 3.3 €/lb), (2) gran disponibilidad (puede obtenerse a partir de -

gas natural, carbón, petróleo, celulosa, etc.), (3) alta pureza la cual es usualmente mayor de 99.5%, (4) completa miscibilidad con el agua, (5) fácil de transportar y almacenar y (6) compuesto parcialmente oxidado.

En este sustrato se han cultivado bacterias y levaduras entre las cuales Hansenula polymorpha crece en un medio de metanol, sales minerales más biotina y tiamina (26, -55).

b. Etanol.- Entre las ventajas del etanol como sustrato pueden mencionarse las siguientes: (1) pureza de obtención (100%), (2) disponibilidad (sintéticamente o por vía fermentativa), (3) fácil operación y almacenamiento, (4) no es tóxico, (5) miscible con el agua en cualquier proporción y (6) tiene baja demanda de Oxígeno y baja producción de calor durante la fermentación (69)

3.4.7. SCP A PARTIR DE OTROS SUSTRATOS.- Entre otros sustratos que pueden utilizarse para la producción de proteína microbiana se mencionan los siguientes:

a. Jugos de agave.- Se han cultivado en este sustrato diferentes especies de levaduras, con la obtención de rendimientos y calidades del producto similares a las mieles de caña (69,85,89).

b. Agua de coco.- Este sustrato tiene una demanda biológica de Oxígeno (BOD) de 40000 mg/l y se calcula que la industria coprera nacional desecha 10^{10} litros de agua de coco al año. Este sustrato es muy rico en aminoáci-

dos tales como: triptofano (5mg/100 ml), lisina (23mg - por 100 ml), fenilalanina (26mg/100ml), valina (32mg/dl) leucina (40mg/100ml), metionina (11mg/100ml), isoleucina (27mg/100ml), sodio, fósforo, potasio y hierro.

El crecimiento de Pleurotus ostreatus en agua de coco - más agua de cocimiento de maíz ha dado rendimientos en - base biomasa/sustrato del orden de 0.35 a 0.50 (65).

CAPITULO IV.- Material y Métodos.

- 4.1. Material: se utilizó material y cristalería de laboratorio.
- 4.2. Equipo: El equipo utilizado para la realización de este trabajo fue el siguiente:
 - 4.2.1. Centrifuga BHG Ultima II
500 rpm
Universal, S. A.
 - 4.2.2. Centrifuga clínica
3500 rpm
Comercial Ultramar, S. A.
 - 4.2.3. Campana de flujo laminar
V. E. C. O.
 - 4.2.4. Horno
300°C
Robertshaw, Inc.
 - 4.2.5. Mesa de agitación G-24
New Brunswick Scientific, Co. Inc.
 - 4.2.6. Espectrofotómetro PM^o2A
Industrias Carl Zeiss de México, S. A.
 - 4.2.7. pHmetro con electrodo de vidrio
Modelo H-2
Beckman Instruments, Inc.
 - 4.2.8. Balanza analítica
E. Mettler. Zurich, Swiss
 - 4.2.9. pHmetro digital
Digi-sense
Cole-Parmer Instruments, Co.

- 4.2.10. Microscopio compuesto
Standard K-7
Industrias Carl Zeiss de México, S. A.
- 4.2.11. Agitador magnético
SB-A1025B
Labline, Inc.
- 4.2.12. Autoclave vertical
TC-2E3
Técnica científica, S. A.
- 4.2.13. Estufa bacteriológica y Química
J. M. Ortiz
- 4.2.14. Filtro Seitz
- 4.2.15. Analizador de aminoácidos
Columna de 1.2 m
Beckman 120-B

4.3. MEDIOS DE CULTIVO:

4.3.1. MEDIO BASE SOLIDO PARA AISLAMIENTO*

Glucosa	10.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
CaSO ₄ , MgSO ₄	5 crist. c/u
MnSO ₄ , FeSO ₄ , ZnSO ₄	2 crist. c/u
Agua destilada	100 ml
Agar	2.0 g
pH final del medio	5.5

La esterilización de este medio se llevó a cabo en -
autoclave a 0.8 kg/cm² de presión durante 20 minutos.

* Comunicación del Profr. Soto.

4.3.2. MEDIO BASE LIQUIDO PARA AISLAMIENTO*

Glucosa	10.0 g
Extracto de levadura	1.0g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
CaSO ₄ , MgSO ₄	5 crist. c/u
MnSO ₄ , FeSO ₄ , ZnSO ₄	2 crist. c/u
Agua destilada	100 ml
pH final del medio	5.5

La esterilización de este medio se lleva a cabo en - autoclave a 0.8 Kg/cm² de presión durante 20 minutos

* Comunicación del Profr. Soto.

4.3.3. MEDIO PARA LA PRØEBA DE ASIMILACION DE FUENTES DE NITROGENO (7).

Glucosa	2.0 g
KH ₂ PO ₄	0.1 g
Fuente de Nitrógeno	2 a 5 mmol
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0.05 g
Agua destilada	100 ml
pH final del medio	6.5

La esterilización de este medio se lleva a cabo a - 0.8 Kg/cm² de presión durante 15 minutos.

4.3.4. MEDIO PARA LA PRUEBA DE ASIMILACION DE FUENTES DE CARBONO (7).

Fuente de Carbono	50 mmol
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.1 g

Extracto de levadura 1.0 g
 $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.05 g
 Agua destilada 100 ml
 pH final del medio 6.5

La esterilización de este medio se lleva a cabo a 0.8 Kg/cm^2 de presión durante 15 minutos.

4.3.5. MEDIO PARA LA PRUEBA DE FERMENTACION DE AZUCARES (7)

Fuente de Carbono 50 mmol
 Extracto de levadura 1.0 g
 $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g
 KH_2PO_4 0.1 g
 $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.05 g
 Agua destilada 100 ml
 Azul de bromotimol (0.01%) 0.5 ml
 pH final del medio 6.5

La esterilización de este medio se lleva a cabo en autoclave a 0.8 Kg/cm^2 de presión durante 15 minutos. Se utilizan tubos de 16mm X 150mm con 10 a 15 ml de medio y con tubos de 50mm X 6mm como campanas; se incuban durante una semana a $28^\circ C$ y se leen diario.

4.3.6. MEDIO PARA LA PRUEBA DE REQUERIMIENTOS VITAMINICOS (7)

El medio se prepara utilizando el medio 4.3.2. y se añaden las vitaminas, excepto la que se está probando, en las siguientes concentraciones por litro:

Biotina 20 g Acido nicotínico ... 400 g
 Ac. p-aminobenzoico 200 g Acido fólico 2 g

Pantotenato de calcio 2 g Riboflavina 200 g
 Tiamina.HCl400 g Piridoxina.HCl . 400 g
 Mio-inositol 10 g pH del medio ... 6.5

La esterilización de este medio se lleva a cabo en -
 autoclave a 0.8 Kg/cm^2 de presión durante 15 minutos.

4.3.7. MEDIO PARA PROBAR EL DESARROLLO A ALTAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA (7).

Glucosa 50 y 60 g
 Extracto de levadura 1.0 g
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g
 KH_2PO_4 0.1 g
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g
 Agar 2.0 g
 Agua destilada 100 ml
 pH 6.5

La esterilización de este medio se lleva a cabo en au
 toclave a 0.8 Kg/cm^2 de presión durante 15 minutos.

Una vez inoculado, se incuba durante 4 semanas a 25°C

4.3.8. AGAR GORODKOWA

Glucosa 0.1 g
 Peptona 1.0 g
 NaCl 0.5 g
 Agar 2.0 g
 Agua destilada 100 ml
 pH del medio 7.0

La esterilización de este medio se lleva a cabo en autoclave a 0.8 Kg/cm^2 de presión durante 15 minutos.

4.3.9. AGAR SABOURAUD

Dextrosa	4.0 g
Proteosa peptona	1.0 g
Agar	1.5 g
Agua destilada	100 ml
pH del medio	7.0

La esterilización de este medio se lleva a cabo en autoclave a 1.2 Kg/cm^2 de presión durante 15 minutos.

4.3.10. MOSTO DE CERVEZA

El mosto de cerveza utilizado durante la realización del proyecto fue donado por la Cervecería Cuauhtémoc, S. A., aunque también puede prepararse de la siguiente manera:

A 1 Kg de malta diastásica se le agregan 2.6 l de agua y se agita durante 3 horas manteniendo la temperatura a 45°C , posteriormente se aumenta la temperatura a 63°C y se sigue agitando durante una hora más; al terminar, se esteriliza a 120°C durante 15 minutos, se filtra y se diluye a 15° Balling; ajustando el pH a 5.4.

4.3.11. MOSTO DE CERVEZA GELOSADO

Mosto de cerveza 100 ml

Agar 2.0 g

pH final del medio 7.0

Este medio se esteriliza a 1.2 Kg/cm² durante 15 minutos.

4.3.12. MOSTO DE CERVEZA GELATINADO

Mosto de cerveza 100 ml

Gelatina 20.0 g

pH final del medio 7.0

Este medio se esteriliza en autoclave a 0.8 Kg/cm² durante 15 minutos.

4.3.13. MOSTO DE UVA

El mosto de uva utilizado consistió en jugo de uvas sin semilla y sin diluir, ajustando el pH a 6.5
Este medio se pasteurizó calentándolo a 62°C durante 30 minutos.

4.3.14. MOSTO DE UVA GELOSADO

Mosto de uva 100 ml

Agar 2.0 g

pH final del medio 7.0

Este medio se pasteurizó calentándolo a 62°C durante 30 minutos.

4.3.15. MOSTO DE UVA GELATINADO

Mosto de uva 100 ml
 Gelatina 20.0 g
 pH final 7.0

Este medio se pasteurizó calentándolo a 62°C durante 30 minutos.

4.3.16. AGUAMIEL LIQUIDO

El aguamiel recientemente extraído fue diluído 1 : 10 para utilizarlo como medio de cultivo, esterilizándolo a 1.2 Kg/cm² durante 15 minutos.

4.3.17. AGUAMIEL GELOSADO

Aguamiel líquido 1:10 100 ml
 Agar 2.0 g
 pH final 7.0

Este medio se esterilizó a 1.2 Kg/cm² en autoclave durante 15 minutos.

4.3.18. AGUAMIEL GELATINADO

Aguamiel líquido 1:10 100 ml
 Gelatina 20.0 g
 pH final 7.0

Este medio se esterilizó en autoclave a 1.2 Kg/cm² durante 15 minutos.

4.3.19. MEDIO DE FERMENTACION (7)

Glucosa	100.0 g
(NH) ₄ SO ₄	5.0 g
KH ₂ PO ₄	2.0 g
CaSO ₄ , MgSO ₄	50 crist. c/u
MnSO ₄ , FeSO ₄ , ZnSO ₄	20 crist. c/u
Inositol, tiamina	30 g c/u
Piridoxina.HCl, biotina	0.5 g c/u
Acido pantoténico	1.0 g c/u
Agua destilada	1000 ml
pH final del medio	5.5

El medio se esterilizó en autoclave a una presión -
 $\frac{2}{0.8 \text{ Kg/cm}^2}$ durante 15 minutos.

4.3.20. MEDIO DE CONSERVACION (7)

Glucosa	2.0 g
Peptona	2.0 g
Extracto de levadura	2.0 g
Agua destilada	100 ml
pH final	6.0

Este medio se esterilizó en autoclave a una presión
 $\frac{2}{0.8 \text{ Kg/cm}^2}$ durante 15 minutos.

4.3.21. MELAZA DE CAÑA

La melaza de caña utilizada fue proporcionada por el Ingenio "Emiliano Zapata" de Zacatepec, Mor. y ajustada a la concentración requerida de acuerdo a la técnica de tratamiento mencionada en 4.4.6.1.

4.3.22. MELAZA DE CAÑA GELOSADA

Melaza de caña al 3% de A. R. T. 100 ml
 Agar 2.0 g
 pH final 5.5

Este medio se esterilizó en autoclave a una presión de 0.8 Kg/cm^2 durante 15 minutos.

4.3.23. CACHAZA DE CAÑA

La cachaza de caña utilizada en el desarrollo del proyecto fue proporcionada por el Ingenio "La Concepción" de Jalapa, Ver. y ajustada a la concentración requerida de acuerdo a la técnica de tratamiento para este medio descrita en 4.4.6.2.

4.3.24. CACHAZA DE CAÑA GELOSADA

Cachaza de caña al 3% de A. R. T. 100 ml
 Agar 2.0 g
 pH final 5.5

Este medio se esterilizó en autoclave a una presión de 0.8 Kg/cm^2 durante 15 minutos.

4.4. METODOS: Los métodos utilizados en el desarrollo experimental de este proyecto fueron los siguientes:

4.4.1. AISLAMIENTO DE LEVADURAS

El aislamiento de las levaduras se llevó a cabo por

el método de dilución en placa, a partir de muestras de aguamiel y pulque obtenidas de Amecameca, Toluca, Pachuca, Tlaxcala y Zona Metropolitana de la Ciudad de México e inoculadas en el medio 4.3.1.

Se utilizaron muestras de pulque fresco, es decir, de 24 h de haber sido obtenido y muestras de aguamiel de 3 h de haber sido obtenido.

Después de una incubación de 48 h (28°C), se examinaron las cajas para seleccionar las colonias que presentaran características de levaduras, para posteriormente examinarlas al microscopio y determinar por su morfología, si se trataba de levaduras. Las colonias seleccionadas fueron purificadas por pases sucesivos en el medio 4.3.1. y finalmente, fueron inoculadas en el medio 4.3.2. e incubadas durante 48 h a 28°C.

4.4.2. OBTENCION DE CULTIVOS PUROS (AXENICOS).- La obtención de cultivos axénicos se realizó por el método de Lindner (75), a partir de los cultivos desarrollados en el medio 4.3.2.

4.4.3. IDENTIFICACION DE LAS LEVADURAS AISLADAS.- Para la identificación de las levaduras aisladas se tomaron en cuenta dos criterios:

4.4.3.1. Las características morfológicas tanto microscópicas como macroscópicas de las levaduras en medios líquidos, sólidos y semisólidos.

Estas características fueron estudiadas en los medios antes descritos, desde agar Gorodkova hasta aguamiel gelatinado y utilizando las cepas obtenidas en el punto 4.4.2, comparándolas con las características descritas por Ruiz Oronoz para las mismas cepas (81,82,83).

4.4.3.2. Las características fisiológicas de las levaduras fueron evaluadas con las siguientes pruebas: asimilación de fuentes de Carbono y Nitrógeno, fermentación de azúcares, requerimientos vitamínicos y crecimiento con glucosa al 50 y 60%, realizándolas en los medios correspondientes (4.3.3 a 4.3.7), y de acuerdo con Barnett (7).

4.4.4. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE NUTRIENTES ESENCIALES (C,N,P)

4.4.4.1. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE FUENTE DE CARBONO.- Se realizó variando la concentración de la fuente de Carbono (glucosa) en la fórmula del medio de fermentación, manteniendo constantes las concentraciones del resto de los nutrientes, además de los siguientes parámetros: pH, 5.5; temperatura, 28°C; velocidad de agitación, 200 rpm y concentración del inóculo, 1%.

Las concentraciones de glucosa que se variaron fueron las siguientes (en g/100ml): 1.0, 2.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, - 12.5, 15.0, 17.5 y 20.0

Se tomaron muestras del cultivo cada 3 h y a partir de la inoculación del medio de cultivo, se valoró el incre-

mento en peso de la levadura (en base seca) y se determinó la concentración de glucosa residual, hasta que el valor del incremento en peso de la levadura permaneció constante o hasta que, ya no se detectó glucosa en el medio de cultivo al utilizar el método de Nelson-Somogyi

4.4.4.2. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE FUENTE DE NITROGENO.- Esta determinación se realizó variando la concentración de fuente de Nitrógeno (Sulfato de amonio) del medio de fermentación de 0.125 a 1.0 g/100ml con intervalos de 0.125 g/100ml, manteniendo constantes las concentraciones de los demás nutrientes y los parámetros de desarrollo mencionados en 4.4.4.1, y el valor de

fente de Carbono del 10%

4.4.4.3. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE FUENTE DE FOSFORO.- La concentración de la fuente de Fósforo (fosfato diácido de potasio) se varió de 0.05 a 0.4 g/100ml con intervalos de 0.05 g/100ml y durante el desarrollo de las levaduras, se mantuvieron constantes las concentraciones del resto de los nutrientes del medio de fermentación y los parámetros de desarrollo (4.4.4.1).

Para los tres nutrientes, la cuantificación de biomasa y la determinación de glucosa residual se realizó como se menciona en 4.4.4.1, misma que tuvo un valor inicial

del 10%
4.4.5. DETERMINACION DE LOS PARAMETROS OPTIMOS DE DESARROLLO (TEMPERATURA, pH, VELOCIDAD DE AGITACION)

- 4.4.5.1. DETERMINACION DEL pH OPTIMO DE DESARROLLO.- Las levaduras se hicieron crecer en el medio de fermentación manteniendo constantes los siguientes parámetros: temperatura, 28°C; velocidad de agitación, 200 rpm. El pH del medio se varió en el intervalo de 3.0 a 9.0 con incrementos de 1.0 unidad en los valores más alejados de 5.5 y de 0.5 unidades en los valores más cercanos al considerado como óptimo. La cuantificación del incremento en la biomasa y la determinación de la glucosa residual se hizo en la forma descrita en el punto 4.4.4.1. Valor inicial de la fuente de Carbono, 10%.
- 4.4.5.2. DETERMINACION DE LA TEMPERATURA OPTIMA DE DESARROLLO.- Para la determinación de la temperatura óptima de desarrollo, las levaduras se hicieron crecer en el medio de fermentación y se mantuvieron constantes los siguientes parámetros: pH, 5.5; velocidad de agitación, 200 rpm y se probaron las siguientes temperaturas: 20°C, 28°C, 37°C y 45°C; haciendo la cuantificación de la biomasa y la determinación de la glucosa residual como en 4.4.4.1. Valor inicial de la fuente de Carbono 10%.
- 4.4.5.3. DETERMINACION DE LA VELOCIDAD DE AGITACION OPTIMA.- El desarrollo de las levaduras se hizo en el medio de fermentación manteniendo constantes los siguientes parámetros: pH, 5.5 y temperatura, 28°C; las velocidades de agitación (en rpm) que se probaron fueron: 50, 100, 150, 200 y 250. Valor inicial de la fuente de C, 10%. Las determinaciones de glucosa residual y biomasa se realizaron de acuerdo a lo mencionado en 4.4.4.1.

4.4.6. TRATAMIENTO DE LOS SUTRATOS DE DESECHO.

4.4.6.1. MELAZA DE CAÑA.- Para realizar la defecación de la melaza e inversión de la sacarosa, se procedió de la siguiente manera: La melaza se diluyó con agua destilada en una relación 1:10 (p/v) y se determinó la concentración de azúcares reductores directos (A.R.D.) por el método de Nelson-Somogyi, para posteriormente ajustar la solución a 3% de A.R.D. y llevarla a un pH de 9.0 y esterilizarla durante 3 h a 1.2Kg/cm^2 .

Al finalizar la esterilización en pH alcalino, se ajusta el pH a 3.0 con ácido sulfúrico y se repite la esterilización durante 2 h a 1.2Kg/cm^2 , para posteriormente hacer la determinación de azúcares reductores totales - (A.R.T.), también por el método de Nelson-Somogyi. (71,85)

4.4.6.2. CACHAZA DE CAÑA.- El tratamiento aplicado a este medio consistió en lo siguiente: Se pesó 1 Kg de cachaza y se mezcló con 2 l de agua destilada, se agregó HCl al 2% - hasta un pH de 5.0 y se esterilizó en autoclave a 1.2Kg/cm^2 durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó la mezcla para obtener el sobrenadante; el cual se filtró en filtro Seitz para eliminar las partículas pequeñas que no fue posible separarlas por centrifugación, - para finalmente, hacer la determinación de azúcares reductores totales por el método de Nelson-Somogyi (71).

4.4.7. ADAPTACION DE LAS LEVADURAS A LOS SUSTRATOS DE DESECHO.

Para llevar a cabo la adaptación de las levaduras a los

sustratos de desecho, se hicieron crecer éstas, en reñetidas ocasiones, en los medios melaza de caña gelosada y cachaza de caña gelosada hasta que se obtuvo una cosecha abundante.

4.4.8. DESARROLLO MASIVO DE LAS LEVADURAS.- Para obtener un desarrollo masivo de las levaduras adaptadas a los sustratos de desecho, éstas se inocularon en los medios melaza de caña y cachaza de caña y además en el medio de fermentación (utilizado como patrón de comparación), bajo condiciones óptimas de desarrollo (obtenidas en 4.4.4. y 4.4.5.).

4.4.9. COSECHA Y SECADO DE LAS LEVADURAS.- Una vez que se obtuvo el desarrollo masivo de las levaduras, éstas se sometieron a centrifugación para separarlas del medio de cultivo y posteriormente, el paquete celular se lavó dos veces con agua destilada, resuspendiéndolo y centrifugándolo.

Para decolorarlas se procedió a resuspenderlas en HCl al 2% agitándolas durante 20 minutos y posteriormente, centrifugándolas; este procedimiento se repitió tantas veces como fue necesario para luego lavarlas una vez con agua destilada, dos veces con etanol al 96% y finalmente con éter etílico, el cual se dejó evaporar para secar las levaduras.

Una vez que se hubieron secado las levaduras, se procedió a triturarlas en un mortero hasta lograr que queda

ran como un polvo muy fino que se recogió en bolsas de plástico que finalmente, fueron selladas y etiquetadas

4.4.10. DETERMINACION DE AZUCARES.- La determinación de azúcares se hizo mediante el método de Nelson-Somogyi (66,98), el cual se basa en la reducción del ión cúprico a cuproso por la glucosa, en solución alcalina caliente, con formación de óxido cuproso (Cu_2O) principalmente.

El paso siguiente es la adición de ácido arsenomolibdico, el cual es reducido por el ión cuproso con formación de óxidos inferiores de Molibdeno que producen un color azul adecuado para mediciones fotométricas (99).

4.4.11. DETERMINACION DE PROTEINAS.- Para determinar la cantidad de proteínas presentes en las levaduras, se procedió primeramente a hidrolizarlas de la siguiente forma: Se pesaron 5 mg de levaduras secas y se depositaron en un tubo de centrifuga para agregarles 2 ml de agua destilada y 1 ml de NaOH 3N, posteriormente se colocaron en un baño de agua hirviente por 10 minutos, se enfrió en un baño de agua y se centrifugó (59).

Con el sobrenadante se realizó la determinación de proteínas por el método del biuret, el cual se basa en la reacción entre el Cu^{2+} y los grupos carbonilo ($-\text{C}=\text{O}$) y amino ($-\text{N}-\text{H}$) de los enlaces de péptido, en un medio moderadamente alcalino, con formación de un complejo quelato coloreado de composición desconocida.

Ocurre una reacción análoga entre el ión Cu^{2+} y el com-

puesto biuret, $\text{NH}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{NH}$, y por ello la reacción se llama reacción del biuret (58,99).

4.4.12. DETERMINACION DE DNA.- La determinación del DNA se realizó por el método de la difenilamina, modificación de Burton al método inicialmente descrito por Dische. El método consiste en la formación de un compuesto colorido entre la desoxiribosa y la difenilamina, el cual se puede medir espectrofotométricamente a 595 nm (14,15,92).

4.4.12.1. REACTIVOS:

REACTIVO DE DIFENILAMINA: Se disolvieron 1.5 g de difenilamina en 100 ml de ácido acético glacial y 1.5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Antes de utilizarse se agregan 0.1 ml de solución acuosa de acetaldehído al 1.6% por cada 20 ml del reactivo de difenilamina.

SOLUCION ACUOSA DE ACETALDEHIDO.- 1 ml de acetaldehído frío se transfirió a 50 ml de agua destilada. La solución al 1.6% es estable durante varios meses almacenada a 4°C.

SOLUCION STANDARD DE DNA: Se preparó una solución de 400 mg de DNA/ml en NaOH 5 mmol.

SOLUCION DE ACIDO TRICLOROACETICO AL 5%.

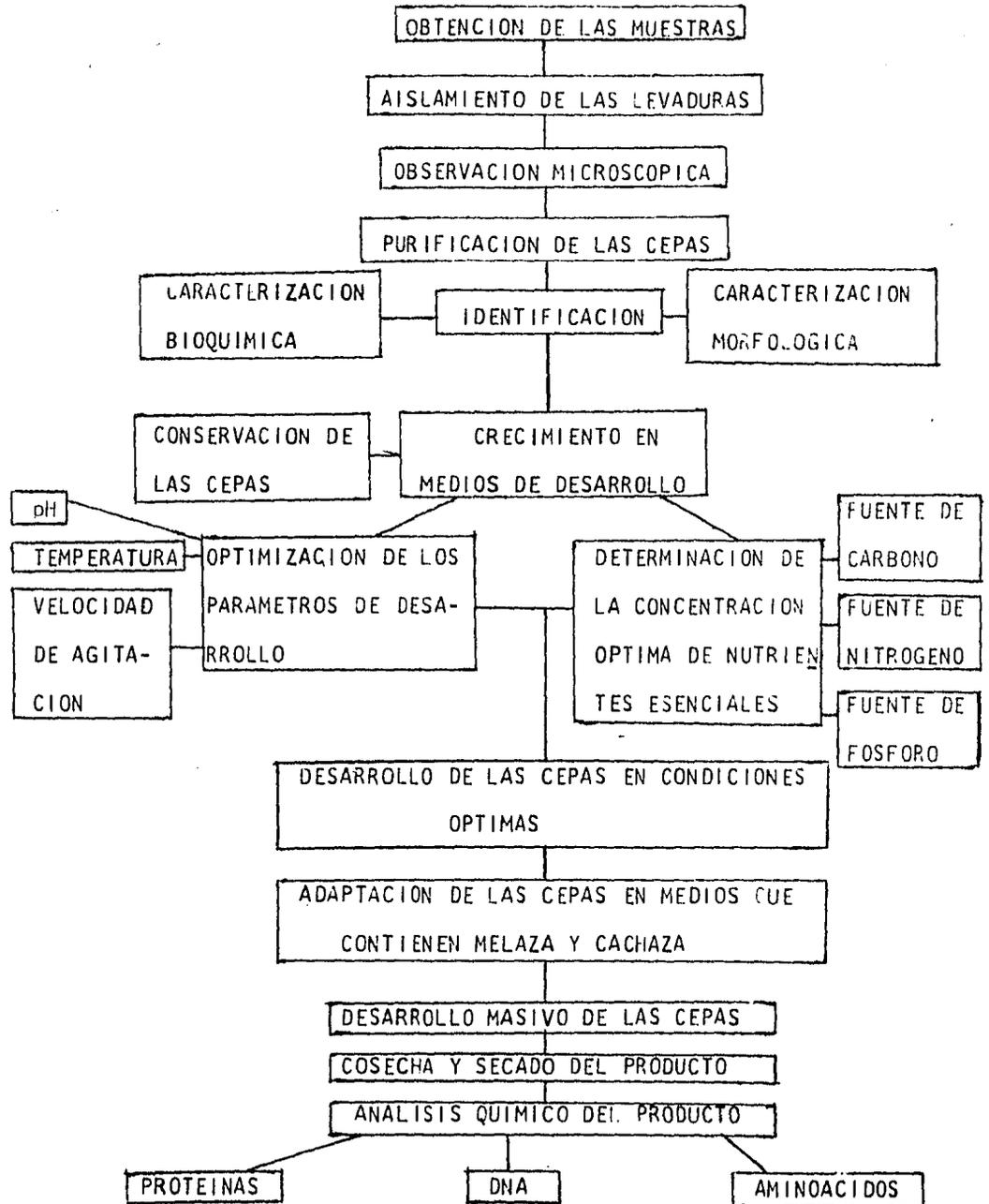
4.4.12.2. PROCEDIMIENTO: Se pesaron 25 mg de levaduras secas, se colocaron en un tubo de ensaye con 5 ml de ácido tricloroacético al 5% y se calentó en un baño de agua hirviendo durante 30 minutos; después se procedió a centrifugar, tomando 2 ml del sobrenadante, al cual se le adi-

cionaron 4 ml de difenilamina y se calentó en baño de agua hirviente durante 10 minutos, se procedió a enfriar la solución y finalmente se leyó en espectrofotómetro a 595 nm.

4.4.12.3. CURVA STANDARD DE DNA.

SOLUCION DE DNA	ACIDO TRICLOROACETICO	DIFENILAMINA	CONCENTRACION DE DNA
0.00 ml	2.00 ml	4.0 ml	0.00 mg
0.25 ml	1.75 ml	4.0 ml	100.00 mg
0.50 ml	1.50 ml	4.0 ml	200.00 mg
0.75 ml	1.25 ml	4.0 ml	300.00 mg
1.00 ml	1.00 ml	4.0 ml	400.00 mg

4.5. DIAGRAMA DE TRABAJO.



CAPITULO V.- Resultados.

En base a la metodología mencionada en el capítulo anterior y para el cumplimiento de los objetivos propuestos, a continuación se muestran los resultados obtenidos durante el desarrollo experimental de este trabajo.

TABLA 5.1. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LA CEPA No.1 EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO LIQUIDOS

MEDIOS DE CULTIVO CARACTERISTICAS	HOSTO DE CERVEZA LIQUIDO	HOSTO DE UVA LIQUIDO	AGUAHIEL LIQUIDO
I. MACROSCOPICAS			
VELO	NO SE FORMA	NO SE FORMA	NO SE FORMA
ANILLO	NO SE FORMA	NO SE FORMA	NO SE FORMA
SEDIMENTO	SE EMPIEZA A FORMAR A LOS 8 DIAS; COLOR BLANCO AMARILLENTO, DESPUES SE TORNA MORENO CLARO.	ABUNDANTE; COLOR BLANCO AMARILLENTO PERSISTE EL COLOR	10 DIAS HUY ABUNDANTE COLOR BLANCO LECHOSO; 10 DIAS BLANCO AMARILLENTO; A LOS 20 DIAS COLOR MORENO CLARO
ENTURBIAMIENTO	24 HORAS LIGERAMENTE TURBIO SE CLARIFICA AL 4o. DIA	LIGERAMENTE TURBIO	
FERMENTACION	HUY ACTIVA SUSPENDIENDOSE A LOS 4 DIAS	HUY ACTIVA SUSPENDIENDOSE A LOS 4 DIAS	HUY ACTIVA DESAPARECIENDO A LOS 4 DIAS
II. MICROSCOPICAS			
FORMA DE LAS CELULAS	OVOIDES; ELIPTICAS; ESFERICAS; ALARGADAS;	ELIPTICAS; ESFERICAS; ALARGADAS; OVOIDES	MAYOR NUMERO DE CELULAS OVOIDES; ESFERICAS Y ALARGADAS
AGRUPACION	LA MAYORIA AISLADAS; SOLO ALGUNAS FORMANDO PEQUEROS GRUPOS Y EN POCOS CASOS PEQUERAS CADENAS	LA MAYORIA AISLADAS; SOLO ALGUNAS FORMANDO PEQUEROS GRUPOS	LA MAYORIA AISLADAS; SOLO ALGUNAS FORMANDO PEQUEROS GRUPOS
BROTES	UN SOLO BROTE EN LOS EXTREMOS	EN CASI TODAS LAS CELULAS BROTES LATERALES	EN CASI TODAS LAS CELULAS BROTES LATERALES
GRANULACIONES	POCAS GRANULACIONES	POCAS GRANULACIONES	POCAS GRANULACIONES
PSEUDOMICELIO	EN ALGUNAS CELULAS SE OBSERVA SU FORMACION	-----	-----

CONTINUACION TABLA 5.1 CULTIVOS EN ESTRIA

MEDIOS CARACTERISTICAS	AGAR GORODKOWA
FORMA	EQUINULADA
BORDES	GASTADO
SUPERFICIE	LISA Y DESPUES POCO RUGOSA
COLOR	BLANCO GRISACEO

(a) EMPLEANDO LOS DISTINTOS MEDIOS SOLIDOS; AGAR SABOURAUD; MOSTO DE CERVEZA GELOSADO; MOSTO DE UVA GELOSADO; AGUAMIEL GELOSADO; MOSTO DE CERVEZA GELATINADO; MOSTO DE UVA GELATINADO Y AGUAMIEL GELATINADO. LAS CARACTERISTICAS SON IGUALES.

CONTINUACION TABLA 5.1 COLONIAS GIGANTES

MEDIOS CARACTERISTICAS	AGAR GORODKOWA	AGAR SABOURAUD	MOSTO DE CERVEZA GELOSADO (a)	MOSTO DE CERVEZA GELATINADO (b)
FORMA	IRREGULAR Y CIRCULAR	CIRCULAR; DES- PUES RIZADA HUMEDA	CIRCULAR; DESPUES RIZADA HUMEDA	RIZADA; SECAS
SUPERFICIE	LISA; POCO RU- GOSA	LISA; DESPUES RUGOSA	LISA; DESPUES RUGOSA	MUY RUGOSA
ELEVACION	CONVEXA; PULVI- NADA	CONVEXA; LEVE- MENTE PULVINA-	CONVEXA; LEVEMENTE PULVINADA	UMBONADA
BORDES	ENTEROS Y ON- DULADOS	ONDULADOS	ONDULADOS	FINAMENTE ONDULA- DOS
COLOR	BLANCO	BLANCO	BLANCO GRISACEO	BLANCO MUY OSCURO
CARACTERISTICAS OPTICAS	TRANSLUCIDAS	OPACAS	OPACAS	OPACAS
BRILLO	MUY INTENSO	MUY INTENSO	BASTANTE BRILLO	SIN BRILLO
DIAMETRO	10 mm	28 mm	28 mm	38 mm

a) EN LOS MEDIOS: MOSTO DE UVA GELOSADO Y AGUAMIEL GELOSADO LAS CARACTERISTICAS SON IGUALES, EXCEPTO EL DIAMETRO; DANDO EN AGUAMIEL GELOSADO 30 mm.

b) EN LOS MEDIOS: MOSTO DE UVA GELATINADO Y AGUAMIEL GELATINADO LAS CARACTERISTICAS SON IGUALES, EXCEPTO EL DIAMETRO Y EL COLOR DE LAS COLONIAS CAMBIAN PARA AGUAMIEL GELATINADO SIENDO DE 24 mm DE DIAMETRO Y EL COLOR DE LA COLONIA BLANCO GRISACEO CON UN LEVE TONO AMARILLENTO

CONTINUACION TABLA 5.2 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LA CEPA No. 2 EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO LIQUIDOS

MEDIOS DE CULTIVO LIQUIDOS	MOSTO DE CERVEZA LIQUIDO	MOSTO DE UVA LIQUIDO	AGUAMIEL LIQUIDO
I. MACROSCOPICAS			
VELO	SE FORMAN PEQUEÑOS ISLOTES EN LA SUPERFICIE DEL MEDIO; 48 HRS VELO MUCOSO; 3 DIAS VELO MICODERMICO TIPICO MUY PLEGADO; SECO, OPACO, BLANCO GRISACEO; 15 DIAS COLOR MORENO, 24 HRS SE INICIA LA FORMACION; 3 DIAS COMPLETA SU DESARROLLO; SECO SIN BRILLO, COLOR BLANCO GRISACEO, CONSERVANDOSE HASTA LOS 3 MESES.	10 DIAS VELO MUCOSO TRANSFORMANDOSE EN MICODERMICO BLANCO GRISACEO; 15 DIAS DE COLOR MORENO	10 DIAS SE OBTIENE UN VELO MUCOSO QUE SE TRANSFORMA EN MICODERMICO
SEDIMENTO	SE EMPIEZA A FORMAR A LOS 5 DIAS A EXPENSAS DE FRAGMENTO DEL VELO DESPRENDIDO DE LA SUPERFICIE, COLOR GRISACEO; 30 DIAS GRIS MORENO	SE EMPIEZA A FORMAR A LOS 5 DIAS A EXPENSAS DE FRAGMENTO DE VELO DESAPARECIENDO DE LA SUPERFICIE; COLOR BLANCO GRISACEO; 30 DIAS GRIS MORENO	SE EMPIEZA A FORMAR A LOS 5 DIAS COLOR BLANCO GRISACEO; 30 DIAS COLOR MORENO MENOS ABUNDANTE QUE EN MOSTO DE CERVEZA LIQUIDO
ENTURBIAMIENTO	NO HAY	NO HAY	NO HAY
FERMENTACION	NO HAY	NO HAY	NO HAY
II. MICROSCOPICAS			
FORMA DE LAS CELULAS	LA MAYORIA OVOIDES Y ALGUNAS ELIPTICAS	OVOIDES Y ELIPTICAS	OVOIDES Y ELIPTICAS
AGRUPACION	MUY POCAS AISLADAS CADENAS DE 3 A 5 CELULAS	CADENAS Y GRUPOS	CADENAS Y ESPECIALMENTE EN GRUPOS
BROTES	BROTES COLOCADOS EN LOS POLOS Y EN LOS LATERALES	BROTES POLARES Y LATERALES	EN LOS POLOS COMO LATERALES
GRANULACIONES	SIN GRANULACIONES	SIN GRANULACIONES	SIN GRANULACIONES
PSEUDOMICELIO	-----	-----	-----

MEDIOS CARACTERISTICAS	AGAR GORODKOWA	AGAR SABOURAUD	MOSTO DE CERVEZA GELOSADO (a)	MOSTO DE CERVEZA GELATINADO (b)
FORMA	EQUINULADA	EQUINULADA	EQUINULADA	EQUINULADA
BORDES	ASERRADOS	CARCOMIDOS Y AURICULADOS	DENTADOS	ASERRADOS
SUPERFICIE	RUGOSA	RUGOSA	RUGOSA	RUGOSA
COLOR	BLANCO GRI- SACEO	BLANCO GRI- SACEO	BLANCO GRISACEO DESPUES BLANCO MORENO	BLANCO GRISACEO

(a) EN LOS MEDIOS MOSTO DE UVA GELOSADO Y AGUAMIEL GELOSADO LAS CARACTERISTICAS SON IGUALES EXCEPTO QUE EN AGUAMIEL GELOSADO LOS BORDES SON FINAMENTE ASERRADOS.

(b) EN LOS MEDIOS MOSTO DE UVA GELATINADO Y AGUAMIEL GELATINADO LAS CARACTERISTICAS SON IGUALES.

CONTINUACION TABLA 5.2 COLONIAS GIGANTES

MEDIOS CARACTERISTICAS	AGAR GORODKOWA	AGAR SABOURAUD	MOSTO DE CERVEZA GELOSADO (a)	MOSTO DE CERVEZA GELATINADO (b)
FORMA	CIRCULAR	CIRCULAR Y EN OCASIONES RI- ZADA	CIRCULAR PERIFERICA SE FORMAN LOBULOS ANCHOS Y POCO PRO- FUNDOS	CIRCULAR;RIZADA E IRREGULAR;SECAS
SUPERFICIE	LISA	RUGOSA	RUGOSA	LEVEMENTE RUGOSA
ELEVACION	LEVEMENTE CONVEXA	PLANA	LEVEMENTE CONVEXA	CONVEXA;PULVINADA Y ALGUNAS UMBILI- CADA
BORDES	ENTEROS	FINAMENTE DEN- TADOS	FINAMENTE ONDULADOS	ONDULADOS Y LOBU- LADOS
COLOR	BLANCO GRI- SACEO	BLANCO GRISA- CEO	BLANCO GRISACEO	BLANCO GRISACEO
CARACTERISTICAS OPTICAS	OPACAS	OPACAS	OPACAS	OPACAS
BRILLO	MEDIANO	SIN BRILLO	SIN BRILLO	SIN BRILLO
DIAMETRO	20 mm	21 mm	20 mm	14 mm

(a) MEDIOS MOSTO DE UVA GELOSADO Y AGUAMIEL GELOSADO: LAS CARACTERISTICAS SON LAS MISMAS EXCEPTO EL DIAMETRO; PARA MOSTO DE UVA GELOSADO 15 mm DE DIAMETRO; AGUAMIEL GELOSADO 40 mm DE DIAMETRO.

(b) EN LOS MEDIOS MOSTO DE UVA GELATINADO Y AGUAMIEL GELATINADO LAS CARACTERISTICAS SON IGUALES EXCEPTO EL DIAMETRO; SIENDO ESTE PARA MOSTO DE UVA GELATINADO 30 mm DE DIA-
METRO Y AGUAMIEL GELATINADO 14 mm DE DIAMETRO.

CONTINUACION TABLA 5.3 CARACTERISTICAS MORFOLÓGICAS DE LA CEPA No. 3 EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO LIQUIDOS

MEDIOS DE CULTIVO LIQUIDO	MOSTO DE CERVEZA LIQUIDO	MOSTO DE UVA LIQUIDO	AGUAMIEL LIQUIDO
I. MACROSCOPICAS			
VELO	20 DIAS SE INICIA LA FORMACION DE PEQUEÑOS ISLOTES DE VELO LOS CUALES ALCANZAN SU MAXIMO DESARROLLO A LOS 30 DIAS; NO LLEGAN A INTEGRAR UN VELO MUCOSO COMPLETO.	20 DIAS SE INICIA LA FORMACION DE PEQUEÑOS ISLOTES DE VELO LOS CUALES ALCANZAN SU MAXIMO DESARROLLO A LOS 30 DIAS Y NO SE LLEGA A INTEGRAR UN VELO MUCOSO COMPLETO.	60 DIAS SE FORMAN MUY CONTADOS 15 LOTES DE VELO PEQUERISIMOS APENAS VISIBLES A SIMPLE VISTA. COLOR MORENO GRISACEO QUE PRONTO DESAPARECE
ANILLO	48 HRS APENAS SE ESBOZA LA FORMACION DE UN ANILLO; 4 DIAS COMPLETA SU DESARROLLO FINO, TRANSPARENTE, COLOR BLANCO GRISACEO	10 DIAS SE ESBOZA SU FORMACION COMPLETANDO SU DESARROLLO A LOS 4 DIAS; FINO TRANSPARENTE Y COLOR BLANCO GRISACEO	PRIMEROS DIAS SE INICIA LA FORMACION COMPLETANDOSE A LOS 30 DIAS. FINO; - TRANSPARENTE, COLOR BLANCO GRISACEO
SEDIMENTO	ABUNDANTE, COLOR MORENO CLARO. A LOS 30 DIAS ALCANZA SU MAXIMO DESARROLLO	ABUNDANTE, COLOR MORENO CLARO ALCANZA SU DESARROLLO A LOS 30 DIAS	ABUNDANTE, COLOR MORENO CLARO ALCANZA SU DESARROLLO A LOS 30 DIAS
ENTURBIAMIENTO	EL MEDIO SE ENTURBIA LIGERAMENTE, DESPUES SE ACENTUA EL FENOMENO CONSERVANDOSE ASI	EL MEDIO SE ENTURBIA LIGERAMENTE DESPUES SE ACENTUA CONSERVANDOSE ASI	EL MEDIO SE ENTURBIA LIGERAMENTE DESPUES SE ACENTUA EL FENOMENO CONSERVANDOSE ASI
FERMENTACION	MUY DEBIL Y APENAS NOTABLE CONTINUANDOSE SOLAMENTE POR 24 HORAS.	EN LOS PRIMEROS DIAS MUY DEBIL. CONTINUAN DOSE POR 3 DIAS	SE INICIA EN LOS 10 DIAS MUY DEBIL CONTINUANDOSE POR 3 DIAS CONSECUTIVOS
II. MICROSCOPICAS			
FORMA DE LAS CELULAS	ESFERICAS ALARGADAS; OVALES; ALGUNAS ELIPTICAS	OVALES, ELIPTICAS, ESFERICAS	OVALES, ELIPTICAS, POCAS ESFERICAS ALGUNAS DE FORMA ALARGADA
AGRUPACION	AISLADAS; CADENAS CORTAS	AISLADAS, MUY POCAS FORMANDO GRUPOS	AISLADAS, MUY POCAS FORMANDO GRUPOS
BROTOS	LA MAYORIA PRESENTA DE 1 A 2 BROTOS	LA MAYORIA PRESENTA DE 1 A 3 BROTOS	LA MAYORIA PRESENTA DE 1 A 3 BROTOS
GRANULACIONES	SIN GRANULACIONES	SIN GRANULACIONES	SIN GRANULACIONES
PSEUDOHICELIO	-----	-----	-----

CONTINUACION TABLA 5,4 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LA CEPA No. 4 EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO LIQUIDOS

MOSTO DE CULTIVO LIQUIDOS			
CARACTERISTICAS	MOSTO DE CERVEZA LIQUIDO	MOSTO DE UVA LIQUIDO	AGUAMIEL LIQUIDO
I. MACROSCOPICAS			
VELO	48 HRS VELO MUCOSO; 3 DIAS VELO MYCODER MICO TIPICO HUY PLEGADO, SECO, OPACO Y DE COLOR BLANCO GRISACEO	PRIMEROS DIAS SE INICIA SU FORMACION CON PLETANDOSE AL TERCER DIA; COLOR BLANCO GRISACEO	4 DIAS VELO MUCOSO
ANILLO	TERCER DIA SE INICIA SU FORMACION, ASPECTO SECO SIN BRILLO, COLOR BLANCO GRISACEO	PRIMEROS DIAS INICIA SU FORMACION COMPLETANDO SU DESARROLLO AL TERCER DIA	SE EMPIEZA A FORMAR AL SEPTIMO DIA
SEDIMENTO	SE EMPIEZA A FORMAR AL SEPTIMO DIA A EXPENSAS DE FRAGMENTO DE VELO	SE EMPIEZA A FORMAR AL QUINTO DIA A EXPENSAS DE FRAGMENTO DE VELO	SE EMPIEZA A FORMAR AL SEPTIMO DIA A EXPENSAS DE FRAGMENTO DE VELO
ENTURBIAMIENTO	NO HAY	MEDIO, LIGERAMENTE TURBIO	NO HAY
FERMENTACION	NO HAY	NO HAY	NO HAY
II. MICROSCOPICAS			
FORMA DE LAS CELULAS	OVOIDES, REDONDAS Y ALGUNAS ALARGADAS	OVOIDES, ELIPTICAS Y ALGUNAS ALARGADAS	OVOIDES, ELIPTICAS Y ALGUNAS ALARGADAS
AGRUPACION	AISLADAS DESPUES EN CADENAS O RACIMOS	CADENAS O RACIMOS	AISLADAS, LADENAS Y RACIMOS
BROTOS	LA MAYORIA GEMANDO	MULTILATERALES CON GRAN CANTIDAD DE CELULAS GEMANDO	MULTILATERALES CON GRAN CANTIDAD DE CELULAS GEMANDO
GRANULACIONES	SE OBSERVAN ZONAS MAS CLARAS QUE EL CITOPLASMA	ALGUNAS GRANULACIONES	ALGUNAS GRANULACIONES
PSEUDOMICELIO	GRAN TENDENCIA A SU FORMACION	SE OBSERVA FORMACION DE PSEUDOMICELIO	SE FORMA DESPUES DE LOS 30 DIAS

MEDIOS	AGAR
CARACTERISTICAS	GORODKOWA (a)
FORMA	EQUINULADA
BORDES	DENTADOS
SUPERFICIE	RUGOSA
COLOR	BLANCO GRISACEO

- (a) EMPLEANDO LOS DISTINTOS MEDIOS SOLIDOS; AGAR SABOURAUD; MOSTO DE CERVEZA GELOSADO; MOSTO DE UVA GELOSADO; AGUAMIEL GELOSADO; MOSTO DE CERVEZA GELATINADO; MOSTO DE UVA GELATINADO Y AGUAMIEL GELATINADO LAS CARACTERISTICAS SON IGUALES.

CONTINUACION TABLA 5.4 COLONIAS GIGANTES

MEDIOS	AGAR	AGAR	MOSTO DE CERVEZA	MOSTO DE CERVEZA
CARACTERISTICAS	GORODKOWA	SABOURAUD	GELOSADO (a)	GELATINADO (b)
FORMA	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR	CIRCULAR
SUPERFICIE	RUGOSA	RUGOSA	RUGOSA PULVINADA	RUGOSA
ELEVACION	UMBONADA	CONVEXA	CONVEXA	CONVEXA
BORDES	IRREGULARES	IRREGULARES	REGULARES	IRREGULARES
COLOR	MORENO	CAFE AMARILLENTO	BLANCO GRISACEO	BLANCO GRISACEO
CARACTERISTICAS OPTICAS	OPACAS	OPACAS	OPACAS	OPACAS
BRILLO	INTENSO	MEDIANO	SIN BRILLO	SIN BRILLO
DIAMETRO	15 mm	17 mm	20 mm	15 mm

- (a) EN LOS MEDIOS MOSTO DE UVA GELOSADO Y AGUAMIEL GELOSADO LAS CARACTERISTICAS SON LAS MISMAS.
- (b) EN LOS MEDIOS MOSTO DE UVA GELATINADO Y AGUAMIEL GELATINADO LAS CARACTERISTICAS SON IGUALES.

TABLA 5.5 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LAS PRUEBAS DE ASIMILACION DE FUENTES DE CARBONO.

FUENTE DE CARBONO	CEPA No.1	CEPA No.2	CEPA No.3	CEPA No.4
GLUCOSA	(+)	(+)	(+)	(+)
SACAROSA	(+) (-)	(-)	(+)	(-)
LACTOSA	(-)	(-)	(-)	(-)
D-GALACTOSA	(+)	(-)	(-)	(-)
MALTOSA	(+) (-)	(-)	(+)	(-)
RAFINOSA	(+) (-)	(-)	(-)	(-)
D-XILOSA	(-)	(+) (-)	(+)	(+) (-)
L-ARABINOSA	(-)	(-)	(+)	(-)
INULINA	(-)	(-)	(-)	(-)
LEVULOZA	(+)	(-)	(+)	(-)
MANOSA	(+)	(-)	(+)	(-)
DEXTROSA	(+)	(-)	(+)	(-)
ALMIDON	(+) (-)	(-)	(+)	(-)
MELEZITOSA	(+) (-)	(-)	(+)	(-)

TABLA 5.6 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LAS PRUEBAS DE FERMENTACION DE FUENTES DE CARBONO.

FUENTE DE CARBONO	CEPA No.1	CEPA No.2	CEPA No.3	CEPA No.4
GLUCOSA	(+)	(+) (-)	(+)	(+) (-)
SACAROSA	(+) (-)	(-)	(+) (-)	(-)
LACTOSA	(-)	(-)	(-)	(-)
D-GALACTOSA	(+) (-)	(-)	(+)	(-)
MALTOSA	(+) (-)	(-)	(-)	(-)
RAFINOSA	(+)	(-)	(-)	(-)
D-XILOSA	(+) (-)	(-)	(+) (-)	(-)
L-ARABINOSA	(-)	(-)	(+)	(-)
INULINA	(+)	(-)	(-)	(-)
LEVULOSA	(+)	(-)	(+)	(-)
MANOSA	(+)	(-)	(+)	(-)
DEXTROSA	(-)	(-)	(+)	(-)
ALMIDON	(+)	(-)	(-)	(-)
MELEZITOSA	(+) (-)	(-)	(-)	(-)

TABLA 5.7 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LAS PRUEBAS DE ASIMILACION DE FUENTES DE NITROGENO.

FUENTE DE NITROGENO	CEPA No.1	CEPA No.2	CEPA No.3	CEPA No.4
Nitrato de Potasio	(-)	(-)	(-)	(-)
Sulfato de Amonio	(+)	(+)	(+)	(+)
Asparagina	(+)	(+)	(+)	(+)
Urea	(-)	(-)	(+)	(-)
Peptona	(+)	(+)	(+)	(+)

TABLA 5.8 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LAS PRUEBAS DE REQUERIMIENTOS VITAMINICOS.

P R U E B A	CEPA No.1	CEPA No.2	CEPA No.3	CEPA No.4
Crecimiento sin Vitaminas	(+) (-)	(+) (-)	(+) (-)	(+) (-)
Crecimiento sin Inositol	(+) (-)	(+) (-)	(+)	(+) (-)
Crecimiento sin Pantotenato	(+)	(+) (-)	(+) (-)	(+) (-)
Crecimiento sin Biotina	(+) (-)	(+) (-)	(+)	(+) (-)
Crecimiento sin Tiamina	(+) (-)	(+) (-)	(-)	(+) (-)
Crecimiento sin Piridoxina	(+) (-)	(+) (-)	(+)	(+)
Crecimiento sin Niacina	(+) (-)	(+) (-)	(+)	(+) (-)
Crecimiento sin Acido Fólico	(+) (-)	(+) (-)	(+)	(+) (-)
Crecimiento sin Paba	(+) (-)	(+) (-)	(+)	(+) (-)

TABLA 5.9 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE OTRAS PRUEBAS MORFOLOGICAS Y FISIOLÓGICAS.

P R U E B A	CEPA No.1	CEPA No.2	CEPA No.3	CEPA No.4
Crecimiento con D-Glucosa al 50%	(-)	(-)	(+) (-)	(-)
Crecimiento con D-Glucosa al 60%	(-)	(-)	(+) (-)	(-)
Crecimiento a 37°C	(+) (-)	(+) (-)	(+)	(+) (-)
Colonias Rosas	(-)	(-)	(-)	(-)
Células con Brotes	(+)	(+)	(+)	(+)
Células Esféricas Ovais y Cilíndricas	(+)	(+)	(+)	(+)
Células de Otras Formas	(-)	(-)	(-)	(-)
Filamentos	(+) (-)	(+) (-)	(+)	(+) (-)
Hifas Septadas	(-)	(-)	(-)	(-)

TABLA 5.10 NOMBRE DE LAS ESPECIES DE LEVADURAS IDENTIFICADAS A TRAVES DE LAS PRUEBAS MORFOLOGICAS Y FISIOLÓGICAS.

NUMERO DE LA CEPA	NOMBRE DE LA ESPECIE
CEPA No. 1	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>
CEPA No. 2	<u>Pichia membranaefaciens</u>
CEPA No. 3	<u>Candida parapsilosis</u>
CEPA No. 4	<u>Candida valida</u>

TARLA 5.11 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZUCARES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FUENTE DE CARBONO (GLUCOSA) PAPA: *Saccharomyces cerevisiae*

	1%		2%		2.5%		5%		7.5%		10%		12.5%		15%		17.5%		20%	
	Glucosa (mg/ml)	μ (h^{-1})																		
3	11.4	0.220	10.2	0.170	25.1	0.135	48.2	0.062	71.0	0.059	94.8	0.040	120.0	0.022	141.8	0.026	174.6	0.032	190.8	0.014
6	7.2	0.216	16.3	0.174	20.2	0.130	16.0	0.054	69.8	0.057	84.0	0.038	117.0	0.014	138.9	0.020	171.9	0.026	186.0	0.020
9	1.8	0.119	15.9	0.166	14.0	0.098	41.5	0.056	63.5	0.042	83.0	0.032	114.5	0.017	127.5	0.019	169.0	0.017	177.0	0.018
12	1.8	0.112	2.4	0.067	7.1	0.041	18.0	0.036	56.0	0.044	82.0	0.036	113.5	0.014	124.0	0.017	164.0	0.020	159.0	0.017
15	1.2	0.102	1.8	0.070	7.1	0.034	11.0	0.026	42.0	0.045	80.0	0.038	112.0	0.013	120.0	0.015	163.0	0.018	146.0	0.014
13	1.8	0.083	1.8	0.063	7.1	0.029	1.0	0.022	28.0	0.038	82.0	0.035	107.0	0.011	118.0	0.018	160.0	0.014	140.0	0.013
21	-	-	-	-	-	-	0.0	0.020	13.0	0.032	68.5	0.030	83.2	0.010	114.5	0.012	124.0	0.013	130.0	0.012
24	-	-	-	-	-	-	0.0	0.018	5.0	0.030	53.0	0.027	67.5	0.009	63.2	0.011	95.5	0.011	116.0	0.011
27	-	-	-	-	-	-	-	-	1.4	0.020	33.0	0.010	53.0	0.008	46.0	0.010	77.0	0.010	97.0	0.009
30	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.018	12.5	0.008	17.6	0.006	32.5	0.009	53.0	0.009	80.2	0.007
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.5	0.006	33.6	0.006	24.0	0.006	38.5	0.008	79.8	0.008
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2	0.004	-	-	10.0	0.004	32.0	0.008	72.0	0.006
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2	0.002	-	-	-	-	32.5	0.007	-	-

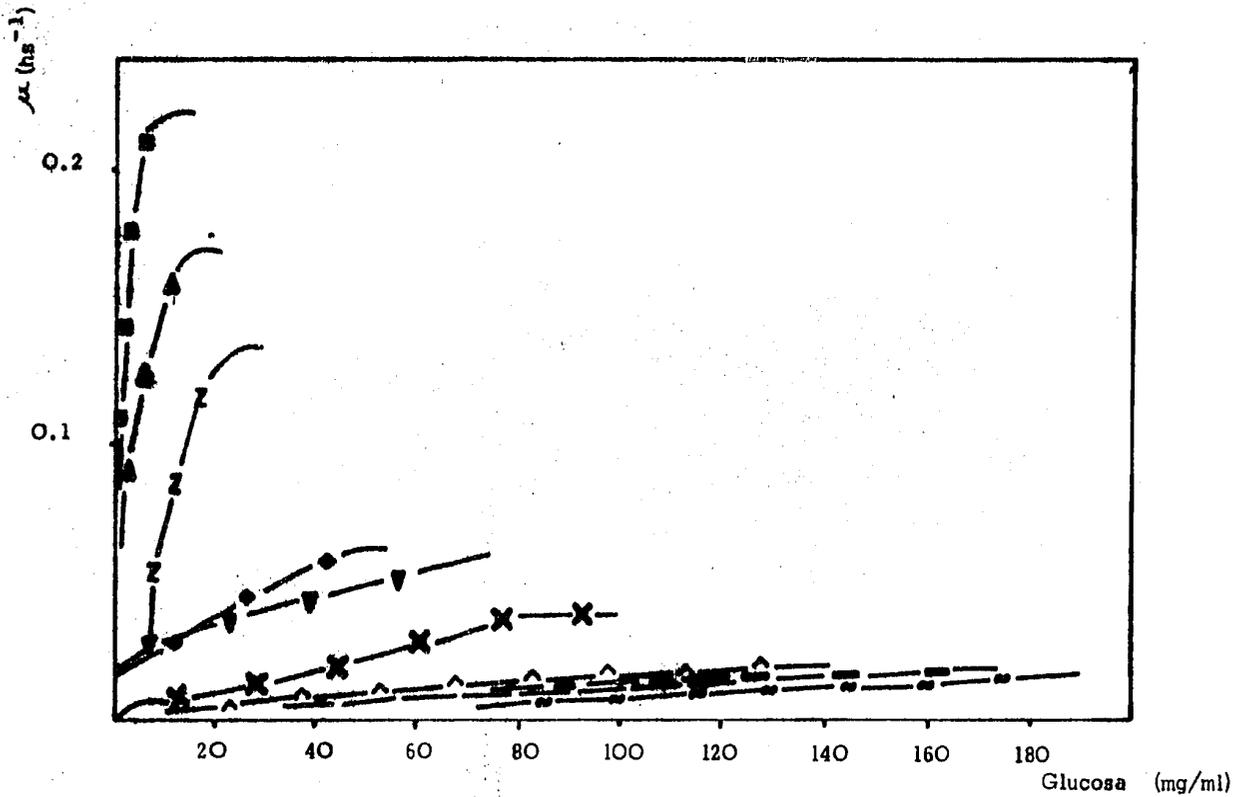


FIGURA 5.1 Consumo de Azúcares vs Velocidad Específica de Crecimiento a diferentes concentraciones de glucosa para *Saccharomyces cerevisiae*. —■— 1%, —▲— 2%, —Z— 2.5%, —◆— 5%, —▼— 7.5%, —X— 10%, — — 12.5%, — — 15%, —●— 17.5%, —●— 20%.

TABLA 5.12 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZUCARES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FUENTE DE CARBONO (GLUCOSA) PARA: *Pichia membranaefaciens*

	1%		2%		2.5%		5%		7.5%		10%		15%		17.5%		20%	
	Glucosa (mg/ml)	μ (h^{-1})																
3	9.2	0.195	21.4	0.175	30.8	0.170	46.8	0.08	-	-	75.0	0.088	127.0	0.070	156.8	0.074	187.0	0.068
6	8.0	0.165	19.5	0.177	12.0	0.146	28.0	0.072	56.4	0.074	61.2	0.062	116.0	0.066	138.8	0.071	171.0	0.084
9	7.4	0.135	17.4	0.166	2.5	0.090	20.0	0.067	50.0	0.070	34.0	0.105	83.7	0.070	122.0	0.084	128.0	0.068
12	7.0	0.130	17.0	0.136	1.2	0.074	11.0	0.057	37.2	0.069	32.0	0.064	66.5	0.072	103.0	0.075	115.0	0.058
15	6.0	0.132	11.0	0.121	1.2	0.063	7.0	0.051	27.5	0.068	24.0	0.054	51.0	0.064	90.0	0.074	102.0	0.048
18	5.4	0.120	9.0	0.100	1.2	0.045	2.0	0.046	25.0	0.068	16.0	0.052	39.0	0.056	67.0	0.070	90.0	0.041
21	4.0	0.108	6.0	0.084	-	-	1.2	0.040	18.0	0.059	11.2	0.048	30.0	0.054	54.0	0.061	80.0	0.037
24	0.06	0.042	6.0	0.082	-	-	0.0	0.039	12.0	0.055	5.0	0.037	18.0	0.047	38.0	0.069	73.0	0.029
27	0.05	0.024	4.0	0.074	-	-	0.0	0.033	4.0	0.044	2.5	0.020	11.0	0.038	25.0	0.044	60.0	0.025
30	0.08	0.022	3.6	0.062	-	-	-	-	1.3	0.026	-	-	6.0	0.034	7.2	0.030	54.8	0.023
33	0.08	0.021	3.6	0.055	-	-	-	-	-	-	-	-	6.0	0.031	3.6	0.025	50.0	0.021
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2	0.020	-	-

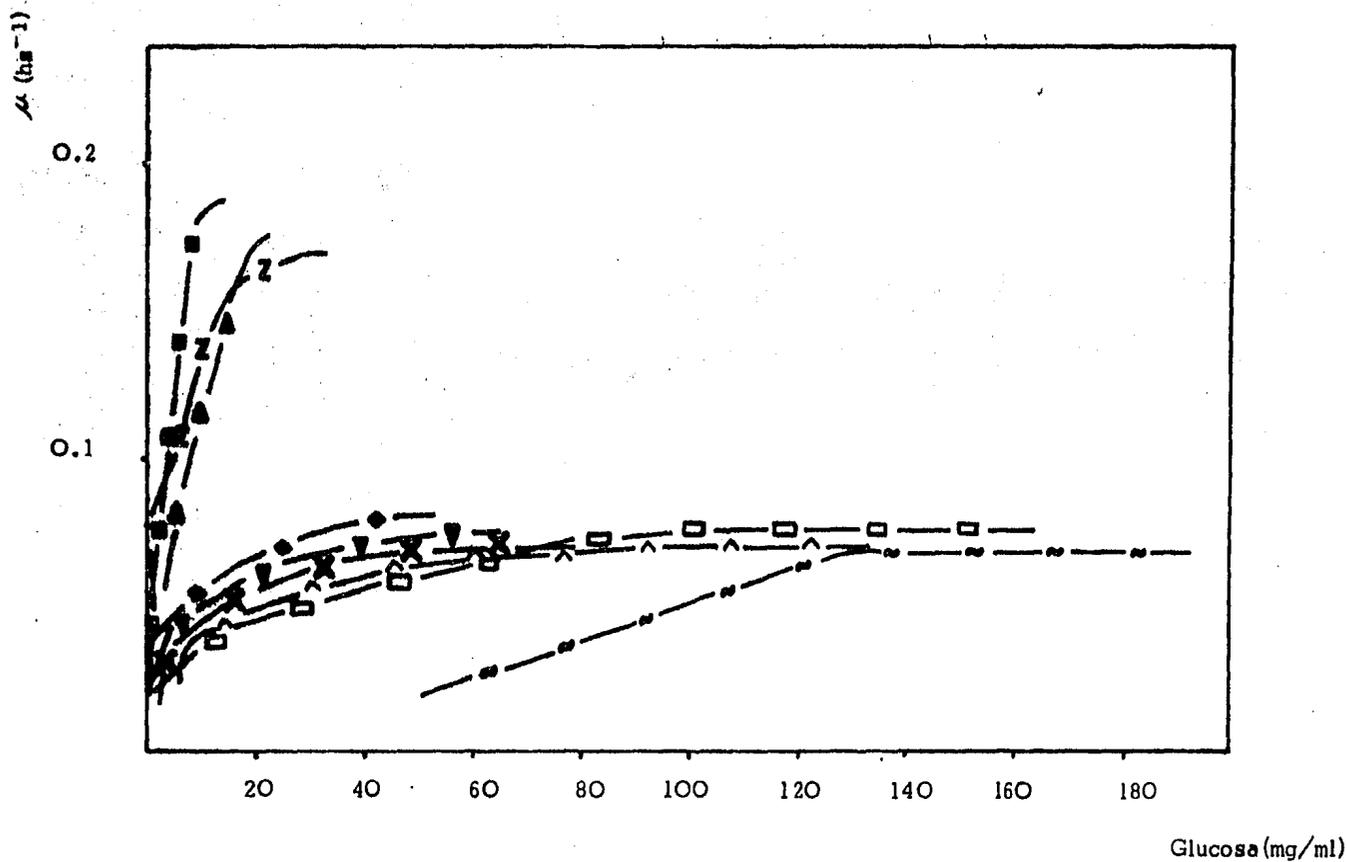


FIGURA 5.2 Consumo de Azúcares vs Velocidad Específica de Crecimiento a diferentes concentraciones de glucosa para: *Pichia membranaefaciens* —■— 1.0%, —▲— 2%, —Z— 2.5%, —◆— 5%, —▼— 7.5%, —X— 10.0%, —^— 15.0%, —□— 17.5% y —●— 20.0%.

TABLA 5.11 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZUCARES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FUENTE DE CARBONO (GLUCOSA) PARA: *Candida parapsilosis*

	1.0:		2.0:		3.0:		5.0:		7.5:		10:		12.5:		15.0:		17.5:		20.0:	
	Glucosa (mg/ml)	μ - (h^{-1})																		
3	-	-	13.0	0.149	20.0	0.162	45.0	0.097	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	9.9	0.131	17.5	0.090	32.5	0.095	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	1.1	0.073	12.0	0.094	31.0	0.065	75.0	0.057	-	-	112.0	0.030	-	-	-	-	-	-
12	-	-	1.8	0.027	10.0	0.072	20.0	0.034	73.0	0.054	90.0	0.048	28.0	0.020	-	-	160.0	0.026	185.0	0.034
15	9.4	0.152	1.0	0.023	6.0	0.041	10.0	0.046	32.5	0.046	61.5	0.037	89.0	0.020	-	-	150.0	0.016	177.0	0.030
18	6.3	0.136	1.3	0.021	3.0	0.032	7.0	0.049	15.0	0.023	51.0	0.027	35.0	0.027	-	-	145.0	0.027	155.0	0.026
21	1.3	0.026	-	-	2.5	0.026	5.0	0.022	37.0	0.034	50.0	0.026	76.0	0.025	142.0	0.042	133.0	0.023	140.0	0.022
24	1.2	0.021	-	-	2.5	0.021	5.0	0.024	15.0	0.043	45.0	0.027	62.0	0.023	109.0	0.041	123.0	0.019	131.0	0.018
27	1.0	0.027	-	-	1.7	0.020	4.5	0.014	33.0	0.042	35.0	0.025	39.0	0.022	37.5	0.045	111.0	0.016	129.5	0.014
30	1.0	0.023	-	-	1.7	0.020	4.0	0.010	23.0	0.030	25.0	0.021	49.0	0.021	87.0	0.040	107.0	0.014	125.0	0.016
33	1.8	0.061	-	-	1.2	0.010	1.5	0.009	20.0	0.030	22.5	0.020	47.0	0.022	75.0	0.034	97.0	0.015	115.0	0.012
36	-	-	-	-	1.5	0.010	0	0.010	15.0	0.031	21.0	0.020	45.0	0.020	53.0	0.029	20.0	0.013	135.0	0.011
39	-	-	-	-	-	-	4.5	0.009	6.0	0.022	21.0	0.015	30.0	0.020	50.0	0.031	80.0	0.012	99.0	0.010
42	-	-	-	-	-	-	-	-	6.0	0.022	21.0	0.015	25.5	0.019	47.0	0.027	75.0	0.013	90.0	0.010
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21.0	0.014	11.0	0.010	45.0	0.026	71.0	0.012	83.0	0.008
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.0	0.008	36.0	0.021	65.0	0.011	70.0	0.007
63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.0	0.006	2.5	0.015	60.0	0.011	65.0	0.007
75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.5	0.013	50.0	0.008	56.0	0.005
111	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.5	0.010	50.0	0.006	56.0	0.005
205	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.0	0.007	56.0	0.004

μ (hr⁻¹)

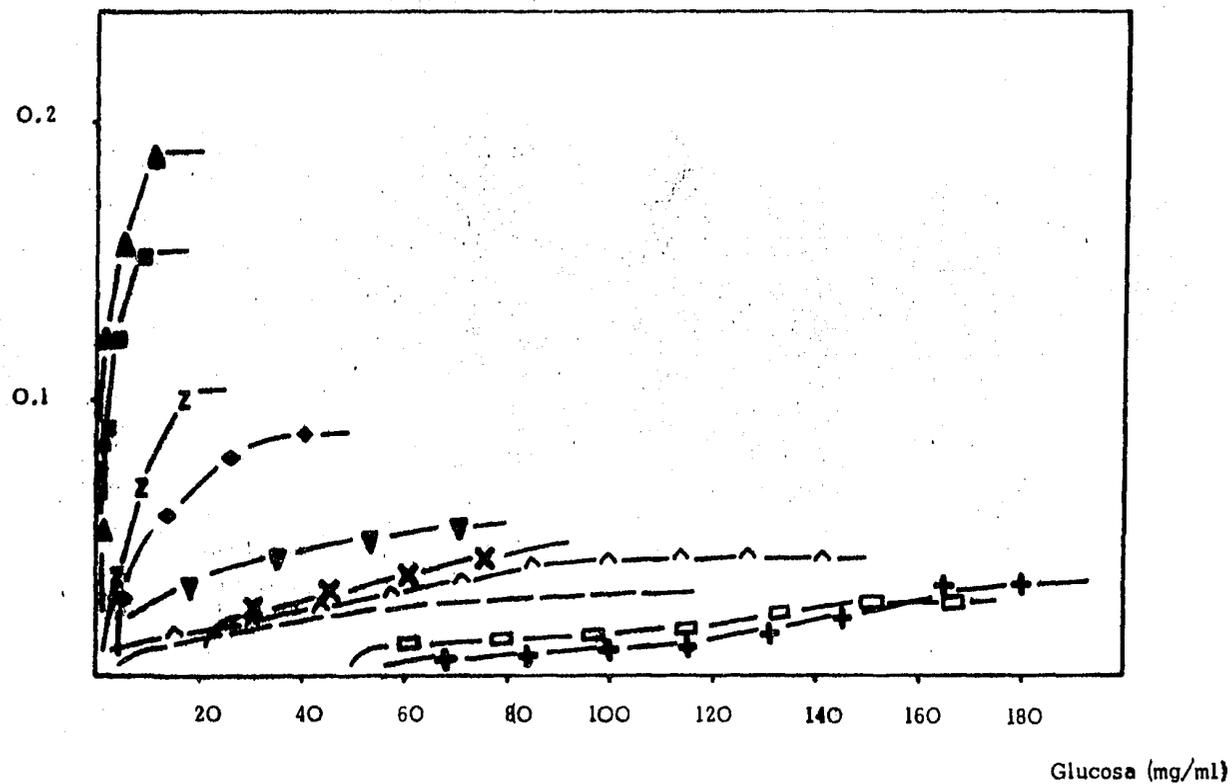


FIGURA 5.3 Consumo de Azúcares vs Velocidad Específica de Crecimiento a diferentes concen_ traciones de glucosa para: Candida parapsilosis —■— 1%, —▲— 2%, —Z— 2.5%, —◆— 5%, —▼— 7.5%, —X— 10%, — — 12.5%, — — 15%, —□— 17.5% y —+— 20%.

TABLA 5.14 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZUCARES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FUENTE DE CARBONO (GLUCOSA) PARA: *Candida utilis*

	1%		2%		2.5%		5%		7.5%		10%		12.5%		15%		17.5%		20%	
	Glucosa (mg/ml)	μ (h^{-1})																		
15	19.4	0.271	16.0	0.199	15.0	0.171	36.0	0.161	60.0	0.110	82.0	0.060	115.0	0.087	130.0	0.071	175.0	0.089	181.0	0.044
21	2.4	0.163	4.0	0.122	12.0	0.169	23.0	0.158	56.0	0.080	70.0	0.064	108.0	0.079	122.0	0.066	170.0	0.092	175.0	0.049
27	2.0	0.162	1.8	0.034	10.0	0.165	17.0	0.120	52.0	0.105	76.0	0.061	88.0	0.075	115.0	0.056	167.0	0.090	165.0	0.040
39	1.0	0.067	1.8	0.020	6.0	0.116	12.0	0.080	40.0	0.080	66.0	0.050	83.0	0.072	100.0	0.039	163.0	0.086	164.0	0.034
45	2.4	0.057	1.4	0.028	4.0	0.060	6.0	0.049	35.0	0.068	63.0	0.042	70.0	0.068	95.0	0.038	141.0	0.082	151.0	0.048
51	1.8	0.053	1.6	0.026	2.0	0.049	7.5	0.042	33.0	0.059	55.0	0.023	65.0	0.063	80.0	0.031	136.5	0.078	146.0	0.040
63	1.8	0.048	-	-	0.5	0.042	1.0	0.031	30.0	0.052	46.0	0.016	50.0	0.051	77.0	0.027	126.0	0.068	140.0	0.039
69	-	-	-	-	9.5	0.037	1.0	0.028	24.0	0.052	30.0	0.014	46.5	0.045	66.0	0.022	119.0	0.063	131.0	0.024
75	-	-	-	-	0.5	0.028	-	-	9.4	0.020	28.0	0.011	40.0	0.043	57.0	0.021	102.5	0.058	127.0	0.030
87	-	-	-	-	-	-	-	-	8.6	0.017	20.0	0.009	35.0	0.040	53.0	0.018	95.0	0.048	120.0	0.027
93	-	-	-	-	-	-	-	-	8.6	0.016	8.0	0.006	25.0	0.029	50.0	0.016	94.0	0.048	115.0	0.022
99	-	-	-	-	-	-	-	-	8.6	0.015	1.0	0.005	21.0	0.025	35.0	0.013	91.0	0.050	110.0	0.022
111	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	0.004	14.0	0.018	28.0	0.011	88.0	0.046	109.0	0.019
117	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.0	0.015	26.0	0.011	75.0	0.040	100.0	0.019
157	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.0	0.014	24.0	0.010	66.0	0.024	98.0	0.014
163	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21.0	0.010	55.0	0.023	86.0	0.016
181	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20.0	0.009	50.0	0.024	78.0	0.013
187	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20.0	0.009	46.0	0.016	70.5	0.012
187	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19.0	0.008	42.0	0.016	65.0	0.011
193	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19.0	0.008	35.0	0.013	55.0	0.011
205	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19.0	0.008	31.0	0.008	53.0	0.010
211	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19.0	0.008	30.0	0.007	51.0	0.010
217	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30.0	0.004	50.0	0.010
229	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43.0	0.009
236	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43.0	0.009
241	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43.0	0.008
253	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43.0	0.008

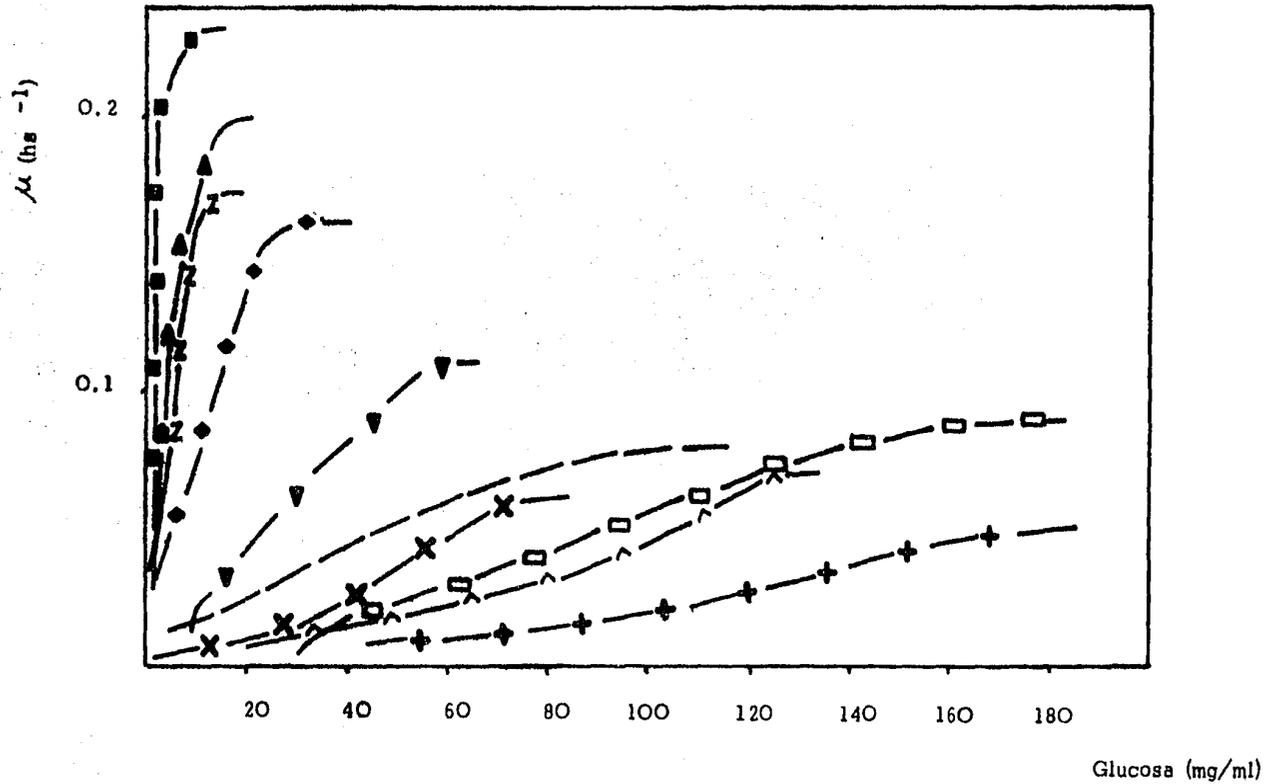


FIGURA 5.4 Consumo de Azúcares vs Velocidad Específica de Crecimiento a diferentes concentraciones de glucosa para: *Candida utilis* —■— 1%, —▲— 2%, —Z— 2.5%, —◆— 5%, —V— 7.5%, —X— 10%, —— 12.5%, —^— 15%, —□— 17.5%, —+— 20%.

TABLA 5.15 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZUCARES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FUENTE DE NITROGENO PARA:

Pichia membranaefaciens

TIEMPO (hs)	* 0.125%		0.25%		0.375%		0.50%		0.625%		0.75%		0.875%		1.0%	
	Glucosa (mg/ml)	μ (hs^{-1})														
3	78.0	0.220	80.0	0.132			83.0	0.100			83.0	0.132				
6	75.0	0.189	62.0	0.122	73.0	0.154	77.0	0.063	85.0	0.138	80.0	0.129	82.0	0.113	86.0	0.092
9	73.0	0.154	40.0	0.099	55.0	0.162	55.0	0.061	80.0	0.132	55.0	0.121	73.0	0.099	77.0	0.077
12	71.0	0.106	30.0	0.084	35.0	0.154	34.0	0.047	77.0	0.135	33.0	0.104	65.0	0.099	37.0	0.052
15	30.0	0.144	21.0	0.073	20.0	0.152	18.0	0.037	15.0	0.087	10.0	0.074	10.0	0.085	12.0	0.047
18	10.0	0.106	11.0	0.066	10.0	0.144	11.0	0.031	9.0	0.075	7.0	0.075	9.0	0.074	10.0	0.043
21	8.0	0.089	7.0	0.059	6.0	0.124	5.0	0.027	4.0	0.067	7.0	0.059	6.0	0.064	9.0	0.038
24	4.0	0.077	4.0	0.056	5.0	0.111	5.0	0.024	4.0	0.061	7.0	0.046	4.0	0.056	8.0	0.037
36	1.0	0.049	4.0	0.037	4.0	0.101	4.0	0.021	4.0	0.044	7.0	0.042	3.0	0.037	6.0	0.029
39	1.0	0.045	4.0	0.035	3.0	0.068	3.0	0.015	4.0	0.044	7.0	0.039	3.0	0.034	5.0	0.028
42	1.0	0.042	1.0	0.033	3.0	0.061	2.0	0.015	4.0	0.041			3.0	0.032	5.0	0.026
45							1.0	0.014							5.0	0.022

* $(NH_4)_2SO_4$

TABLA 5.16 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZUCARES
 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FUENTE DE NITROGENO PARA: Saccharomyces cerevisiae

TIEMPO (hs)	* 0.125%		0.25%		0.375%		0.50%		0.625%		0.75%		0.875%		1.0%	
	Glucosa (mg/ml)	μ (hs ⁻¹)														
3	85.0	0.134	88.0	0.184	87.0	0.095			87.0	0.101	86.0	0.092	81.0	0.080	88.0	0.069
6	80.0	0.140	75.0	0.167	85.0	0.089	88.0	0.098	82.0	0.100	83.0	0.085	77.0	0.082	80.0	0.064
9	74.0	0.138	72.0	0.166	82.0	0.090	82.0	0.102	70.0	0.104	81.0	0.083	75.0	0.080	77.0	0.063
12	73.0	0.133	62.0	0.158	77.0	0.088	77.0	0.094	60.0	0.099	55.0	0.074	54.0	0.061	39.0	0.058
15	71.0	0.129	56.0	0.146	75.0	0.080	75.0	0.089	50.0	0.089	10.0	0.054	52.0	0.048	12.0	0.046
18	68.0	0.124	50.0	0.132	72.0	0.084	58.0	0.077	42.0	0.068	8.0	0.052	43.0	0.040	10.0	0.040
21	65.0	0.130	43.0	0.128	70.0	0.078	12.0	0.026	28.0	0.070	6.0	0.054	32.0	0.036	8.0	0.035
24	62.0	0.114	35.0	0.112	25.0	0.043	10.0	0.024	24.0	0.061	6.0	0.048	26.0	0.032	6.0	0.033
36	12.0	0.055	8.0	0.056	10.0	0.029	10.0	0.020	10.0	0.047	2.5	0.037	10.0	0.030	6.0	0.031
39	10.0	0.050	5.0	0.043	8.0	0.028	10.0	0.016	6.0	0.044	2.5	0.034	8.0	0.021		
42	7.0	0.042	5.0	0.038	8.0	0.026			6.0	0.041	2.5	0.033	4.0	0.020		
45													4.0	0.018		

* (NH₄)₂SO₄

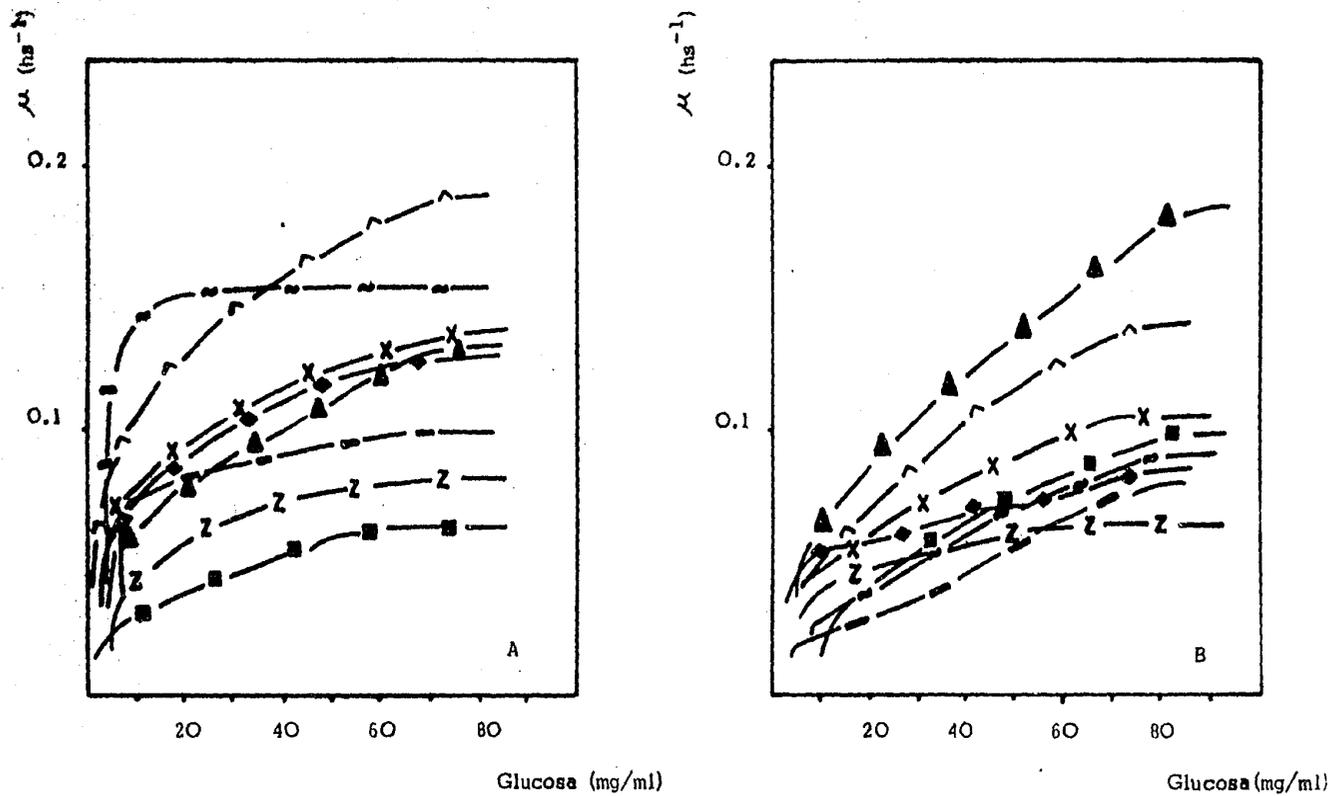


FIGURA 5.5 Consumo de Azúcares vs Velocidad Específica de Crecimiento a diferentes concentraciones de Sulfato- de Àmonio para: (A) *Pichia membranaefaciens* y (B) *Saccharomyces cerevisiae* — ^ — 0.125%, — ▲ — 0.25%, — ∞ — 0.375%, — ■ — 0.5%, — X — 0.625%, — ◆ — 0.75%, — ■ — 0.875%, — Z — 1.0%.

TABLA 5.17 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZUCARES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FUENTE DE NITROGENO PARA: Candida parapsilosis

TIEMPO (hs)	*0.125%		0.025%		0.375%		0.050%		0.625%		0.75%		0.875%		1.0%	
	Glucosa (mg/ml)	μ (hs^{-1})														
3	70.0	0.231	72.0	0.216	77.0	0.198	73.0	0.074	75.0	0.089	71.0	0.060	75.0	0.046	67.0	0.065
6	50.0	0.226	55.0	0.206	72.0	0.202	50.0	0.052	67.0	0.082	61.0	0.055	50.0	0.042	46.0	0.051
9	36.0	0.185	40.0	0.121	52.0	0.176	40.0	0.041	57.0	0.073	38.0	0.049	35.0	0.021	32.0	0.034
12	28.0	0.148	32.0	0.112	27.0	0.123	30.0	0.037	40.0	0.046	27.0	0.032	29.0	0.016	26.0	0.026
24	20.0	0.115	30.0	0.118	20.0	0.109	23.0	0.027	38.0	0.052	20.0	0.030	21.0	0.015	20.0	0.020
27	10.0	0.070	24.0	0.088	4.0	0.055	6.0	0.012	20.0	0.032	3.0	0.006	8.0	0.059	6.0	0.012
30	6.0	0.060	10.0	0.039	2.5	0.051	4.0	0.008	3.0	0.022	0.0	0.004	3.0	0.005	3.0	0.010
33			8.0	0.035	2.5	0.050	4.0	0.008	0.0	0.015						

* $(NH_4)_2SO_4$

TABLA 5.18 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZUCARES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FUENTE DE NITROGENO PARA: Candida valida

TIEMPO (hs)	*0.125%		0.25%		0.375%		0.50%		0.625%		0.75%		0.875%		1.0%	
	Glucosa (mg/ml)	μ (hs^{-1})														
3	80.0	0.162			83.0	0.052										
6	72.0	0.158	85.0	0.137	78.0	0.056	85.0	0.052	85.0	0.082	83.0	0.068	81.5	0.031	86.0	0.026
9	67.0	0.144	75.0	0.112	73.0	0.047	82.0	0.046	81.0	0.081	80.0	0.070	81.0	0.030	73.0	0.024
12	62.0	0.142	70.0	0.098	69.0	0.040	78.0	0.043	75.0	0.074	78.0	0.066	68.0	0.022	61.0	0.020
24	52.0	0.116	53.0	0.062	55.0	0.024	73.0	0.041	70.0	0.066	70.0	0.059	66.0	0.019	55.0	0.023
27	49.0	0.103	50.0	0.060	51.0	0.024	69.0	0.041	54.0	0.036	60.0	0.041	62.0	0.017	46.0	0.019
30	46.0	0.108	43.0	0.049	50.0	0.021	65.0	0.032	48.0	0.026	57.0	0.037	60.0	0.014	46.0	0.016
33	45.0	0.110	43.0	0.047	45.0	0.022	64.0	0.038	47.0	0.025	53.0	0.032	47.0	0.011	42.0	0.017
36	43.0	0.104	38.0	0.031	45.0	0.022	56.0	0.032	43.0	0.024	51.0	0.031	45.0	0.010	30.0	0.010
48	40.0	0.084	35.0	0.034	37.0	0.016	55.0	0.031	38.0	0.028	50.0	0.028	42.0	0.013	27.0	0.009
51	36.0	0.072	28.0	0.036	37.0	0.016	45.0	0.023	35.0	0.018	38.0	0.023	39.0	0.011	22.0	0.008
54	32.0	0.064	27.0	0.033	34.0	0.015	43.0	0.021	33.0	0.017	35.0	0.022	32.0	0.009	21.0	0.007
57	31.0	0.061	25.0	0.022	32.0	0.014	40.0	0.021	31.0	0.016	32.0	0.024	31.0	0.008	19.0	0.006
60	25.0	0.035	25.0	0.022	30.0	0.014	37.0	0.020	29.0	0.015	31.0	0.023	30.0	0.008	17.0	0.005
72	23.0	0.040	25.0	0.020	29.0	0.011	32.0	0.018	27.0	0.015	26.0	0.021	28.0	0.007	16.0	0.005
75	20.0	0.035	23.0	0.020	27.0	0.011	27.0	0.017	25.5	0.012	25.0	0.017	27.0	0.006	13.0	0.005
78	19.0	0.034	21.0	0.017	23.0	0.011	26.0	0.016	25.5	0.009	22.5	0.015	25.0	0.007	9.0	0.004
81	17.0	0.029	20.0	0.015	22.0	0.010	26.0	0.016	25.5	0.008	19.0	0.015	22.5	0.006	8.0	0.004
84	17.0	0.027	20.0	0.014	23.0	0.011	26.0	0.015			17.0	0.013	20.0	0.005	8.0	0.003
144													20.0	0.005	8.0	0.002

* $(NH_4)_2SO_4$

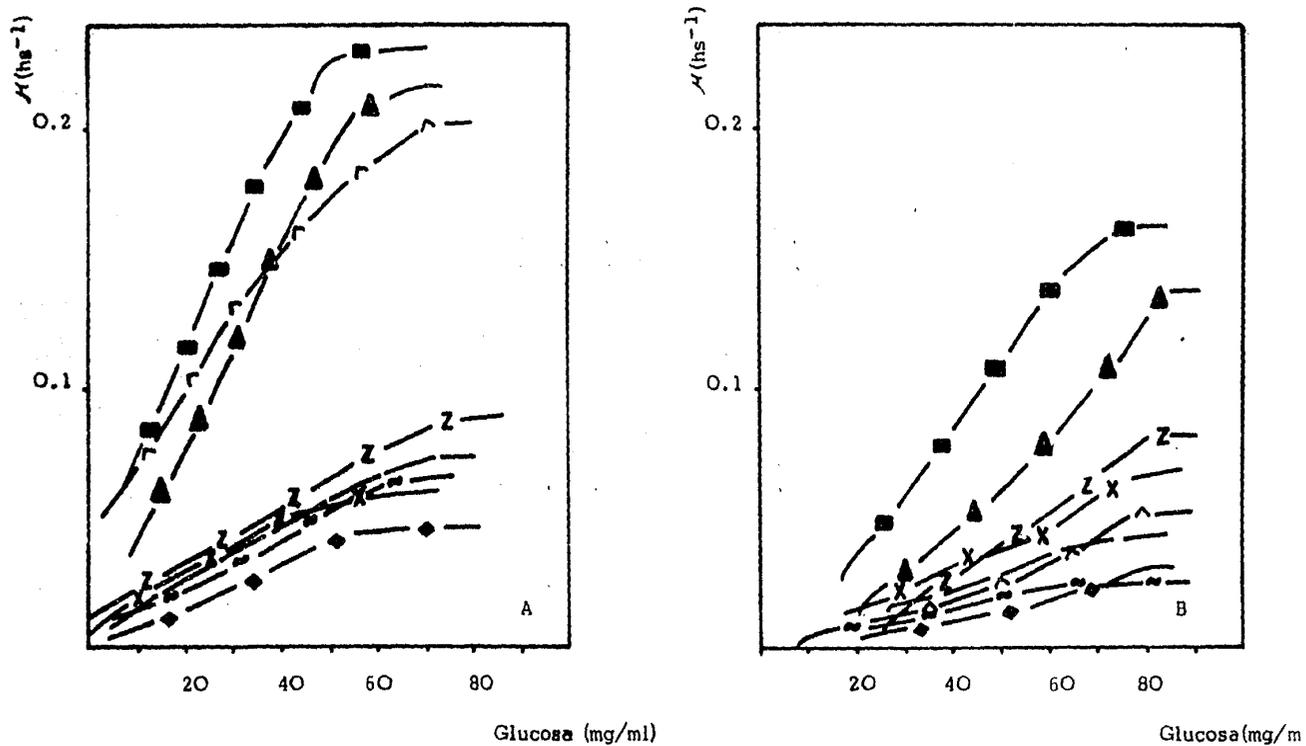


FIGURA 5.6 Consumo de Azúcares vs Velocidad Específica de Crecimiento a diferentes concentraciones de Sulfato de Amonio para: (A) *Candida parapsilosis* y (B) *Candida valida* —■— 0.125%, —▲— 0.25%, —^— 0.375%, —○— 0.5%, —Z— 0.625%, —X— 0.75%, —◆— 0.875% y —~— 1.0%.

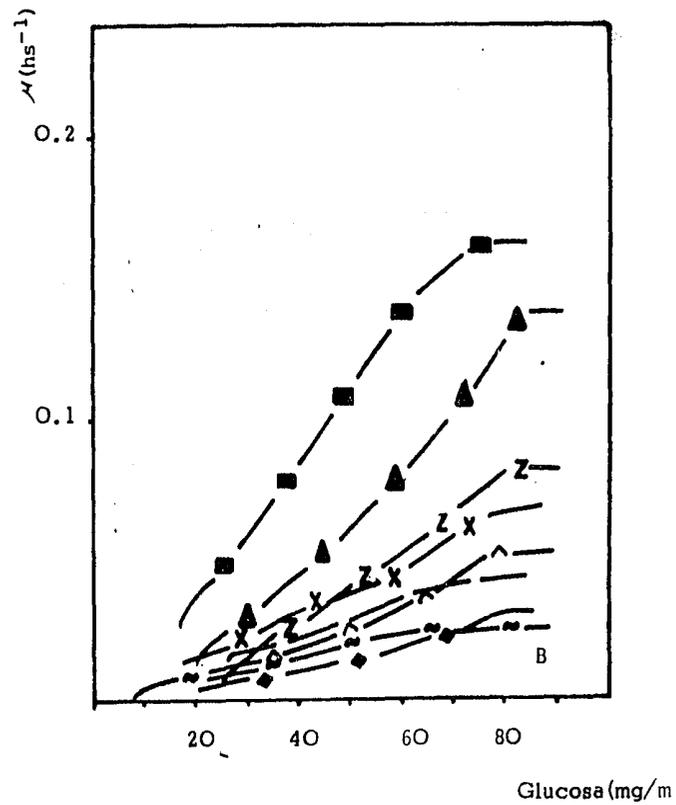
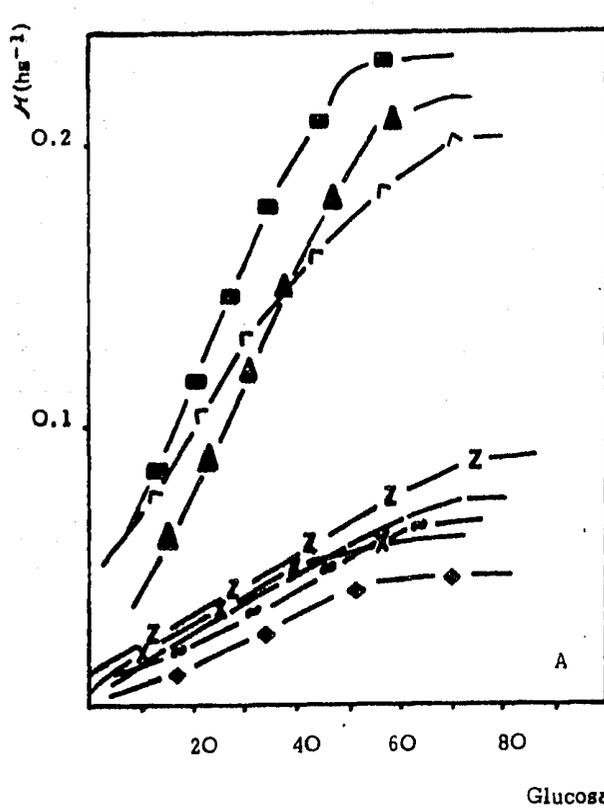


FIGURA 5.6 Consumo de Azúcares vs Velocidad Específica de Crecimiento a diferentes concentraciones de Sulfato de Amonio para: (A) *Candida parapsilosis* y (B) *Candida valida* —■— 0.125%, —▲— 0.25%, —
—^— 0.375%, — — 0.5%, —Z— 0.625%, —X— 0.75%, —◆— 0.875% y —•— 1.0%.

TABLA 5.19 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZUCARES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FUENTE DE FOSFORO PARA: Pichia membranaefaciens

TIEMPO (hs)	*0.05%		0.10%		0.15%		0.20%		0.25%		0.30%		0.35%		0.40%	
	Glucosa (mg/ml)	μ (hs^{-1})														
3	84.0	0.340	80.0	0.220	86.0	0.185	88.0	0.131	80.0	0.199	86.0	0.110	88.0	0.066	86.5	0.062
6	66.0	0.314	60.5	0.199	74.0	0.134	79.0	0.125	75.0	0.190	77.0	0.096	70.0	0.063	69.5	0.085
9	50.0	0.239	40.0	0.151	52.0	0.150	65.0	0.102	70.0	0.185	54.0	0.100	45.0	0.045	43.5	0.060
12	34.0	0.202	26.0	0.124	23.0	0.084	28.0	0.077	37.0	0.129	29.0	0.070	28.0	0.035	31.0	0.048
15	17.0	0.082	14.0	0.107	34.0	0.066	22.0	0.063	23.0	0.096	9.0	0.060	14.0	0.025	30.0	0.040
18	14.0	0.069	9.0	0.099	3.25	0.045	17.0	0.056	10.0	0.076	3.25	0.050	6.0	0.030	14.0	0.025
24	14.0	0.052	6.0	0.076	3.25	0.035	10.0	0.045	3.25	0.067	0.0	0.027	3.25	0.021	10.0	0.024
27	14.0	0.046	6.0	0.061			10.0	0.040	3.25	0.050	0.0	0.020	3.25	0.020	3.25	0.005
30																

* KH_2PO_4

TABLA 5.20 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZUCARES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FUENTE DE FOSFORO PARA: Saccharomyces cerevisiae

TIEMPO (hs)	* 0.05%		0.10%		0.15%		0.20%		0.25%		0.30%		0.35%		0.40%	
	Glucosa (mg/ml)	μ (hs^{-1})														
3	88.0	0.349	89.0	0.323	82.0	0.147	85.0	0.203	87.5	0.140	86.0	0.163	85.0	0.102	83.0	0.190
6	76.0	0.340	77.5	0.275	75.5	0.142	83.0	0.170	80.0	0.116	80.0	0.150	75.6	0.103	72.5	0.185
9	71.0	0.303	72.5	0.264	66.5	0.142	60.0	0.156	72.0	0.120	75.0	0.140	66.5	0.085	65.0	0.150
12	48.0	0.202	62.0	0.230	43.5	0.115	57.0	0.145	55.5	0.085	60.0	0.110	46.0	0.063	42.0	0.138
24	44.5	0.213	40.0	0.117	30.0	0.050	56.0	0.150	45.0	0.076	50.0	0.100	40.0	0.060	40.0	0.125
27	37.0	0.174	35.5	0.110	27.0	0.070	51.0	0.135	27.0	0.048	40.0	0.075	34.0	0.050	38.0	0.130
30	31.0	0.145	29.5	0.105	25.0	0.063	37.0	0.105	26.0	0.043	36.0	0.070	31.0	0.050	29.0	0.122
33	25.0	0.135	20.0	0.062	21.0	0.060	25.0	0.063	21.5	0.040	32.0	0.073	28.5	0.035	25.0	0.100
36	3.25	0.054	18.0	0.058	6.0	0.017	19.0	0.50	10.0	0.030	26.5	0.050	24.0	0.035	18.0	0.084
48	0.0	0.035	3.25	0.013	3.25	0.015	0.0	0.15	6.0	0.020	20.0	0.040	6.0	0.012	0.0	0.036
51																

* KH_2PO_4

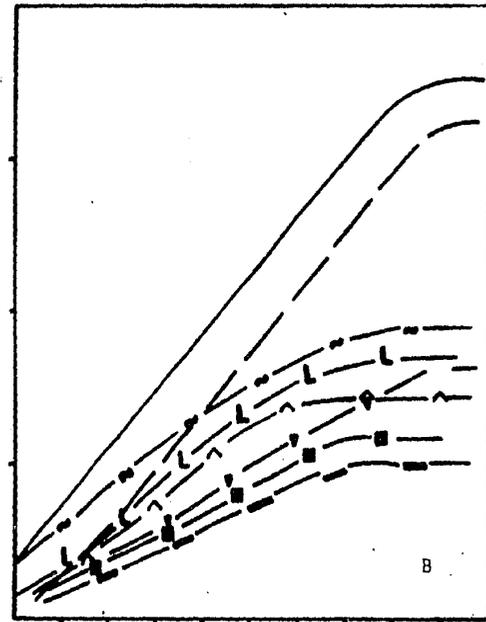
μ (h^{-1})



20 40 60 80

Glucosa (mg/ml)

μ (h^{-1})



20 40 60 80

Glucosa (mg/ml)

FIGURA 5.7 Consumo de Azucares vs Velocidad Especifica de Crecimiento a diferentes concentraciones de Fosfato Monobásico de Potasio para: (A) *Pichia membranaefaciens* y (B) *Saccharomyces cerevisiae*.

— 0.05%, --- 0.10%, -^-- 0.15%, -F- 0.2%, -■- 0.25%, -▼- 0.3%, - - - 0.35%
- * - 0.4%.

TABLA 5.21 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZUCARES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FUENTE DE FOSFORO PARA: Candida parapsilosis

TIEMPO (hs)	* 0.05		0.10%		0.15%		0.20%		0.25%		0.30%		0.35%		0.40%	
	Glucosa (mg/ml)	μ (hs ⁻¹)														
3	77.5	0.248	85.0	0.183	89.0	0.160	87.5	0.231	80.0	0.169	86.5	0.140	82.0	0.123	83.0	0.108
6	58.0	0.231	70.0	0.164	77.6	0.152	76.8	0.208	77.0	0.165	74.5	0.135	70.0	0.111	65.5	0.096
9	44.0	0.208	57.0	0.156	66.5	0.151	66.8	0.173	67.0	0.161	55.0	0.125	58.0	0.098	52.5	0.091
21	18.0	0.125	20.0	0.088	35.0	0.094	30.0	0.125	27.0	0.101	35.5	0.070	23.0	0.049	30.0	0.043
24	12.0	0.100	16.0	0.074	20.6	0.075	23.0	0.105	17.0	0.075	29.0	0.063	18.0	0.044	28.8	0.040
27	9.0	0.078	12.8	0.070	14.6	0.056	15.0	0.094	10.0	0.061	24.4	0.058	11.5	0.040	24.6	0.037
30	5.0	0.073	7.0	0.060	9.6	0.054	9.0	0.070	5.7	0.030	16.0	0.053	5.0	0.032	20.0	0.034
33	1.8	0.056	1.5	0.035	0.6	0.030	1.8	0.035	1.8	0.025	12.0	0.044	1.25	0.025	16.0	0.034

* KH₂PO₄

TABLA 5.22 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZUCARES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FUENTE DE FOSFORO PARA: Candida utilis

TIEMPO (hs)	* 0.05%		0.10%		0.15%		0.20%		0.25%		0.30%		0.35%		0.40%	
	Glucosa (mg/ml)	μ (hs^{-1})														
18	82.0	0.142														
21	79.5	0.142														
24	74.0	0.128	92.0	0.090	93.0	0.049	94.5	0.036			94.0	0.096	93.0	0.025		
36	67.0	0.119	88.0	0.086	90.0	0.050	89.0	0.032	92.0	0.065	88.0	0.094	82.0	0.026	83.0	0.073
51	64.5	0.110	78.0	0.077	85.0	0.044	86.0	0.030	86.0	0.064	86.0	0.091	80.0	0.019	75.0	0.067
63	50.0	0.103	73.0	0.069	82.0	0.041	75.0	0.028	75.5	0.053	79.0	0.084	72.0	0.017	68.0	0.050
75	47.5	0.080	67.0	0.064	81.0	0.038	71.0	0.032	75.0	0.048	76.0	0.078	70.5	0.013	67.0	0.060
87	38.5	0.071	63.0	0.049	73.0	0.034	68.0	0.026	73.0	0.044	68.0	0.072	65.0	0.012	64.0	0.052
108	38.5	0.068	58.0	0.050	68.0	0.026	62.0	0.024	65.0	0.040	61.0	0.070	62.5	0.010	63.0	0.053
132	32.5	0.057	55.0	0.040	60.0	0.023	59.0	0.019	60.0	0.038	55.0	0.066	53.0	0.009	59.0	0.047
154	24.0	0.053	48.0	0.044	50.0	0.019	54.0	0.016	45.0	0.028	53.0	0.064	51.0	0.008	42.0	0.025
176	19.0	0.049	42.5	0.033	48.0	0.017	40.0	0.014	39.0	0.025	45.0	0.052	34.0	0.007	35.0	0.023
201	15.0	0.039	35.0	0.026	28.0	0.013	32.0	0.013	28.0	0.022	37.0	0.046	26.0	0.007	25.0	0.012
225	10.0	0.032	29.0	0.012	17.0	0.010	23.0	0.011	21.0	0.020	28.0	0.040	21.0	0.006	18.5	0.011
249	3.0	0.028	23.0	0.011	17.0	0.009	15.0	0.010	15.0	0.018	22.0	0.029	15.0	0.006	17.0	0.010
256			22.0	0.011	17.0	0.007	15.0	0.010	15.0	0.018	22.0	0.030	15.0	0.006	13.0	0.008

* KH_2PO_4

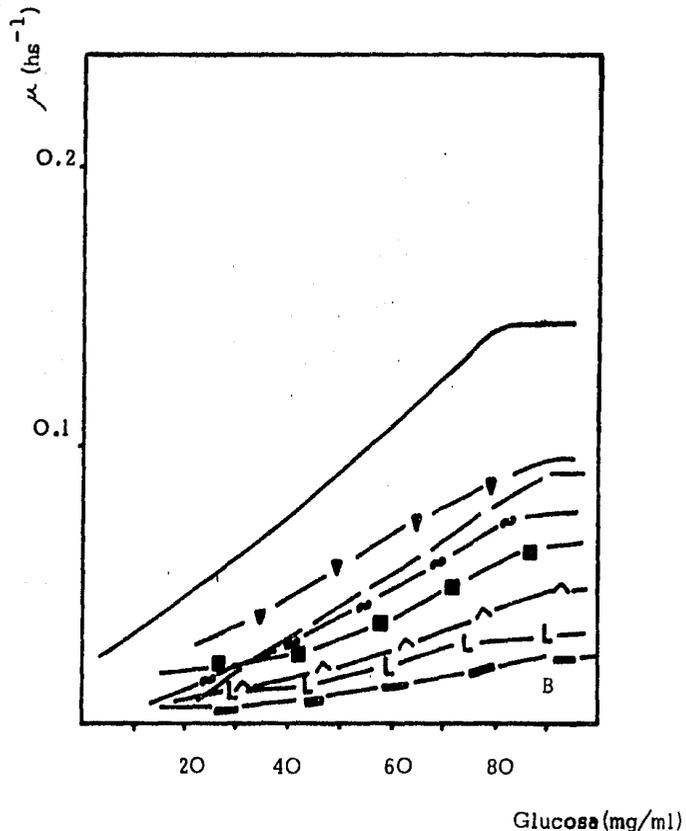
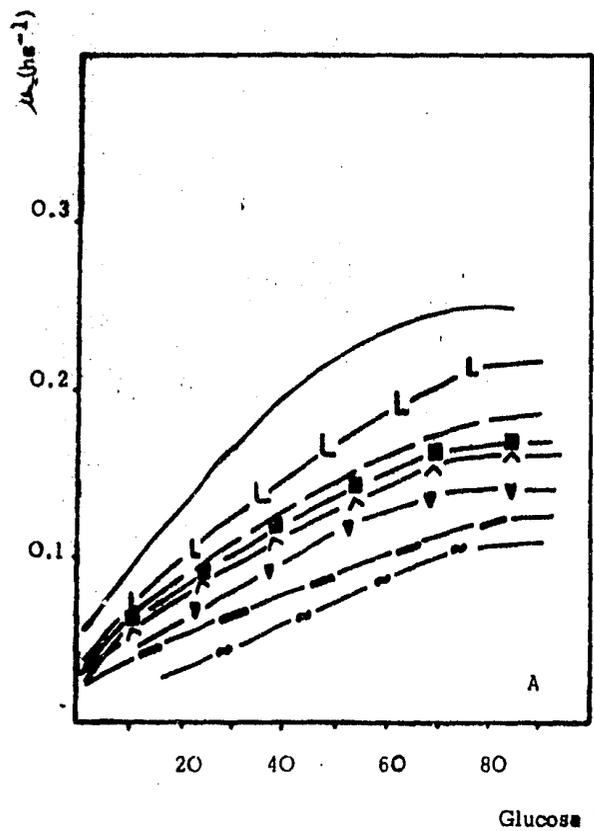


FIGURA 5.8 Consumo de Azúcares vs Velocidad Específica de Crecimiento a diferentes concentraciones de Fosfato Monobásico de Potasio para: (A) *Candida parapsilosis* y (B) *Candida valida* — 0.05%, --- 0.10%, -^ - 0.15%, L 0.2%, -■ - 0.25%, -▼ - 0.3%, - - - 0.35% y -~ - 0.4%.

TABLA 5.23 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZUCARES A DIFERENTES VELOCIDADES DE AGITACION PARA: Pichia membranaefaciens

TIEMPO (hs)	50 rpm		100 rpm		150 rpm		200 rpm		250 rpm	
	Glucosa (mg/ml)	μ (hs^{-1})								
3	-	-	-	-	-	-	95.0	0.255	-	-
6	-	-	75.0	0.074	75.0	0.112	89.0	0.245	-	-
21	-	-	40.0	0.067	45.0	0.109	11.0	0.120	80.0	0.082
24	-	-	-	-	20.2	0.088	1.25	0.109	-	-
27	82.0	0.128	28.0	0.046	4.5	0.066	0.0	0.090	61.0	0.074
30	80.0	0.127	-	-	1.25	0.040	0.0	0.080	-	-
33	-	-	15.0	0.039	1.25	0.028	-	-	50.0	0.073
36	-	-	-	-	-	-	-	-	47.0	0.075
45	40.0	0.108	2.0	0.030	-	-	-	-	30.0	0.048
48	-	-	-	-	-	-	-	-	10.0	0.026
51	9.0	0.067	1.2	0.027	-	-	-	-	10.0	0.024
57	7.2	0.064	0.0	0.023	-	-	-	-	10.0	0.022
69	6.0	0.058	0.0	0.019	-	-	-	-	-	-
72	0.0	0.042	-	-	-	-	-	-	-	-
84	0.0	0.033	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLA 5.24 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZUCARES A DIFERENTES VELOCIDADES DE AGITACION PARA: Saccharomyces cerevisiae

TIEMPO (hs)	50 rpm		100 rpm		150 rpm		200 rpm		250 rpm	
	Glucosa (mg/ml)	μ (hs^{-1})								
3	-	-	85.7	0.230	-	-	73.0	0.417	-	-
6	-	-	-	-	82.0	0.322	68.5	0.401	-	-
21	71.0	0.086	50.0	0.173	48.2	0.255	13.0	0.149	-	-
24	-	-	-	-	43.5	0.249	9.0	0.126	-	-
27	63.7	0.084	30.0	0.118	33.5	0.199	2.0	0.099	70.0	0.105
30	-	-	-	-	22.5	0.160	0.0	0.088	57.5	0.089
33	42.0	0.076	23.2	0.116	17.5	0.148	-	-	30.0	0.075
45	7.5	0.030	3.75	0.073	7.5	0.105	-	-	27.5	0.065
48	-	-	-	-	3.2	0.081	-	-	1.0	0.038
51	2.0	0.026	1.0	0.065	0.0	0.068	-	-	1.0	0.019
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	0.0	0.021	0.0	0.057	-	-	-	-	-	-
69	0.0	0.016	0.0	0.049	-	-	-	-	-	-

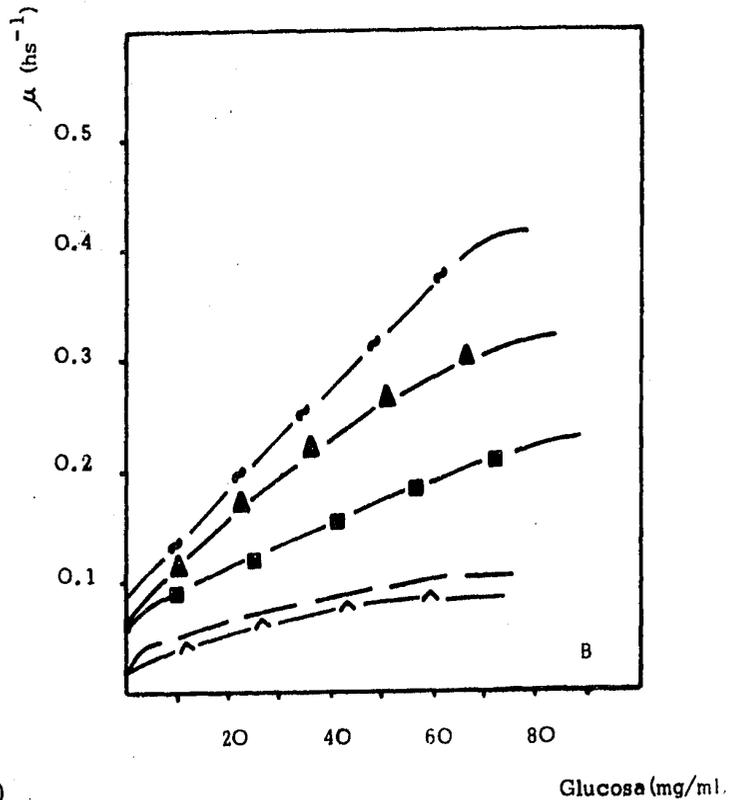
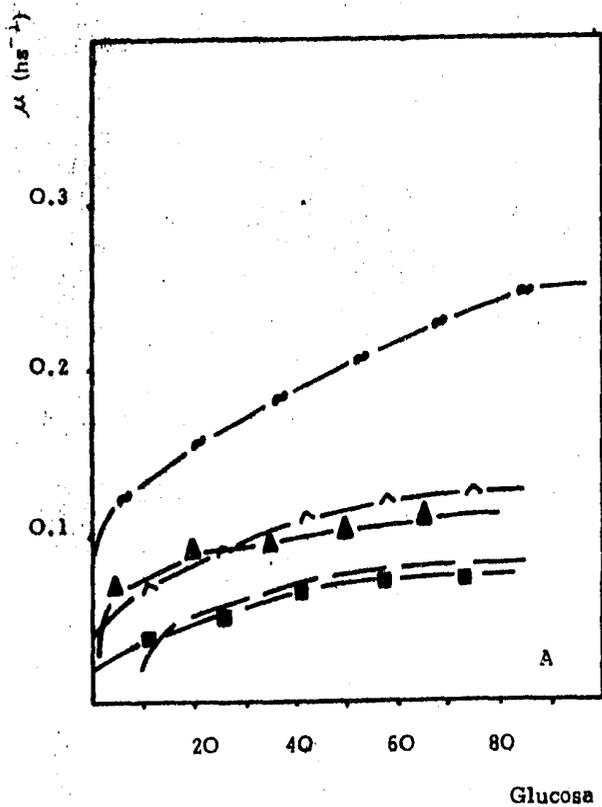


FIGURA 5.9 Consumo de Azúcares vs Velocidad Específica de Crecimiento a diferentes Velocidades de Agitación -- para: (A) *Pichia membranifaciens* y (B) *Saccharomyces cerevisiae*, -- Δ -- 50 rpm, -- \blacksquare -- 100 rpm, -- \blacktriangle -- 150 rpm -- \circ -- 200 rpm, y - - - 250 rpm.

RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZUCARES A DIFERENTES VELOCIDADES DE AGITACION PARA: Candida parapsilosis.

TIEMPO (hs)	50 rpm		100 rpm		150 rpm		200 rpm		250 rpm	
	Glucosa (mg/ml)	μ (hs^{-1})								
3	-	-	-	-	72.5	0.216	86.0	0.263	-	-
6	-	-	68.5	0.084	70.0	0.207	78.5	0.242	-	-
21	-	-	32.5	0.034	36.7	0.200	43.5	0.225	-	-
24	-	-	-	-	30.0	0.195	33.5	0.179	-	-
27	-	-	31.7	0.028	15.0	0.166	30.0	0.183	-	-
30	-	-	-	-	11.0	0.090	26.0	0.185	-	-
33	-	-	20.7	0.024	0.0	0.054	18.5	0.145	-	-
45	73.0	0.106	9.5	0.020	-	-	0.0	0.049	-	-
51	60.0	0.103	9.5	0.018	-	-	0.0	0.040	-	-
57	52.0	0.107	0.0	0.015	-	-	0.0	0.031	80.5	0.190
69	45.0	0.089	0.0	0.012	-	-	-	-	52.0	0.154
72	37.0	0.077	-	-	-	-	-	-	23.5	0.081
75	-	-	-	-	-	-	-	-	25.7	0.077
78	30.2	0.056	-	-	-	-	-	-	25.7	0.063
84	15.7	0.056	-	-	-	-	-	-	-	-
90	15.0	0.056	-	-	-	-	-	-	-	-
96	15.0	0.053	-	-	-	-	-	-	-	-
108	11.0	0.045	-	-	-	-	-	-	-	-
114	5.0	0.042	-	-	-	-	-	-	-	-
120	3.5	0.046	-	-	-	-	-	-	-	-
132	0.0	0.036	-	-	-	-	-	-	-	-
138	0.0	0.035	-	-	-	-	-	-	-	-
144	0.0	0.033	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLA 5.26

RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZUCARES A DIFERENTES VELOCIDADES DE AGITACION PARA: Candida valida.

TIEMPO (hs)	50 rpm		100 rpm		150 rpm		200 rpm		250 rpm	
	Glucosa (mg/ml)	μ (hs^{-1})								
9	-	-	80.0	0.127	75.0	0.165	74.5	0.281	84.2	0.442
12	-	-	-	-	-	-	-	-	80.5	0.424
21	-	-	70.0	0.135	41.0	0.130	37.0	0.151	-	-
24	-	-	-	-	36.0	0.095	36.0	0.142	8.7	0.100
27	-	-	67.0	0.099	21.7	0.076	30.0	0.118	6.0	0.099
30	-	-	-	-	14.5	0.055	30.0	0.108	1.2	0.075
33	-	-	65.2	0.094	0.0	0.021	28.0	0.098	0.0	0.085
36	-	-	50.0	0.074	-	-	29.0	0.101	0.0	0.060
57	80.0	0.121	48.0	0.056	-	-	24.0	0.057	-	-
69	75.0	0.136	42.0	0.050	-	-	-	-	-	-
72	58.0	0.097	34.0	0.051	-	-	24.0	0.045	-	-
84	43.5	0.071	36.0	0.043	-	-	-	-	-	-
90	33.5	0.064	35.0	0.041	-	-	-	-	-	-
96	28.0	0.059	27.0	0.041	-	-	-	-	-	-
108	25.7	0.036	26.0	0.036	-	-	-	-	-	-
114	25.0	0.046	27.0	0.034	-	-	-	-	-	-
120	22.5	0.038	20.0	0.032	-	-	-	-	-	-
132	22.0	0.032	17.0	0.030	-	-	-	-	-	-
138	21.0	0.029	19.2	0.028	-	-	-	-	-	-
144	20.0	0.023	14.7	0.025	-	-	-	-	-	-
162	19.0	0.018	16.0	0.022	-	-	-	-	-	-
168	18.0	0.026	15.0	0.021	-	-	-	-	-	-
186	16.0	0.020	14.0	0.019	-	-	-	-	-	-

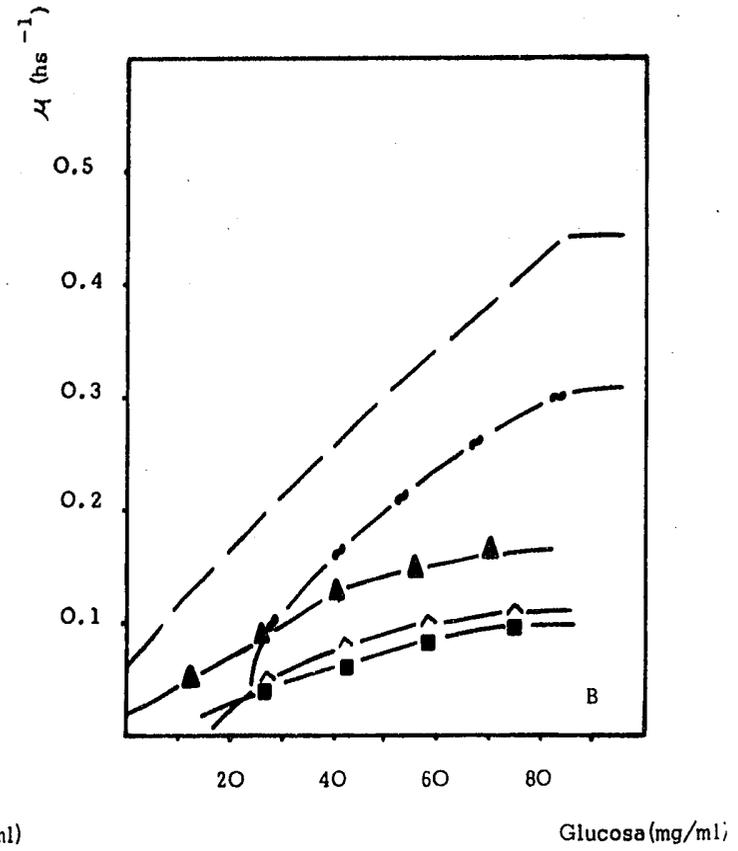
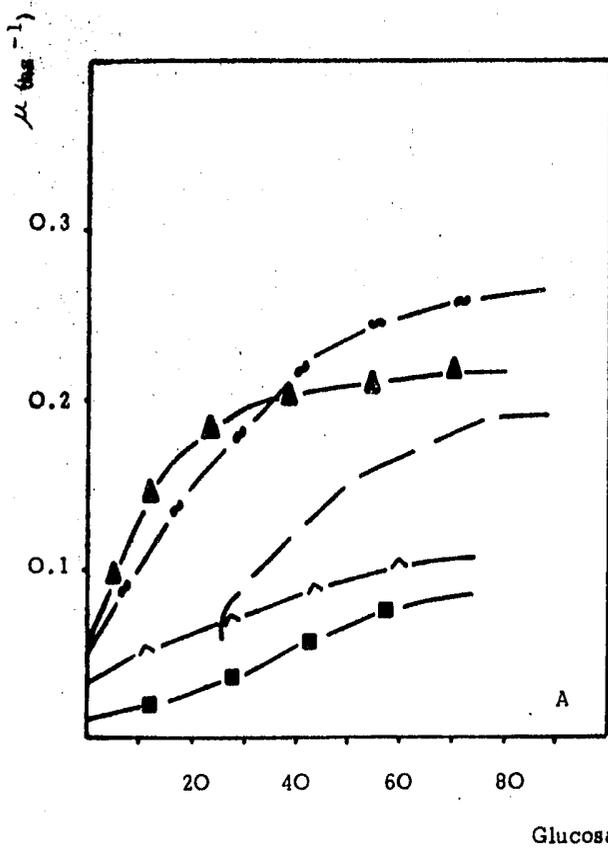


FIGURA 5.10 Consumo de Azúcares vs Velocidad Específica de Crecimiento a diferentes Velocidades de Agitación para: (A) Candida parapsilosis y (B) Candida valida, — ^ — 50 rpm, — ■ — 100rpm, — ▲ — 150 rpm, — ● — 200 rpm y - - - 250 rpm.

TABLA 5.27 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZUCARES A DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBACION PARA: Pichia membranaefaciens

TIEMPO (hs)	20° C		28° C		37° C		45° C	
	Glucosa (mg/ml)	μ (hs ⁻¹)						
6	70.0	0.070	-	--	-	--	-	--
9	62.0	0.067	-	--	-	--	-	--
12	33.5	0.060	74.0	0.121	-	--	-	--
15	29.0	0.054	55.0	0.121	-	--	-	--
18	18.0	0.048	43.0	0.106	-	--	-	--
21	2.0	0.020	24.0	0.089	-	--	-	--
24	2.0	0.019	22.5	0.086	-	--	-	--
36	0.0	0.015	18.0	0.048	-	--	-	--
39	0.0	0.008	18.0	0.046	-	--	-	--
45	-	--	18.0	0.030	-	--	-	--
48	-	--	15.0	0.029	-	--	90.0	0.028
54	-	--	-	--	69.0	0.067	-	--
57	-	--	-	--	65.2	0.078	-	--
60	-	--	-	--	-	--	81.0	0.032
69	-	--	-	--	35.0	0.062	-	--
72	-	--	-	--	27.0	0.051	80.0	0.031
75	-	--	-	--	21.5	0.043	-	--
78	-	--	-	--	21.0	0.039	-	--
81	-	--	-	--	19.0	0.035	-	--
83	-	--	-	--	16.0	0.023	-	--
96	-	--	-	--	13.5	0.019	-	--
99	-	--	-	--	12.5	0.021	-	--
105	-	--	-	--	11.5	0.016	-	--
120	-	--	-	--	11.0	0.016	-	--
144	-	--	-	--	11.0	0.012	78.0	0.027
168	-	--	-	--	-	--	80.0	0.023
216	-	--	-	--	-	--	78.0	0.015
240	-	--	-	--	-	--	76.0	0.014
288	-	--	-	--	-	--	78.0	0.021
312	-	--	-	--	-	--	78.0	0.015

TABLA 5.2B RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE
 CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZUCARES A DIFERENTES TEMPE-
 RATURAS DE INCUBACION PARA: Saccharomyces cerevisiae

TIEMPO (hs)	20° C		28° C		37° C		45° C	
	Glucosa (mg/ml)	μ (hs^{-1})						
3	-	--	72.5	0.263	-	--	-	--
6	95.0	0.242	65.0	0.260	-	--	-	--
9	89.0	0.227	56.5	0.267	-	--	-	--
21	73.5	0.205	50.5	0.231	-	--	-	--
24	72.0	0.197	45.0	0.200	-	--	-	--
27	70.0	0.204	14.5	0.075	90.0	0.106	-	--
30	67.5	0.193	12.0	0.066	85.0	0.115	-	--
33	65.0	0.185	12.0	0.057	75.0	0.105	-	--
45	24.0	0.088	-	--	-	--	-	--
48	25.0	0.082	-	--	49.0	0.070	-	--
51	18.5	0.081	-	--	-	--	-	--
54	15.0	0.077	-	--	13.5	0.052	-	--
57	14.5	0.057	-	--	8.5	0.056	-	--
60	-	--	-	--	-	--	-	--
63	-	--	-	--	7.0	0.050	-	--
69	-	--	-	--	7.0	0.048	87.0	0.075
78	-	--	-	--	-	--	80.2	0.060
84	-	--	-	--	-	--	78.0	0.052
153	-	--	-	--	-	--	75.0	0.055
177	-	--	-	--	-	--	75.0	0.037
201	-	--	-	--	-	--	70.2	0.030
225	-	--	-	--	-	--	70.0	0.052
249	-	--	-	--	-	--	65.0	0.030
273	-	--	-	--	-	--	63.0	0.045
297	-	--	-	--	-	--	63.0	0.037
321	-	--	-	--	-	--	-	--

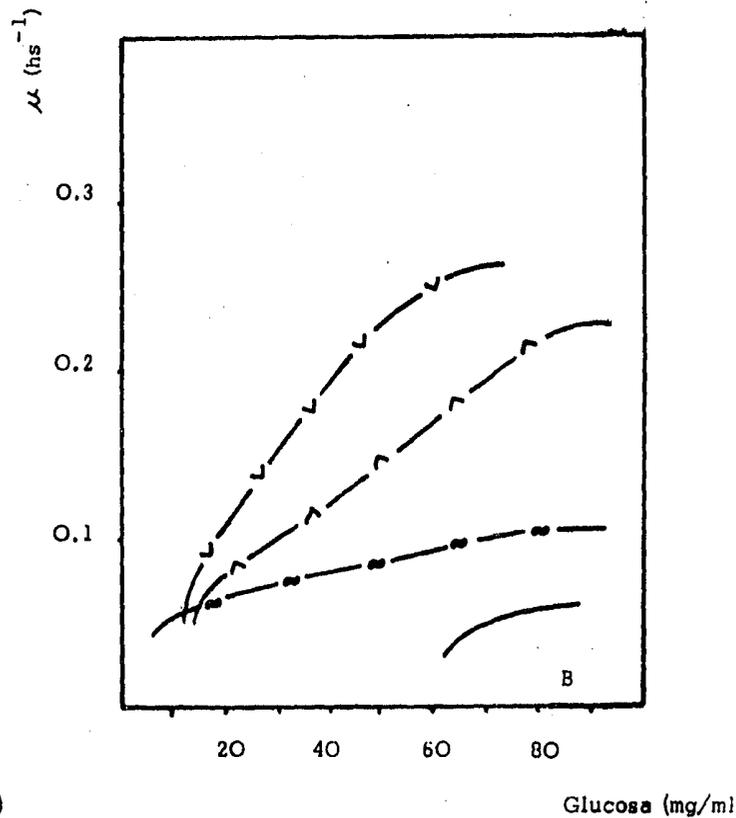
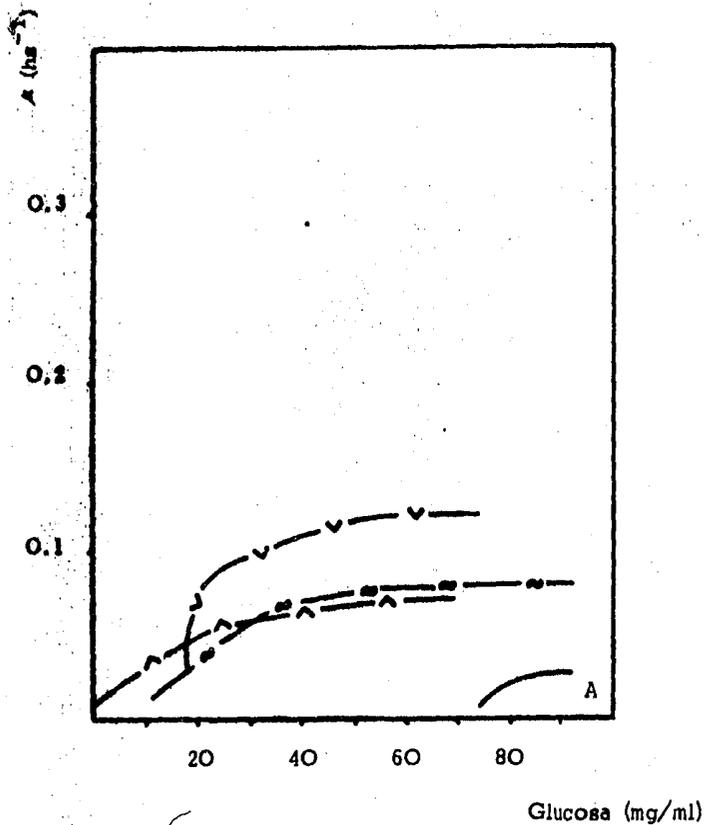


FIGURA 5.11 Consumo de Azúcares vs Velocidad Específica de Crecimiento a diferentes temperaturas de Incubación para: (A) *Pichia membranaefaciens* y (B) *Saccharomyces cerevisiae*. — ^ — 20° C, — v — 28° C, — □ — 37° C y — ○ — 45° C.

TABLA 5.29 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZUCARES A DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBACION PARA: Candida parapsilosis

TIEMPO (hs)	20° C		28° C		37° C		45° C	
	Glucosa (mg/ml)	μ (hs ⁻¹)						
9	--	--	94.0	0.233	-	--	--	--
12	--	--	90.0	0.197	-	--	--	--
24	--	--	74.0	0.167	-	--	--	--
27	--	--	55.0	0.114	-	--	--	--
30	--	--	35.0	0.093	-	--	--	--
33	90.0	0.084	30.0	0.085	-	--	--	--
45	66.0	0.071	26.5	0.077	-	--	--	--
48	62.5	0.077	16.5	0.049	-	--	--	--
51	61.5	0.068	5.0	0.020	-	--	--	--
57	--	--	0.0	0.013	-	--	--	--
69	43.0	0.030	-	--	-	--	--	--
78	40.0	0.067	-	--	86.0	0.100	--	--
81	36.0	0.055	-	--	80.2	0.092	--	--
84	36.0	0.043	-	--	-	--	--	--
87	--	--	-	--	-	--	86.5	0.023
90	--	--	-	--	67.5	0.090	--	--
102	--	--	-	--	-	--	81.5	0.024
105	--	--	-	--	31.5	0.078	--	--
108	--	--	-	--	30.0	0.077	--	--
111	--	--	-	--	23.5	0.073	--	--
114	--	--	-	--	19.5	0.069	78.0	0.020
126	--	--	-	--	15.0	0.060	--	--
129	--	--	-	--	12.0	0.049	--	--
132	--	--	-	--	10.0	0.044	--	--
153	27.5	0.049	-	--	-	--	73.5	0.022
177	12.0	0.020	-	--	-	--	70.0	0.025
201	10.0	0.020	-	--	-	--	68.0	0.017
225	--	--	-	--	-	--	65.0	0.020
249	--	--	-	--	-	--	62.0	0.020
273	--	--	-	--	-	--	62.0	0.015
297	--	--	-	--	-	--	60.0	0.013
321	--	--	-	--	-	--	60.0	0.010

TABLA 5.30 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZUCARES A DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBACION PARA: Candida utilis

TIEMPO (hs)	20° C		28° C		37° C		45° C	
	Glucosa (mg/ml)	μ (hs^{-1})						
9	--	--	--	--	91.0	0.184	--	--
27	--	--	81.0	0.150	89.0	0.182	--	--
30	--	--	66.0	0.146	83.0	0.176	--	--
33	--	--	61.0	0.147	--	--	--	--
45	--	--	58.5	0.142	70.0	0.170	--	--
48	--	--	56.0	0.132	65.0	0.152	--	--
51	--	--	54.5	0.124	--	--	--	--
54	--	--	50.0	0.109	63.2	0.156	--	--
57	--	--	46.0	0.111	--	--	--	--
63	--	--	--	--	65.0	0.166	--	--
66	--	--	--	--	54.0	0.146	--	--
78	--	--	38.0	0.070	--	--	--	--
81	86.5	0.049	37.5	0.067	24.0	0.050	--	--
84	86.0	0.060	--	--	20.5	0.052	--	--
87	--	--	--	--	20.0	0.045	--	--
90	--	--	--	--	24.2	0.055	--	--
102	77.5	0.047	38.0	0.048	16.2	0.038	--	--
105	--	--	37.0	0.049	15.0	0.036	--	--
108	--	--	35.5	0.038	14.0	0.037	--	--
111	--	--	34.0	0.045	12.0	0.029	--	--
114	--	--	36.0	0.034	10.0	0.030	--	--
126	--	--	35.0	0.039	10.0	0.026	--	--
129	--	--	34.0	0.037	10.0	0.028	--	--
132	--	--	--	--	--	--	--	--
135	--	--	34.0	0.035	--	--	--	--
153	68.0	0.036	34.0	0.030	--	--	--	--
177	49.0	0.024	--	--	--	--	96.0	0.006
201	36.0	0.020	--	--	--	--	89.5	0.003
204	36.0	0.018	--	--	--	--	90.0	0.006
225	--	--	--	--	--	--	87.5	0.007
249	--	--	--	--	--	--	86.0	0.003
273	--	--	--	--	--	--	86.0	0.001

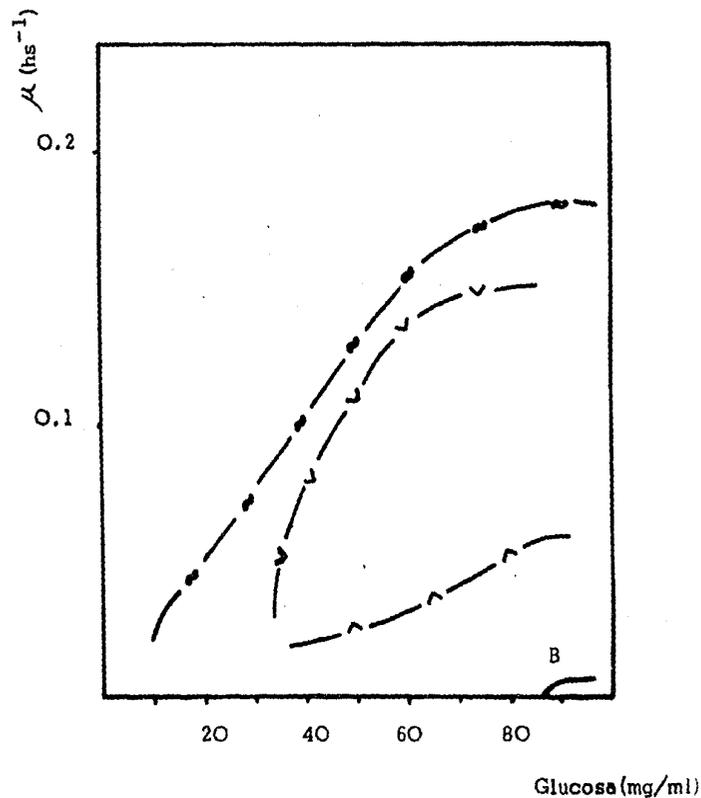
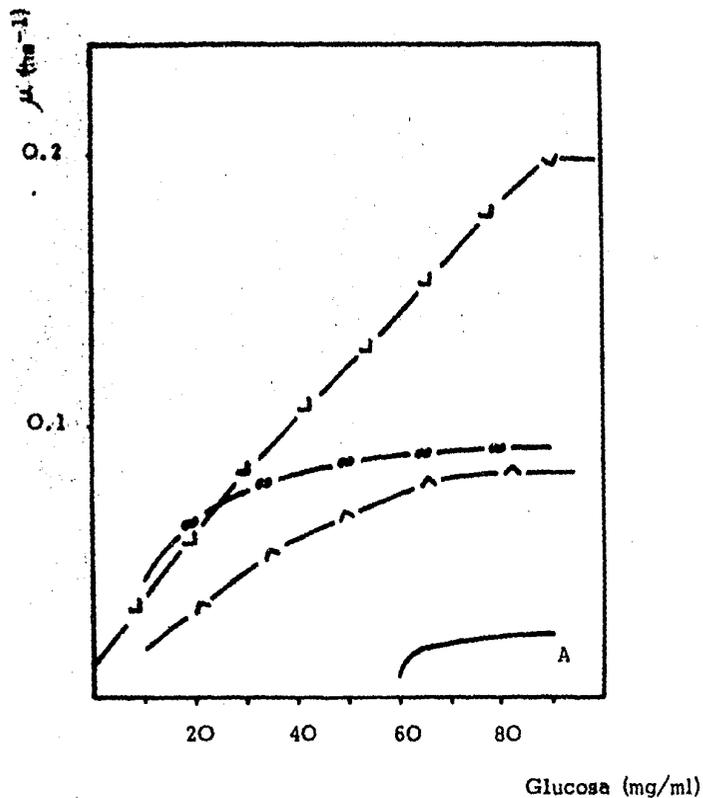


FIGURA. 5.12 Consumo de Azúcares vs Velocidad Específica de Crecimiento a diferentes Temperaturas de Incubación para: (A) *Candida parapsilosis* y (B) *Candida valida*. — \wedge — 20°C, — ∇ — 28°C, — \bullet — 37°C y — \triangle — 45°C.

TABLA 5.31 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZÚCARES A DIFERENTES VALORES DE pH PARA: *Pichia membranifaciens*

	pH 3		pH 4		pH 4,5		pH 5,0		pH 5,5		pH 6,0		pH 6,5		pH 7,0		pH 9,0		pH 10,0	
	Glucosa (mg/ml)	U (hs ⁻¹)																		
6	74,0	0,047	90,0	0,050	-	-	-	-	-	-	84,5	0,196	89,0	0,115	-	-	79,0	0,121	87,0	0,151
9	73,5	0,043	80,0	0,053	85,0	0,041	75,0	0,175	90,0	0,212	81,0	0,192	64,0	0,115	81,0	0,111	70,0	0,112	72,0	0,141
12	68,5	0,043	77,0	0,048	80,0	0,035	78,0	0,175	81,0	0,206	77,0	0,184	55,0	0,115	65,0	0,098	58,0	0,118	70,0	0,136
24	57,2	0,034	66,0	0,050	68,0	0,031	68,0	0,172	65,0	0,192	70,0	0,181	37,0	0,108	20,0	0,069	27,0	0,114	38,0	0,119
27	50,0	0,028	62,0	0,048	45,0	0,028	58,0	0,157	60,5	0,188	40,5	0,128	30,0	0,095	15,0	0,061	25,0	0,113	37,0	0,114
30	50,0	0,026	50,0	0,039	39,0	0,027	50,0	0,156	52,5	0,168	35,0	0,113	25,0	0,086	16,6	0,054	10,0	0,104	35,0	0,112
33	41,0	0,026	48,0	0,037	29,0	0,027	45,0	0,147	47,0	0,172	30,5	0,108	22,0	0,082	12,6	0,059	6,0	0,096	35,0	0,102
48	38,0	0,025	35,0	0,035	15,0	0,026	40,0	0,130	45,0	0,158	27,0	0,098	19,0	0,076	6,6	0,056	5,0	0,090	10,0	0,070
51	38,0	0,023	32,0	0,034	12,0	0,025	20,0	0,106	42,5	0,150	25,0	0,096	15,0	0,061	6,0	0,049	2,6	0,067	8,0	0,066
54	38,0	0,022	26,0	0,034	11,0	0,023	18,0	0,088	22,0	0,103	15,0	0,066	12,0	0,058	5,0	0,047	2,6	0,064	7,0	0,064
57	28,5	0,018	26,0	0,031	10,5	0,023	15,0	0,085	14,0	0,084	14,0	0,064	7,0	0,055	3,0	0,043	2,6	0,060	6,0	0,062
60	25,5	0,017	25,0	0,030	9,5	0,022	18,0	0,086	10,5	0,062	13,5	0,065	4,0	0,051	2,6	0,039	2,6	0,059	6,0	0,060
72	25,5	0,017	19,0	0,029	7,0	0,022	4,0	0,066	2,0	0,054	4,0	0,044	3,0	0,045	2,6	0,037	-	-	6,0	0,055
75	23,5	0,014	19,0	0,028	5,0	0,022	5,0	0,063	2,0	0,052	5,0	0,040	2,0	0,044	-	-	-	-	6,0	0,054
78	23,5	0,014	18,5	0,024	5,0	0,022	4,0	0,061	2,0	0,049	3,0	0,034	2,0	0,043	-	-	-	-	6,0	0,050
81	23,5	0,013	18,0	0,024	-	-	-	-	-	-	1,5	0,033	-	-	-	-	-	-	-	-
93	21,0	0,014	18,0	0,023	-	-	-	-	-	-	1,5	0,032	-	-	-	-	-	-	-	-
96	20,0	0,013	18,0	0,022	-	-	-	-	-	-	1,5	0,031	-	-	-	-	-	-	-	-
99	20,0	0,013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
102	17,5	0,013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
105	17,5	0,013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
117	15,0	0,012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	15,0	0,012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
123	15,0	0,011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
126	15,0	0,010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLA 5.22 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZUCARES A DIFERENTES VALORES DE PH PARA: *Saccharomyces cerevisiae*

pH 3.0		pH 4.0		pH 4.5		pH 5.0		pH 5.5		pH 6.0		pH 6.5		pH 7.0		pH 9.0		pH 10.0		
Glucosa (mg/ml)	U (hs ⁻¹)																			
6	-	-	-	89.0	0.113	97.5	0.110	99.0	0.136	90.0	0.169	93.5	0.152	85.0	0.091	91.0	0.131	92.0	0.142	
9	95.0	0.074	98.0	0.064	81.0	0.115	85.0	0.085	90.0	0.135	82.0	0.160	83.5	0.156	89.0	0.095	86.0	0.128	88.0	0.140
12	90.0	0.377	95.0	0.361	75.0	0.136	80.0	0.084	87.5	0.129	74.0	0.152	77.5	0.142	72.0	0.332	72.0	0.124	66.0	0.126
24	72.0	0.368	76.0	0.371	65.0	0.099	60.0	0.367	65.0	0.127	55.0	0.134	50.5	0.103	42.0	0.068	67.0	0.114	54.0	0.102
27	70.5	0.067	76.0	0.068	60.0	0.041	59.0	0.374	62.0	0.125	52.0	0.130	45.0	0.034	36.0	0.062	63.0	0.106	53.0	0.099
30	66.5	0.067	74.0	0.059	55.0	0.040	57.0	0.373	57.0	0.122	47.0	0.126	40.0	0.030	31.0	0.039	60.0	0.099	52.0	0.095
33	66.5	0.067	70.0	0.054	50.5	0.074	48.0	0.361	54.0	0.120	44.0	0.120	35.0	0.076	26.0	0.052	56.0	0.092	50.0	0.094
36	65.0	0.061	64.0	0.046	38.0	0.052	46.0	0.356	49.0	0.118	27.0	0.094	33.0	0.073	12.0	0.027	42.0	0.070	48.0	0.090
48	59.0	0.053	52.0	0.029	32.0	0.032	43.0	0.354	33.0	0.111	19.0	0.082	14.5	0.044	4.0	0.015	34.0	0.053	43.0	0.083
51	57.0	0.052	45.0	0.028	23.0	0.031	42.0	0.052	31.0	0.110	15.0	0.070	12.5	0.033	2.0	0.014	39.0	0.050	42.0	0.079
54	56.0	0.050	43.0	0.026	23.0	0.030	20.0	0.040	27.0	0.100	11.0	0.060	3.5	0.031	1.0	0.012	27.5	0.038	39.0	0.079
57	55.0	0.040	46.0	0.025	21.0	0.028	17.5	0.030	25.0	0.098	10.0	0.060	7.0	0.030	0.0	0.009	20.0	0.036	39.0	0.074
60	54.0	0.047	-	-	21.0	0.025	14.0	0.033	18.0	0.090	10.0	0.056	4.0	0.023	0.0	0.009	12.0	0.026	38.0	0.072
72	52.0	0.041	-	-	19.5	0.024	12.0	0.032	15.0	0.080	3.0	0.030	3.0	0.024	-	-	10.0	0.024	31.0	0.061
75	50.0	0.039	-	-	19.5	0.023	7.0	0.030	12.0	0.075	0.0	0.028	0.0	0.021	-	-	6.0	0.022	26.0	0.052
78	47.0	0.038	-	-	19.5	0.022	7.0	0.029	10.0	0.072	0.0	0.027	0.0	0.022	-	-	4.0	0.021	25.0	0.050
81	49.0	0.036	-	-	19.5	0.021	-	-	8.0	0.070	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
93	48.0	0.032	-	-	-	-	6.0	0.024	4.0	0.060	-	-	-	-	-	-	3.5	0.020	5.0	0.025
96	48.0	0.031	-	-	-	-	6.0	0.023	4.0	0.060	-	-	-	-	-	-	2.5	0.019	4.0	0.024
99	47.0	0.030	-	-	-	-	6.0	0.022	-	-	-	-	-	-	-	-	2.5	0.018	4.0	0.022
102	45.0	0.029	-	-	-	-	6.0	0.019	-	-	-	-	-	-	-	-	2.5	0.018	3.0	0.021
105	45.0	0.028	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.0	0.020
117	44.0	0.025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.020
120	42.0	0.025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.020
123	41.0	0.024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
126	40.0	0.022	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
141	40.0	0.022	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144	39.0	0.022	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
147	39.0	0.022	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
150	39.0	0.021	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

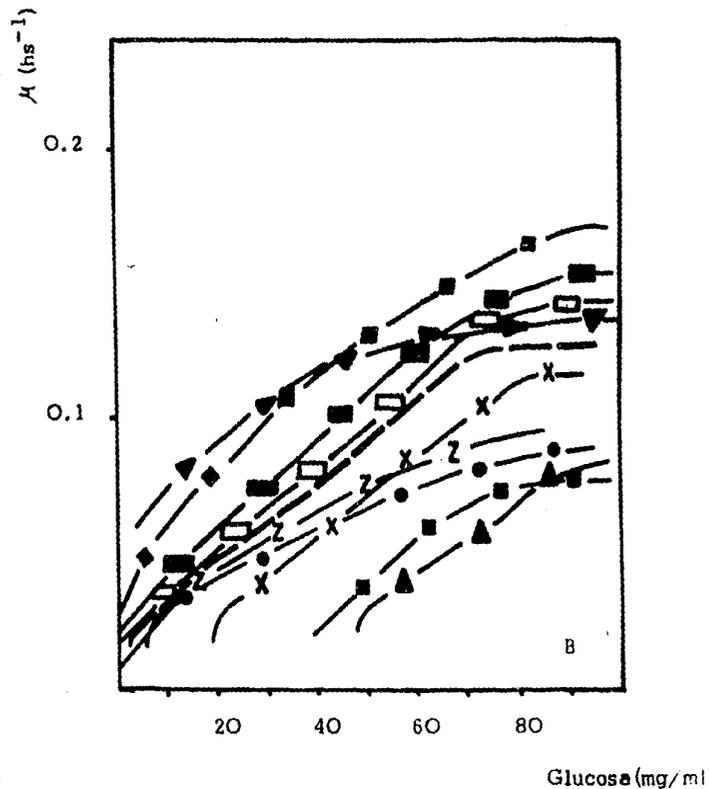
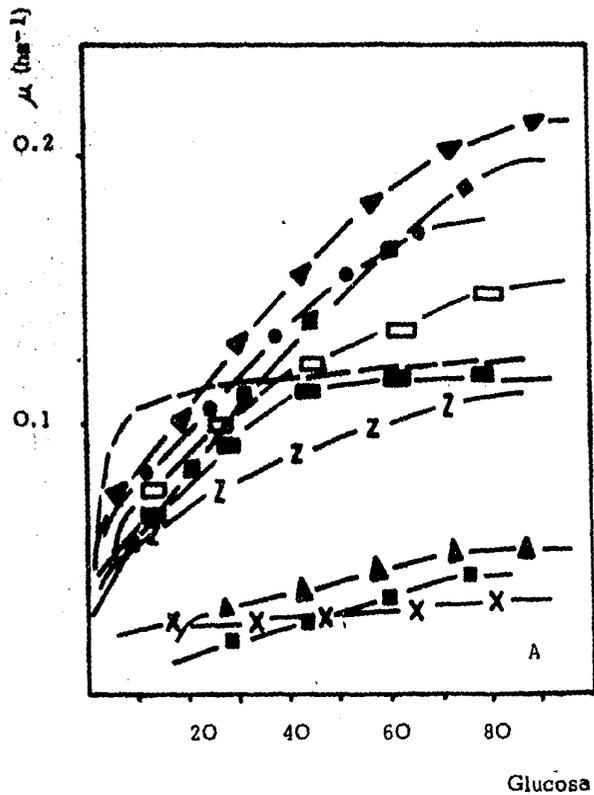


FIGURA 5.13 Consumo de Azúcares vs Velocidad de Crecimiento a diferentes valores de pH para: (A) *Pichia membranaefaciens* (B) *Saccharomyces cerevisiae*. —■— 3, —▲— 4, —X— 4.5, —●— 5, —▼— 5.5, —◆— 6, —■— 6.5, —Z— 7, — — — 9, y —□— 10.

TABLA 5.33 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONTENIDO DE AZUCARES A DIFERENTES VALORES DE pH PARA: *Candida parapsilosis*

	pH 2,0		pH 4,0		pH 4,5		pH 5,0		pH 5,5		pH 6,0		pH 6,5		pH 7,0		pH 7,0		pH 10,0	
	Glucosa (mg/ml)	U (hs ⁻¹)																		
9	-	-	-	-	91.0	0.137	-	-	89.0	0.168	81.0	0.113	90.0	0.107	90.0	0.101	-	-	-	-
12	-	-	-	-	90.0	0.121	-	-	83.0	0.167	74.0	0.113	81.0	0.100	80.0	0.090	98.0	0.079	84.0	0.042
14	-	-	-	-	83.0	0.109	85.0	0.156	71.5	0.158	70.0	0.107	57.0	0.073	59.5	0.095	68.0	0.075	68.0	0.038
27	-	-	-	-	70.2	0.090	83.0	0.158	69.0	0.156	68.2	0.096	52.5	0.068	48.5	0.089	49.7	0.054	66.0	0.034
30	-	-	-	-	80.0	0.097	72.7	0.158	60.7	0.140	63.0	0.094	42.0	0.064	29.0	0.070	-	-	-	-
33	-	-	-	-	70.0	0.088	68.0	0.150	59.0	0.131	61.0	0.080	39.0	0.057	20.5	0.067	-	-	35.0	0.032
40	-	-	-	-	62.0	0.076	37.0	0.117	33.0	0.097	50.0	0.077	12.2	0.039	8.0	0.053	9.0	0.052	27.0	0.031
51	-	-	-	-	63.0	0.072	27.2	0.114	27.2	0.090	46.0	0.075	18.0	0.035	5.0	0.051	5.0	0.047	25.5	0.030
54	-	-	-	-	55.5	0.062	19.0	0.095	24.0	0.076	37.7	0.050	16.0	0.034	4.2	0.049	4.7	0.045	19.0	0.028
57	-	-	59.2	0.069	55.5	0.066	15.0	0.085	21.0	0.071	42.0	0.054	14.0	0.032	3.2	0.047	3.0	0.042	16.0	0.025
60	-	-	95.0	0.054	55.0	0.050	12.0	0.063	28.0	0.069	30.0	0.051	10.0	0.020	3.2	0.045	1.2	0.040	13.0	0.024
72	-	-	75.0	0.051	46.5	0.049	11.7	0.062	11.2	0.040	21.5	0.030	8.0	0.025	3.2	0.042	0.0	0.039	10.2	0.010
75	-	-	75.5	0.050	45.0	0.044	9.0	0.054	9.0	0.044	13.0	0.024	3.0	0.027	-	-	-	-	9.0	0.017
78	-	-	71.5	0.048	40.0	0.047	10.0	0.046	8.0	0.040	11.0	0.021	2.0	0.021	-	-	-	-	8.0	0.017
81	91.0	0.069	70.0	0.047	39.5	0.036	9.0	0.039	8.0	0.038	8.0	0.015	2.5	0.020	-	-	-	-	9.0	0.016
93	80.5	0.067	59.0	0.042	31.0	0.029	9.0	0.037	0.0	0.033	0.0	0.013	1.2	0.012	-	-	-	-	8.0	0.015
96	75.0	0.065	53.0	0.043	24.0	0.030	10.0	0.032	9.0	0.031	0.0	0.013	1.2	0.012	-	-	-	-	6.0	0.015
99	70.0	0.064	51.7	0.037	23.0	0.029	9.0	0.028	0.0	0.023	-	-	1.0	0.010	-	-	-	-	6.0	0.015
102	52.7	0.053	47.7	0.032	32.0	0.020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.0	0.014
105	53.2	0.052	48.0	0.033	30.7	0.025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.0	0.013
117	19.2	0.050	38.0	0.027	27.0	0.024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.0	0.012
120	12.0	0.048	35.0	0.025	26.5	0.023	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
123	10.0	0.046	35.0	0.023	27.0	0.022	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
126	10.0	0.044	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLA 5.34 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL CONSUMO DE AZUCARLES A DIFERENTES VALORES DE pH PARA: Candida utilis

	pH 3.0		pH 4.0		pH 4.5		pH 5.0		pH 5.5		pH 6.0		pH 6.5		pH 7.0		pH 9.0		pH 10.0	
	Glucosa (mg/ml)	U (hs ⁻¹)																		
51	-	-	-	-	-	-	-	-	93.5	0.170	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-	-	-	-	91.0	0.172	-	-	-	-	90.5	0.082	-	-	86.5	0.052
72	-	-	-	-	-	-	-	-	65.0	0.144	91.0	0.135	-	-	66.7	0.051	75.0	0.050	75.0	0.050
75	-	-	-	-	-	-	-	-	65.0	0.140	89.5	0.134	82.0	0.091	67.5	0.051	72.0	0.051	77.0	0.019
78	-	-	-	-	-	-	-	-	63.5	0.136	82.0	0.129	82.0	0.109	58.0	0.047	60.5	0.049	81.0	0.017
81	-	-	-	-	-	-	-	-	62.5	0.133	73.0	0.118	76.2	0.093	56.5	0.045	57.0	0.050	57.5	0.017
93	-	-	-	-	-	-	-	-	60.0	0.125	62.5	0.105	61.2	0.080	56.5	0.035	53.0	0.042	45.5	0.017
96	-	-	-	-	-	-	-	-	50.0	0.119	50.0	0.087	59.7	0.066	53.0	0.033	45.5	0.039	40.0	0.024
99	-	-	-	-	97.0	0.115	98.0	0.094	49.0	0.110	48.0	0.085	57.0	0.062	53.0	0.031	45.0	0.017	40.0	0.016
102	-	-	-	-	97.0	0.129	94.7	0.091	46.0	0.108	50.0	0.082	55.5	0.061	52.7	0.030	43.0	0.034	31.0	0.010
105	-	-	-	-	90.0	0.117	90.0	0.097	42.5	0.103	45.0	0.079	54.0	0.066	51.0	0.028	43.5	0.031	20.5	0.006
117	-	-	-	-	95.0	0.115	83.5	0.089	33.7	0.092	40.0	0.075	39.5	0.046	51.0	0.024	43.5	0.026	19.5	0.007
120	-	-	97.0	0.102	91.0	0.114	75.0	0.079	33.7	0.089	40.0	0.067	35.0	0.031	-	-	-	-	19.0	0.007
123	-	-	90.0	0.079	89.0	0.114	72.0	0.080	36.0	0.086	37.5	0.050	35.0	0.022	-	-	-	-	16.0	0.006
126	-	-	84.0	0.072	85.5	0.112	69.0	0.068	39.0	0.080	33.0	0.041	29.7	0.018	-	-	-	-	19.0	0.007
144	-	-	65.0	0.052	81.5	0.099	62.0	0.062	26.0	0.071	28.5	0.026	29.7	0.016	-	-	-	-	19.0	0.005
147	-	-	65.0	0.058	76.0	0.104	57.0	0.061	27.0	0.069	27.0	0.018	28.0	0.016	-	-	-	-	-	-
150	95.25	0.073	77.5	0.056	73.5	0.102	50.0	0.048	23.0	0.060	23.0	0.015	29.7	0.015	-	-	-	-	-	-
153	67.5	0.069	60.0	0.053	68.2	0.096	48.7	0.049	20.0	0.056	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
177	65.0	0.037	52.0	0.050	51.5	0.081	43.0	0.039	14.0	0.040	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
180	62.5	0.035	52.0	0.047	46.0	0.072	36.5	0.034	15.0	0.038	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
186	57.2	0.030	53.0	0.049	39.0	0.068	33.0	0.027	13.0	0.030	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
201	55.5	0.028	20.0	0.029	21.0	0.052	33.5	0.026	10.0	0.025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
207	52.0	0.024	16.7	0.028	18.5	0.022	31.5	0.024	8.0	0.014	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
213	50.0	0.023	19.0	0.027	18.0	0.016	33.5	0.023	8.0	0.010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
219	50.0	0.021	18.0	0.021	18.0	0.016	32.5	0.020	8.0	0.008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

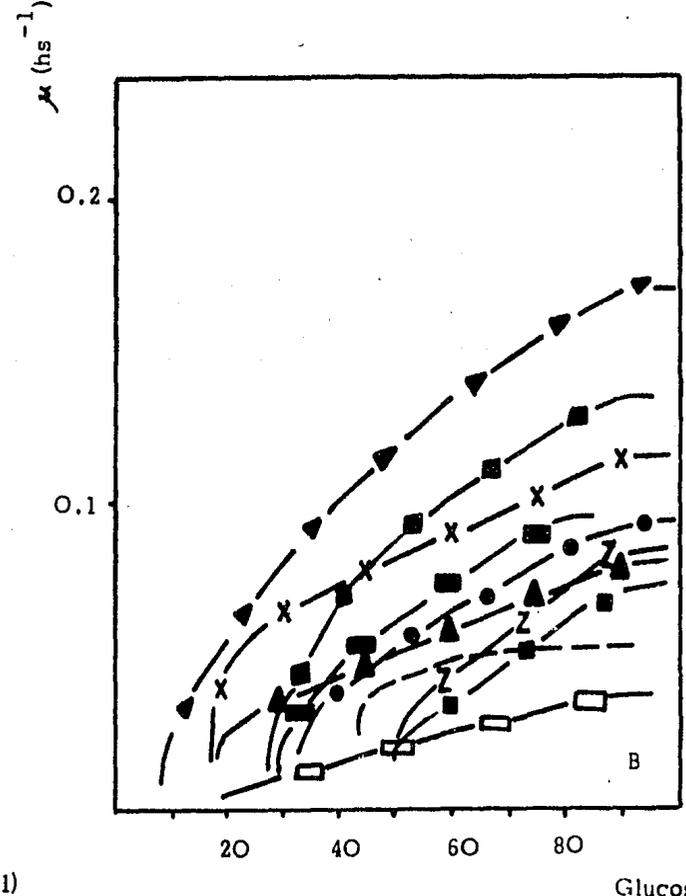
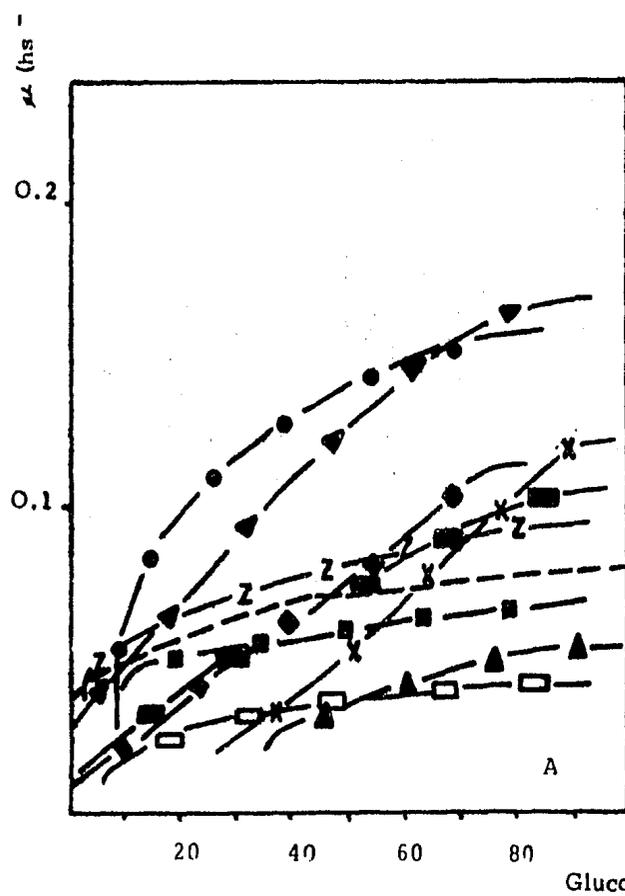


FIGURA 5.14 Consumo de Azúcares vs Velocidad Específica de Crecimiento a diferentes valores de pH para:

(A) *Candida parapsilosis* y (B) *Candida valida*. —■— 3, —▲— 4, —X— 4.5, —●— 5, —▼— 5.5, —◆— 6, —■— 6.5, —Z— 7, —--- 9, y —□— 10.

TABLA 5.35 CONCENTRACION DE NUTRIENTES ESENCIALES ELEGIDA PARA EL OPTIMO DESARROLLO DE LAS LEVADURAS.

NOMBRE DE LA ESPECIE	FUENTE DE CARBONO ^a	FUENTE DE NITROGENO ^b	FUENTE DE FOSFORO ^c
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	1.0	0.25	0.05
<u>Pichia membranaefaciens</u>	1.0	0.125	0.05
<u>Candida parapsilosis</u>	2.0	0.125	0.05
<u>Candida valida</u>	1.0	0.125	0.05

a Como Glucosa en gr/100 ml

b Como $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ en gr/100 ml

c Como KH_2PO_4 en gr/100 ml

TABLA 5.36 PARAMETROS ELEGIDOS A LOS QUE LAS LEVADURAS PRESENTAN SU OPTIMO DESARROLLO.

NOMBRE DE LA ESPECIE	PH	TEMPERATURA (°C)	VELOCIDAD DE AGITACION (rpm)
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	6.0	28°C	200
<u>Pichia membranaefaciens</u>	5.5	28°C	200
<u>Candida parapsilosis</u>	5.5	28°C	200
<u>Candida valida</u>	5.5	37°C	250

TABLA 5.37 CONTENIDO DE PROTEINAS DE LAS LEVADURAS DESARROLLADAS EN DIFERENTES SUSTRATOS.

NOMBRE DE LA ESPECIE	CONCENTRACION DE PROTEINAS (mg/100mg de células secas)		
	Glucosa	Melaza	cachaza
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	36.4	30.4	23.0
<u>Pichia membranaefaciens</u>	36.4	56.8	45.4
<u>Candida parapsilosis</u>	60.8	26.4	39.2
<u>Candida valida</u>	58.5	25.0	50.4

TABLA 5.38 CONTENIDO DE DNA DE LAS LEVADURAS DESARROLLADAS EN DIFERENTES SUSTRATOS.

NOMBRE DE LA ESPECIE	CONCENTRACION DE DNA (mg/100mg de células secas)		
	Glucosa	Melaza	cachaza
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	0.72	0.91	1.58
<u>Pichia membranaefaciens</u>	0.84	4.46	0.91
<u>Candida parapsilosis</u>	0.91	2.78	0.56
<u>Candida valida</u>	3.15	1.04	0.49

TABLA 5.39. RESULTADOS DE LA CONCENTRACION DE AMINOACIDOS
 PARA: Saccharomyces cerevisiae

AMINOACIDOS	GLUCOSA	MELAZA	CACHAZA	REFERENCIA FAO
Lisina	5.0421	2.0363	2.9623	4.2
Histidina	7.1727	3.1502	3.6573	---
Amoníaco	0.7863	0.8617	1.0153	---
Arginina	3.2600	1.8870	2.1446	---
Ac. Aspártico	7.1398	8.7585	9.3182	---
Treonina	3.1494	3.9849	4.2908	2.8
Serina	2.5383	3.5000	3.4073	---
Ac. glutámico	8.7238	12.6063	11.2271	---
Prolina	3.2149	4.2695	5.6760	---
Glicina	3.3157	4.3145	3.9080	---
Alanina	4.0493	5.1281	5.2939	---
Cisteína	-----	-----	-----	2.0
Valina	4.7705	6.4478	6.5037	4.2
Metionina	1.0849	1.7059	1.5616	2.2
Isoleucina	3.4344	4.6655	4.5711	4.2
Leucina	5.2563	7.2856	6.7141	4.8
Tirosina	2.2398	2.0175	2.5563	4.2
Fenilalanina	2.9514	3.2459	3.9498	2.8

Todos los datos en gramos de aminoácido por 100 gramos de proteína.

TABLA 5.40. RESULTADOS DEL INDICE INTEGRADO DE AMINOACIDOS ESENCIA-¹⁹⁰
LES DE OSER CALCULADO EN BASE A LA CONCENTRACION DE
AMINOACIDOS DE: Saccharomyces cerevisiae

AMINOACIDOS	GLUCOSA	MELAZA	CACHAZA	REFERENCIA FAO
Lisina	0.9669	0.3905	0.5681	0.8054
Treonina	0.3705	0.4688	0.5048	0.3294
Valina	0.5708	0.7715	0.7782	0.5025
Metionina	0.1019	0.1602	0.1467	0.2067
Isoleucina	0.3670	0.4986	0.4885	0.4488
Leucina	0.5617	0.7786	0.7175	0.5129
Tirosina	0.1732	0.1560	0.1977	0.3248
Fenilalanina	0.2504	0.2754	0.3351	0.2375
SUMA	3.3624	3.4996	3.7366	3.5994
INDICE DE OSER	0.9341	0.9722	1.0381	1.0000

Todos los datos en gramos de aminoácidos por 16 gramos de N.

TABLA 5.41. RESULTADOS DEL COMPUTO QUIMICO DE AMINOACIDOS ESENCIA-
LES PARA: Saccharomyces cerevisiae

AMINOACIDOS	GLUCOSA	MELAZA	CACHAZA
Lisina	120.06	48.48	70.53
Treonina	112.48	142.32	153.24
Cisteína	0.00	0.00	0.00
Valina	113.59	153.53	154.86
Metionina	49.31	77.54	70.98
Isoleucina	81.78	111.09	108.84
Leucina	109.52	151.80	139.89
Tirosina	53.33	48.04	60.87
Fenilalanina	105.44	115.96	141.10
COMPUTO QUIMICO	0.00	0.00	0.00
AMINOACIDO LIMITANTE	Cisteína	Cisteína	Cisteína

Todos los datos en cifras porcentuales.

TABLA 5.42 RESULTADOS DE LA CONCENTRACION DE AMINOACIDOS
 PARA: Pichia membranefaciens

AMINOACIDOS	GLUCOSA	MELAZA	CACHAZA	REFERENCIA FAO
Lisina	4.2796	4.2145	3.7954	4.2
Histidina	4.5854	5.2470	4.4037	---
Amoniaco	1.0157	0.8328	0.9252	---
Arginina	2.7042	2.6709	2.3839	---
Ac. Aspártico	9.0193	9.7754	8.9775	---
Treonina	5.1945	3.8993	4.6333	4.4
Serina	4.0262	3.7424	4.0870	---
Ac. Glutámico	11.840	13.955	8.5383	---
Prolina	1.3970	5.9163	3.8385	---
Glicina	4.6465	4.5672	4.5092	---
Alanina	6.1242	6.5661	5.4895	---
Cisteína	0.0000	0.0000	0.0000	2.0
Valina	5.7828	4.4069	6.1407	4.2
Metionina	2.0532	2.0200	1.4082	2.2
Isoleucina	5.8883	4.2676	4.1156	4.2
Leucina	10.449	8.1361	6.8462	4.8
Tirosina	3.7104	2.4929	3.4592	4.2
Fenilalanina	4.9879	3.1434	3.6894	2.8

Todos los datos en gramos de aminoácido por 100 g de proteína

TABLA 5.43 RESULTADOS DEL INDICE INTEGRADO DE AMINOACIDOS ESENCIALES DE OSER CALCULADO EN BASE A LA CONCENTRACION DE AMINOACIDOS DE: Pichia membranaefaciens

AMINOACIDOS	GLUCOSA	MELAZA	CACHAZA	REFERENCIA FAO
Lisina	0.8207	0.8082	0.7278	0.8054
Treonina	0.6111	0.4587	0.5450	0.3294
Cisteína	0.0000	0.0000	0.0000	0.2314
Valina	0.6919	0.5273	0.7347	0.5025
Metionina	0.1929	0.1897	0.1323	0.2067
Isoleucina	0.6292	0.4560	0.4398	0.4488
Leucina	1.1167	0.8695	0.7316	0.5129
Tirosina	0.2869	0.1928	0.2675	0.3248
Fenilalanina	0.4232	0.2667	0.3130	0.2375
Suma	4.7726	3.7689	3.8917	3.5994
Indice de Oser	1.3259	1.0470	1.0812	1.0000

Todos los datos de los aminoácidos en gramos de aminoácidos por 16 gramos de N.

TABLA 5.44 RESULTADOS DEL COMPUTO QUIMICO DE AMINOACIDOS ESENCIALES PARA: Pichia membranaefaciens

AMINOACIDOS	GLUCOSA	MELAZA	CACHAZA
Lisina	101.89	100.34	90.36
Treonina	185.51	139.25	165.45
Cisteína	0.00	0.00	0.00
Valina	137.69	104.93	146.20
Metionina	93.32	91.77	64.00
Isoleucina	140.19	101.60	97.99
Leucina	217.72	169.52	142.63
Tirosina	88.33	59.35	82.35
Fenilalanina	178.18	112.29	131.78
Aminoácido Limitante	Cisteína	Cisteína	Cisteína

Todos los datos en cifras porcentuales

CAPITULO VI.- Discusión de los resultados.

6.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACION.- De las levaduras objeto de estudio unicamente C. parapsilosis tiene la capacidad para asimilar la sacarosa, por este motivo se eligió la glucosa como fuente de Carbono del medio de aislamiento. El método de obtención de cultivos puros descrito por Lindner, fue modificado de la siguiente manera: se aplicó unicamente una gota de muestra por cada cubreobjetos examinado debido a que se sustituyó el uso de papel filtro estéril (porque perdía absorbencia al esterilizarse) por el lavado del cubreobjetos y recolección en tubos con medio de cultivo.

6.2. IDENTIFICACION Y CLASIFICACION.- Además de las características morfológicas descritas en las tablas 5.1, 5.2, 5.3 y 5.4, existen otras pruebas adicionales que no se realizaron por considerarse de carácter secundario.

De un total de 68 pruebas bioquímicas y morfológicas recomendadas por Barnett (7), se realizaron 50 por no contar con el resto de los reactivos requeridos.

Estos resultados están concentrados en las tablas 5.5 a 5.9 y corresponden las cepas 1,2,3,4 a Saccharomyces cerevisiae (Hansen), Pichia membranaefaciens (Hansen), Candida parapsilosis (Ashford, Langeron et Talice) y Candida valida, respectivamente como se muestra en la tabla 5.10.

6.3. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE NUTRIENTES Y PARAMETROS DE DESARROLLO OPTIMOS.- Los datos contenidos en las tablas 5.11 a 5.34 muestran el comportamiento de las cepas desarrolladas a diferentes concentraciones de nutrientes (C,P,N) y parámetros de desarrollo.

Este comportamiento se evaluó por el consumo de azúcares y la velocidad específica de crecimiento calculada por la expresión matemática siguiente:

$$\mu = \frac{\ln n/n_0}{t - t_{lag}}$$

En base a los valores encontrados se eligieron las concentraciones de nutrientes y condiciones de desarrollo correspondientes al máximo valor de velocidad específica de desarrollo observadas en las gráficas y que en lo sucesivo se denominarán condiciones óptimas de desarrollo, las cuales están resumidas en las tablas 5.35 y 5.36.

Cabe mencionar que en las tablas 5.11 a 5.14, los valores que se muestran para concentraciones de glucosa de 1%, 2% y 2.5% fueron obtenidos cuando las levaduras desarrollaron bajo condiciones óptimas.

Comparando los valores correspondientes de la velocidad específica de crecimiento para las cuatro cepas desarrolladas bajo las condiciones óptimas, se observa que Candida valida presenta el máximo valor con respecto al resto de ellas que en orden decreciente son: Saccharomy-

ces cerevisiae, Candida parapsilosis y Pichia membranaefaciens.

Estas observaciones son interesantes ya que podemos correlacionar μ_{max} con la variación que sufre la biomasa en el tiempo.

6.4. ANALISIS QUIMICO DE LAS LEVADURAS.- El análisis químico de las levaduras consistió en determinaciones de proteína, aminoácidos y DNA. Los resultados de estos análisis están concentrados en las tablas 5.37 a 5.44. Los valores de proteína para Saccharomyces cerevisiae en orden decreciente de concentración de acuerdo al medio de desarrollo fueron: glucosa, melaza y cachaza. En este mismo caso para DNA, los resultados fueron, cachaza, melaza y glucosa.

Se encontró el mismo orden para los valores del índice integrado de aminoácidos esenciales de Oser. En todos los casos el aminoácido limitante fue la cisteína. Los aminoácidos esenciales que se encuentran en una concentración mayor que el patrón de referencia de la FAO fueron: para glucosa, fenilalanina, leucina, treonina, valina y lisina; para melaza, isoleucina, fenilalanina, treonina, leucina y valina y para cachaza, isoleucina, leucina, fenilalanina, treonina y valina.

Los valores de proteína para Pichia membranaefaciens en orden decreciente de concentración de acuerdo al medio de desarrollo fueron: melaza, cachaza y glucosa.

En este mismo caso para DNA, los resultados fueron: melaza, cachaza y glucosa. El orden que se halló para los valores del índice de aminoácidos esenciales de Oser -- fue: glucosa, cachaza y melaza. En todos los casos el aminoácido limitante fue la cisteína. Y los aminoácidos esenciales que se encuentran en una concentración mayor que el patrón de referencia de la FAO fueron para glucosa: lisina, valina, isoleucina, fenilalanina, treonina y leucina; para melaza: lisina, isoleucina, valina, fenilalanina, treonina y leucina y para cachaza: fenilalanina, leucina, valina y treonina.

Los valores de proteína para Candida parapsilosis en orden decreciente de acuerdo al medio de desarrollo fueron: glucosa, cachaza y melaza. En este mismo caso para DNA, los resultados fueron: glucosa, melaza y cachaza. Es conveniente anotar que la concentración de aminoácidos sulfurados en el patrón utilizado por la FAO es --- excesivamente alto y por ello al calcular el índice de aminoácidos esenciales de Oser el valor disminuye notablemente.

CAPITULO VII.- Resumen y conclusiones.

7.1. RESUMEN.- Utilizando muestras de aguamiel y pulque se aislaron un total de 75 colonias que por sus características microscópicas y macroscópicas pertenecieran a especies de levaduras; estas colonias fueron sometidas a un proceso de purificación por pases sucesivos en el medio de aislamiento y posteriormente se procedió a la obtención de cultivos axénicos de donde se obtuvieron un total de 57 cultivos que se numeraron en orden progresivo y se sometieron a las pruebas de identificación mencionadas anteriormente.

De acuerdo a los resultados de las pruebas morfológicas y fisiológicas llevadas a cabo, se identificaron cuatro cepas de levaduras que son: Saccharomyces cerevisiae (Hansen), Pichia membranaefaciens (Hansen), Candida parapsilosis (Ashford, Langeron et Talice) y Candida valida; posteriormente, éstas fueron sometidas a las pruebas de determinación de la concentración de nutrientes esenciales y de los parámetros para su óptimo desarrollo. Para Saccharomyces cerevisiae, los resultados encontrados fueron: concentración de glucosa 1%, concentración de sulfato de amonio 0.25%, concentración de fosfato diácido de potasio 0.05%, temperatura de incubación 28°C, velocidad de agitación 200 rpm y pH del medio 6.0. Para Pichia membranaefaciens, los resultados son similares a los de Saccharomyces cerevisiae excepto en

que la concentración de fuente de Nitrógeno (sulfato de amonio) fue de 0.125% y el pH del medio 5.5: en el caso de Candida parapsilosis las condiciones óptimas determinadas fueron: concentración de glucosa 2%, concentración de sulfato de amonio 0.125%, temperatura de incubación 28°C, velocidad de agitación 200 rpm y pH del medio 5.5. Candida valida presentó los siguientes valores: concentración de glucosa 1%, concentración de sulfato de amonio 0.125%, concentración de fosfato diácido de potasio 0.05%, temperatura de incubación 37°C, velocidad de agitación 250 rpm y pH del medio 5.5.

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de desarrollo de las levaduras se procedió a la comprobación de los valores determinados y posteriormente, se les adaptó a desarrollarse en los medios de desecho utilizando las condiciones mencionadas anteriormente.

Se realizó el desarrollo masivo de las levaduras en medios de fermentación que contenían glucosa, melaza y ca chaza como fuente de carbono y posteriormente se procedió a la cosecha y al secado del producto.

Con las células secas y molidas se llevó a cabo su análisis químico que consistió en la determinación de proteínas, DNA y aminoácidos; los resultados de estos análisis señalaron que se obtienen valores más altos, en cuanto a contenido de proteínas, utilizando glucosa como fuente de Carbono para S. cerevisiae y utilizando melaza para Pichia membranaefaciens; en el caso de C. parapsilosis y C. valida, los valores más altos se obtie-

nen cuando la fuente de Carbono es la glucosa.

El análisis de DNA indicó que para S. cerevisiae se obtienen valores más altos con la cachaza; para P. membranaefaciens, cuando se utiliza melaza; para C. paraositosis los valores más altos son con la melaza y para C. valida son con la glucosa.

La determinación de aminoácidos se llevó a cabo solamente para Pichia membranaefaciens y para Saccharomyces cerevisiae; los resultados muestran que para las dos especies, el aminoácido limitante, con respecto al patrón de aminoácidos de la FAO, es la cisteína. Para la primera cepa, tomando en cuenta el índice integrado de aminoácidos esenciales de Oser, la mayor concentración es con la cachaza, le sigue la melaza y finalmente la glucosa, para la segunda cepa el orden fue glucosa, cachaza y melaza.

CONCLUSIONES.- De acuerdo a los resultados obtenidos durante el desarrollo experimental del presente trabajo podemos concluir - lo siguiente:

1).- El incremento en la concentración de biomasa en base biomasa/sustrato obtenido de las levaduras Pichia membranaefaciens (Hansen), Saccharomyces cerevisiae (Hansen) y Candida valida es mayor cuando estas desarrollan al 1% de -- concentración de la fuente de Carbono que a concentraciones mayores. En el caso de Candida parapsilosis (Ashford Langeron et Talice) la concentración óptima de la fuente de Carbono es del 2%.

La concentración de los nutrientes varía en forma directa en relación a la concentración de la fuente de Carbono.

2).- Los sustratos utilizados, melaza y cachaza, resultaron adecuados por su calidad como medios de cultivo así como - por el desarrollo que en ellos se obtiene de las levaduras estudiadas y porque constituyen materiales de desecho.

3).- La materia prima utilizada, así como los factores temperatura, pH, la concentración de los nutrientes y la velocidad de agitación, afectan considerablemente la obtención de biomasa en cuanto a la proporción con que esta - se produce y aparentemente a la calidad biológica de sus proteínas

- 4).- La finalidad específica a la que se destinen las levaduras aquí mencionadas y estudiadas, determinará la elección del medio de cultivo a utilizar tomando en cuenta la respuesta que se desee obtener en base a la composición química del producto.
- 5).- Más de un método "in vitro" debe usarse para determinar la calidad biológica de las proteínas alimentarias en una primera fase de trabajo y para ello se recomienda el cómputo químico y el índice integrado de aminoácidos esenciales de Oser.
- 6).- Los nuevos productos proteicos obtenidos a partir de fuentes no convencionales de proteína, tienen que ser evaluados desde el punto de vista de calidad biológica de sus proteínas ya que van a ser usados en la alimentación del hombre y los animales, aunque en determinados casos no vayan a ser empleados con una finalidad nutricional directa.
- 7).- El contenido de aminoácidos esenciales, las características de la pared celular, el contenido de ácidos nucleicos, las condiciones bajo las que se procesen las levaduras y también las condiciones de almacenamiento de sus productos pueden afectar significativamente la calidad biológica de sus proteínas.

8).- Además de los parámetros de desarrollo y la concentración de nutrientes, estudiados en este trabajo; deberán considerarse en futuros proyectos el efecto estimulante que sobre el metabolismo de algunas levaduras tienen ciertos aminoácidos y minerales.

CAPITULO VIII.- Bibliografía

- 1).- Aiba, S.; Humprey, A. E. and Millis, N. F. (1973). "BIO
CHEMICAL ENGINEERING"
Academic Press, U.S.A.
- 2).- Anderson, R. F. and Jackson, R. W. (1958). "ESSENTIAL A
MINOACIDS IN MICROBIAL PROTEINS"
Applied Microbiology. 6 : 369.
- 3).- 'Anonymous (1973b). "PROTEIN PROCESS FOR NEW PLANTS"
European Chemical News. Citado por Lininsky.
- 4).- Bailey, J. E. and Ollis, D. F. (1977). "BIOCHEMICAL ENGI
NEERING FUNDAMENTALS"
McGraw book Hill Co. U.S.A.
- 5).- Ballester, D.; Borja, I.; Yáñez, E. and Donoso, G (1968)
"PROTEIN RICH MIXTURES FOR HUMAN CONSUMPTION BASED ON
FISH FLOUR"
British Journal of Nutrition. 22 : 255
- 6).- Barford, J. P. and Hell, R. J. (1976). "ESTIMATION OF
THE LENGTH OF THE CELL CYCLE PHASES FROM ASYNCHRONOUS
CULTURES OF YEASTS"
Exp. Cell. Res. 102 : 276.
- 7).- Barnett, J. A.; Payne, R. W. and Yarrow, D. (1979). "A
GUIDE TO IDENTIFYING AND CLASSIFYING YEASTS"
Cambridge University Press, London

- 8).- Bhattacharjee, J. K. (1970). "MICROORGANISMS AS POTENTIAL SOURCES OF FOOD"
Advances in applied Microbiology. 13 : 139.
- 9).- Blackwell, B.; Mabbitt, L. A. and Marley, E. (1969). -
"HISTAMINE AND TYRAMINE CONTENT OF YEAST PRODUCTS"
Journal Food Science. 34 : 47
- 10).- Blumenthal, H. J. and Lewis, K. F. (1954). "AN ESTIMATION OF PATHWAYS OF GLUCOSE CATABOLISM IN YEAST"
J. Am. Chem. Soc. 76 : 6093.
- 11).- Bressani, R.; Elias, L. G.; Braham, J. E. and Erasles, M. (1967). "VEGETABLE PROTEIN MIXTURES FOR HUMAN CONSUMPTION THE DEVELOPMENT AND NUTRITIVE VALUE OF INCAP MIXTURE 15, BASED ON SOYBEAN AND COTTONSEED PROTEIN CONCENTRATES"
Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 17, No. 3:177.
- 12).- Buck, C. A. and Nass, M. M. (1968). "DIFFERENCES BETWEEN MITOCHONDRIAL AND CYTOPLASMIC tRNA AND AMINOACYL tRNA SYNTHETASES"
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 60 : 1045.
- 13).- Bush, D. A. and Horisberger, M. (1973). "MANNAN OF YEAST BUD SCARS"
J. Biol. Chem. 248 : 1318.

- 14).- Burton, K. (1955). "A STUDY OF THE CONDITIONS AND MECHANISM OF THE DIPHENYLAMINE REACTION FOR THE COLORIMETRIC ESTIMATION OF THE DEOXYRIBONUCLEIC ACID"
Biochemical Journal. Vol. 62 : 315.
- 15).- Burton, K. (1968). "DETERMINATION OF DNA CONCENTRATION WITH DIPHENYLAMINE"
Methods in Enzimology. Vol. 111 No. 128 : 163.
- 16).- Cabib, E. and Ulane, R. (1973). "YEAST QUITIN SYNTHETASE"
J. Biol. Chem. 248 : 1459.
- 17).- Cabib, E. (1975). "MOLECULAR ASPECTS OF YEAST MORPHOGENESIS"
Ann. Rev. Microbiol. 29 : 191.
- 18).- Campbell, I. (1975). "NUMERIC ANALYSIS OF NUCLEAR GENOME OF YEASTS"
Ann. Rev. Microbiol. 29 : 402.
- 19).- Campbell, I. and Gimour, R. H. (1969). "SEROLOGICAL SPECIFICITY OF YEASTS"
J. Gen. Microbiol. 59 : 193.
- 20).- Canepa, A.; Piebaer, M.; Romero, C. and Toha, J. C. (1972)
"A METHOD FOR LARGE REDUCTION OF THE NUCLEIC ACID CONTENT OF YEAST"
Biotech. and Bioeng. vol. XIV : 173.

- 21).- Castro, A. C.; Sinskey, A. J. and Tannenbaum, S. R. -
 (1971). "REDUCTION OF THE NUCLEIC ACID CONTENT IN Candida
 YEAST CELLS BY BOVINE PANCREATIC RIBONUCLEASE A TREAT-
 MENT"
 Applied Microbiology. 22, No. 3 : 422.
- 22).- Chen, S. L. (1959). "METABOLIC PATHWAYS FOR (¹⁴C) GLU-
 COSE UTILIZATION BY YEAST DURING AEROBIC FERMENTATION"
 Biochim. Biophys. Acta 32 : 470.
- 23).- Chen, S. L. (1959). "CARBOHYDRATE ASSIMILATION IN ACTI-
 VELY GROWING YEAST; Saccharomyces cerevisiae"
 Biochim. Biophys. Acta 32 : 481.
- 24).- Clarck-Walker, G. D. and Linnane, A. W. (1966). "IN VI
VO DIFFERENTIATION OF YEAST CYTOPLASMIC AND MITOCHON--
 DRIAL PROTEIN SYNTHESIS WITH ANTIBIOTICS"
 Biochem. Biophys. Res. Commun. 25 : 8.
- 25).- Cook, A. H. (1958). "THE CHEMISTRY AND BIOLOGY OF YEASTS"
 Academic Press, New York.
- 26).- Cooney, Ch. L.; Levine, D. W. and Snedecor, B. (1975).
 "PRODUCTION OF SINGLE CELL PROTEIN FROM METHANOL"
 Food Technology. 29, No. 33 : 33.
- 27).- Dabbah, R. (1970). "PROTEIN FROM MICROORGANISMS"
 Food Technology. 25 : 659.

- 28).- Dam, R.; Lee, S.; Fry, P. C. and Fox, H. (1965). "UTILIZATION OF ALGAE AS A PROTEIN SOURCE FOR HUMANS"
Journal of Nutrition. 86 : 376.
- 29).- De Dekken, R. H. (1966). "THE CRABTREE EFFECT: A REGULATORY SYSTEM IN YEAST"
J. Gen. Microbiol. 44 : 149.
- 30).- De Dekken, R. H. (1966). "THE CRABTREE EFFECT AND ITS RELATION TO THE PETITE MUTATION"
J. Gen. Microbiol. 44 : 157.
- 31).- Del Río, E. C. (1947). "MICROBIOLOGIA DEL PULQUE"
Ciencia. Nos. 4 y 5 : 121.
- 32).- Edozien, J. C.; Udo, V. V.; Young, V. R. and Scrimshaw, N. S. (1970). "EFFECTS OF HIGH LEVELS OF YEAST FEEDING ON URIC ACID METABOLISM OF YOUNG MEN"
Nature. 228 : 130.
- 33).- Espín, P. A. "ASPECTOS GENERALES DE LA OBTENCION DE LA PROTEINA FORRAJERA POR EL PROCESO DE MELAZAS-AMONIACO"
Tesis de Licenciatura. Fac. de Química, UNAM, 1982.
- 34).- FAO (1964). "LAS PROTEINAS: CLAVE DE LA ALIMENTACION MUNDIAL"
Boletín No. 5, Roma, Italia.

- 35).- FAO (1970). "MUNDO DE NIVELES SUPERIORES DE VIDA Y UNA MEJOR ALIMENTACION"
Memorias 2do. Congreso Mundial de Alimentación, La Haya.
- 36).- FAO (1970). "VIDAS EN PELIGRO. LAS PROTEINAS Y EL NIÑO"
Boletín No. 12, Roma, Italia.
- 37).- FAO (1983). "INFORME ALIMENTARIO MUNDIAL"
Roma, Italia.
- 38).- GAP (1974). "ASPECTOS DE NUTRICION Y SEGURIDAD EN LAS NUEVAS FUENTES DE PROTEINAS PARA LA NUTRICION DE ANIMALES"
Norma No. 15. 4 ; No. 3 : 12.
- 39).- Girard, H. y Rougieux, R. (1964). "TECNICAS DE MICROBIOLOGIA AGRICOLA"
Ed. Acribia, España.
- 40).- Goncalves de Lima, O. (1978). "EL MAGUEY Y EL PULQUE EN LOS CODICES MEXICANOS"
Fondo de Cultura Económica. 2da. edición. México.
- 41).- Goyco, J. A. (1957). "ESTUDIO DE LA RELACION ENTRE LA CAPACIDAD REGENERATIVA DE LA PROTEINA HEPATICA Y LA ACTIVIDAD NECROGENICA DE LAS PROTEINAS DE LEVADURA"
Bol. del Colegio de Químicos de Puerto Rico. 15, No. 1
- 42).- Hall, A.P. (1967). "LA NUTRICION Y LA SALUD Y FECUNDIDAD DE LA MADRE. EFECTOS DE LA PROCREACION EN LA SALUD Y LA NUTRICION"
Boletín del GAP 3 : 1975.

- 43).- Hartwell, L. H. and Culotti, J. (1974). "GENETIC CONTROL OF THE CELL DIVISION CYCLE IN YEAST"
Science. 183 : 46.
- 44).- Herrera, T. y Ulloa, M. (1975). "RECONSIDERACIONES SOBRE DOS TRABAJOS ANTERIORES, PARA LA IDENTIFICACION DE Kluyveromyces fragilis Y Candida quilliermondii EN EL POZOL Y DE Kloeckera apiculata EN EL PULQUE"
Bol. de la Soc. Mex. de Micología. 2 : 13.
- 45).- Herrea, T.; Ulloa, M. and Taboada, M. (1980). "MEXICAN INDIGENOUS FERMENTED BEVERAGES"
Sixth International Conference. GIAM IV (Global Impacts of Applied Microbiology). Lagos, Nigeria.
- 46).- Hsiao, H. Y.; Chiang, L. Ch.; Uang, P. P. and Tsao, G.T. (1982). "SEQUENTIAL UTILIZATION OF MIXED MONOSACCHARIDES BY YEASTS"
Appl. and Env. Microbiol. 43, No. 4 : 840.
- 47).- Huang, M. and Biggs, D. R. (1966). "CHROMOPHENICOL INHIBITION OF THE FORMATION OF MITOCHONDRIAL ENZYMES OF Saccharomyces cerevisiae"
Biochim. Biophys. Acta. 114 : 434.
- 48).- Indge, K. J. (1968). "METABOLIC LYSIS OF YEAST PROTOPLAST"
J. Gen. Microbiol. 51 : 433.
- 49).- Indge, K. J. (1968). "THE ISOLATION AND PROPERTIES OF THE YEAST CELL VACUOLE"
J. Gen. Microbiol. 51 : 441.

- 50).- Indge, K. J. (1968). "POLYPHOSPHATES OF THE YEAST CELL"
J. Gen. Microbiol. 51 : 447.
- 51).- Instituto Nacional de la Nutrición. (1976). "ENCUESTAS
NUTRICIONALES EN MEXICO"
II : 91 a 111 México.
- 52).- Kihlberg, R. (1972). "THE MICROBE AS A SOURCE OF FOOD"
Ann. Rev. Microbiol. 26 : 427.
- 53).- Krebs, H. A. (1972). "THE PASTEUR EFFECT AND THE RELA-
TIONS BETWEEN RESPIRATION AND FERMENTATION"
Essays. Biochem. 8 : 2.
- 54).- Leningher, A. L. (1979). "BIOQUIMICA. LAS BASES MOLECU-
LARES DE LA ESTRUCTURA Y FUNCION CELULAR"
Ed. Omega. 2da. edición. Barcelona, España.
- 55).- Levine, D.W. and Cooney, C.L. (1973). "ISOLATION AND
CHARACTERIZATION OF A THERMOTOLERANT METANOL UTILIZING
YEAST"
Appl. Microbiol. 26, No. 6 : 982.
- 56).- Linnane, A.W. and Haslam, J.M. (1972). "THE BIOGENESIS
OF MITOCHONDRIA IN MICROORGANISMS"
Ann. Rev. Microbiol. 26 : 163.
- 57).- Lipinsky, F.S. and Litchfield, H.J. (1974). "SINGLE CELL
PROTEIN IN PERSPECTIVE"
Food Technology. 28 : 16.
- 58).- MANUAL DE PRACTICAS DE BIOQUIMICA I Y II.
Facultad de Química. U.N.A.M. México.

- 59).- MANUAL DE PRACTICAS DE FISILOGIA Y BIOQUIMICA DE LOS MICROORGANISMOS.
Facultad de Química, U.N.A.M. México.
- 60).- Marchant, R and Smith, D.G. (1968). "SPUD FORMATION IN Saccharomyces cerevisiae AND A COMPARISON WITH OTHERS YEASTS"
J. Gen. Microbiol. 53 : 163.
- 61).- Maul, S.B.; Sinskey, A.J. and Tannenbaum, S.R. (1970). "NEW PROCESS FOR REDUCING THE NUCLEIC ACID CONTENT OF YEAST"
Nature. 228 : 181.
- 62).- Méndez, A.; Pijuán, N. y Carrillo, O. (1981). "ESTUDIOS NUTRICIONALES EN NUEVOS PRODUCTOS PROTEICOS" Informe Científico técnico. Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical de la Academia de Ciencias de Cuba. No. 176 : 1 a 55.
- 63).- Moens, P.B. and Ranport, E. (1971). "SPINDLES, SPINDLES PLACUES AND MEIOSIS IN THE YEAST, Saccharomyces cerevisiae (Hansen)"
J. Cell. Biol. 50 : 356.
- 64).- Monod, J. (1949). "THE GROWTH OF BACTERIAL CULTURES"
Ann. Rev. Microbiol. 3 : 371.
- 65).- Nahón, D. (1981). "OBTENCION DE BIOMASA FUNGICA (Pleurotus ostreatus) UTILIZANDO COMO FUENTE ENERGETICA AGUA DE COCO"
Tesis de Licenciatura. Fac. de Química, UNAM. México.

- 66).- Nelson, N. (1944). "A COPPER REDUCTION METHOD FOR SUGAR DETERMINATION"
Journal of Biological Chemistry. 153 : 375.
- 67).- Niels, A.W. (1981). "YEAST CELL ENVELOPES: BIOCHEMISTRY, BIOPHYSICS AND ULTRASTRUCTURE"
C. R. C. Press. Vol. 1, U.S.A.
- 68).- Ohta, S.; Maul, S.; Sinskey, A.J. and Tannenbaum, S.R. (1971). "CHARACTERIZATION OF A HEAT-SHOCK PROCESS FOR REDUCTION OF THE NUCLEIC ACID CONTENT OF Candida utilis"
Applied Microbiology. 22 : No. 3: 415.
- 69).- Otero, M.A.; Bernal, G. y Almazán, A. (1981). "LA PROTEÍNA UNICELULAR II. FUENTES DE CARBONO Y ENERGIA UTILIZADAS"
Revista de la Asociación de técnicos azucareros de Cuba
Vol. 40 No. 1 : 8.
- 70).- Oura, E. (1974). "EFFECT OF AERATION INTENSITY ON THE BIOCHEMICAL COMPOSITION OF BAKER'S YEAST II. ACTIVITIES ON THE OXIDATIVE ENZYMES"
Biotech. and Bioeng. XVI : 1213.
- 71).- Pérez, A.R. (1978). "CURSO PRACTICO DE LABORATORIO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES"
Tesis de Licenciatura. Fac. de Química, UNAM. México.
- 72).- Patersons, J.B. and Ris, H. (1972). "MEIOTIC SPINDLE PLATES IN Saccharomyces cerevisiae"
J. Cell. Biol. 53 : 837.

- 73).- Phaff, H.J. (1963). "CELL WALL OF YEASTS"
Ann. Rev. Microbiol. 17 : 15.
- 74).- Phaff, H.J.; Miller, M.W. and Mrak, E.M. (1978). "THE
LIFE OF YEAST"
Harvard University Press. London. 2d. edition.
- 75).- Prescott, S.C. (1959). "INDUSTRIAL MICROBIOLOGY"
Mc.Graw Hill Look Co. third edition. Japan.
- 76).- Quintero, R.R. (1981). "INGENIERIA BIOQUIMICA. TEORIA Y
APLICACIONES"
Editorial Alhambra. Primera edición. México.
- 77).- Reed, G. and Peopler, H. (1973). "YEAST TECHNOLOGY"
The Avi Publishing Co. Westport, U.S.A.
- 78).- Robinow, C.F. and Marak, J. (1966). "A FIBBER APPARATUS
IN THE NUCLEUS OF THE YEAST CELL"
J. Cell. Biol. 29 : 129.
- 79).- Rodnan, G.P. (1973). "GOTA Y OTRAS FORMAS AFINES DE AR-
TRITIS"
JAMA 224 : 661.
- 80).- Ruiz, O.M. (1936). "NOTA ACERCA DE LA MICROBIOLOGIA DEL
PULQUE Y DEL AGUAMIEL"
Anales del Instituto de Biología. VII : 251.
- 81).- Ruiz, O.M. (1938). "CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE LAS LE-
VADURAS DEL AGUAMIEL Y DEL PULQUE. I Saccharomyces caribajali"
Anales del Instituto de Biología IX

- 82).- Ruiz, O.M. (1939). "CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE LAS LEVADURAS DEL AGUAMIEL Y DEL PULQUE. II P. barraganii"
Anales del Instituto de Biología. X
- 83).- Ruiz, O.M. (1952). "CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE LAS LEVADURAS DEL AGUAMIEL Y DEL PULQUE. III Torulopsis hydromelitis"
Anales del Instituto de Biología. XX
- 84).- Salas, M.L.; Viñuela, E.; Salas, M. and Sols, A. (1965). "CITRATE INHIBITION OF PHOSPHOFRUCTOKINASE AND THE PASTEUR EFFECT"
Biochem. Biophys. Res. Comm. 19 : 371.
- 85).- Sánchez-Marroquín, A. (1955). "ESTUDIOS SOBRE LA MICROBIOLOGIA DEL PULQUE. XVI PROPAGACION DE Candida parapsilosis Y OTRAS LEVADURAS DE ESTE SUSTRATO"
Ciencia. 15, No. 8 : 136.
- 86).- Sánchez-Marroquín, A.; Terán, J. y Piso, J. (1957). "ESTUDIOS SOBRE LA MICROBIOLOGIA DEL PULQUE. XVIII DATOS QUIMICOS DE LA FERMENTACION DEL AGUAMIEL CON CULTIVOS PUROS"
Revista de la Sociedad Química Mexicana. 1 : 167.
- 87).- Sánchez-Marroquín, A.; Larios, C. y Vierna, L. (1967). - "ESTUDIOS SOBRE LA MICROBIOLOGIA DEL PULQUE. XIX ELABORACION DE LA BEBIDA MEDIANTE CULTIVOS PUROS, EN PLANTA PILOTO"
Rev. Latinoamericana de Microbiología y Parasitología 9:83

- 88).- Sánchez-Marroquín, A. (1967). "ESTUDIOS SOBRE LA MICROBIOLOGIA DEL PULQUE. XX PROCESO INDUSTRIAL PARA LA ELABORACION TECNICA DE LA BEBIDA"
Rev. Latinoamericana de Microbiol. y Parasitología. 9:87
- 89).- Sánchez-Marroquín, A. (1970). "INVESTIGACIONES REALIZADAS EN LA FACULTAD DE QUIMICA DE LA UNAM TENDIENTES A LA INDUSTRIALIZACION DEL AGAVE"
Revista de la Sociedad Química de México. 14 : 184.
- 90).- Sánchez-Marroquín, A.; Herrera, T. and Goncalves de Lima, O. (1977). "MICROBIAL STUDIES ON PULQUE"
Symp. on Indigenous Fermented Foods. Bangkok, Thailand.
- 91).- Scargg, A. and Villa, V. (1971). "CELL-FREE PROTEIN SYNTHESIZING SYSTEM FROM YEAST"
Science. 171 : 908.
- 92).- Schneider, W.C. (1968). "DETERMINATION OF NUCLEIC ACIDS IN TISSUES BY PENTOSE ANALYSIS"
Methods in Enzimology. 111, No. 99 : 680.
- 93).- Scrimshaw, N.S.; Bressani, R.; Wilson, D. and Behar, M. (1962). "EFFECT OF Torula YEAST ON THE PROTEIN QUALITY OF INCAP VEGETABLE MIXTURE 9"
American Journal of Clinical Nutrition. 11 : 537.
- 94).- Sentandreu; R. and Northcote, D. (1969). "THE FORMATION OF BUDS IN YEAST"
Journal of General Microbiology. 55 : 393.

- 95).- Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972). "THE FLUID MO-
SAIC MODEL OF THE STRUCTURE OF CELL MEMBRANE"
Science. 175 : 720.
- 96).- Slater, M.L. (1977). "CELL CYCLE OF Saccharomyces cere
visiae IN POPULATIONS GROWING AT DIFERENT RATES"
Proc. Natl. Acad. Sci. 74 : 3850.
- 97).- Snyder, H.E. (1970). "MICROBIAL SOURCES OF PROTEIN"
Advances in Food Research. 18 : 85.
- 98).- Somogyi, M. (1952). "NOTES ON SUGAR DETERMINATION"
Journal of Biological Chemistry. 195 : 19.
- 99).- Tietz, N.W. (1972). "QUIMICA CLINICA MODERNA"
Nueva Editorial Interamericana. México.
- 100).- Topiwala, H.H. (1973). "MATHEMATICAL MODELS IN MICRO--
BIOLOGY"
Methods in Microbiology. 8 : 35.
- 101).- Tsuchiya, H.M.; Fredrickson, A.G. and Aris, R. (1966).
"DYNAMICS OF MICROBIAL CELL POPULATIONS"
Advances in Chemical Engineering. 6 : 125.
- 102).- Ulloa, M. y Herrera, T. (1973). "DESCRIPCION DE UNA VA
RIEDAD NUEVA DE Kloeckera corticis AISLADA DEL PULQUE"
Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología 7 : 27.
- 103).- Villalón, R. y Tagle, M.A. (1973). "LAS LEVADURAS COMO
RECURSOS PROTEICOS DE LA DIETA HUMANA. ALGUNOS ASPECTOS
DE SU PROBLEMATICA"
Rev. del Inst. Cubano de Investigaciones sobre los deri
vados de la caña de azúcar (ICIDCA). 7, No. 3: 3.

- 104).- Walker, J.D. and Colwell, R.R. (1974). "MICROBIAL PETROLEUM DEGRADATION. USE OF MIXED HYDROCARBON SUBSTRATES"
Applied Microbiology. 27, No. 6 : 1053.
- 105).- Waslien, C.I.; Calloway, D.H. and Costa, F. (1969). -
"HUMAN INTOLERANCE TO BACTERIA AS FOOD"
Nature. 221 : 84.
- 106).- Waslien, C.I.; Calloway, D.H.; Margen, S. and Costa, F.
(1970). "URIC ACID LEVELS IN MEN FED ALGAE AND YEAST
AS A PROTEIN SOURCE"
Journal Food Science. 35 : 294.