



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**Propagación de Pseudomonas cariophilli en
Melaza de Caña, para la Obtención de Pro-
teína Unicelular**

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

o r e s e n t a

MARIA GABRIELA ARAUJO PACHECO



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

C O N T E N I D O

RESUMEN	xi
INTRODUCCION	
1. Problema Alimentario	1
2. Producción Agrícola y Subproductos	8
3. Industria de Fermentaciones	14
OBJETIVO	22
MATERIALES Y METODOS	
1. Preparación del Medio de Cultivo	24
2. Microorganismo	33
3. Experimentos en Cultivo por Lote	35
4. Experimentos en Cultivo Continuo	47
5. Recuperación del Producto	54
6. Evaluación Nutricional	56
RESULTADOS	
1. Medio de Cultivo	59
2. Cultivo por Lote	60
3. Constante de Saturación	92
4. Cultivo Continuo	94
5. Evaluación Nutricional	86
CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFIA	99

RESUMEN

Con el objeto de presentar una opción para la producción de forrajes baratos para utilizarlos en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, se realizó un estudio sobre la cinética de crecimiento de *Pseudomonas catiophylli* empleando melaza de caña como sustrato.

Se evaluó y optimizó el crecimiento en cultivos por lote y continuo en función de parámetros ambientales como pH, sustrato y temperatura, así como la velocidad de dilución en cultivo continuo.

Los resultados obtenidos arrojan productividades alrededor de 1.4 g/ℓHr y 3.21 g/ℓHr en cultivo por lote y continuo, respectivamente.

Los valores óptimos encontrados son: pH de 7, temperatura de 37°C, y una concentración de azúcar de 5%; la velocidad máxima de crecimiento en cultivo por lote fue de 0.415 Hr⁻¹, y la velocidad de dilución en donde se obtiene la máxima productividad fue 0.25 Hr⁻¹.

Finalmente, se realizó un estudio nutricional de la biomasa obtenida, cuyo contenido proteico no es menor del 44% y una digestibilidad *in vitro* del 84%.

INTRODUCCION

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

1. PPOBLEMA ALIMENTARIO.

Después de miles de años de crecimiento lento, la población mundial se ha incrementado enormemente durante la segunda mitad del presente siglo, llegando en la actualidad a una cifra cercana a 4000 millones de seres humanos.

Las Naciones Unidas estiman que, en los próximos 25 años la población del mundo se duplicará, lo que implica que la producción de satisfactores, y en particular los alimentos, deberá duplicarse en el mismo período, tan sólo para mantener el nivel de alimentación actual, sin tomar en cuenta ninguna mejora de la subalimentación a gran escala que existe en los países subdesarrollados (27). Si se toman en cuenta los niveles de ingestión de proteína/día que la O.M.S. (1973) recomienda y que van de 14 a 16 g, dependiendo del sexo y edad de la persona, la producción mundial de proteína necesita aumentar alrededor de 59% para 1990—54 millones de toneladas más que la producción actual—. (62)

Lo anterior es más dramático si se toma en cuenta que el consumo de proteína en los países desarrollados (1/3 de la población mundial) es cercano a 100g/día, mientras que el consumo en los países subdesarrollados (los 2/3 restantes) es inferior a 60 g/día. La F.A.O. estima que se requiere un incremento entre 12 y 36 millones de toneladas para llevar el consumo de los países subdesarrollados a un nivel similar al de los desarrollados (54).

En México, la población en 1980, superó los 74 millones de habitantes, y se estima para 1990, un valor cercano a 90 millones (Tabla 1). Esto implica una tasa de crecimiento de 3.3 % anual, aproximadamente, lo que hace más dramático el déficit de producción de alimentos que se presenta desde hace varios años y que ha dado lugar a un incremento de casi 2000 % en los volúmenes de alimentos importados (45).

T A B L A 1

CRECIMIENTO POBLACIONAL PARA EL
PERIODO 1940-1990 *

AÑO	MILLONES DE HAB.
1940	20
1950	26
1960	35
1970	49
1980	74
1990	93

* Adaptado de Quintero, 1976.

Más importante que los aspectos cuantitativos mencionados, es el déficit alimentario en términos cualitativos, lo que significa una ingestión insuficiente de proteínas (62). Las proteínas, combinaciones complejas de aminoácidos, son esenciales en todo organismo vivo, tanto en el peso, como desde el punto de --

vista fisiológico, debido a que casi la totalidad de las reacciones que se llevan a cabo en el organismo son catalizadas por enzimas, que a su vez son de naturaleza protéica. Lo anterior pone de manifiesto la importancia que tiene un suplemento continuo y adecuado de proteína para lograr un desarrollo integral en el humano y en la mayoría de los organismos superiores.

Son varios los efectos que una nutrición deficiente en proteínas ocasiona en el ser humano; dependen, tanto de la calidad de la proteína ingerida, así como de la edad del individuo que la ingiere. Con el fin de ilustrar esto, se presenta en la Tabla 2 una comparación entre los suplementos y los requerimientos de energía y proteína para países subdesarrollados y desarrollados, y el efecto que tales relaciones tienen en 3 indicadores -- del estado de salud de la población. Se observa que, tan pronto como los suplementos alcanzan o superan el 100% de los requerimientos, el exceso de proteína, por encima y por debajo de los niveles de seguridad de ingestión aumenta a una velocidad aún mayor, lo que a su vez está asociado a un aumento de su calidad. También se observa que sin duda hay falta de proteínas de buena calidad en los países subdesarrollados.

La tendencia de la producción de proteína en México, a partir de fuentes convencionales, durante el período 1970-1985 está dada en la Tabla 3. La producción animal ha tenido un crecimiento cercano al 4.8% anual, el pescado 10%, y los productos agrícolas 4%.

La demanda para la alimentación animal y humana en el mismo

T A B L A 2

RELACION ENTRE EL SUPLEMENTO Y EL
REQUERIMIENTO DE PROTEINA *

Clasificación por países	% S/R cal	% S/R prot	A	B	C
Subdesarrollados:					
S/R cal 90%	85	127	99.9	2.94	120.40
S/R cal 90-109%	97	156	67.5	3.01	118.06
S/R cal 110%	112	183	72.4	3.06	120.05
Desarrollados:					
S/R cal 90-109%	106	215	26.8	3.03	124.8
S/R cal 110-119%	116	213	29.6	3.24	124.7
S/R cal 120%	122	236	25.4	3.36	126.4

* Nicol, 1973.

S = Suplemento
R = Requerimiento
A = Mortalidad infantil por cada 1000 nacimientos
B = Peso al nacer (Kg)
C = Altura a los 8 años (cm)

período, se muestra en la Gráfica 1, que indica un déficit creciente, considerando que el 80% de la proteína requerida para el consumo animal proviene de cereales, y que el contenido proteico de los alimentos, para consumo humano, es de 70% (48).

El déficit para 1970 fue de aproximadamente 750,000 toneladas, y para 1985 se espera un déficit de 1.03 millones de toneladas. El efecto inmediato de este déficit es el aumento en las -

T A B L A 3

PRODUCCION DE PROTEINA DE FUENTES
CONVENCIONALES EN MEXICO (Ton/año) *

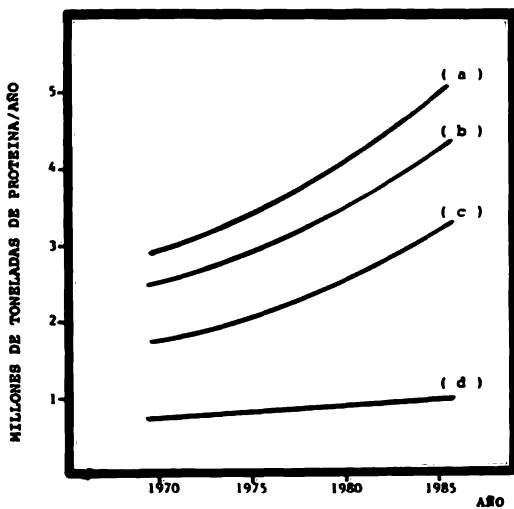
FUENTE	1970	1975	1980	1985
Carne g. vacuno	122028	154264	145264	246534
Carne g. porcino	24664	31178	38415	49827
Aves	19676	24874	31445	39752
Otros	5571	7042	8902	11254
Huevos	42108	48815	61711	78013
Leche de vaca	161290	203899	257763	325857
Pescado	37938	61100	101520	167378
Maíz	858853	1030624	1236748	1484098
Frijol	223910	268692	322430	386916
Trigo	270397	324476	389372	467246
TOTAL	1766435	2154964	2644322	3256875

* Quintero, 1976.

importaciones de productos alimenticios tales como leche, pescado y cereales (45).

La posibilidad de lograr aumentos considerables en la producción agropecuaria existe, pero depende de las medidas estructurales e institucionales que adoptan los países en vías de desarrollo. En México se espera que con el S.A.M. se logre a mediano plazo incrementar la producción de alimentos, tanto para animales como para humanos.

GRAPICA 1



PRODUCCION, DEMANDA Y DEFICIT DE PROTEINA EN MEXICO.

a) DEMANDA: 100% alimentación animal, 100% alimentación humana

b) DEMANDA: 80% alimentación animal, 100% alimentación humana

c) PRODUCCION de Protefna animal y vegetal

d) DEFICIT de Protefna: 80% alim. animal, 100% alim. humana

Actualmente, las oleaginosas son la línea que soporta la -- producción intensiva de ganado; en general son más baratas que - el forraje tradicional, y tienen un alto contenido de protefna_ de buena calidad. Hasta ahora, la más importante ha sido la soya, que además proporciona una gran variedad de productos como ex--- tractos, aislados o concentrados de soya; se emplea como sustitu to de carne debido a su capacidad de absorción de agua, mejora-- miento de sabor y textura, disminución de la contracción muscu-- lar y capacidad de retención de grasa; es la protefna vegetal - que compite más favorablemente con las protefnas animales, lo -- cual no es muy común en las protefnas vegetales (62).

El resumen del panorama mundial presentado permite ver que, cualquier fuente alterna de protefnas que tienda a disminuir los déficits mencionados anteriormente, debe tomarse en cuenta cada_ vez que la población tienda a incrementarse. Es importante te-- ner presente también, que la producción de protefna convencional es cada vez más costosa por el constante aumento en los precios_ de la tierra, así como de los insumos necesarios para la produc-- ción agropecuaria, por lo cual es deseable que las fuentes alter_ nas de protefna sean más económicas que las ya existentes.

2. LA PRODUCCION AGRICOLA Y SUS SUBPRODUCTOS.

Como se indicó en la Tabla 3, las principales fuentes de -- protefna de origen vegetal son las representadas por el maiz, el frijol y el trigo, siendo además el maiz, el cultivo más imporr-- tante en todo el país.

El segundo cultivo en importancia en México lo constituye - la caña de azúcar que, aunque no es una fuente de protefna, sí - es, en forma de azúcar, la principal fuente de calorías de la -- dieta del mexicano.

Los 4 cultivos mencionados producen cantidades variables de desechos que, en número y peso, son mayores que los productos de ellos obtenidos, como son: pajas, bagazos o rastrojos, ricos en_ celulosa y lignina, pero además, en el caso de la caña de azúcar y el maiz, se obtienen melazas ricas en carbohidratos solubles,- lo que constituye una ventaja con respecto a los residuos celuló_ sicos, que en su mayoría son insolubles.

Tanto el maiz como la caña de azúcar, son cultivos de tempo_ ral, sin embargo, gracias a la diversificación de las técnicas - de cultivo, la producción se ha podido extender hasta cerca de 8 meses al año, lo que permite espaciar durante mayor tiempo la -- disponibilidad de estos residuos y transformarlos en materia pri_ ma para otras industrias, o bien, en subproductos que incremen-- tan la rentabilidad del proceso.

La producción de azúcar y de caña de azúcar, es uno de los_ factores más importantes en la economía agrícola de México. De

las industrias derivadas de la tierra, la azucarera combina las características y problemas de actividades agrícolas e industriales, y presenta las mayores dificultades para sostener una producción económica equilibrada, lo que se hace más difícil si se toma en cuenta la gran inversión de capital fijo que se requiere para transformar la caña de azúcar en productos comerciales (5).

La caña de azúcar es un cultivo típico de regiones tropicales subdesarrolladas (20), sin embargo, la industria azucarera se distingue de otras porque nace y se transforma en el campo, aunque en sentido estricto, es una industria netamente extractiva que propicia polos de desarrollo industrial que emplean mano de obra constante, tanto agrícola como fabril, lo que ayuda a la descentralización económica del país (9). Cabe mencionar, que la caña de azúcar posee uno de los sistemas fotosintéticos más eficientes que se conocen, lo que la ubica en un lugar preponderante en el reino vegetal.

Lo anterior obliga a prestar especial atención a todos los aspectos que la integran, y transformarla así, en una industria más eficiente. Para ilustrar su importancia, se presentan en la Tabla 4, algunos aspectos económicos de la caña de azúcar. Como se puede apreciar en la tabla, el rendimiento por hectárea para la caña oscila alrededor de las 70 toneladas, mientras que la soya es de 1.5 - 2.0 toneladas (aunque existen reportes de producción hasta de 120 Ton/Ha para la caña de azúcar).

Un balance global para el proceso que sufre la caña de azú-

T A B L A 4

ASPECTOS ECONOMICOS DE CARA DE AZUCAR Y SOYA *

Año	Superficie (Ha)	Producción (Ton)	Valor (\$ x 10 ³)
Caña de Azúcar:			
1973	505,063	32,861,253	2,790,137
1974	491,482	33,499,145	3,307,443
1975	497,691	35,840,570	4,158,725
1976	496,268	31,386,550	5,315,969
1977	463,547	28,205,952	6,322,979
1978	537,172	35,474,851	8,684,697
Grano de Soya:			
1973	311,895	585,474	1,774,132
1974	300,118	491,084	1,618,892
1975	344,450	598,694	2,005,041
1976	172,379	302,402	1,255,688
1977	314,276	516,275	2,690,680
1978	216,514	333,960	1,912,454

* S.P.P. 1980.

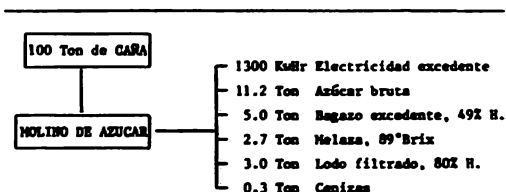
car arroja los datos presentados en el Cuadro 1, en el cual se observa que los principales subproductos del proceso de la caña de azúcar son: bagazo, melazas y lodos de filtrado.

En el caso particular de la melaza, se produce en una proporción aproximada de 1-4 con respecto al azúcar, y su producción en el ciclo agrícola 78-79 fue superior a 1 millón de toneladas (55).

La composición de una melaza es función de factores geográ-

C U A D R O 1

BALANCE DE MASA APROXIMADO PARA UNA
OPERACION DEL MOLINO DE AZUCAR *



Suposiciones:

- 13 % Sacarosa en la caña
- 13 % Fibra en la caña
- 95 % Extracción con molino
- 85 % Recuperación total
- 84 % Pureza del jugo mezclado
- 500 Kg Consumo de vapor/Ton caña
- 2.3 Ton de vapor generado/Ton bagazo húmedo

En donde:

- El Bagazo, es desperdicio celulósico,
- Las Melazas, fuente rica en carbohidratos, y
- El Lodo intermedio, es una mezcla compleja.

* Rolz, 1975.

ficos y agrícolas, de la variedad de caña utilizada, y de la eficiencia con la que opera el ingenio. Una comparación típica, se muestra en la Tabla 5 (53). Las melazas, como puede observarse en la tabla, son ricas en azúcares fermentables, minerales esenciales (K, Mg, P, Zn, Fe, Cu), vitaminas (biotina, ácido pantoténico,

inositol, piridoxina, tiamina) y algunos aminoácidos (aspártico, glutámico, glicina), razones por las cuales son materia prima - empleada en gran número de industrias, entre las que se encuentran:

Alimentación Animal: en donde son fuente importante de --- energía y substituyen parcialmente los granos en las raciones a ninales, e incluso, si se suplementan con urea y fósforo, pueden reemplazar fuentes de proteína (20).

Fermentaciones: las melazas de mejor calidad se emplean en la producción de antibióticos y aminoácidos; las melazas de mediana calidad, se emplean en la producción de ácido cítrico y, las remanentes de baja calidad, para la producción de alcohol.

T A B L A 5

COMPOSICION APROXIMADA DE
MELAZAS DE CASA *

Componente	%
Sólidos totales	78 - 85
Azúcares totales	50 - 58
Nitrógeno	0.08 - 0.5
P ₂ O ₅	0.009- 0.07
CaO	0.15 - 0.8
MgO	0.25 - 0.8
K ₂ O	0.80 - 2.2
SiO ₂	0.05 - 0.3
Al ₂ O ₃	0.01 - 0.04
Fe ₂ O ₃	0.001- 0.01
Carbono	28 - 33

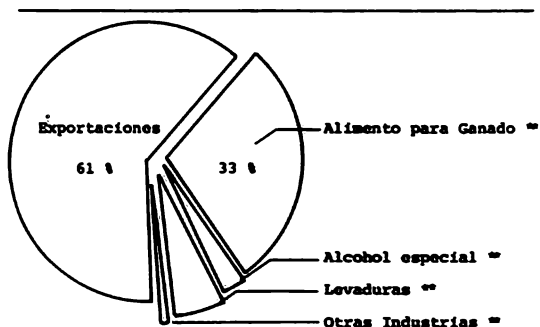
* Solomon, 1969.

Para el potencial mencionado, un alto porcentaje de la melaza producida se exporta para servir de materia prima en industrias que pueden obtener productos con un valor agregado, muchas veces mayor del de la melaza de la que se partió.

Lo anterior, se ilustra en la siguiente figura:

F I G U R A 1

VENTAS DE MIELES INCRISTALIZABLES
(1979) *



** Consumo Interno = 39 %
Total de Ventas = 100 % (1,016,775 Ton)

Como se puede observar, por las características y la cantidad de melaza producida, es ésta un sustrato con capacidad para soportar todavía un mayor número de industrias que hagan posible aumentar la rentabilidad del proceso de la caña de azúcar.

3. LA INDUSTRIA DE FERMENTACIONES Y SU POTENCIAL EN LA PRODUCCION DE PROTEINA UNICELULAR.

El empleo de microorganismos en alimentación se conoce desde tiempos muy antiguos, por lo que la historia de las fermentaciones se remonta a muchos años atrás. Primero, la producción de fermentos como vino, cerveza, quesos, vinagre y pan, en las cuales se desconocía la presencia y la acción de los microorganismos.

La levadura ha sido usada en panificación durante mucho tiempo, y desde luego, la levadura de cervecera, que fue quizá el primer desarrollo tecnológico formal de un proceso microbiano. Las bacterias, son la base principal de alimentos tales como yogurt, queso y sauerkraut.

En Alemania, durante la Primera Guerra Mundial, se realizó el primer esfuerzo moderno para la producción de la levadura *Torula* y su empleo en alimentación. Este proceso continuó durante el período comprendido entre las dos Guerras Mundiales, alcanzando una producción máxima de 15,000 Ton/año (34).

Después de la Segunda Guerra Mundial se abrieron nuevos --

horizontes en la industria de fermentaciones, con la introducción del cultivo sumergido, lo que a su vez dió lugar a la producción en gran escala de antibióticos, esteroides, y reguladores metabólicos y, más recientemente, la producción de enzimas específicas y enzimas inmovilizadas.

Las ventajas que los sistemas microbianos presentan, se -- pueden resumir principalmente en:

- i) rápido crecimiento;
- ii) capacidad para crecer en casi cualquier sustrato, y
- iii) requerimientos ambientales escasos, en general.

El rápido crecimiento de los microorganismos se hace muy evidente, si se comparan los tiempos de duplicación que presentan diversos organismos involucrados en la alimentación humana, como se ilustra en la siguiente tabla:

T A B L A 6

TIEMPO DE DUPLICACION DE LA MASA CELULAR
DE ALGUNOS ORGANISMOS

Organismo	Tiempo
Bacterias	20-200 min.
Levaduras	45-350 min.
Hongos	60-500 min.
Algas	6- 18 hrs.
Pastizales	1- 2 sem.
Aves	2- 4 sem.
Bovinos	1- 2 meses

Otra ventaja derivada del corto tiempo de duplicación es - el hecho de facilitar la manipulación genética en periodos cortos, así como mediante métodos más sencillos y seguros que los empleados en organismos superiores.

La segunda y tercera ventaja planteadas permiten flexibilidad para poder emplear más de un sustrato, lo cual es importante en un proceso industrial.

Finalmente, los procesos microbianos no están sujetos a variaciones de tipo estacional, como ocurre con la mayoría de los productos agrícolas, e incluso con algunos animales.

La expresión "Proteína Unicelular" (P.U.) ó "Single Cell Protein" (S.C.P.) fue creada en 1966; se eligió como una forma nueva y neutra para describir las proteínas microcelulares derivadas de bacterias, levaduras, hongos y algas, y tuvo como objetivo evitar el uso de nombres más específicos que empezaron a surgir en ese entonces, tales como: Petroproteína ó Proteína -- Bacteriana (47).

Por lo general, las PU contienen más del 50% de proteína - de buena calidad, además de contener lípidos, carbohidratos y - minerales, en una proporción adecuada.

Aunque la composición varía con cada microorganismo y con el tipo de sustrato utilizado para su propagación, en la Tabla 7 se presentan algunas composiciones de PU reportadas.

Hasta ahora se ha demostrado que, cuando son producidas y tratadas adecuadamente, las PU no son tóxicas ni alérgicas, y son nutritivas, tanto para animales como para humanos.

T A B L A 7

COMPOSICION DE PU COMPARADAS CON HARINA DE
SOYA Y HARINA DE PESCADO *

Organismo	Sustrato	Composición en % Peso				
		Prot. cruda	Prot. verdadera	LIS	MEF	Líp.
Bacteria	metanol	80	65	5.8	2.2	8
	metano	60	50			
Levadura	N-parafinas	60	53	7.4	1.8	9
	gasóleo	69	60	7.8	1.6	2
	etanol	54	45	6.7	1.5	6
Hongos	carbohidrato	35-50	34-40	6.5	1.5	5
Algas	CO ₂	45-60	40-50	4.6	1.4	5
	Harina de Pescado	60-65	50-60	7.0	2.6	5-10
	Harina de Soya	45-50	40-45	6.5	1.4	1.5

* CONTACTT, 1979.

Se ha enfatizado el potencial de las PU como suplemento de proteínas y de vitamina B, en una gran variedad de productos alimenticios (56). Por esta razón, el uso de PU en alimentos debe basarse en la identificación del producto final más deseable, tomando en cuenta aspectos económicos, nutricionales y toxicológicos que garanticen seguridad en su empleo (56). Para cubrir lo anterior, existen 3 criterios principales de preocupación, - en lo que a alimentación animal se refiere (57):

1. Establecimiento de su valor nutritivo.
2. Determinación de la seguridad para animales.
3. Determinación de la seguridad del alimento derivado de los animales que consuman tales productos, cuyo consumidor final sea el hombre.

En cuanto al segundo punto mencionado, uno de los principales problemas lo constituye el alto nivel de ácidos nucleicos - que en general contienen las PU. En el caso de complemento alimenticio en dietas o forrajes, no es necesario remover dichos ácidos de las PU, pues no son dañinos para animales; en cuanto a humanos adultos, los estudios indican que pueden ingerirse no más de 2 g/día de ácidos nucleicos para mantener niveles razonables de ácido úrico y evitar efectos tóxicos del mismo.

La hidrólisis de la biomasa cruda puede disminuir los ácidos nucleicos hasta cantidades menores del 5%, que ya es un nivel aceptable para aplicarlo en alimentos. Si la hidrólisis se efectúa adecuadamente, no desnaturaliza las proteínas contenidas en la PU, y además, aumenta el contenido de proteína total.

Las PU pueden tratarse en diferentes formas, después de remover los ácidos nucleicos, para obtener un producto más concentrado y/o funcional, y entonces usarlo como ingrediente alimenticio. Los aislados y concentrados resultantes son muy similares a los derivados de soya. Pueden ligar agua y lípidos para impartir propiedades funcionales a los alimentos que las contengan y, en caso de aislados, pueden hacerse texturizados que podrán transformarse en análogos de alimentos.

En el caso de alimentación animal, el alto contenido y calidad de la proteína de las PU está 25-50% por encima de la harina de soya. De todos modos, en el caso de ingredientes de alimentos, en donde la funcionalidad es el principal factor, se espera que la proteína unicelular se venda al mismo precio que los derivados de soya, con el objeto de mantener la competitividad económica. El valor nutritivo de la PU usada como suplemento alimenticio es generalmente alto, y en muchos casos, después de adicionar metionina, es excelente (29).

La tercera consideración, que involucra la seguridad a largo plazo, básicamente debe respaldarse con estudios toxicológicos también a largo plazo, lo que a su vez depende del esclarecimiento de algunos factores como son: niveles dietéticos apropiados, grado de fortificación deseable, aspectos toxicológicos del sustrato, así como los cambios que puedan ocurrir en el metabolismo e histología de las especies, propiedades de función y forma, además de la aceptación del producto por el consumidor (14). Aunque existen reportes sobre la ausencia de efectos en algunas especies, es necesario llevar a cabo estudios sobre posibles manifestaciones crónicas y subcrónicas, y estudios en relación a la reproducción (15).

En resumen, la aprobación de una PU para un proceso, un sustrato y un microorganismo en particular, debe realizarse en términos únicos, ya que no es posible extrapolar resultados de uno a otro tipo de proteína unicelular.

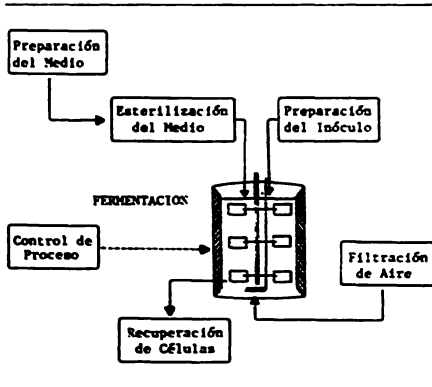
Desde el punto de vista económico, las PU deben competir -

razonablemente con los productos que pretendan substituir, lo que implica, hasta donde sea posible, la aplicación de un proceso de fermentación eficiente.

Aunque el esquema y las condiciones de operación son particulares para cada proceso, en el siguiente cuadro se muestra el diagrama de proceso para una fermentación aeróbica típica, que incluye la mayoría de las operaciones industriales (63).

C U A D R O 2

DIAGRAMA DEL PROCESO DE UNA FERMENTACION
AEROBICA TIPICA *



* Weinshank, 1969.

Desde el punto de vista cinético, si se parte de un microorganismo eficiente y con alto contenido de proteína, los aspectos más relevantes para garantizar una buena productividad son:

- diseño y optimización del medio de cultivo;
- optimización de las variables que afectan la cinética de crecimiento; y
- un adecuado diseño del reactor.

Finalmente, y como conclusión de lo expuesto, se considera que el potencial de las PU es una alternativa importante para aliviar, aunque sólo parcialmente, la situación alimentaria mundial, mediante la utilización de materias primas baratas y disponibles en cantidad razonable, como es el caso de la melaza de caña, razón por la que, para este trabajo, se plantea el objetivo que aparece a continuación ...

O B J E T I V O

Propagación de *Pseudomonas caxiophilli* en Melaza de Caña, para la obtención de Protefna Unicelular.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

1. PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO.

Como muchos sustratos empleados en las fermentaciones, las melazas no siempre son utilizadas en forma directa para la preparación de los medios de cultivo en donde se propaga finalmente el microorganismo de interés, ya que es necesario someterlas a un pretratamiento que elimine sustancias que puedan interferir con el crecimiento microbiano y que, por otro lado, aumenten la disponibilidad de los azúcares presentes.

Aunque la composición de las mieles incristalizables depende del tipo de caña y de la eficiencia con la que opera el ingenio, en la Tabla 8, se muestra un análisis promedio de sus constituyentes. En dicha tabla, se observa que el contenido de cenizas es muy elevado, y que la relación carbono:nitrógeno:fósforo está alrededor de 250:1:0,1 lo que pone de manifiesto la necesidad de suministrar una fuente externa adicional de nitrógeno y fósforo que mantenga una relación cercana al 100:20:1 que se recomienda para la propagación de microorganismos (38).

Son diversos los tratamientos que se han empleado para limpiar las cenizas, sin embargo, los más utilizados son los tratamientos térmicos en condiciones ácidas con ácido sulfúrico ó

T A B L A 8

ANALISIS DE MELAZAS *

COMPONENTE	(%)	COMPONENTE	(%)
Sólidos totales	78-85	Nitrógeno	0.080-0.50
Caniza total	9.8	P ₂ O ₅	0.009-0.07
Azúcar total	50-58	CaO	0.150-0.80
Rafinosa	-	H ₂ O	0.250-0.80
Sacarosa	33.4	K ₂ O	0.800-2.20
Canizas	9.8	SiO ₂	0.050-0.30
Orgánicos no-CHO	19.6	Al ₂ O ₃	0.010-0.04
Agua	16.0	Fe ₂ O ₃	0.001-0.01
		Carbono	28-33
VITAMINAS : (µg/g)			
Tiamina	0.8		
Ac. Nicotínico	15.0		
Ac. Pantoténico	20.0		
Piridoxina	-		
Biotina	1.5		
Riboflavina	-		
Inositol	2000		
Colina	-		

* Solomons, 1969.

fosfórico, los cuales precipitan una porción importante del material inorgánico y, en el caso del ácido fosfórico, proporcio-

nan una cantidad adicional de fósforo.

En este caso se empleó el método de clarificación con ácido sulfúrico (33), cuyo procedimiento es el siguiente:

La melaza se diluyó 1:1 con agua, se agregó ácido sulfúrico concentrado (Baker, R.A.) hasta un pH de 3.5 y se llevó a ebullición (parrilla Corning PC-100) durante 3-5 minutos. Se dejó enfriar y sedimentar. Transcurridas 6 hrs. se decantó y desechó el sedimento. Con el propósito de evitar crecimiento microbiano y mantener constante la calidad durante los diferentes experimentos, la melaza clarificada se guardó en refrigeración a 4°C (donde precipita una cantidad adicional de sólidos, aumentando la eficiencia del tratamiento). Finalmente, antes de emplear la melaza, se neutralizó con solución de NaOH 10 N (Baker, R.A.).

Para seguir en forma adecuada cualquier proceso fermentativo, es imprescindible un buen control de la fuente de carbono y energía (que en el caso de las melazas está constituida por un alto porcentaje de sacarosa). Para ello, se realizaron ensayos con métodos colorimétricos como el de Ting (1956), el del Acido Dinitrosalicílico (Miller, 1959) y el de Fenol-Sulfúrico (Dubois, 1956), así como el método volumétrico de Fehling (A.O.A.C. 31-035). Unos determinan azúcares reductores directos y otros azúcares totales; sin embargo, debido a problemas con la duplicidad de resultados (que se originan en parte por la gran cantidad de compuestos que contiene la melaza y que pueden interferir en las determinaciones), de los métodos probados, el de Fenol-Sul

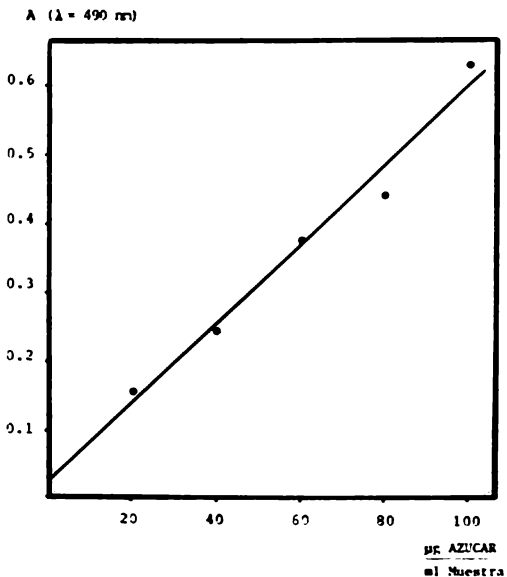
fúrico fue el que más constancia y reproducibilidad demostró; - razón por la cual fue el método seleccionado para evaluar la -- concentración de sustrato.

Dicho método fue propuesto por Dubois (1956) y se basa en la cuantificación del color naranja que se desarrolla al poner en contacto el fenol con los azúcares en presencia de ácido sulfúrico; de esta manera es posible detectar monosacáridos, disacáridos, polisacáridos e incluso aminoazúcares, en forma razonablemente rápida y precisa. Otra ventaja del método es que el color es bastante estable y los reactivos empleados son relativamente baratos.

El procedimiento consistió en colocar 4 ml de la muestra - conteniendo una concentración de azúcar entre 10 y 70 μg en un tubo de ensaye de 22 x 150 mm; en seguida se agregaron 0.2 ml - de una solución de fenol (Baker, R.A.) al 80% en agua, y por último, 10 ml de H_2SO_4 concentrado (Baker, R.A.); se agitó durante 5 segundos en un vórtex (Lab-Line, modelo Supermixer 1290) y - se dejó reposar a temperatura ambiente. Transcurridos 30 minutos, se leyó la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro -- Perkin-Elmer 35. La concentración de azúcar en las muestras se calculó a partir de una curva patrón de glucosa (Baker, R.A.) - 0.01% en agua destilada a pH 7. La gráfica y la ecuación obtenidas por mínimos cuadrados se muestra en la Gráfica 2.

Para suministrar los nutrientes esenciales para el crecimiento microbiano (como son los macronutrientes: C,H,O,N,S,P, y los micronutrientes: Ca,Mg,K,Mo,Cu,Co, etc., así como algunos -

GRAFICA 2



Curva patrón de Glucosa al 0.01%

$\mu\text{g AZUCAR}$ A - 0.0265
ml Muestra 0.995735

factores de crecimiento) y suplir las deficiencias de la melaza, fue necesario desarrollar un diseño del medio de cultivo que tomase en cuenta los requerimientos anteriores, así como la composición macromolecular y elemental de bacterias. En las Tablas 9 y 10, se muestran los valores promedio reportados.

T A B L A 9

COMPOSICION MACROMOLECULAR DE BACTERIAS *

Componente	% Base Seca
Proteínas	70.0
Acidos Nucléicos	8 -16
Lípidos	1.5- 3
Cenizas	3 - 7

* Paredes, 1976.

En el caso particular de *Pseudomonas cariophilli*, un análisis de la biomasa propagada en un medio diseñado en base a una concentración de proteína supuesta (50%) arrojó la composición que se muestra en la Tabla 11. Con el dato de proteína del 48.87% se procedió a diseñar el medio en la forma siguiente:

Abbot y Clamen (1973), han reportado rendimientos para carbohidratos del orden del 50%, con lo que, aplicando la definición de rendimiento en base a sustrato se tiene la relación que se muestra a continuación:

T A B L A 10

COMPOSICION ELEMENTAL DE BACTERIAS *

ELEMENTO	% BASE SECA
Fósforo	2.000-3.00
Azufre	0.200-1.00
Potasio	1.000-4.50
Magnesio	0.100-0.50
Sodio	0.500-1.00
Calcio	0.010-1.10
Fierro	0.020-0.20
Cobre	0.010-0.02
Manganeso	0.001-0.01

* Aiba, 1973

T A B L A 11

COMPOSICION ELEMENTAL DE *Ps. cariophilii*

COMPONENTE	(%)
Proteína	48.87
Grasa	2.32
Fibra cruda	3.5
Cenizas	4.11
Humedad	3.55

$$Y_{x/s} = \frac{\text{g Células formadas}}{\text{g Sustrato consumido}} = 0.5$$

Tomando como base de cálculo un medio con una concentración de azúcar del 1%, se concluye que es posible producir 5g/l de células, en condiciones óptimas, por lo cual los demás nutrientes quedan de la siguiente manera:

Nitrógeno.- En los diseños preliminares del medio de cultivo se empleó fosfato de amonio con fórmula $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, como fuente de nitrógeno, sin embargo, se presentaron gran cantidad de problemas por precipitación de la sal, por lo que se decidió cambiarla por cloruro de amonio (NH_4Cl).

Los requerimientos de nitrógeno son:

$$\frac{\% \text{ N}}{\text{células}} = \frac{488 \text{ mg Prot/g Células}}{6.25} = \frac{78 \text{ mg N}}{\text{g Célula}}$$

y el nitrógeno requerido en base al azúcar es:

$$\left(\frac{78 \text{ mg N}}{\text{g Célula}} \right) \left(\frac{0.5 \text{ g Células}}{\text{g Azúcar}} \right) = \frac{39 \text{ mg N}}{\text{g Azúcar}}$$

por lo que la cantidad requerida es:

$$\left(\frac{39 \text{ mg N}}{\text{g Azúcar}} \right) \left(\frac{53.5 \text{ mg NH}_4\text{Cl}}{14 \text{ mg N}} \right) = \frac{149 \text{ mg NH}_4\text{Cl}}{\text{g Azúcar}}$$

Fósforo.- De acuerdo con la tabla 12, los requerimientos -

de este elemento son del 2 - 3% en base seca, por lo que la cantidad para el medio al 1% es:

$$\left(\frac{0.03 \text{ g P}}{\text{g Células}} \right) \left(\frac{0.5 \text{ g Células}}{\text{g Azúcar}} \right) = \frac{0.015 \text{ g P}}{\text{g Azúcar}}$$

Debido a que se usó $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, la cantidad requerida para el medio es:

$$\left(\frac{0.015 \text{ g P}}{\text{g Azúcar}} \right) \left(\frac{138 \text{ g NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}}{31 \text{ g P}} \right) = \frac{66.7 \text{ mg NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}}{\text{g Azúcar}}$$

Azufre.- De la tabla 10, se observa que se requiere 1% en peso de azufre para la biomasa bacteriana, por lo que la demanda es:

$$\left(\frac{0.01 \text{ g S}}{\text{g Células}} \right) \left(\frac{0.5 \text{ g Células}}{\text{g Azúcar}} \right) = \frac{0.005 \text{ g S}}{\text{g Azúcar}}$$

El azufre se suministra al sistema como H_2SO_4 , a través del tratamiento de clarificación; por lo que, haciendo un balance del ácido necesario para bajar el pH a 3.5 como ya fue descrito, se tiene:

$$\left(\frac{0.7 \text{ ml H}_2\text{SO}_4}{40 \text{ ml Melaza Bruta}} \right) \left(\frac{1.84 \text{ g H}_2\text{SO}_4}{\text{ml H}_2\text{SO}_4} \right) \left(\frac{320 \text{ mg S}}{\text{g H}_2\text{S}_7\text{O}_6} \right) \left(\frac{49 \text{ ml Mal.Bruta}}{10 \text{ g Azúcar}} \right) \\ = \frac{41.2 \text{ mg S}}{\text{g Azúcar}}$$

Esto implica que los requerimientos de azufre están cubier

tos con el tratamiento realizado.

Magnesio y Oligoelementos.- De la Tabla 10, se aprecia que los requerimientos de magnesio son del 0.5% y que, por otro lado, de la Tabla 8 se observa que la melaza posee 0.8% en peso - de MgO, por lo que se requieren:

$$\left(\frac{0.005 \text{ g Mg}}{\text{g Células}} \right) \left(\frac{0.5 \text{ g Células}}{\text{g Azúcar}} \right) = \frac{0.0025 \text{ g Mg}}{\text{g Azúcar}}$$

El suministro fue:

$$\left(\frac{8 \text{ mg MgO}}{\text{ml Melaza}} \right) \left(\frac{4 \text{ ml Melaza}}{\text{g Azúcar}} \right) \left(\frac{24 \text{ g Mg}}{40 \text{ g MgO}} \right) = \frac{19.2 \text{ mg Mg}}{\text{g Azúcar}}$$

Lo que demuestra que la demanda está cubierta.

El resto de los oligoelementos y vitaminas, basándose en los datos de Solomons, 1970, (62), se considera que están cubiertos, además de que la cepa empleada no requiere vitaminas.

2. MICROORGANISMO.

En el desarrollo de este trabajo se empleó una cepa de --- *Pseudomonas cariophilii* CDBB - b58, perteneciente a la colección microbiana del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del C.I.E.A. (IPN). Esta cepa fue seleccionada por tener gran capacidad para crecer en una amplia variedad de fuentes de carbono, y, en particular, en azúcares. Sus característi-

cas principales se describen en las Tablas 12 y 13 .

T A B L A 12

PRINCIPALES CARACTERISTICAS DE *Pseudomonas caryophylli* *

Aeróbica	+
Saprófito	
No-fermentativa	
Motilidad	+
Mesófila-termotolerante	

* Koneman (1973) y Bergey's (1975)

T A B L A 13

FUENTES DE CARBONO Y ENERGIA USADAS POR *Pseudomonas caryophylli* *

FUENTE	CRECIMIENTO	FUENTE	CRECIMIENTO
Glucosa	+	D-Xilosa	+
D-Ribosa	+	L-Ramnosa	+
Sacarosa	+	Mesotartrato	+
Glicolato	+	2,3 Butilenglicol	+
D-Arabinosa	+	D-Fucosa	+
Celobiosa	+	Levulinato	+
Citraconato	+	Nicotinato	+
Adonitol	+	Meta-OH-benzoato	+
Triptamina	+	α -Amilamina	+

* Bergey's, 1975.

Lo anterior ilustra la gran capacidad metabólica de la cepa, logrando así aprovechar los azúcares presentes en la melaza, aunque se encuentren en pequeña proporción.

3. EXPERIMENTOS EN CULTIVO POR LOTE.

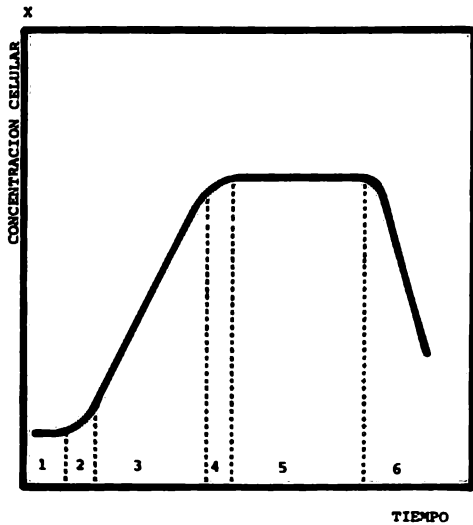
El cultivo por lote, por tanda, o cultivo batch, fue la -- primera forma en la que los microorganismos fueron propagados.-- Consiste en colocar al organismo en el medio de cultivo y dejar lo que crezca cierto tiempo, o bien, que el crecimiento cese -- por alguna razón. Es un cultivo en estado no estacionario, esto es, que sufre cambios con respecto al tiempo, y su representación más general se muestra en la Gráfica 3.

Aunque la forma y duración de cada una de las fases que se presentan durante el cultivo por lote es función del microorganismo, del medio de cultivo y de las condiciones de crecimiento a las cuales está sometido, las explicaciones para cada fase -- son las siguientes:

En la fase LAG se llevan a cabo el mayor número de cambios en cuanto a fisiología celular se refiere; es el período de inducción y síntesis enzimática necesaria para la adaptación y el aprovechamiento de los constituyentes del medio.

La fase de ACELERACION no es sino la consecuencia lógica -- de la fase LAG, y es el período donde la velocidad de crecimiento empieza a aumentar, hasta llegar al máximo fijado por las --

GRAFICA 3



CURVA TIPICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO POR LOTE

<u>Fase</u>	<u>Velocidad de Crecimiento</u>
Lag (1)	0
Aceleración (2)	incremento
Logarítmica (3)	constante y máxima
Retardamiento (4)	disminuye
Estacionaria (5)	0
Muerte (6)	negativa

condiciones ambientales y la capacidad enzimática del microorganismo, lo que se denomina "Fase de crecimiento LOGARITMICO".

Conforme los nutrientes van siendo agotados o bien, cuando los productos de excreción se acumulan en cantidad tal que afectan el crecimiento en forma negativa, se genera la Fase de REESTADAMIENTO, la cual culmina en la Fase ESTACIONARIA y aún en la de MUERTE, si las condiciones drásticas persisten.

Para propósitos de producir un microorganismo o de obtener una sustancia a partir de él, lo más importante es lograr un número grande de células, lo cual se alcanza durante la Fase de Crecimiento Exponencial, en donde la razón de cambio de la concentración celular es directamente proporcional a la concentración celular presente, y que matemáticamente se expresa como:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (1)$$

en donde:

x = concentración celular (g/l)
t = tiempo (horas)

Al introducir la constante de proporcionalidad, la ecuación 1 queda:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (2)$$

y "μ" se define como la Velocidad Específica de Crecimiento, - que es igual a:

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad (3)$$

Rearrogando la ecuación (3) se tiene:

$$u dt = \frac{dx}{x} \quad (4)$$

Al integrar la ecuación anterior, poniendo como límites de tiempo desde cero hasta "t", y de concentración celular desde " x_1 " hasta " x_2 ":

$$\int_0^t u dt = \int_{x_1}^{x_2} \frac{dx}{x} \quad (5)$$

queda:

$$u t = \ln \frac{x_2}{x_1} \quad (6)$$

Despejando " x_2 ", que es la concentración de células en un tiempo "t", se tiene:

$$x_2 = x_1 e^{ut} \quad (7)$$

La ecuación (7) implica que, para un cultivo creciendo en forma exponencial, es posible predecir su comportamiento en un tiempo "t", si se conoce la concentración celular inicial y la velocidad específica de crecimiento. Un caso particular de la ecuación (7) se obtiene cuando se mide el tiempo que un microorganismo emplea para duplicar su masa celular, y esto es :

$$x_2 = 2 x_1 \quad (8)$$

Por tanto, el tiempo de duplicación t_d , de un microorganismo, puede calcularse por substitución de la ecuación (8) en la ecuación (6), y tomando $t = t_d$:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (9)$$

Como todo ser vivo, los microorganismos crecen a expensas de un cierto sustrato, el cual les sirve como fuente de carbono y energía. Un problema importante fue el determinar las relaciones entre el sustrato y el crecimiento. J. Monod (1942) -- mostró que, cuando la concentración de sustrato es baja, existe una relación lineal entre este y la velocidad específica de crecimiento, pero a altas concentraciones, alcanza un valor de saturación similar al de la ecuación de Michaelis-Menten.

Lo anterior, matemáticamente implica:

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \frac{S}{K_s + S} \quad (10)$$

en donde:

K_s = Constante de saturación (g/l)

$\mu_{\text{máx}}$ = Velocidad Específica Máxima de --
Crecimiento (hr^{-1})

Si: $K_s = S$, implica que:

$$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}}}{2} \quad (11)$$

Monod también observó que la cantidad de células que se obtiene a partir de un determinado sustrato y unas condiciones dadas, - se define como "Constante de Rendimiento Celular", y matemáticamente se expresa como:

$$Y_{x/s} = \frac{\text{g Células formadas}}{\text{g Sustrato consumido}} \quad (12)$$

Lo anterior implica que la velocidad de crecimiento está dada por:

$$\frac{dx}{dt} = -Y_{x/s} \frac{ds}{dt} \quad (13)$$

en donde el signo negativo (-) simplemente significa que la concentración de sustrato disminuye conforme la concentración celular aumenta.

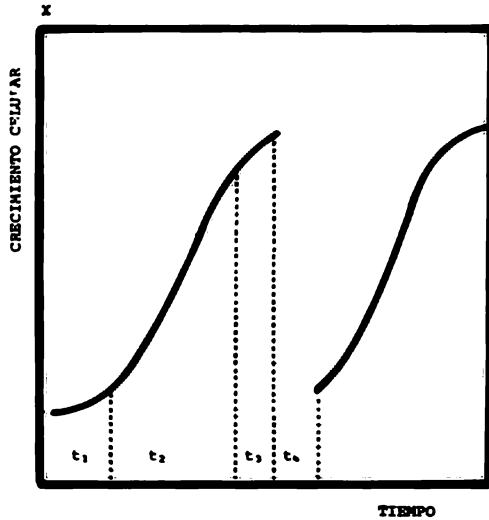
El parámetro más importante de una fermentación, y de cualquier proceso en general, es la Productividad, que significa la producción obtenida por unidad de tiempo.

En una fermentación por lote, en donde lo que importa es - la concentración celular a un tiempo "t", se tiene:

$$P = \frac{p}{t} = \frac{x}{t} = \frac{Y_{x/s} (S)}{t} \quad (14)$$

Para calcular "t" en un cultivo por lote, es necesario tomar en cuenta el tiempo que lleva, por separado, cada actividad involucrada en su preparación, dentro de cada una de las fases. Esto se ilustra en la Gráfica 4.

GRAPICA 4



CALCULO DE TIEMPO EN CULTIVO POR LOTE

- t_1 - tiempo de duración de la fase Lag
- t_2 - tiempo empleado en el crecimiento Logarítmico
- t_3 - tiempo de la fase de Declinación y/o Muerte
- t_4 - tiempo de preparación de un lote nuevo

El tiempo, en la Fase Log, está dado por:

$$t_2 = \left(\frac{1}{\mu} \right) \ln \frac{x_2}{x_1} \quad (15)$$

por lo que la Productividad finalmente queda:

$$p = \frac{Y_{x/s} S_0}{\left(\frac{1}{\mu} \right) \left(\ln \frac{x_2}{x_1} \right) + \tau} \quad (16)$$

en donde:

$$T = t_1 + t_2 + t_3 \quad (17)$$

Evaluación Experimental del Crecimiento.

El crecimiento de la cepa fue evaluado mediante la cuantificación de sólidos en suspensión y por la absorción de luz que el cultivo tiene a una determinada longitud de onda.

Para el primer caso, se filtró 1 ml del cultivo a través de una membrana millipore (Millipore HAWP-087) de peso conocido en un equipo para filtración a vacío (Millipore, Ground Vained_ Flask), evaluando el peso residual cuando las membranas son secadas hasta peso constante en un horno de vacío (Heraeus RVT.W. Germany) a una temperatura de 50°C durante 3 horas.

La cantidad de luz absorbida fue evaluada mediante la absorbancia de una muestra diluida a 10, leyendo a 640 nm y correlacionándola con los sólidos mediante una curva de calibración previamente construida.

Mantenimiento del Microorganismo.

Al principio del estudio, el microorganismo se conservó en tubos con medio inclinado a base de Agar Nutritivo (Bioxon). -- Posteriormente, se consideró más adecuado conservar el organismo en medio a base de melaza y agar, en una relación de 1% de - Azúcar con 2% de Agar.

Todos los medios fueron preparados y esterilizados a 1.5 kg /cm² en autoclave (CSR de México) durante 30 minutos.

El microorganismo fue sembrado por asada e incubado a 37°C por periodos de 24 - 48 hrs. Una vez que se obtuvo crecimiento abundante, se sellaron los tubos con papel parafilm y se guardaron en refrigeración a 4°C.

Experimentos en Matraz.

Con el objeto de determinar la duración aproximada de las diversas fases de crecimiento del microorganismo, se realizó -- una cinética en matraz agitado con una concentración de azúcar de 1% y agitación igual a 150 rpm.

Los matraces fueron preparados y esterilizados en la forma antes descrita. El experimento se llevó a cabo en una serie de 20 matraces erlenmeyer de 250 ml de capacidad, con 50ml de medio de cultivo; el inóculo fue preparado mediante la suspensión del crecimiento de un tubo inclinado en agua destilada estéril, seguida de 2 transferencias a matraz con inóculos de 10% v/v para lograr una adecuada aclimatación del mismo, esto último sir-

vió para inocular los 20 matraces (a un 10t v/v) que se colocaron en una incubadora (New Brunswick Scientific Co. modelo G25) a 37°C. Los tiempos de incubación fueron de 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36 horas; se analizaron azúcares, pH, y el crecimiento microbiano a 2 matraces en cada uno de los tiempos experimentados.

Experimentos en Fermentadores.

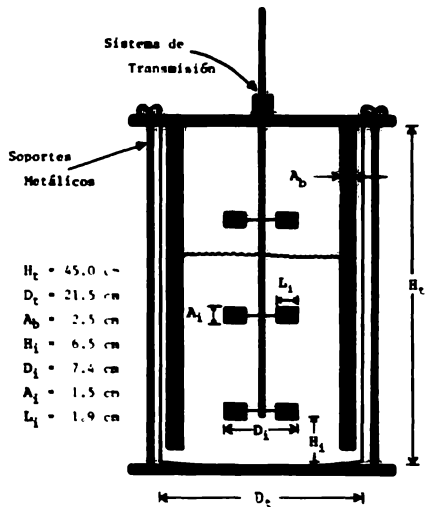
Para conocer los parámetros cinéticos más importantes del sistema se decidió experimentar en fermentador, con el propósito de tener condiciones más reproducibles y ventajas como: control de pH, de espuma, de agitación, de flujo de aire, de temperatura, mejor transferencia de oxígeno y mayor facilidad de escalamiento.

El equipo utilizado fue un fermentador de 14 litros y una unidad NBS - 314 (New Brunswick Scientific Co.), con los controles mencionados.

El fermentador consta de una jarra de vidrio pyrex y tapas de acero inoxidable tipo 316, con las entradas que se muestran en la Figura 2. La agitación se logra por medio de un sistema de transmisión mecánica y 3 turbinas de paletas planas colocadas en la flecha. Tiene 4 baffles verticales y 1 difusor de aire en el fondo del fermentador.

El control de espuma se realizó mediante la adición automática de antiespumante para soluciones acuosas (Daw Corning FG 10)

FIGURA 2



ESQUEMA DEL FERMENTADOR UTILIZADO EN LOS EXPERIMENTOS.

- | | |
|---------------------------|-------------------------|
| H_t = Altura impulsor | H_t = Altura tanque |
| D_1 = Diámetro impulsor | D_t = Diámetro tanque |
| A_1 = Ancho impulsor | A_b = Ancho bafle |
| L_1 = Largo impulsor | |

diluido al 50%, y una bomba peristáltica interconstruida en la unidad. El pH se mantuvo constante por medio de un controlador Horyzon (Cole Parmer Inst. Co.) y una bomba peristáltica Masterflex de velocidad variable conectada al controlador y accionada por un electrodo para pH tipo Ingold. En todos los experimentos se empleó NaOH 5N estéril.

El fermentador, con todos sus accesorios, se esterilizó en autoclave a 1.5 Kg/cm², durante 30' para cada corrida. En todos los casos se emplearon 5 l de medio de cultivo como volumen de operación, agitación de 500 rpm y un flujo de aire de 1 vvm (1 - volumen de aire/volumen de medio/minuto).

El inóculo empleado fue de 10% v/v, preparado en la forma descrita para los experimentos en matraz, con una edad de 12 horas e introducido al fermentador en condiciones asépticas.

Los venteos se hicieron burbujear en solución de alcohol y benzal.

Los parámetros variados fueron: pH, concentración de azúcar (S), y temperatura (°T); se evaluaron: azúcar residual (S_f), sólidos en suspensión (X), absorbancia (A) y, con los datos obtenidos, se calcularon: velocidad específica de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (t_d), rendimiento (Y_{x/a}) y productividad (P). Los rangos de variación de los parámetros fueron:

pH : 5.6, 5.9, 6.4, 7.0 y 8.0

S : 1 %, 3 %, 5 %, 7 % y 9 %

°T : 31°, 34°, 37°, 40°C

4. EXPERIMENTOS EN CULTIVO CONTINUO.

Tomando en cuenta el medio ambiente que rodea al microorganismo cuando es propagado en un cultivo por lote, se ve que dicho medio está en cambio constante, desde el principio hasta el final de una fermentación, lo que trae como consecuencia que só lo parte del ciclo de crecimiento sea productivo (la fase logarítmica en donde los factores ambientales son más favorables), originándose una serie de etapas "muertas" cuya duración afecta en forma inversamente proporcional a la productividad, ya que la velocidad de crecimiento es el resultado de una serie de --- reacciones bioquímicas y biofísicas interdependientes (35) que varían en cada etapa del cultivo.

Con el propósito de evitar lo anterior, Monod (1950), Herbert (1961) y Malek (1966), han planteado la forma de evitar -- las desventajas ya mencionadas a través de una variante operativa de un reactor batch, transformándolo en un reactor continuo mediante la adición constante de medio fresco a una velocidad -- de flujo " F " (l/hr.), para mantener el volumen fijo, retien--- rando el cultivo del fermentador a la misma velocidad con la -- cual se alimenta.

De acuerdo con Malek y Herbert, existen alrededor de 12 va riantes de la técnica del cultivo continuo. En el caso de es-- tos experimentos, la variante utilizada fue la de un sistema -- continuo abierto homogéneo de una sola etapa.

La operación continua se gobierna por 2 factores:

La Forma en la que los reactantes pasan a través del reactor -- (lo que depende del tipo de reactor y la forma de operación del mismo) y La Cinética de la reacción que tiene lugar en él (que depende del microorganismo empleado y el medio ambiente en el cual se desarrolla).

En un reactor de tanque agitado (como el usado en este trabajo), el tiempo de residencia (θ) ó espacio tiempo, se define como (32):

$$\theta = \frac{V}{F} \quad (18)$$

en donde:

θ = tiempo de residencia (Hr)

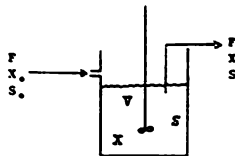
V = volumen de operación del reactor (l)

F = flujo de alimentación (l/Hr)

El inverso de la ecuación 19 es definido como el "espacio velocidad" o "velocidad de dilución del reactor" (D), e indica el número de recambios en volumen que tiene un reactor en la unidad de tiempo.

F I G U R A 3

REPRESENTACION DE UN CULTIVO CONTINUO



La figura anterior representa un reactor continuo agitado, con mezclado perfecto, en donde:

S_0 = concentración inicial de sustrato limitante (g/l)

X_0 = concentración de microorganismos en la alimentación (g/l)

V = volumen de operación del reactor (l)

X = concentración de microorganismos dentro del reactor (g/l)

El hecho de suponer que existe un sustrato limitante en el reactor implica que todos los demás, excepto S , están en exceso.

La gran ventaja del cultivo continuo es que permite mantener una población microbiana en un estado de crecimiento en el cual, en promedio, equivale a una fase logarítmica. Por ello, es válido aplicar la ecuación (3) para representar el crecimiento del cultivo; esto es:

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad (3)$$

Por otro lado, dichas células son lavadas con una velocidad de salida igual a DX :

$$DX = - \frac{dx}{dt} \quad (19)$$

Al hacer un balance en el reactor se tiene que:

$$\text{Acumulación} = \text{Crecimiento} - \text{Muerte} - \text{Salida} \quad (20)$$

y que matemáticamente implica:

$$\frac{dx}{dt} = \mu X - K X - D X \quad (21)$$

en donde " K " es una constante de muerte microbiana. Sin embargo, para un cultivo creciendo en fase logarítmica:

$$\mu \gg K \quad (22)$$

y, suponiendo estado estacionario:

$$\frac{dx}{dt} = 0 \quad (23)$$

la ecuación 21 se reduce a:

$$\mu X = D X \quad (24)$$

Lo que implica que:

$$\mu = D \quad (25)$$

Esto significa que, en cultivo continuo, la velocidad de crecimiento está dada por la velocidad de dilución (un parámetro biológico controlado por un parámetro hidráulico).

En forma similar, para el sustrato, la velocidad neta del cambio en concentración, se obtiene por el balance dado en la siguiente ecuación:

$$\text{Acumulación} = \text{Entrada} - \text{Salida} - \text{Consumo} \quad (26)$$

que matemáticamente es igual a:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F S_0}{V} - \frac{F S}{V} - \frac{\mu X}{Y_{x/s}} \quad (27)$$

o bien:

$$\frac{dS}{dt} = D S_0 - D S - \frac{\mu X}{Y_{x/s}} \quad (28)$$

Si en la ecuación (29) se substituye la (26), y se considera estado estacionario, se tiene:

$$\mu (S_0 - S) = \frac{\mu X}{Y_{x/s}} \quad (29)$$

que se reduce a:

$$X = Y_{x/s} (S_0 - S) \quad (30)$$

La ecuación (31) es la segunda ecuación básica para un cultivo continuo, y da la relación entre concentración celular y sustrato.

De acuerdo con la ecuación (26), entre mayor sea la velocidad de dilución, mayor será la velocidad de crecimiento; sin embargo, existen limitaciones de tipo biológico, y en particular, la capacidad de crecimiento del microorganismo tiene un límite, lo que implica que existe un valor de velocidad de dilución por arriba del cual el cultivo no crece más y la concentración de microorganismos tiende a bajar, lo que da lugar a las condiciones conocidas como "lavado" del sistema, que matemáticamente implica:

$$\mu X < D X \quad (31)$$

En el valor de "D", a partir del cual ocurre lo anterior, se denomina "Dc" (velocidad de dilución crítica), y matemáticamente está regido por la ecuación de Monod:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (10)$$

Si se substituye el valor dado por la ecuación 25, y considerando que:

$$D_c = \mu_{\max} \quad (32)$$

la ecuación de Monod queda:

$$D = \mu = D_c \frac{S}{K_s + S} \quad (33)$$

La validez de la ecuación anterior depende de la relación que existe entre concentración de sustrato en la cual la velocidad de crecimiento es la mitad de la velocidad máxima, lo que implica que es recomendable trabajar con valores de concentración de sustrato mayores que K_s . Esto es:

$$S \gg K_s \quad (34)$$

La ecuación que describe el cultivo en una forma más representativa, resulta al despejar "S" de la ecuación (33):

$$S = K_s \frac{D}{D_c - D} \quad (35)$$

y, substituyéndolo en la ecuación (30) queda:

$$X = Y_{x/s} \left(S_0 - K_s \frac{D}{D_c - D} \right) \quad (36)$$

Para evaluar la Productividad del cultivo, simplemente se considera la salida del fermentador, que es igual a:

$$P_c = D X \quad (37)$$

en donde "Pc" es la productividad evaluada en un cultivo continuo.

Un caso particular de la ecuación anterior permite conocer la situación que se tiene, cuando:

$$D = D_c = \mu_{\max}$$

$$X = Y_{x/s} S_0$$

y que, al aplicarse a (37), da la productividad máxima de un cultivo continuo:

$$P_c = Y_{x/s} \mu_{\max} S_0 \quad (38)$$

Con el objeto de demostrar la justificación planteada al principio, en cuanto a la diferencia entre el cultivo por lote y continuo se refiere, la comparación de la productividad obtenida en cada caso da la relación:

$$G = \frac{Y_{x/s} \mu_{\max} S_0}{\frac{Y_{x/s} S_0}{\frac{1}{\mu_{\max}} \ln \frac{K_1}{K_2} + T}} \quad (39)$$

que al simplificar queda:

$$G = \ln \frac{X_2}{X_1} + T \mu_{\max} \quad (40)$$

Lo anterior implica que, la Ganancia en productividad de - un cultivo continuo con respecto a un cultivo por lote es mayor, si:

- la concentración celular es alta ($X_2 \gg X_1$),
- la velocidad de crecimiento es alta, y,
- los tiempos del ciclo del cultivo por lote son grandes.

En la etapa experimental del cultivo continuo, se evaluó - el efecto y la correspondencia entre la velocidad de dilución y los parámetros mencionados en las ecuaciones: 26, 31, 36, 37, - 38, 39 y 41, en los rangos de velocidad de dilución comprendi-- dos entre 0.1 y 0.415 (μ_{\max}), midiendo, en cada caso: X, S, y D, en condiciones de estado estacionario, y calculando los paráme-- tros restantes.

5. RECUPERACION DEL PRODUCTO.

Esta parte del trabajo se realizó en dos etapas: una de -- ellas consistió en la centrifugación del mosto de las fermenta-- ciones, con el propósito de concentrarlo y poder así someterlo_ a la etapa de secado.

La concentración se llevó a cabo en una centrifuga Westfa-

lia para operación continua (Westfalia Separator mod. SA 1-02 W. Germany), que en sí es un clarificador de discos que opera cerca de 10,000 rpm y separa 2 fases en función de su peso (una ligera y otra pesada) y descarga la fase más pesada en forma intermitente, aunque la capacidad de la máquina depende de varios factores, como por ejemplo: viscosidad, temperatura, concentración y naturaleza de los sólidos y el grado de pureza de seado. En los experimentos, la capacidad osciló alrededor de 20 l/Hr, y todo el material se recirculó una vez, para mejorar la separación. La reducción obtenida en volumen fue de 80-90 % en relación al volumen inicial.

El producto, una vez concentrado, fue secado por medio de liofilización y, en algunos casos, secado en un horno de vacío.

Para la liofilización, las muestras concentradas se colocaron en matraces kitasato (llenos al 35% de su capacidad) para ser congeladas en una mezcla de acetona-hielo seco, formando una película lo más uniforme y delgada posible en las paredes y fondo de los matraces. Una vez bien congelados, se colocaron en una liofilizadora NBS-066 (New Brunswick Scientific - Co.), en la que se dejaron secar durante períodos de 3 a 4 días, a una temperatura de -20° a -30°C, y una presión entre 250 y 500 μ de mercurio.

Por desperfectos en la liofilizadora, fue necesario secar un lote de muestra en horno de vacío (Heracus RVT-500 W. Germany) a 50°-60°C por un período alrededor de 15 días.

6. EVALUACION NUTRICIONAL.

Para poder evaluar en forma razonable la proteína unicelular obtenida del sistema en estudio, se determinaron 3 aspectos importantes relativos a la calidad nutricional de la misma. Estos son:

- a) Análisis Proximal
- b) Digestibilidad *in vitro*
- c) Perfil de Aminoácidos

Análisis Proximal.

En este punto se obtiene, tanto la relación de los diversos componentes del material, como una idea clara de la eficiencia del enriquecimiento proteico del sustrato empleado por medio de la conversión microbiana.

Las determinaciones efectuadas fueron: Humedad, Ceniza Total, Fibra Cruda, Grasa, y Proteína Cruda, que se llevaron a cabo en el Depto. de Nutrición del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (I.N.I.P.).

Digestibilidad *in vitro*.

Se realizó con el propósito de medir la relación del nitrógeno disponible con respecto al nitrógeno total que contiene la biomasa, mediante la solubilización de la proteína contenida en la muestra por acción de la pepsina empleada.

El procedimiento consistió en colocar, por triplicado, 0.5 g de muestra de biomasa en polvo brevemente desengrasada (si-

guiendo el método de Soxhlet) y seca, en botellas para digestión de 8 onzas de capacidad, a cada una de las cuales se le agregó 150 ml de solución de pepsina (actividad 1:10000) al 0.2% en HCl 0.075 N preparada justo antes de emplearse, y precalentada a 42°-45°C. Las botellas se taparon y colocaron en una agitadora marca Fuji Works tipo T-52 (Fuji Works LTD, Japón), e incubadas durante 16 horas en una incubadora Lab Line, mod. 3597-8 (Lab Line USA). Transcurrido el tiempo mencionado, las muestras fueron filtradas a través de papel Whatman 1; al filtrado se le determinó % de proteína y se comparó con un blanco de la solución Pepsina-HCl según el método de A.O.A.C. (7.016 [9]).

Perfil de Aminoácidos.

Este análisis tiene por objeto evaluar la calidad de la proteína obtenida en relación a su contenido de aminoácidos, -- comparándola con los patrones establecidos, y determinar así la necesidad de suplementarla, en caso necesario.

Dicho aminograma se llevó a cabo en los laboratorios de Alimentos Balanceados de México, S.A. (ALBAMEX).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO.

El medio de cultivo diseñado para *Pseudomonas cariphilli*, y que fue empleado en todos los estudios cinéticos, tiene la composición que se muestra en la Tabla 14.

El valor de azúcar que se reporta en el medio es el resultado de la determinación por el método de Fenol-Sulfúrico; los otros métodos probados se descartaron por presentar poca reproducibilidad y gran variación (más de 100%, en algunos casos).

T A B L A 14
COMPOSICION DEL MEDIO DE
CULTICO EMPLEADO

Componente	g/g Azúcar
NH ₄ Cl	0.149
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0.066
pH	ajustado al valor requerido

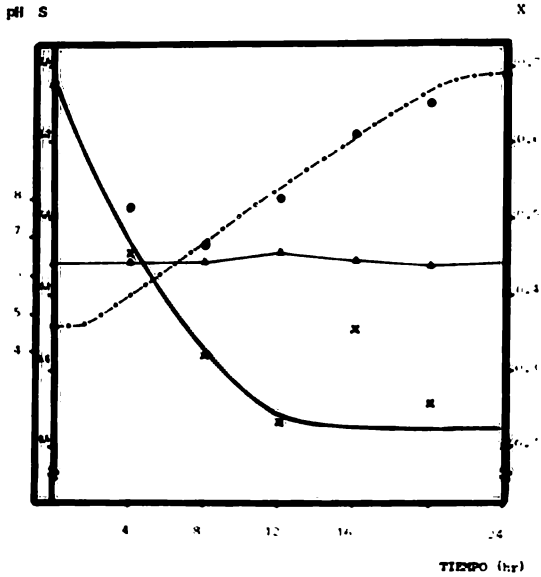
2. EXPERIMENTOS EN CULTIVO POR LOTE.

Curva de Crecimiento. Con este experimento fue posible conocer, en forma preliminar, el comportamiento del microorganismo, y poder determinar el tiempo en el cual se encuentra en Fase de Crecimiento Logarítmico. En la Gráfica 5 se muestran los resultados y se observa que la fase LOG se presenta entre las 4 y las 18 horas, razón por la cual se escogió, como edad de los inóculos empleados, 12 horas, considerando que a este tiempo el cultivo está en Fase LOG con la máxima densidad de células.

Aunque en este experimento no se evaluó el crecimiento por medio de absorción de luz, en la Gráfica 6 aparece el espectro de absorción del medio de cultivo estéril, y del medio de cultivo con microorganismo. De estas curvas, se eligió el valor de 640 nm como el más adecuado para medir el crecimiento por este método. El comportamiento anterior refleja el contenido de sólidos en suspensión que contiene la melaza y que dificultan seguir el crecimiento por medio de la determinación de peso seco, sin embargo, para poder calcular el valor de $Y_{x/s}$ en cada experimento, fue necesario correlacionar la absorbancia leída a 640 nm con el % de sólidos al final de cada fermentación. Se escogió esta etapa, con el propósito de asegurar el máximo contenido celular en los sólidos suspendidos.

Los resultados de los experimentos realizados para observar el efecto del pH se muestran en las Gráficas 5, 7, 8, 9, y 10; los resultados globales en la Gráfica 11, así como en la Ta-

GRAFICA 5



CINETICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO POR LOTE

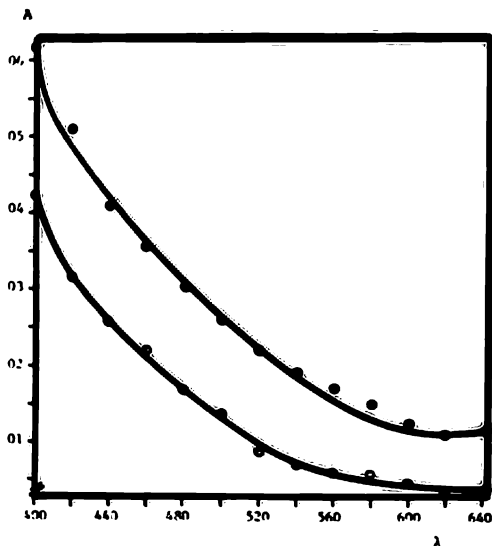
pH = 6.4

S = 1%

T = 37 °C

- ▲ : pH
- : S = Substrato
- : X = Células

GRAFICA 6



ESPECTRO DE ABSORCION DE MEDIO DE CULTIVO.

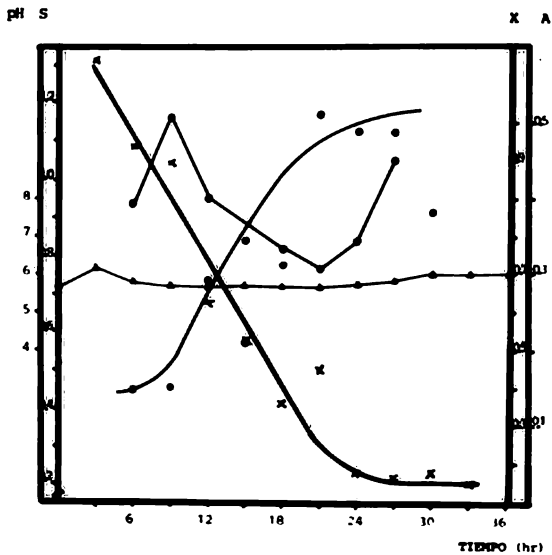
- Medio Estéril
- Medio con Microorganismo

bla 15.

El efecto de la concentración de azúcar en los parámetros_ de crecimiento, se presenta en las Gráficas 12, 13, 14 y 15; y en forma global, en la Gráfica 16 y en la Tabla 16.

De igual forma, el efecto de la temperatura aparece en las Gráficas 17, 18, 19 y 20; y global, en la Gráfica 21 y en la Tabla 17.

GRAFICA 7



CINETICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO POR LOTE

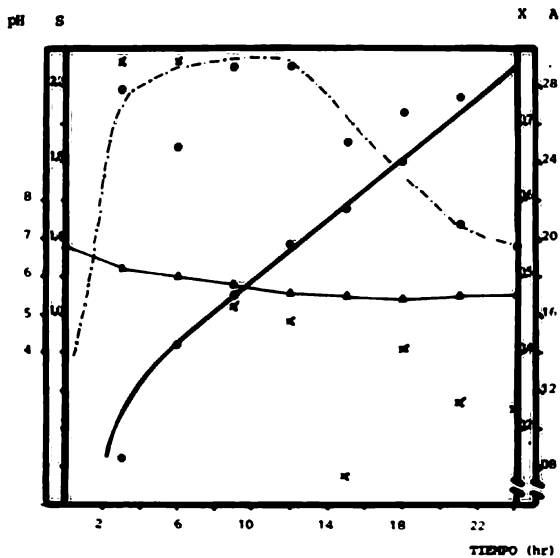
pH = 5.9

S = 1"

T = 37°C

- Δ : pH
- \times : S = Substrato
- \circ : X = Células
- \bullet : A = Absorbancia

GRAFICA 8



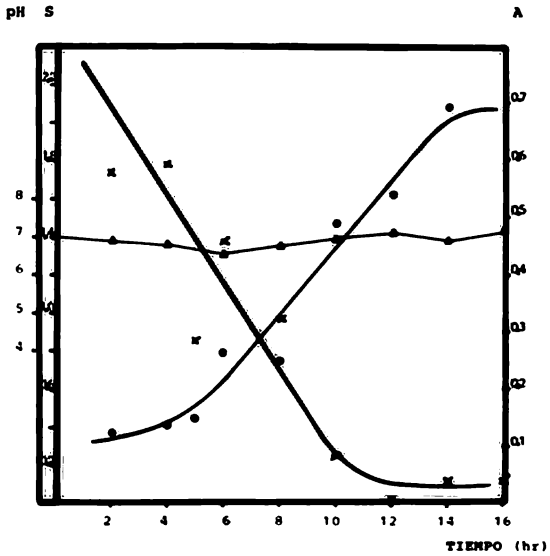
CINETICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO POR LOTE

pH = 5.6

S = 12

T = 37°C

GRAPICA 9



CINETICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO POR LOTE

pH = 7

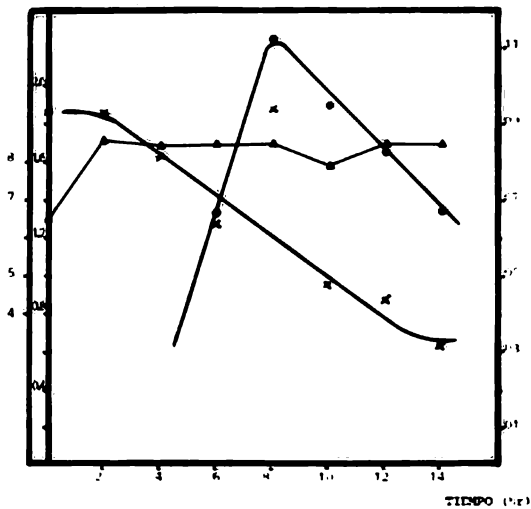
S = 12

*T = 37°C

GRAFICA 10

pH S

A



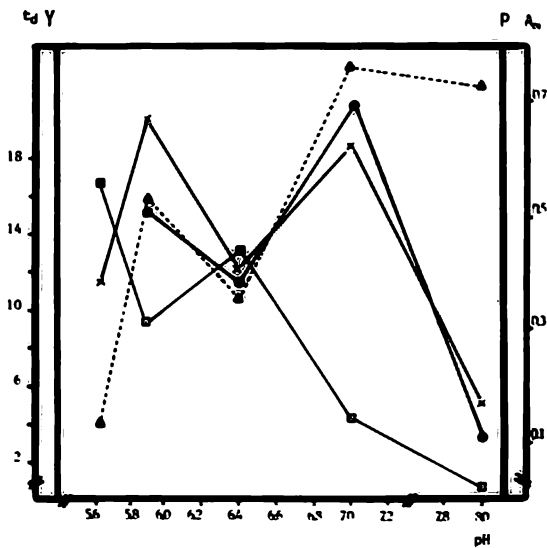
CINETICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO POR LOTE

pH = 8

S = 1%

T = 37°C

GRAFICA 11



RESULTADOS DE CINÉTICAS EN CULTIVO POR LOTE
VARIANDO pH

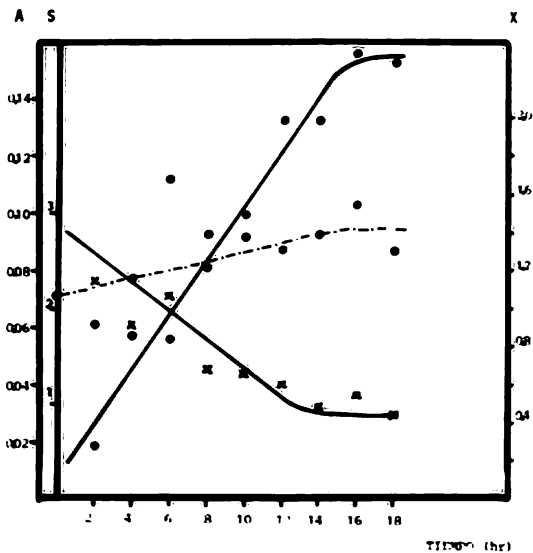
- : t_d = Tiempo de Duplicación
- × : Y = Rendimiento
- ▲ : P = Productividad
- : A = Absorbancia máxima

T A B L A 15

RESULTADOS DE CINÉTICAS EN CULTIVO POR
LOTE, VARIANDO pH

$Y_{x/s}$	S_0 (%)	μ (hr ⁻¹)	t_d (hr)	$A_{máx}$ λ_{640}	pH	p
0.23	1.53	0.0410	16.8	-	5.6	0.101
0.40	1.37	0.0730	9.45	0.5100	5.9	0.244
0.24	1.35	0.0520	13.29	0.2893	6.4	0.183
0.37	2.51	0.1577	4.39	0.6950	7.0	0.330
0.10	1.86	0.0680	0.79	0.1125	8.0	0.320

GRAFICA 12



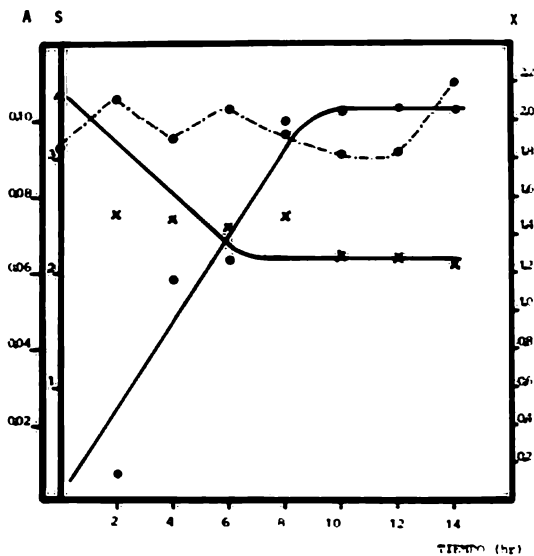
CINETICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO POR LOTE

pH = 6

S = 17

*T = 37°C

GRAFICA 13



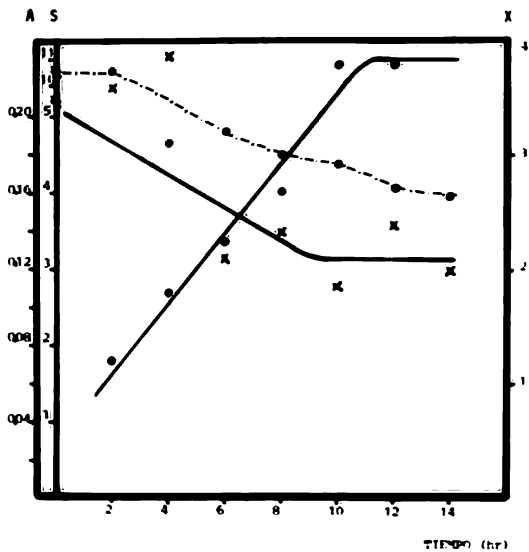
CINETICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO POR LOTE

pH = 7

S = 5%

T = 37°C

GRAFICA 14



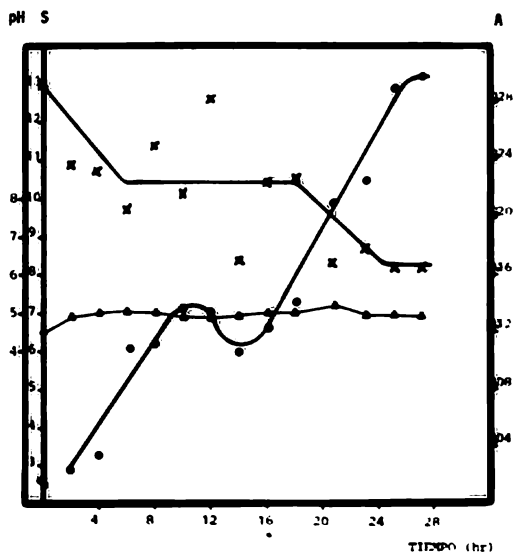
CINETICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO POR LOTE

pH = 7

S = 7%

T = 37°C

GRAFICA 15



CINETICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO POR LOTE

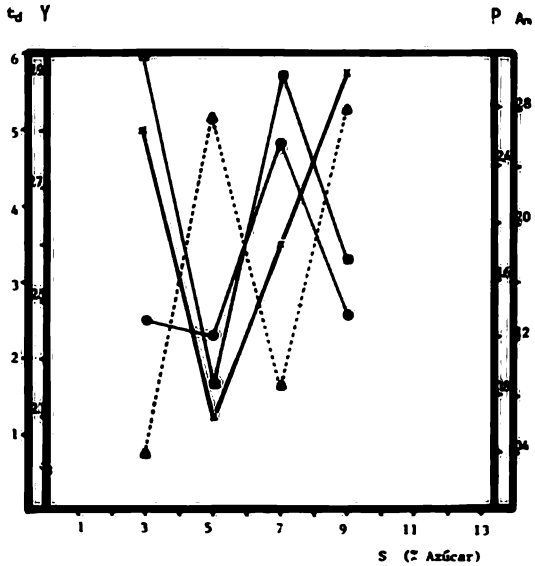
pH = 7

S = 92

T = 37°C

(*) Aumento de Agitación y Aereación

GRAFICA 16



RESULTADOS DE CINETICAS EN CULTIVO POR LOTE.
VARIANDO SUSTRATO

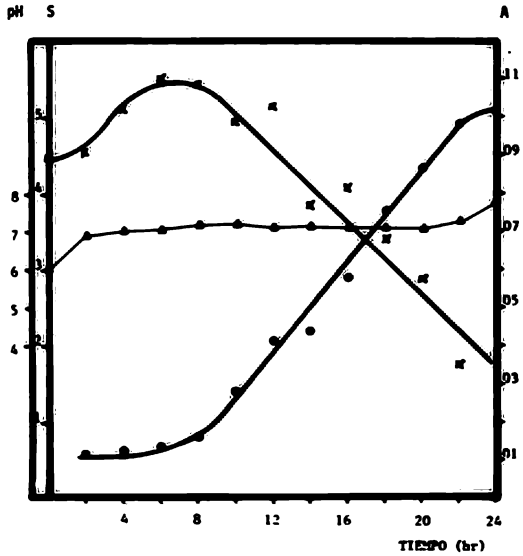
- : t_d = Tiempo de Duplicación
- × : Y = Rendimiento
- ▲ : P = Productividad
- : A_m = Absorbancia máxima

T A B L A 16

RESULTADOS DE CINÉTICAS EN CULTIVO POR
LOTE, VARIANDO S_0 .

γ μ/s	S_0 (%)	μ (h^{-1})	t_d (h)	A_{max} 1 640	S_0 teórica	p
0.28	3.08	0.1160	5.97	0.1325	3%	0.380
0.23	3.55	0.4150	1.67	0.1150	5%	1.286
0.26	5.08	0.1214	5.70	0.2575	7%	0.850
0.29	12.09	0.2190	3.30	0.1375	9%	2.800

GRAFICA 17



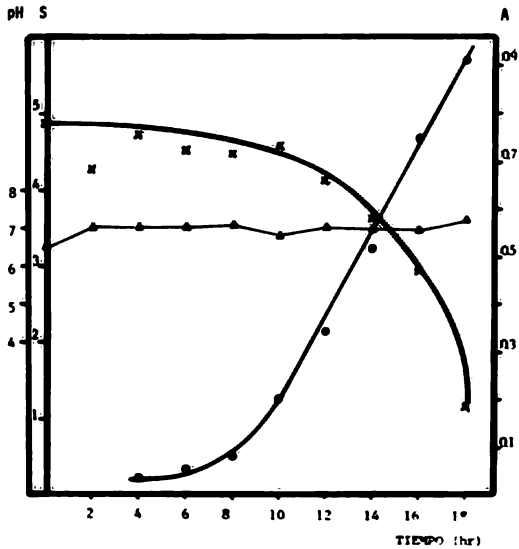
CINETICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO POR LOTE

pH = 7

S = 5%

T = 31°C

GRAFICA 18



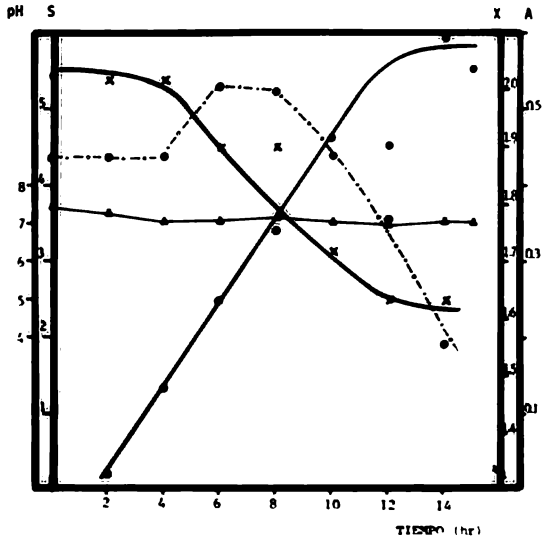
CINETICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO POR LOTE

pH = 7

S = 5%

T = 34°C

GRAFICA 19



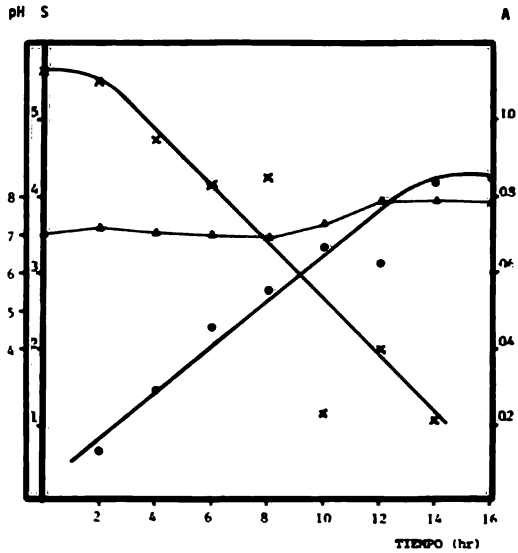
CINETICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO POR LOTE

pH = 7

S = 52

T = 37°C

GRAFICA 20



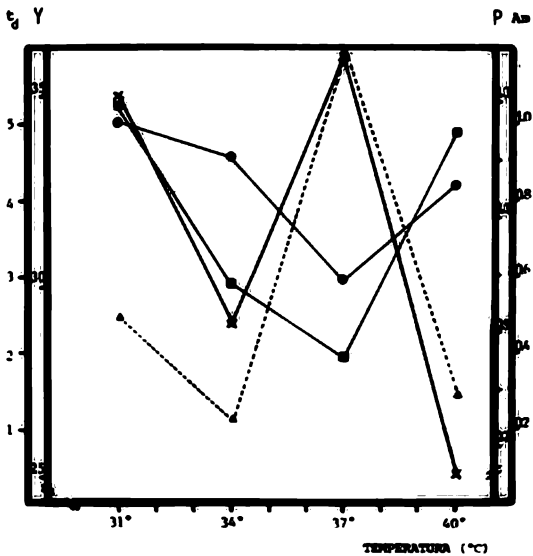
CINETICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO POR LOTE

pH = 7

S = 5%

T = 40°C

GRAPICA 21



RESULTADOS DE CINÉTICAS EN CULTIVO POR LOTE,
VARIANDO TEMPERATURA

- : t_d = Tiempo de duplicación
- × : Y = Rendimiento
- ▲ : P = Productividad
- : A_m = Absorbancia máxima

T A B L A 17

RESULTADOS DE CINÉTICAS EN CULTIVO POR
LOTE, VARIANDO °T

$Y_{x/s}$	S_0 (%)	μ (Hr ⁻¹)	t_d (Hr)	A_{max} λ 640	T (°C)	P
0.35	4.48	0.132	5.25	1.08	31°	0.93
0.29	4.88	0.236	2.93	0.91	34°	0.75
0.36	5.44	0.356	1.95	0.59	37°	1.38
0.25	5.64	0.141	4.89	0.84	40°	0.78

3. CALCULO DE LA CONSTANTE DE SATURACION.

Es posible obtener el valor de la constante de saturación (K_s), dado por la ecuación de Monod (ecuación 10), a partir de los experimentos realizados a $pH = 7$ y a $T = 37^\circ C$, con las diferentes concentraciones de sustrato empleadas, como se muestra en la siguiente tabla:

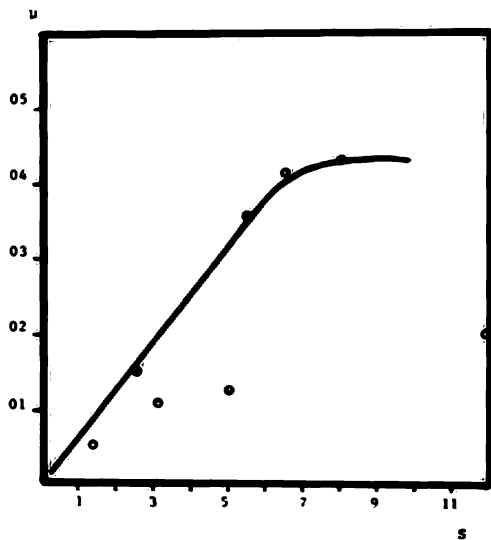
T A B L A 18

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO
EN LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

S (g)	μ (Hr ⁻¹)
1.35	0.0520
2.51	0.1370
3.08	0.1160
5.08	0.1214
5.44	0.3560
6.47	0.4150
12.99	0.2000

El comportamiento de estos datos aparece representado en la Gráfica 22.

GRAPICA 22



EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO EN
LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

$$K_s = 35 \text{ g/l}$$

4. EXPERIMENTOS EN CULTIVO CONTINUO.

Estos experimentos fueron realizados en las siguientes condiciones:

$$S_0 = 5 \text{ \%} \quad \text{pH} = 7 \quad *T = 37^\circ\text{C}$$

cuyos resultados se muestran en la siguiente tabla:

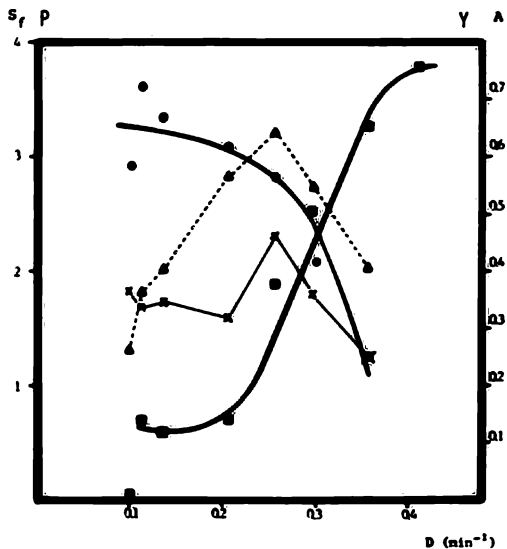
T A B L A 19

CULTIVO CONTINUO DE *Pseudomonas cariophilii*

D (Hr ⁻¹)	S ₀ (g/l)	S _F (g/l)	A λ 640 (10 ⁻¹)	X (g/l)	Y _{x/s}	P (DK) (g/DHr)
0.101	31.8	0.33	0.583	12.90	0.41	1.30
0.114	54.2	6.87	0.721	16.00	0.34	1.82
0.137	48.0	5.70	0.669	14.80	0.35	2.02
0.207	49.6	7.07	0.617	13.71	0.32	2.83
0.256	45.8	18.80	0.565	12.55	0.46	3.21
0.296	50.6	25.20	0.417	9.26	0.36	2.74
0.357	55.4	32.67	0.256	5.68	0.25	2.02
0.411	55.4	37.80	Lav6	-	-	-

En la Gráfica 23, aparecen algunos de los resultados de la Tabla 19.

GRAFICA 23



CINETICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO CONTINUO

pH = 7.0

S = 5 g

T = 37°C

- : S_f = Substrato residual (g)
- : A = Absorbancia, 640 nm (10^{-1})
- ▲: P = Productividad
- ×: Y = Rendimiento

5. EVALUACION NUTRICIONAL.

Los resultados del análisis bromatológico practicado a la biomasa obtenida en este estudio se muestran en la Tabla 24:

T A B L A 24

ANALISIS PROXIMAL DE
Pseudomonas carotophylli

Determinación	%
Humedad	6.0
Proteína	44.7 *
Grasa	6.6 *
Fibra cruda	0.75*
Cenizas	17.4 *

* Base seca

Los resultados de las pruebas de digestibilidad aparecen en la Tabla 25. Se comparó con un patrón de caseína, cuya digestibilidad *in vitro* es conocida.

T A B L A 25

RESULTADOS DE DIGESTIBILIDAD *in vitro*

Muestra	Digestibilidad (%)
<i>Pseudomonas cariohilli</i>	84
Caseína	90

Los resultados del Aminograma de la muestra de biomasa se presentan en la Tabla 26. Están relacionados tanto al 100% de muestra, como a la proteína expresada como 16 g de nitrógeno, en donde: * N Total = 5.94 (Kjeldhal).

T A B L A 26

AMINOGRAMA DE *Pseudomonas cariohilli*

Aminoácido	g/%	g / 16 g N *
Lisina	1.24	3.34
Histidina	0.52	1.40
Arginina	1.11	3.00
Acido Aspártico	2.28	6.15
Treonina	1.17	3.14
Serina	0.76	2.04
Acido Glutámico	3.35	9.03
Prolina	1.56	4.20
Glicina	1.46	3.92
Alanina	2.56	6.88
Valina	2.73	7.35
Metionina	0.71	1.90
Isoleucina	1.53	4.12
Leucina	2.60	7.01
Tirosina	1.39	3.75
Fenilalanina	1.31	3.52

DISCUSION Y CONCLUSIONES

DISCUSION Y CONCLUSIONES

1. MEDIO DE CULTIVO.

El medio utilizado en este estudio se caracteriza por su sencillez, ya que sólo requiere 2 sales adicionales y el ácido sulfúrico empleado en la clarificación. Sin embargo, los resultados obtenidos al evaluar crecimiento mediante los sólidos suspendidos, indican que existe una gran interferencia de material en suspensión, lo que sugiere la necesidad de hacer más intenso el tratamiento con ácido sulfúrico, o bien, adicionar una operación de filtración gruesa de la melaza después del tratamiento ácido.

El valor de longitud de onda seleccionado para evaluar el crecimiento mediante absorción de luz (640 nm), indica la zona de mínima absorción de la melaza que, aunque no es la región de máxima absorción del cultivo, sí es una longitud de onda donde la interferencia es mínima.

Como lo muestran las cinéticas realizadas, la medición del crecimiento como una función de la absorbancia es válida, siempre que se establezcan las correlaciones correspondientes a -- las determinaciones de peso seco. Es recomendable que dichas correlaciones sean calculadas al final de la Fase Logarítmica, que es cuando la mayor parte de los sólidos inorgánicos se solu

bilizaron y fueron sustituidos por sólidos orgánicos, representados por células.

En este renglón, es recomendable optimizar el diseño del medio de cultivo en forma experimental, tanto en cultivo por lote como en cultivo continuo, siendo este último la forma más rápida de llevarlo a cabo mediante el sistema de estímulo-respuesta recomendado por Mateles (37). A pesar de que esto no fue realizado, los valores de rendimiento calculados son cercanos al 100% teórico para carbohidratos ($Y = 0.5$), cuya utilización se lleva a cabo aeróbicamente (1). Esto pone de manifiesto que el medio se encuentra próximo al óptimo, hablando en términos de composición del mismo.

En cuanto al valor de 35 g/l para la constante de saturación K_s , dado por la ecuación de Monod, se concluye que es necesario trabajar con altas concentraciones de sustrato para tener velocidades de crecimiento cercanas al valor de u_{\max} . Las explicaciones al comportamiento anterior se pueden deber a varios factores, entre los que se pueden mencionar:

- a) Humphrey (28) reporta que se obtienen valores de K_s hasta 10 veces más altos cuando en el sistema existe inhibición por sustrato; presentan curvas similares a las reportadas en la Gráfica 22, calculadas con la ecuación:

$$\mu = \frac{u_{\max}}{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_i}} \quad (41)$$

K_i = constante de inhibición del sistema

- b) Se reportan valores anormalmente altos de K_s en casos en los que existen limitaciones de transferencia de masa, y en particular, resistencias de tipo difusional.
- c) Cuando el sustrato limitante es otro diferente al usado en la ecuación de Monod y que dé por consecuencia valores anormales en la constante de saturación.

De los 3 casos anteriores, el segundo se descarta al observar el comportamiento que muestra el cultivo en la Gráfica 15, y que indica en forma clara las condiciones en que la transferencia de masa limitaba al sistema, y cómo se cubrió la demanda de oxígeno al aumentar los niveles de agitación y aereación.

Se considera más probable que los valores altos de la constante de saturación sean consecuencia de una inhibición o bien de otro nutriente limitante. La primera de estas 2 opciones no es muy apoyada por el hecho de que el sistema en cultivo continuo se apega más a la ecuación de Monod, por lo tanto, sólo queda la tercera posibilidad (c), que puede refutarse al optimizar el medio de cultivo.

2. EXPERIMENTOS EN CULTIVO POR LOTE.

Curva de Crecimiento. De la Gráfica 5 se ve claramente que el ciclo de fermentación, para esas condiciones es de cerca de 20 hr., y que el cultivo se encuentra en la Fase Logarítmica entre las 4 y 20 hr., razón por la cual se seleccionó un

tiempo de 12 hr como la edad más adecuada de los inóculos.

Efecto del pH. Tanto en la Tabla 15 como en las Gráficas 5, 7, 8, 9, 10 y 11, se observa que las mejores velocidades de crecimiento, los tiempos de duplicación más cortos, y las mejores productividades, se obtienen bajo condiciones de pH 7 y pH 8. Sin embargo, el mejor rendimiento se obtuvo a un pH de 7 - además de que, mantener la fermentación con pH de 8 incrementa en forma logarítmica, el consumo de álcali necesario para mantenerlo en ese valor (sobre todo por el hecho de que el microorganismo por sí mismo acidifica el medio). Todo lo anterior, hace considerar al pH de 7 como el más adecuado para lograr resultados óptimos con esta técnica.

Efecto de Sustrato. En las Gráficas 12, 13, 14, 15 y 16, así como en la Tabla 16, se muestra el efecto que la concentración de sustrato tuvo sobre los parámetros cinéticos (velocidad específica de crecimiento, tiempo de duplicación, rendimiento celular y productividad) del microorganismo. En general, - se observa que la velocidad de crecimiento del microorganismo aumentó, en comparación con los experimentos desarrollados para pH, aunque el rendimiento celular varió poco. Es importante señalar que la máxima velocidad de crecimiento de esta serie de experimentos se obtuvo con una concentración de azúcar de 5% (50 g/l que equivalen a un valor de 1.43 para la constante de saturación), lo que permitió seleccionarla como la concentración más adecuada para trabajar, a pesar de que se observó, de la Tabla 16, que el máximo valor de productividad se lo

gró con 98 de sustrato, con la desventaja de que la velocidad de crecimiento es sólo la mitad de la velocidad máxima, además de que la demanda de oxígeno aumentó, lo que obligó a elevar los niveles de agitación y aereación al doble (de 0.5 a 1 vvm; y, de 400 a 500 rpm, respectivamente). Este aumento dió lugar a la curva diáxica que se muestra en la Gráfica 15, que fue generada por limitación de oxígeno.

Efecto de Temperatura. La influencia que este parámetro tuvo sobre el crecimiento se muestra en las Gráficas 17, 18, 19, 20 y 21, y en la Tabla 17. Se observa que, el mejor rendimiento, la mayor velocidad de crecimiento y por consecuencia, la mejor productividad, se obtuvieron a 37°C, por lo que se leccionó como la temperatura de trabajo más adecuada.

3. CULTIVO CONTINUO.

En el cultivo continuo desarrollado se observa, en general, un aumento en productividad de 2½ veces, y una mejoría 1½ veces en los rendimientos, ambos con respecto al mejor dato obtenido en cultivo por lote.

Aunque el cultivo continuo se comportó semejante a lo encontrado por otros autores, (3), la velocidad de dilución crítica (D_c) del cultivo se empieza a manifestar desde valores superiores a velocidades de dilución de 0.21 (dato que equivale a la mitad de la velocidad máxima).

Lo anterior, básicamente se explica en términos de la ---

ecuación de Monod: si de la Tabla 19 se toma el valor de la velocidad de crecimiento en 0.256 y se compara con el obtenido - mediante la ecuación 10...

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \cdot \frac{S}{K_s + S}$$

$$\left. \begin{array}{l} K_s = 35.0 \text{ g/l} \\ S = 18.8 \text{ g/l} \end{array} \right\} \rightarrow \mu = 0.35 \mu_{\text{máx}}$$

Esto implica que la velocidad real es superior a la teórica, y que, para propósitos de elevar la productividad, es factible aumentar la concentración de sustrato a valores en los - que μ tienda a $\mu_{\text{máx}}$ y que lógicamente, permitirán tener valores de velocidad de dilución cercanos a 0.4 Hr^{-1} , aumentando - en un 50%, la productividad del sistema, haciéndolo por ende, - susceptible de escalamiento a nivel industrial, inclusive.

4. EVALUACION NUTRICIONAL.

En este aspecto, aunque los análisis revelan un porcentaje de proteínas más bajo que lo reportado para otras bacterias (60 %) como *Micrococcus* ó *Hydrogenomonas* (45), se considera razonable, - sobre todo al pensar que es casi seguro que va acompañada de impurezas inorgánicas de la melaza, como lo demuestra el alto contenido de cenizas.

Como contraparte, la biomasa de *Pseudomonas carioiphilli* posee

una digestibilidad no mucho menor a la de la caseína: 84 y 90% respectivamente, lo cual indica que tiene una fragilidad muy alta y por lo tanto, un valor nutricional potencialmente elevado.

Del perfil de aminoácidos realizado cuyos datos aparecen en la Tabla 26, se observa que, en primer lugar, el contenido de proteína es bajo y por ende, el porcentaje de aminoácidos. En segundo lugar, es importante hacer notar la baja concentración de lisina, aminoácido esencial, que suele estar presente en cantidades del orden de 8 g, cuando se trata de biomasa. Por otra parte, en cuanto a aminoácidos azufrados concierne -- (metionina, cisteína y cistina), se espera que aparezcan en baja concentración —como el 1.9% de metionina que se reporta en el análisis— por ser escasos en las muestras de biomasa. (Cistina, triptófano y cisteína no aparecen debido a que no se realizaron tales determinaciones).

A pesar de que es baja la concentración de aminoácidos de la biomasa obtenida (3.34 g de lisina), se considera que en general no es malo, pues la muestra contiene residuos de sustrato además de las impurezas inorgánicas de la melaza que se mencionaron con anterioridad. En base al aminograma, es importante mencionar la conveniencia de usar la biomasa de *Pseudomonas cariophilii* como complemento alimenticio de las raciones empleadas hasta ahora, siempre y cuando se realicen algunas pruebas para evaluar la toxicidad y el valor biológico de la biomasa en cuestión.

5. CONCLUSIONES GENERALES.

En base a los resultados obtenidos se considera que, si el medio se optimiza, es factible que el proceso —en la forma como se ha diseñado— entre sin problemas, bajo positiva consideración económica. (Un proceso con productividad de más de 5 g/Hr es prometedor, en términos económicos).

Es importante señalar que hay que desarrollar trabajo en el sentido de reducir el costo de recuperación del producto, —mediante la sustitución por ejemplo, del paso de centrifugación por una floculación, para concentrar aún más la biomasa y hacer económico el secado.

La producción de proteína mediante el crecimiento de organismos unicelulares es una solución sugerida para satisfacer las necesidades nutricionales de gran parte de la población mundial.

El arribo a la situación actual en la industria de fermentaciones no ha sido de ninguna manera fortuito, sino que ha involucrado una gran cantidad de esfuerzo y capital, y tal como ha sido puntualizado por Lindell y Laiho (1976), "la investigación en fermentaciones continúa, a un paso acelerado, con la esperanza que el trabajo se vea capitalizado en nuevos productos y mayores beneficios y ... estos esfuerzos resultan en ocasiones fructíferos" (23).

Es importante enfrentar la propaganda que se hace en contra de las proteínas unicelulares pues además, algunos produc-

tores de carne lo hacen para promover sus productos para animales alimentados sólo con alimentos 'naturales'. En realidad, el tamaño del mercado de alimentos lo determina el precio. -- Mientras continúa creciendo la demanda para proteína de alimentación, el aumento de los suplementos de pescado, soya y otras fuentes proteicas, obligarán a los productores de proteína unicelular a disminuir sus precios, si quieren competencia. Para que la P.U. sea competitiva, debe ser valuada a un mismo precio que el pescado y la soya. Así, en vez de aumentar la demanda, la presión competitiva de tales fuentes hará que los precios permanezcan a un nivel relativamente bajo --y esto lo tendrá que aceptar la proteína unicelular--.

Si los estudios de alimentación en animales de granja --- arrojan resultados satisfactorios, y no se observan indicios de efectos deletéreos en los diversos estudios con ratas, entonces queda poca duda en cuanto a la seguridad del producto para animales y humanos.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. ABBOTT B.J. & A. CLAMEN.
"The Relationship of Substrate, Growth Rate & Maintenance Coefficient to SCP Production". Biotech. & Bioeng. XV,117:127 (1973).
2. ABBOTT J.C.
"Economics of SCP in relation to World Protein Supplies", en "SCP" p. 25-45 (Davis P., ed.). Ac. Press, Italy (1973).
3. AIBA S. et al.
"Comparison Between Batch & Continuous Cultivations".- Biochemical Engineering, Ac. Press, USA (1973).
4. A.O.A.C.
"Official Methods of Analysis". 11th ed. (1970).
5. BANCO DE MEXICO.
"La Industria Azucarera de México". Romos I,II (1953).
6. BERGEY DAVID H.
"Manual of Determinative Bacteriology". Williams & Wilkins Co. 8th ed. p. 228-229 (1975).
7. BRIDSON E.Y. & A. BECKER.
"Design & Formulation of Microbial Culture Media". Methods in Microbiology, vol. III p. 229-292 (1973).
8. CHEN, & ENG. NEWS.
"SCP Pilot Plant Unit Starts Up". Chem. & Eng. News, -- LVI,20:20 (1978).
9. COMISION NACIONAL DE LA INDUSTRIA AZUCARERA.
"Estadística Azucarera". Unión de Productores de Azúcar. (1979).
10. CONACYT.
"P.U.: ¿Una Respuesta al Problema de la Alimentación?" Información Científica y Tecnológica I,3:5-7 (1979).
11. COMAN S.T. & K.J. STEEL'S.
"Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Médica" CECSA, 2^a ed. p.23-138 ((1979).

12. DAVIS & MIGNOLI.
"Medio Davis sin Citrato. J.Bact. (1950).
13. DAVIS JOHN C.
"A Pause Hits Plans for Protein from H.C.". Chem. Eng.-
XXVIII,26:87-89 (1975).
14. DAVIS P.
"Nutritional Evaluation of SCP", en "SCP" p.73 (Davis P.
ed.) Ac. Press, Italy (1973).
15. DE GROOT A.P.
"Minimum Tests Necessary to Evaluate the Nutritive Qua-
lity of SCP", en "SCP" p.75-92 (Davis P. ed.) Ac. Press
Italy (1973).
16. DUBOIS M. et al.
"Colorimetric Method for Determination of Sugars & Rela-
ted Substances". Anal.Chem. XXVIII,3: (1956).
17. EMERY A.N. & A.J. BAKER.
"Processing of Microbial Protein for Food Use". Chem. -
Eng. 322:506-509 (Jul. 1977).
18. FLORES T. & S. MENDO.
"Algunas Consideraciones sobre la Utilización de Tuna -
para Producción de P.U." Tesis Profesional ENCB del --
IPN (1981).
19. FOOD ENG.INT'L.
"Advantages for SCP for Animal Feed". Food Eng.Int'l -
III,11:48-50 (Nov. 1976).
20. GADEN E.L. Jr.
"Substrates for SCP Production", en "SCP" p.47-60 (Da-
vis P. ed.) Ac. Press, Italy (1973).
21. GANZIN M.
"Considerations of SCP as a Protein Source", en "SCP" -
p.3-6 (Davis P. ed.) Ac. Press, Italy (1973).
22. GOMEZ S.F.
"Industrialización en México". LANFI V,2:2-5 (1979).
23. GONZALEZ VALDES A.
"Aspectos Relevantes en el Diseño de Plantas de Fermen-
tación". Universidad de Waterloo (1980).
24. HAWK et al.
"Fermentation". Biochem. et Biophys. Acta, XVII,81:55 -
(1975).

25. HERBERT D. et al.
"The Continuous Culture of Bacteria: A Theoretical & Experimental Study". J.Gen.Microbiol. XIV,8:601-622 --- (1956).
26. HERBERT D.
"A Theoretical Analysis of Continuous Culture Systems". Society of Chem.Ind.Monograph 12, p.21-53 London (1961).
27. HOGERHEIDE J.C.
"Proposed Guidelines for Testing of SCP Destined as Major Source for Animal Feeds: Standards of Identity", - on "SCP" p.61-71 (Davis P. ed.) Ac. Press, Italy (1973).
28. HUMPHREY A.E.
"Fermentation Technology". Chem.Eng.Progress, p.85-91 - (May 1977).
29. KIHMBERG R.
"The Microbe as Source of Food". Ann.Rev.Microbiol. --- XXVI:427-466 (1972).
30. LIM H.C. & G.T.TSAO.
"SCP Production on C Compounds". AIChE J. XXIV,3:406--417 (May 1978).
31. LEVENSPIEL O.
"Chemical Reaction Engineering". J. Wiley & Sons, Ac. - Press (1972).
32. LITCHFIELD J.H.
"SCP". Food Tech. XXXV,5:175-179 (May 1977).
33. LOPEZ SOTO H.
"Ensayos de Purificación de Melazas". Tesis Profesional ENCB-IPN (1964).
34. MAC LAREN D.D.
"SCP". Chem.Tech. V,10:594-597 (1975).
35. MALEK I.
"Theoretical & Methodological Basis of Continuous Culture". Ac. Press (1966).
36. HALLETTE M.F.
"Evaluation of Growth by Physical & Chemical Means". Methods in Microbiology, vol. I p.521-565 (Calam ed.) -- (1969).

37. MATELES R.I. & E. BATTAT.
"Continuous Culture Used for Media Optimization". Appl. Microbiol. XXVIII,6:901-905 (Dec. 1974).
38. METCALF & EDDY, Inc.
"Wastewater Engineering: Collection, Treatment, Disposal". McGraw-Hill Book Co. (1972).
39. MILLER G.L.
"Use of DNS Reagent for Determination of Reducing Sugar" Anal.Chem. 31:5 (1950).
40. MOGREN & HÅKAN.
"SCP from Methanol: The Nororoitein Process". Process -- Biochem. p.2-7 (March 1979).
41. MONOD J.
"The Growth of Bacterial Cultures". Ann.Rev.Microbiol.- 3,371-349 (1949).
42. MONOD J.
"La Technique de Culture Continue. Théorie et Applications". Annales de L'Institut Pasteur LXXIX,4:390-410 (1950).
43. NICOL B.
"Recent Development in the Status of Int'l Food & Nutr." on "SCP" p.7-24 (Davis P. ed.) Ac. Press, Italy (1973).
44. O'SULLIVAN D.A.
"European Producers Boost SCP". Chem.Eng. News LVI,38:12-13 London (1978).
45. PAREDES O.
"Alimentos Baratos a Partir de Microbios". Ciencia y Desarrollo II,10:49-54 (1976).
46. PEPPLER H.J.
"Yeast Technology", en "Microbial Technology" Cap.6 --- (Peppler H.J. ed.) Universal Foods Corp. USA (1967).
47. PROTEIN ADVISORY GROUP OF THE UNITED NATIONS.
Boletín VI,2:1-12 (Jun. 1976).
48. QUINTERO R. & POWERS.
"La Producción y Demanda de Proteína en México: Papel de los Procesos de PU". Rev.Soc.Ciém. XX,1:5-12 (1976).
49. RATLEDGE C.
"The Economics of SCP Production". Chem. & Ind. 21:918-920 (Nov. 1975).

50. ROLZ C.
"Utilization of Cane & Coffee By-Products as Microbial Protein Source", en "SCP" p.51-68 (Davis P. ed.) Ac. Press, Italy (1973).
51. S.A.R.H.
"Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los - Estados Unidos Mexicanos". SARH (1978).
52. SHACKLADY C.A.
"Response of Livestock & Poultry to SCP" en "SCP" p.115 -127 (Davis P. ed.) Ac. Press, Italy (1973).
53. SOLOMONS G.L.
"Materials & Methods in Fermentation". Ac. Press (1970).
54. S.P.P.
"Anuario de los Estados Unidos Mexicanos 1975-1976", Cap. 9 (1979).
55. S.P.P.
"Anuario de los Estados Unidos Mexicanos 1977-1978", Cap. 4 (1980).
56. STONE H. & J. SIDEL.
"The Use of SCP in Food", en "SCP" p.147-160 (Davis P.-ed.) Ac. Press, Italy (1973).
57. TAYLOR et al.
"Evaluation of SCP's for Non-ruminants", en "SCP" p.179-186 (Davis P. ed.) Ac. Press, Italy (1973).
58. TING S.
"Rapid Colorimetric Method for Simultaneous Determination of Total Reducing Sugars & Fructose in Citrus Juices". Agr. & Food Chem. IV,3:263-265 (March 1956).
59. TRAUBERNAN L. (ed.)
"Planning Ahead for Low Cost Protein". Food Eng. XLVI,1: 70-72 (1974).
60. WALDROUP P.W.
"The Future of Petroleum-Derived Sources for Livestock" p.34-39 University of Arkansas, USA (1977).
61. WANG D.I.C. et al.
"Protein from Petroleum". ChemEng. 26:32 (1968).
62. MATTS H.
"SCP: A New Source of Food from B.C. Fermentation". -- Chem. & Ind. 13:537-540 (Jul 1976).

63. WEINSHANK D.J. & J.C. GARVER.
"Theory & Design of Aerobic Fermentation", en "Microbial
Technology", Cap. 4 (Peppler H.J. ed.) Universal Foods
Corp. USA (1967).
64. YAMADA K.
"Recent Developments in Fermentation in Japan". Biotech
Bioeng. XIX,3:87-89 (1977).