



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

OBTENCION DE BIOMASA (Aspergillus niger) USANDO
COMO SUSTRATO CAMOTE (Ipomoea batatas)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
JOSE RAUL FLORES FLETES

ENEP - ZARAGOZA U N A M

JUNIO 1985



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.

I N D I C E

			<u>Página</u>
CAPITULO	I	INTRODUCCION	1
CAPITULO	II	FUNDAMENTACION DEL TEMA	4
CAPITULO	III	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
CAPITULO	IV	OBJETIVOS E HIPOTESIS	27
CAPITULO	V	DESARROLLO EXPERIMENTAL	29
CAPITULO	VI	MATERIALES Y METODOS	36
CAPITULO	VII	RESULTADOS Y DISCUSION	68
CAPITULO	VIII	CONCLUSIONES	117
CAPITULO	IX	BIBLIOGRAFIA	121

I. INTRODUCCION

La imaginación, talento, empuje y creatividad del hombre no conoce límite, menos aún, cuando se trata de solucionar alguna cuestión que amenace su confort o existencia. Esto se ha comprobado a lo largo de su devenir histórico, siendo tiempo de que la humanidad vuelva a ocupar sus capacidades y responda al reto actual.

La escasez endémica de proteínas; la reducción en la captura de algunas especies pesqueras; la alta tasa de crecimiento demográfico; la inflación y los incrementos en los precios de las fuentes tradicionales de proteínas, tanto para consumo humano como animal, han desembocado en crisis y tensiones mundiales. De ésta forma, investigadores de varios países en cooperación con organismos internacionales, (FAO/OMS), están considerando estas situaciones, encontrándose en camino de buscar y ofrecer fuentes alternas de proteínas a las tradicionales.

Como acota Kihlberg (20): Emil Fischer, gran químico alemán, expresó en 1907 unas palabras que en su tiempo sonaron como pertenecientes a la ficción científica, fueron:

"Durante los últimos 50 años, se ha acostumbrado, tanto a los excelentes resultados producidos por la industria química, que la consideran capaz de todo y de esta manera se piensa en las proteínas sintéticas como el alimento del futuro común y barato, además.

Este deseo se ilustró en papel bajo el título "Nutrientes del carbón", en una espléndida pintura que enseñaba la conversión del carbón en varios platillos muy deliciosos, esto en un restaurant muy elegante conectado a una mina de este mineral. Desgraciadamente el pensamiento soberbio de los quí

micos no tolera estas expectativas".

Si en ese tiempo tales palabras sonaban a fantasía pura, en la actualidad podemos decir que la predicción se cumplió, no siendo la Química quien dió la respuesta, sino que ésta --partió del campo microbiológico, especialmente en su rama industrial.

En la actualidad, existe un gran número de microbiólogos que no vacilarían en dibujar una mina de carbón o una refinería conectadas a un restaurant por medio de una combinación de tecnologías alimentarias y fermentativas. Los problemas de ingeniería relacionados con la realización de este proyecto han sido resueltos de manera satisfactoria al describirse e implementarse procesos industriales que permiten cultivar microorganismos en gran escala, usando como sustratos: petróleo y derivados, gas natural, materias celulósicas, desechos agrícolas y otros. Existen todavía, problemas a discutir de tipo sanitario antes de usar esta fuente como alimento humano; pero se cumple un sueño: alimentos a partir del carbono.

Esta búsqueda por proteínas no convencionales de ninguna manera constituye un palo de ciego, Gray (11) y un reporte publicado en WHO Chronicle (47), hacen un estudio de la situación y sobre todo en el primero, se llega a la conclusión de que en un futuro no lejano, la Tierra, a pesar de los avances en la ciencia agrícola, habrá llegado a su límite agrícola máximo, siendo incapaz entonces de mantener a su población. A la escasez artificial, producido de la especulación y los intereses políticos, se sumará una terriblemente, real, debido al agotamiento de los suelos. Es por ésto que una de las soluciones presentadas para esta situación es la producción de proteínas pro microorganismos unicelulares a los que se deno-

mina PU. (proteína unicelular) o SCP (single cell protein).

Aunque inconscientemente, el hombre ingiere proteínas de origen microbiológico desde tiempos inmemoriales al ingerir - consumir vino, vinagre, yogurt, salchichas, kefir, queso, levadura, etc. Los intentos de aprovechamiento racional y consciente de PU, comenzaron a principios de siglo cuando los alemanes en la I guerra mundial llegaron a producir hasta 15000-toneladas anuales de ella, repitiendo la experiencia en la II guerra mundial, con similar éxito. Los que retomaron la investigación de este problema, en época posterior y por casualidad fueron los petroleros; quienes al experimentar con microorganismos para eliminar la parafina y el azufre del petróleo crudo, notaron que obtenían un producto que al ser analizado le encontraron más del 50% de proteína de alta calidad, - que además podía ser aprovechado para incorporarlo en la dieta de animales y/o humanos. A partir de entonces, se derivan las demás investigaciones en este campo, ampliando éstas hacia la utilización de otro tipo de sustratos. (11, (18), (20), (23), (32).

II. FUNDAMENTACION

Proteína unicelular (PU) o single cell protein (SCP), es un término acuñado por el Dr. Wilson del Massachusetts Institute of Technology (MIT), (20), que se usa para designar un concentrado proteínico obtenido a partir de microorganismos unicelulares (levaduras, hongos, algas y bacterias), los cuales pueden ser cultivados en medios relativamente abundantes y baratos, como: aguas negras, residuos del petróleo, gas natural, melazas, celulosa, desechos amiláceos y muchos otros más. Este término tiene un cierto valor psicológico, ya que al cubrir el origen de las proteínas, evitan aversiones y reticencias que podrían surgir por este concepto si dijésemos: proteína fúngica, proteína bacteriana, etc.

Son muchas cualidades que posee la PU, que la hacen ser un interesante objeto de investigación, produciéndose con mucho éxito en varios países. Entonces la PU nos ofrece, en resumen de lo expuesto por: Kihlberg (20), de la Torre (45), -- Luiselli (23), Fraser (10), Kharatyan (18), Perlman (32), y -- Humphrey(16), lo siguiente:

- a). Los microorganismos pueden ser modificados fácilmente en su genética. Las mutaciones, inducidas por mé todos físicos o químicos y bajo un programa de scree ning, darán variantes con las características deseadas, por ejem.: mayor velocidad de crecimiento, so --brevivir a temperaturas altas, deficiencias en la ar quitectura de la pared celular, modificación enzimática para incidir en la composición de aminoácidos -- y tener alguno que nos interese de manera especial.
- b). Los microorganismos poseen un tiempo de generación -- muy corto, que se refleja en un rápido incremento de la masa superior a cualquier otro organismo, como -- vemos en las tablas I y II.
- c). El contenido de proteínas de los microorganismos es -- alto, como vemos en la tabla III, aún en peso seco y haciendo la corrección del nitrógeno aportado por o -- tros componentes celulares nitrogenados.

- d). la producción de PU puede basarse en materias primas baratas y fácilmente asequibles en el área donde se piense establecer la industria, además podemos aseverar un abasto prolongado y abundante.

* screening: pruebas de selección.

TIEMPO DE DUPLICACION DE MICROORGANISMOS (20)

Tabla I

Microorganismos	Tiempo de duplicación. (horas)
bacterias	0.5--2
levaduras	1--3
hongos	2--6
algas	4--12

TIEMPO DE DUPLICACION DE VARIOS ORGANISMOS (10)

Tabla II

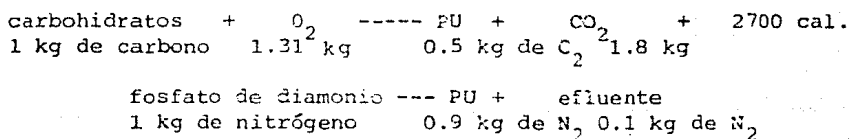
organismos	Tiempo de duplicación.
bacterias y levaduras	10--120 minutos
algas y hongos	2--6 horas
alfalfa	1--2 semanas
pollos	2--4 semanas
porcinos	4--6 semanas
bovinos	1--2 meses

CONTENIDO DE PROTEINAS DE VARIOS ORGANISMOS (18), (23)

Tabla III

Organismos	sustrato	%nitrógeno	%proteína cruda
bacterias	metanol	---	80
"	metano	---	60
levaduras	parafinas	---	60
"	Kerosinas	---	69
"	etanol	---	54
algas	CO ₂	---	45-60
hongos	carbohidratos	---	35-60
harina de pescado	---	---	60-65
harina de soya	---	---	50-45
leche	---	3.5-4.0	22-25
carne	---	13-14.4	81-90
huevo	---	5.6	35
arroz	---	1.2-1.4	7.5-9.0
harina de trigo	---	1.6-2.2	9.8-13.5
maíz	---	1.1-1.5	7.0-9.4

- e). El cultivo contínuo puede ser un proceso a seguir, - lo cual hace independiente de cambios climáticos e - intensidad lumínica a la producción de PU, además se requiere de un área relativamente pequeña en comparación con la que se necesitaría para producir una cantidad idual de proteína convencional. El problema - de basura es mínimo, en comparación con otros procesos de alimentos.
- f). Aunque el personal requerido necesita tener un grado de estudios técnicos, éste se emplea en corto número, ejem: para producir 1.2 millones de toneladas de pescado en la INDIA se necesitan de 1 millón de personas, mientras que la petrolera ASSAN podría proporcionar la misma cantidad de PU con 100 técnicos.
- g). El costo de la PU es semejante o menor que el de la contenida en otros alimentos, tabla IV, claro que -- esto depende del microorganismo y sustrato manejados, como vemos también en tabla V.
- h). Frazer (10), nos muestra un balance de materia, carbono-nitrógeno, general para el proceso, de la siguiente manera:



Estas ecuaciones muestran que la mayor parte del nitrógeno se queda retenido en el producto, pero la mitad del carbono se pierde, siendo usado como energético para la síntesis de macromoléculas biológicas - de alto orden. Sin embargo, en los sustratos hay desechos que de otro modo se quemarían, enterrarían o descargarían a ríos y mares. Entonces el 50% de la recuperación en un proceso de PU representa un incremento de carbono disponible para el sistema alimenticio, obtenido a expensas de una pequeña cantidad de nitrógeno fijado. De manera similar se puede comparar la suma de entrada de energía con el contenido energético de la proteína microbiana recuperada. Las entradas de energía son: el consumo de la planta por este concepto más el contenido de energía de la sal-

COSTO DE PROTEINA EN VARIOS PRODUCTOS. (20)

Tabla IV

fuerite	costo prod.(#)	% de prt.	costo prot.(#)
soya	8.9	44	20
algodón (aceite)	8.9	41	22
soya (harina desgrasada)	15.5	50	31
harina de pescado	40.0	80	50
levadura de tórula	37.7	48	79
cacahuete (harina)	55.4	60	72
caseína	88.6	95	93
leche en polvo	44.4	37	120

(# de centavos de dolar por kg)

amonio. La suma de éstas entradas es de aproximadamente 3000 cal/g. Así pués, ignorando la energía atada como planta y la usada como labor manual, hay una ganancia neta de 2500 cal/g. en la PU.

Equilibrando la situación y siendo justos, debemos consignar también los inconvenientes que la PU tiene. La investigación, en consecuencia, debe efectuarse con sumo cuidado y a fondo para asegurar la inocuidad del producto obtenido, entonces podemos decir que los estudios, citados por Kihlberg (20) y Kharatyan (18), más intensamente hechos hasta la fecha son los efectuados con PU proveniente de levaduras crecidas sobre fracciones crudas de petróleo, aunque últimamente, éstos se han extendido a otro tipo de microorganismos y sustratos, habiéndose encontrado hasta ahora los siguientes inconvenientes:

- 1.- Baja digestibilidad: esto significa que no es fácil acceder, por parte de los organismos superiores, a la proteína microbiana y ésto por dos razones, hasta ahora: la pared celular y factores antinutriciona-

les que son propios de los microorganismos.

La primera es una barrera natural protectora que envuelve a los microorganismos, compuesta principalmente por: peptidogluconos, fosfolípidos, ácido teicoico, lipopolisacáridos; que no es destruída fácilmente por el sistema digestivo, haciendo difícil aprovechar las proteínas celulares que nos interesan; aunado a esto, en bacilos Gram (+) la pared aporta facto

COSTOS DE PROTEINA DE VARIOS SUSTRATOS. (20)

Tabla V

sustrato	organismo	costo prod. (#)	costo prot. (#)
carbohidratos	levadura	15-20	30-40
gas	bacteria	12.6	21
n-alcanos	"	14.2	24
gas	levaduras	14.2	28
n-alcanos	levaduras	17.1	34
metano	bacterias	17.5	29
metano	bacterias	13.3-22.1	22-37
metano	bacterias	52.7	88
metanol	bacterias	43.0	72
metanol	bacterias	25	42
aguas negras	algas	6.7-20.0	13-40
CO ₂ -N ₂	algas	66.5	133

(#) centavos de dolar/kg.

res antigénicos. Las sustancias antinutricionales son generalmente metabolitos secundarios que impiden la digestión de algún alimento y su consiguiente no-aprovechamiento; a ésto hay que agregarle que causan trastornos gastroentéricos como diarrea y/o flatulen

cias, por el esfuerzo en tratar de aprovechar el alimento por parte del sistema digestivo.

- 2.- Presencia de sustancias que raramente son ingeridas--causando diversos trastornos, entre éstas tenemos --pigmentos, lípidos, esteroides, carbohidratos no u--suales; ácidos grasos de cadena impar; tiamina e his--tamina, causantes de reacciones alérgicas; endo y e--xotoxinas (ejem.: aflatoxinas, ocratoxinas, etc.) --compuestos aromáticos con actividad carcinogénica; -sustancias productoras de necrosis hepática. Este --problema puede ser sorteado mediante una selección -escrupulosa del microorganismo, ayudándose además --con un manipuleo genético tendiente a inhibir la ---producción de estas sustancias.
- 3.- En lo general la PU ofrece una relación Ca/P de 0.01 que es más baja de la presente en alimentos conven--cionales, siendo ésta muy importante en organismos -en crecimiento; por lo cual, si la PU será alimento--único, hay que considerar este detalle y dar suple--mento de estos dos elementos.
- 4.- Las células de rápido crecimiento presentan un elevado contenido de ácidos nucleicos, especialmente RNA lo que las hace ser un riesgo si van a ser utiliza--das como alimento, por las consecuencias que aca---rrean. El porcentaje que encontramos es de 8-25 g de AN/100 g de proteína, mayor que el ofrecido por -los alimentos convencionales, ejem.: sardina 2.2-5.7 g de AN/100 g de proteína. El resultado orgánico de -una alta ingestión de ácidos nucleicos se manifiesta por una aparición de ácido úrico en gran concentra--ción en la sangre, que propicia la presencia de una enfermedad conocida como gota, así como la propen--sión a cálculos renales y biliares. Esto tiene espe--cial interés, ya que el hombre durante su evolución perdió la enzima uratoxidasas que metaboliza el ácido úrico a alantoína, hecho que impide a los humanos --puedan metabolizar el ácido úrico y este no les cause daño. Las investigaciones tienen como derivación secundaria el encontrar un método eficiente y barato para remover los ácidos nucleicos sin afectar el contenido proteico de la PU.
- 5.- Se ha encontrado que los resultados obtenidos al ex--perimentar con animales no pueden ser extrapolados a seres humanos, ya que no responde igual nuestro orga

nismo y el de ellos, ante la misma fuente protéica, es decir, existe tolerancia a las proteínas, como ejemplo, podemos decir que se probaron PU proveniente de: Hydrogenomonas eutropha, Aerobacter aerogenes, Chlorella sp., Scenedesmus sp., en diferentes especies animales en forma exhaustiva, obteniendo buenos resultados y no presentándose complicación alguna, pero al experimentarse en humanos, aparecieron diversos trastornos como vómito, diarrea, náuseas, dolor de cabeza y trastornos alérgicos; por lo que estas fuentes se descartaron para alimentación, quedando como alimento para animales.

Una vez abordados los aspectos generales de la PU, particularizaremos en los elementos que conforman el presente trabajo, haciendo una revisión de ellos y de las propiedades que nos serán útiles para alcanzar el fin que se persigue en el proyecto.

Lo primero que analizaremos será el sustrato que se utilizará para obtener la PU. El camote, cuyo nombre científico es Ipomoea batatas, es una planta fanerógama, angiosperma, dicotiledónea de la familia de las Convolvuláceas. La planta es una guía rastrera muy sensible a las heladas. Sus raíces tuberosas, variables en cuanto a color y tamaño, según la variedad que se cultiva, se usan como legumbres, para producción de dulces o como alimento para animales. Es originario, según parece, de la parte central de América de donde se ha extendido a casi todo el continente. Crece mejor en climas cálidos húmedos, que en cualquier otro, pero puede adaptarse a climas secos. La tierra apropiada para cultivarlo es una franca, rica que conserve bien la humedad, en orden decreciente, tenemos las tierras arenosas y arcillosas. Es una planta que resiste bien la sequía, pudiendo producir una cosecha con menos agua que otra planta hortaliza.

En nuestro país se cultiva principalmente en los estados

de Jalisco, Puebla, Michoacán, Veracruz, Tabasco y Colima. Actualmente, su producción no es la suficiente como para satisfacer alguna demanda industrial, las razones son el empleo de técnicas anticuadas para su cultivo y la poca demanda existente en el mercado en comparación con otros productos. Su posible uso como sustrato a nivel industrial, podría desembocar en un aumento de su producción, pudiendo extenderse su cultivo a regiones donde la precipitación pluvial escasea y no puede mantener a otras siembras, así mismo, los campesinos tendrían otra opción para darle utilidad a sus tierras y tener una fuente alterna de ingresos.

En la tabla VI, observamos la composición del camote, llamándonos la atención dos casilleros principalmente, contenido de proteínas y almidón. De lo primero observamos un porcentaje bajo, lo cual hace que sea un alimento de escaso valor nutritivo, en contraste, ofrece una alta existencia de almidón, que puede ser usado como sustrato. Según Whitaker (46): "El almidón es hidrolizado más rápidamente que la celulosa y existe el potencial para fermentarlo directamente por hongos amilolíticos en un proceso continuo; una alternativa aproximada es usar un cultivo mixto para almidón de desperdicio. El almidón puede ser de particular interés en á

COMPOSICION DEL CAMOTE (28)

Tabla VI

alimento	%agua	%prot.	%grasa	%ceniza	%c.h.tots.	%fibra	%azucares
camote	68.5	1.8	0.7	1.07	27.9	1.0	5.4
alimento	%almidón	Ca(mg)	Ph(mg)	Fe(mg)	Vit.A(UI)	Tiamina (mg)	
camote	20.2	30	49	0.7	7700	0.1	
alimento	niacina(mg)	riboflavina(mg)	ac.ascórbico(mg)	energía(cal/100g)			
camote	0.7	0.06	22	125			

reas sub y tropicales, en donde se producen en gran cantidad raíces y -- frutos feculentos que pueden ser acumulados de manera económica para un proceso industrial".

Si utilizamos un microorganismo apropiado y usando el -- procedimiento correcto, obtendremos un alimento con alto valor nutritivo aprovechable por algún miembro de la cadena alimenticia que finalice en el hombre, ó por él mismo; ésto usando como sustrato un vegetal pobre en cualidades nutricionales. Aunado a ésto, el camote como vemos en tabla VI, ofrece otros elementos como sales minerales y vitaminas que pueden ser aprovechables, ésto impactaría en utilizar un medio sencillo y barato para el crecimiento; tendemos a sólo utilizar fuente de carbono, nitrógeno y lo menos posible factores de crecimiento.

Gray y colaboradores (11), usaron camote integral como fuente de carbono seleccionando Cladosporium sp. en un proceso de cultivo sumergido. Se tuvo un rendimiento (g de prot. sintetizada/lt de medio) de 5.87. De 100 g de camote se obtuvieron 81.29 de producto seco (micelio más camote sin usar) - conteniendo 31.6 g de proteína. Inicialmente en los 100 g de camote se tenía 6.9 g de proteína, la proteína total se incrementó en 4.8x. Tal proceso puede ser de un gran valor en países en donde la reserva de alimentos altamente protéicos es corta y el potencial para producir camote es alta, ejem.: Egipto, México, Malasia, Tanzania, Perú, etc.

Los carbohidratos son acumulados por una gran variedad de plantas, están ampliamente distribuidos y se producen en gran tonelaje. La agricultura, incluyendo la parte forestal, sintetiza más o menos 10 billones de ch/año, la mitad de los cuales están en forma de celulosa, 1.5 billones de toneladas de almidón grado alimenticio y una pequeña proporción conver-

tida en aceites vegetales. Posiblemente el 75% de carbohidratos producidos por esta vía se regresan al ambiente como basura, mucha de la cual es potencialmente utilizable como sustrato microbiano.

Después de la celulosa, el almidón es el carbohidrato -- mas ampliamente y abundante encontrado en el reino vegetal. - En la naturaleza casi siempre se haya en forma de gránulos. - La forma y el tamaño de ellos son característicos de c/variedad de plantas. El análisis químico nos dice que este se compone de 44.4% de carbón, 6.2% de hidrógeno y 49.4% de oxígeno. El monómero que lo conforma es la D-glucosa que se agrupa endos diferentes glucógenos: la amilosa que es una cadena li---neal y la amilopectina que es ramificada, encontrándose en --proporción de 22-26% y 74-78%, respectivamente.

Muchas de las enzimas que actúan sobre el almidón se clasifican como amilasas, sus acciones sobre el almidón dan lu--gar a la formación de productos de bajo molecular y cadena abierta reductora llamados dextrinas. Las enzimas que hidrolizan el almidón se denominan alfa-amilasas y las sacarifican--tes como B-amilasas. Otras enzimas atacan al almidón como --las forilasas y amiloglucosidasas, pero no producen dextrinas. fosforilasas.

La palabra Aspergillus fue usada por primera vez en ---1729 en un escrito de Micheli que la utilizó para denominar -una etapa asexual de ciertas especies de hongos comunes. Hasta nuestro días este nombre se aplica a un género en el cualno todas las especies presentan fase ascospórica, pero eso no se ha tomado como punto decisivo para que un hongo entre al -género si reúne otras características pedidas. Raper(36) menciona que no todos los micólogos están de acuerdo con este --procedimiento. De este modo, y para tener la posición correcta

ta del Aspergillus entre los hongos, se presenta una clasificación en donde situamos al Aspergillus dentro de los Ascomycetes y los Fungi Imperfecti:

CLASIFICACION DEL Aspergillus niger

Tabla VII

Clase: Ascomycetes

Subclase: Euascomycetidae (serie: Plectomycetes)

Orden: Eurotiales

Familia: Eurotiaceae

Especies: niger

Clase: Deuteromycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género: Aspergillus

Especie: niger

En sus estudios, Raper y Thom (36), reconocen 78 especies diferentes de este género. El grupo vinculado al Aspergillus niger está formado por hongos que comunmente llamamos hongos negros. El género tiene amplia distribución, desde los trópicos a las regiones frías. El aire, en todas partes, parece transportar de estos organismos, como se puede apreciar exponiendo al aire por pocos minutos una caja Petri que contenga un medio de cultivo apropiado. Por su potente actividad enzimática, los Aspergillus son parte fundamental en muchos procesos industriales; entre los cuales podemos mencionar la producción de ácido cítrico, glucónico y otros ácidos orgánicos, transformación de esteroides, obtención de enzimas, manu

facturas de bebidas y alimentos fermentados, antibióticos, --
etc.

Particularizando, los aspergilos negros son, con toda --
probabilidad, más comunes que cualquier otro grupo del género.
Su distribución es muy amplia en el medio ambiente, aprove---
chando una gran variedad de sustratos para crecer entre los --
que incluimos: granos, forrajes, frutos y vegetales podridos,
fibras de algodón, cuero, sustratos ricos en proteínas, folla
je y ramas de los bosques. Son abundantes en todos los suelos
examinados, particularmente en los provenientes de las áreas-
sub y tropicales. Con la posible excepción del grupo de As--
pergillus flavus, que es de gran importancia en Oriente, el -
grupo de los aspergilos negros, es sin duda, el más ampliamen
te usado en la industria que cualquier otro grupo de hongos.

Ahora pasaremos al terreno de la descripción morfológica
del Aspergillus niger: el micelio es semejante al de muchos -
hongos. Las hifas bien desarrolladas, tabicadas, hialinas, -
están muy ramificadas. Sus células por lo general son multi-
nucleadas. Cuando todavía está joven y vigoroso, el micelio-
produce abundantes conidióforos (de hialino a café, típicament
e suaves, pero en algunas especies ligeramente granular o -
puntuado, usualmente de paredes gruesas). Estos no se orga-
nizan de algún modo, sino que nacen aislados directamente de-
las hifas somáticas. La célula hifal que se ramifica para dar
lugar al conidióforo, se llama célula basal. Los conidiófo--
ros, son hifas largas, erguidas, cada una terminada en una ca-
beza llamada vesícula (globosas o parecidas a, hialinas o colo-
readas en sombras de café oscuro a pálido).

Sobre toda la superficie de la vesícula multinucleada, se
desarrolla una gran cantidad de esterigmas (en general, profunn

damente coloreadas o llenas de un pigmento) que la cubren completamente. Según la especie pueden producir uno o dos estratos de esterigmas. Raper (36) llama primarios a los esterigmas del primer estrato y secundarios a los del estrato superior. Cuando se producen dos estratos de esterigmas, los conidios salen de los secundarios. Los esterigmas que llevan los conidios, sean primarios o secundarios, tienen típicamente forma de botella. A medida que los esterigmas van madurando, empiezan a formarse conidios en sus extremos, uno debajo de otro, en cadenas. Los conidios son globosos y unicelulares, con paredes rugosas en su exterior. Al principio uninucleados, en muchas especies, por divisiones nucleares sucesivas, pronto se hacen multinucleares; sin embargo, en la mayoría de las especies los conidios permanecen uninucleados.

Los conidios del Aspergillus niger se forman dentro del extremo del esterigma que en realidad es un tubo. En el extremo del esterigma, un tabique transversal delimita una porción del protoplasma con un núcleo. El protoplasto se redondea, segrega una pared propia dentro del esterigma tubular y desarrolla un conidio. La pared conidial puede fusionarse parcial o completamente con la pared del esterigma. Entre tanto, un segundo protoplasto, debajo del primero, se desarrolla para formar otra espora y empuja la anteriormente formada hacia afuera, de tal modo que se forma una cadena de esporas a medida que el protoplasma del esterigma continua creciendo y nuevos conidios se organizan, uno debajo del otro. La esclerotia es una estructura de forma globosa a subglobosa que es de color crema, en su etapa joven y posteriormente sobre un fondo café adquiere tintes rosáceos. Como los conidióforos y los conidios se producen en gran abundancia, es su color el que predomina sobre la colonia que cubren. De tal modo las colonias del Aspergillus parecen ser negras (niger), castañas, a-

marillas, verdosas, etc.

Profundizando un poco mas en la utilización en la industria, de los hongos, podemos decir según Whitaker & Tannenbaum y Forage & Righelato, (46) y (49), que los hongos filamentosos se han usado en alimentos por siglos, habiéndose cultivado industrialmente por mucho tiempo para obtener diversos productos tales como: ácidos orgánicos, enzimas, antibióticos, aminoácidos, esteroides, etc. Con frecuencia el micelio obtenido de esas fermentaciones se lava, se seca y es vendido como forraje. Pero hasta el día de hoy, no han sido considerados muy seriamente para usarse en procesos industriales de obtención de PU. Generalmente se ha creído que la velocidad de crecimiento de los hongos es sustancialmente menor que la de las levaduras, que su contenido de proteínas es mas bajo y que no son apropiados para cultivo sumergido, debido a su morfología filamentosa o de bolas lo que aumenta la viscosidad del medio de fermentación con el consiguiente retraso en el crecimiento y la autólisis. Pero, en años recientes, se han descubierto y obtenido hongos con velocidades específicas de crecimiento comparables con las levaduras, presentando, así mismo, un contenido de 50% de proteínas crudas de buena calidad, como vemos en tabla VIII.

La morfología de los hongos es un resultado de la frecuencia de la ramificación de las hifas, pudiendo ser controlada por una buena selección de las condiciones del cultivo y cepa a utilizar. En la actualidad, el cultivo continuo es una herramienta común en la investigación y desarrollo de procesos de PU, en general las cinéticas observadas en bacterias y levaduras son aplicables a los hongos filamentosos.

Una vez dado un vistazo a las características de los hongos, en general, que justifican su participación en procesos de producción de PU, pasaremos a revisar las que presentan el

Aspergillus niger.

COMPARACION ENTRE LEVADURAS Y HONGOS

Tabla VIII.

Microorganismo	sustrato	%proteína cruda	Vel. de crec. (h ⁻¹)	ref.
<u>Aspergillus niger</u>	---	48	0.20	(9)
<u>Aspergillus niger</u>	extracto de alubias	45	0.25	(32)
<u>Aspergillus Fumigatus</u>	casava	44	----	(11)
<u>Aspergillus nidulans</u>	----	--	0.36	(9)
<u>Fusarium moniliforme</u>	----	51	0.31	(9)
<u>Penicillium chryso-</u> <u>genum.</u>	----	42	0.11-0.30	(9)
<u>Cándida utilis</u>	----	50	0.5	(9)
<u>Rhodotorula glutinis</u>	----	--	0.158-0.211	(32)
<u>Sacharomyces cerevi-</u> <u>siae.</u>	----	--	0.20-0.25	(32)

- 1). Muchas especies de hongos, entre las cuales se encuentran el A. niger, tienen propiedades ideales para procesos de PU que utilizan como materia prima, materiales de desecho. Están diseñados para invadir tejidos vegetales debido a su extenso y potente equipo enzimático, que incluye una gran variedad de polisacárido, hidrolasas, lipasas, proteasas; por lo tanto, están capacitados para aprovechar la mezcla de materiales considerados como desperdicios. De hecho, ellos son los principales productores de enzimas en procesos industriales. (32), (45).
- 2). Algunas especies de hongos son termotolerantes, capaces de crecer en forma satisfactoria en el rango de temperaturas de 25-60 °C, lo cual baja costos por enfriamiento. El A. niger se incluye dentro de este grupo. (12), (42).

- 3). Los hongos se pueden desarrollar en pH s de 1.5 a -- 4.0, lo que los confiere una ventaja selectiva muy fuerte sobre posibles contaminantes, pudiendo ser posible obviar medidas de esterilidad. De hecho la literatura en donde el A. niger se ve involucrado, maneja ph de 3.0 - 3.5, y en un artículo, (42), Senezllegó a trabajar en condiciones no estériles, sin que llegara a presentarse contaminación en el producto.
- 4). Los hongos se desarrollan de manera filamentosa, ésta su naturaleza bien controlada, hace posible recuperar el micelio con una simple operación de filtración sin que tengamos grandes pérdidas celulares, además, de ser fácil y rápida de llevarse a cabo, (9), (20), (42).
- 5). Presentan una estabilidad genética mayor que las levaduras y bacterias, lo que el peligro de tener una cepa patógena o productora de alguna toxina, es menor, (9).
- 6). Los hongos son capaces de aprovechar el nitrógeno -- proveniente de una fuente inorgánica, como fuente --- principal de este elemento. El Aspergillus niger cubre este aspecto también, (42), (43).
- 7). Uno de los objetivos del proceso de PU es la preservación de las tierras de cultivo para fines agrícolas y no para industriales, entonces los hongos deben ser capaces de crecer en cultivo sumergido, además de aprovechar una sola fuente de carbono y desarrollarse en medios baratos y abundantes. (11).
- 8). Como ya vimos en la tabla VIII, el Aspergillus niger presenta una buena velocidad de crecimiento comparable a la de las levaduras, que puede incrementarse, -- aun más si la economía del proceso así lo requiere, -- (32), (9), (11).
- 9). El Aspergillus niger a utilizarse en el proceso, debe convertir con eficiencia el carbono del sustrato en carbono tisular acompañando a éste un aprovechamiento cercano de nitrógeno inorgánico en nitrógeno proteico, (11).
- 10). Se pretende utilizar el proceso de PU en regiones -- donde hay una sobreproducción de carbohidratos e infraproducción de proteínas, en nuestro caso específico

co éstos son el almidón, así que el hongo debe poseer capacidad amilolítica. El A. niger la posee, tanto que es una de las fuentes de obtención de amilasas a nivel industrial, (11), (35).

Tabla IX (9), (32).

<u>Contenido de aminoácidos (g de Aa/100 g de proteína)</u>										
Fuente	Cys--	Ile--	Leu--	Lys--	Met--	Phe--	Thr--	Try--	Tyr-	Val--
ref. FAO°	2.0	4.2	4.8	4.2	2.2	2.8	2.8	1.4	2.8	4.2
<u>A. niger</u>	1.1	4.2	5.7	5.9	2.6	3.8	5.0	2.1	3.2	5.2
bacterias	0.4	3.0	4.7	4.1	1.7	2.4	3.2	0.6	2.1	3.6
levaduras	0.3	7.3	8.1	10.7	1.4	4.1	4.8	0.5	1.4	5.7
soya (harina)	1.2	5.8	7.6	6.6	1.1	4.8	3.9	1.2	5.8	3.2
leche de vaca	0.9	6.4	9.9	7.8	2.4	4.9	4.6	1.4	5.1	6.9

° FAO (Food and Agriculture Organism).

11). Es deseable, no solo obtener proteína en grandes cantidades, sino que además sea de buena calidad, esto significa que no tenga deficiencias cuanti y/o cualitativas de aminoácidos esenciales. Esto lo tenemos reflejado en la tabla IX en donde comparamos el contenido de aminoácidos del A. niger con otras fuentes y la referencia de la FAO, en donde apreciamos que teóricamente se puede obtener proteína de buena calidad a partir del hongo.

12). Perlman, (32), menciona estudios hechos con biomasa de A. niger, acerca de su poder nutricional, obteniendo los siguientes resultados:

--- PER (coeficiente de eficiencia proteica) 2.50.
(g. ganados en peso/g de proteína consumida)
contra caseína.

--- Relación de conversión de alimento (kg/kg de ---
 peso ganado) = 2.02 (ajustado a un valor de PER
 de caseína de 2.50).

Estos estudios se efectuaron en pollitos, no repor-
 tándose toxicología alguna.

- 13). Gray, (11), manifiesta que en estudios calorimétricos realizados con este hongo, A. niger, se encontraron valores de 4.8--5.9 kcal/g, esto es importante si el alimento va a ser utilizado en regiones con deficiencia calórica, además de protéica.
- 14). También es importante conocer el aporte de vitaminas que da el hongo tanto cuali como cuantitativamente, Tabla X.

CONTENIDO DE VITAMINAS (ug/ g de peso seco).

Tabla X

microorganismos	biotina	riboflavina	piridoxina	ac. pant.	cianocobalam.
<u>A. niger</u>	0.24	6.7	25.4	25	35
<u>Fusarium moniliforme</u>	0.31	9.5	36.8	25.5	33
<u>Torula sp.</u>	2.3	45	33.4	57	-
Basidiomycetes	0.37-2.32	7-96	0.6-98	3-52	-
soya (harina)	-	3.5	-	15	-

Como vimos al principio en la introducción, en los aspectos generales de PU, ésta tiene desventajas importantes que deben tomarse en cuenta antes de adoptar una decisión respecto al destino de la biomasa obtenida. Centraremos nuestra atención en buscar si el microorganismo utilizado presenta al-

gún aspecto toxicológico y/o patológico.

Segretain (41) y Alexopolous (2), hacen notar que algunas cepas de Aspergillus niger son patógenas para el hombre y los animales. Especialmente, las aves demuestran mayor susceptibilidad al ataque de este hongo, la micosis que causa es conocida como aspergilosis, afectando principalmente a los pulmones, aunque a veces infecta los oídos de manera seria. Debemos aclarar que en los humanos esta afección no se presenta regularmente, sino que tiende a ser rara y oportunista. Los casos reportados se produjeron después de sensible baja en las defensas del organismo, exposición prolongada a las esporas o como producto de un tratamiento con esteroides. El cuadro clínico que desarrolla la aspergilosis pulmonar, frecuentemente se confunde con la tuberculosis pulmonar, que invade la misma zona, por lo que al tratársele erróneamente resulta ser de fatales consecuencias.

Existen maneras de resolver este problema, una de ellas es seleccionar la cepa a utilizarse y probar experimentalmente que no desarrolla estados patológicos. Otra es manipular genéticamente la cepa a utilizar para obtener un mutante estable que no esporule, como el mencionado por Gregory (12). Una más sería, controlar las condiciones del cultivo de, tal manera, que no se llegara a la fase de esporulación y obtener así, puro micelio. Añadiendo, si es costeable, un proceso de esterilización.

El género Aspergillus tiene dentro de sus miembros algunos productores de sustancias tóxicas para el hombre y los animales, llamadas micotoxinas, según Pore (34), la concentración tóxica es menor a 1mg/kg de peso corporal, destacándose las aflatoxinas y ocratoxinas por su importancia económica al contaminar y echar a perder grandes cantidades de productos agrícolas.

En el momento actual, la literatura no hace mención del Aspergillus niger como productor de algún compuesto tóxico similar a las aflatoxinas u ocratoxinas, este microorganismo es un gran productor de ácido oxálico, sustancia de uso industrial, tóxica para los seres vivos. De hecho, existen procesos para obtenerlo a partir del A. niger como variante de los usados para ácido cítrico, Prescott (35). Pero esto también significa, lo dice el mismo autor, que modificando las condiciones de cultivo en lo que se refiere al pH y concentración, así como presencia de, sales minerales podemos hacer que el ácido oxálico se produzca en cantidades mínimas en el medio y no "envenenará" la biomasa obtenida.

Pero hay que puntualizar lo que subraya Gray (11); "la cantidad de especies productoras de micotoxinas es muy poca - en comparación con las que no lo hacen, de tal manera que con una adecuada selección sortearíamos el problema".

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En nuestro país, gran parte de la población tiene que recurrir al uso de "harinas pobres" nutricionalmente, (es decir que su contenido en proteínas es muy bajo y que para cubrir la demanda del organismo se tendrían que ingerir en cantidades que sobrepasan la capacidad del sistema digestivo), para satisfacer sus requerimientos alimenticios y los de los animales que detestan.

Estudios efectuados por Durán Flores (45), revelan que el porcentaje de consumo diario de proteínas animales en relación con las recomendaciones de nutrimentos para la población mexicana era de 36.8% per cápita para las zonas rurales, 47.6% para las semirurales y de 89.2% para las urbanas. Ahora bien, este problema se agudiza por las dificultades que actualmente soporta el campo, las cuales orillan a la importación de alimentos y forrajes, lo que impacta gravemente sobre la economía agropecuaria, obligando a poner precios prohibitivos a las proteínas animales y no pocas vegetales, quedando de esta manera lejos del poder adquisitivo de la gente.

Esta situación deficitaria no es privativa de nuestro país, sino que se presenta en mayor o menor grado en el mundo, WHO Cronicle (47), las causas que le han dado origen, en su mayoría, son ajenas a la ciencia y no está dentro de nuestros objetivos el analizarlas y/o solucionarlas. Sin embargo, la ciencia como parte de la realidad, de la cual no puede excluirse, ha dado respuesta a este problema. Una de ellas es buscar y encontrar fuentes protéicas alternas a las tradicionales, que sean baratas e industrializables, Luiselli (23), para cubrir con creces la demanda, evitando en el futuro la escasez y especulación por causas económico-políticas.

Lo que es objeto de nuestro interés lo constituye la obtención de PU, fuente protéica alterna, barata y factible de

procesarse a gran escala. Proteína unicelular es un término genérico que se aplica al concentrado protéico obtenido a partir de microorganismos unicelulares, los cuales pueden cultivarse en una gran variedad de medios relativamente abundantes y baratos, cuyo valor inicial es nulo o escaso. Entonces podemos aseverar que las "harinas pobres" con ayuda microbiana y la tecnología adecuada, podrán tornarse en "harinas enriquecidas" (aquéllas que se les aumenta su contenido de algún parámetro alimenticio), siendo ésto una contribución, que ayude a aliviar el déficit protéico existente en la actualidad.

La meta inmediata es obtener un producto de alta calidad y costo semejante, o menor al de los forrajes, que pueda aprovecharse como alimento para los animales de cría. De esta -- manera conseguiríamos:

- Desviar a consumo humano una importante cantidad de -- proteína vegetal que se utiliza en la preparación de -- alimentos balanceados.
- Abatir costos de cría y manutención de animales de pas -- toreo, lo que necesariamente rebajaría el precio de -- los productos primarios y derivados de ellos.
- Lograr que el país sea autosuficiente en recursos ali -- mentarios, disminuyendo la importación de granos y ali -- mentos.
- Recuperar y engordar animales que actualmente se sacri -- fican por carecer de alimentos para mantenerlos.

La mediata sería probar el producto para saber si llena los requerimientos para su incorporación a la dieta humana.

IV. OBJETIVOS E HIPOTESIS

OBJETIVO GENERAL:

"En este trabajo se elevará el contenido protéico de un-macerado de camote (Ipomoea batatas). Esto se hará utilizando la capacidad enzimática que posee el hongo Aspergillus niger, que permite, a partir de carbohidratos del camote elevar la cantidad inicial de proteínas del mismo".

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1.- Aislar el Aspergillus niger de sus diferentes habitats conocidos. El aislamiento se hará de suelo, aire y frutos cítricos que presenten contaminación característica. Se usará la técnica de aislamiento -- por diluciones o siembra directa, según sea el caso y sembrando en agar Rosa de Bengala.
- 2.- Identificar y caracterizar a las colonias que se sospeche pertenecen al género que nos interesa, usando técnicas de microcultivo y crecimiento en placas (características macro y microscópicas) apoyadas en crecimiento, en medio de Foster, aunque esta prueba no es concluyente.
- 3.- Efectuar el análisis bromatológicos al camote por utilizar, empleando técnicas apropiadas; para tener los patrones de comparación cuando se obtenga la biomasa final.
- 4.- Encontrar las condiciones óptimas (cepa, temperatura, pH, medio, concentración de componentes del medio) para el proceso. Esto se hará corriendo cinéticas en matraz, (erlenmeyer de 250 ml.).
- 5.- Correr cinética de fermentador con los valores obtenidos.

nidos en el punto anterior. Sacar información sobre la cinética del hongo.

- 6.- Hacer el análisis bromatológico de la biomasa obtenida de la fermentación.

HIPOTESIS

"La fermentación en condiciones óptimas debe producir un aumento en el contenido protéico inicial de la harina de camote".

V. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental consistió de los siguientes -
pasos:

1. Obtención, preparación y análisis del camote.
2. Aislamiento e identificación del microorganismo.
3. Cinéticas en matraz.
4. Cinética en fermentador.
5. Análisis de la biomasa obtenida.

Desglosando tenemos que:

1. Obtención, preparación y análisis del camote:

- a). Obtención: el camote (Ipomoea batatas) se adquirió en el departamento de legumbres de una tienda de autoservicio.
- b). Secado: el camote se lavó y cortó en pedazos lo más fino posible. Se puso a secar en estufa a -- 60°C por 24 horas y al sol. En la estufa tuvimos problemas de espacio y caramelización del camote, por lo que se optó mejor por el segundo método.
- c). Molienda: para moler el camote se utilizó un molino de cuchillas marca Arthur H. Thomas and co. -- Scientific apparatus, hasta pasar por malla 60.
- d). Análisis bromatológico: se efectuaron sobre el camote los siguientes análisis: % de humedad, % de proteína, % de cenizas, % de carbohidratos totales, % de grasa, % de fibra cruda.
- e). Almacenaje: el camote molido y seco, se guardó en frascos de vidrio limpios, en lugar fresco y seco.

2. Aislamiento e identificación del microorganismo.

- a). Aislamiento: las cepas se aislaron de: suelo, aire y frutos contaminados, estos últimos adquiridos.

en puestos de jugos localizados alrededor de la -
ENEP/Zaragoza, 2 cepas fueron aportadas por el -
laboratorio de Microbiología Farmacéutica, gracias
a la Profra. Dora Alicia Pérez González. Los me-
dios utilizados fueron el agar Rosa de Bengala y
de Foster. Ya aisladas las cepas, se transfieren-
a tubos inclinados de agar Czapeck, en espera de -
su identificación.

b). Identificación:

b.1 Microscópica: se utilizó la técnica de micro-
cultivo. Las preparaciones se fijaron con --
bálsamo de Canadá, obteniéndose microfotogra-
fías con el siguiente equipo:

- microscopio Axiomat/ Carl Zeiss. Lentes ---
25 x y 50 x.
- rollo: Ektachrome/Asa 200.Kodak/35 mm

b.2 Macroscópica: se utilizó el método marcado --
por Raper (36). Se tomaron fotografías del -
crecimiento en placa, así como de otras par--
tes del proceso con el siguiente equipo:

- cámara: Minolta pocketpack 440E
- rollo: Fujicolor 24, CN 110, Asa 100, 21 --
DIN.

c). Preservación: una vez identificadas las cepas, --
estas se preservaron en agar Camote Czapeck, re--
sembrándose cada 3 meses. Se trabajó con 2 lí---
neas, una llamada de reserva y otra de trabajo. Se
tuvieron problemas de adaptación del microorganis-
mo al medio, manifestándose esto en una variabi--
lidad de coloración de la colonia. Se dejó incu-

bar más días, las cepas que homogeneizaron su color se conservaron como puras, mientras que las que no lo hicieron fueron consideradas contaminadas.

3. Cinéticas en matraz.

- a). Selección de cepa, temperatura y medio: este bloque de experimentos se conduce bajo un diseño que nos permite dilucidar 3 variables en él; a saber: cepa, temperatura y medio. Las cepas que se utilizaron en el estudio fueron: S-II, S-VI y S-IX, que desde este momento se nombraron como: cepa III, cepa I y cepa II, respectivamente. Estas presentaron crecimiento abundante y coloración uniforme en el medio de mantenimiento. No presentaron excreción.

Las temperaturas que se probaron fueron: 37, 45 y 50°C; ya que según la bibliografía, Senez (42), Gregory (12), Forage (9) y Reed (35), es deseable contar con un microorganismo termotolerante que haga innecesaria la integración de un sistema de enfriamiento en el proceso. De este modo los costos rebajarían este renglón que impacta severamente en ellos y como consecuencia, el producto podrá tener una rentabilidad mayor que resultaría en tener el producto a precios accesibles a la mayor porción de población.

La diferencia entre el medio ~~alfa~~ y el B, está en la composición de la fuente de carbono, que en este caso, es el camote. En el primero de ellos, alfa, el camote agregado no tiene cáscara y en beta sí la tiene, habiendo entonces un mejor aprovecha---

miento de este tubérculo. Villé (50), nos dice - que en la cáscara se concentra la mayor cantidad - de sales minerales y otras sustancias, mientras - que la porción restante es, por decirlo así, un - "almacén" de carbohidratos, mayoritariamente en - forma de almidón. Entonces supusimos, se iban a - presentar diferencias en los resultados.

- b). Series de corroboración: este experimento se denominó "serie de corroboración, ya que sirvió --- para decidir la temperatura utilizada en los expe rimentos posteriores. Esa vez se contó con mayor espacio en la plancha de agitación/incubación, -- por lo que se consideró pertinente aumentar el -- tiempo de incubación. El inóculo sufre una modi- ficación, ya que en vez de agregar micelio, se op- tó por adicionar una suspensión de esporas.
- c). Efecto del pH sobre el crecimiento: se hicieron - 4 variaciones sobre el pH inicial del medio, para determinar cual de los valores propuestos daba me- jores resultados. Se tuvieron interferencias en el desarrollo de color en el método de medición - de crecimiento (determinación de desoxipentosas) por lo que se decidió cambiar de método y se mon- tó un experimento para probarlo.
- d). Prueba de método de crecimiento: el método que se leccionamos fué la determinación de fósforo total por medio de molibdato de amonio. Se corrió una cinética para obtener biomasa en medio ~~W~~ y B, e-- fectuáronse las pruebas y el método no produjo in- terferencias.
- e). Optimización del medio; fuente de carbono: se tra

tó de encontrar la concentración óptima de fuente de carbono en el medio que veníamos manejando, para lo cual variamos la cantidad de camote agregado de 0 a 5 g; las determinaciones se hicieron sobre la biomasa y filtrado obtenidos a las 96 horas de crecimiento.

f). Optimización de medio: fuente de nitrógeno: seguimos la misma idea que en el experimento anterior, variando lo agregado de fuente de nitrógeno (nitrato de amonio) de 0 a 1.5 g. Las determinaciones se hicieron a las 96 horas de crecimiento. La fórmula del medio tiene incorporada el nuevo valor de fuente de carbono.

g). Optimización del medio: fuente de fósforo: nos quedaba por dilucidar la concentración del último componente, se hizo de manera similar a los otros 2 experimentos. Se varió la cantidad de fosfato-monobásico de potasio de 0 a 1.5 g. En el medio se incorporaron los valores encontrados experimentalmente en las pruebas anteriores.

4. Cinética en fermentador.

Se quiso saber del comportamiento del hongo en el fermentador con el medio escogido y los parámetros encontrados experimentalmente. Así que se montó una cinética en fermentador incorporando todos los valores hallados.

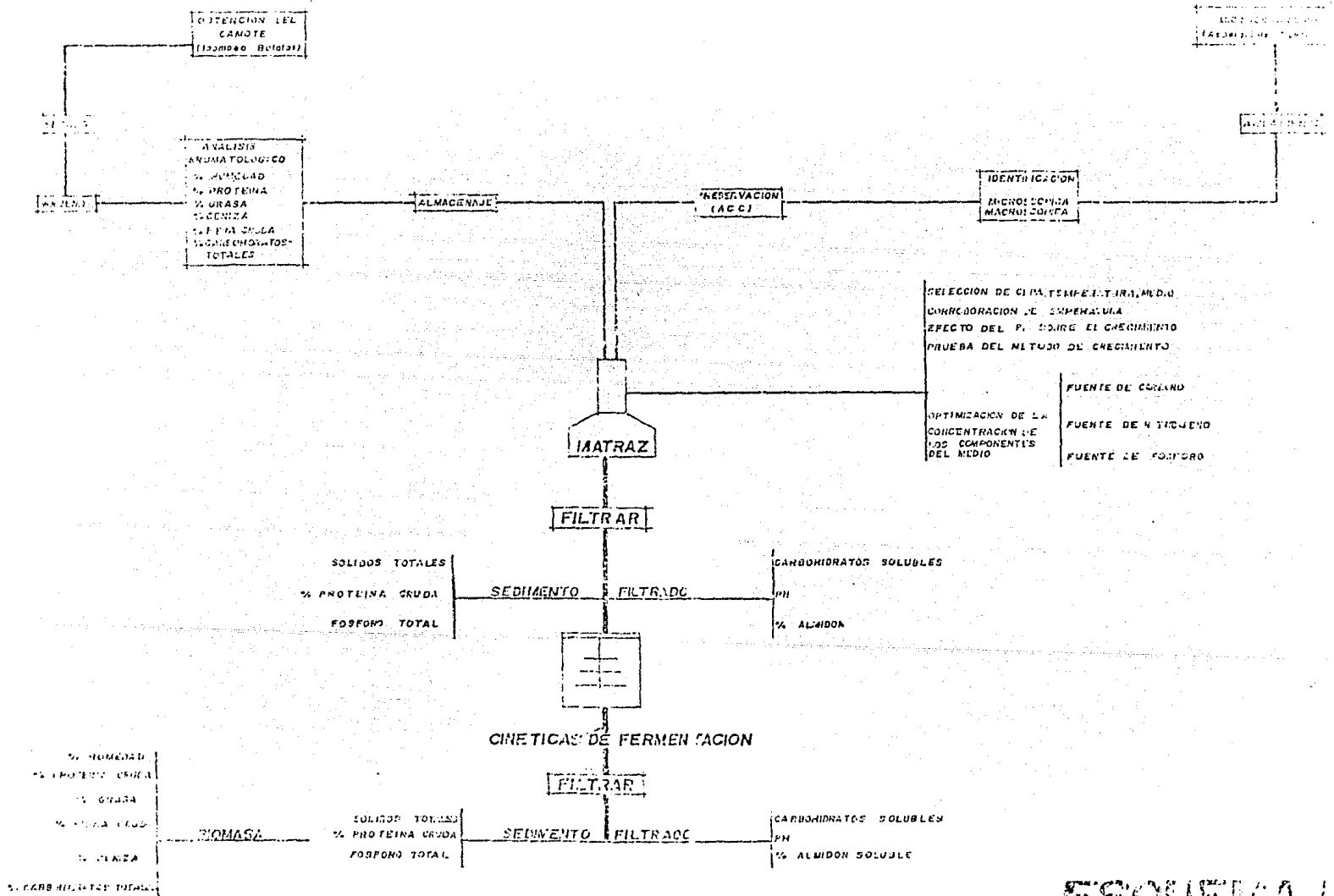
5. Análisis de la biomasa.

La biomasa que se obtuvo en la fermentación, se analizó para compararla con los resultados que previamente se obtuvieron sobre el camote.

Los materiales y métodos se describen a continuación. El esquema I nos da mejor idea del planteamiento del desarrollo experimental.

DESARROLLO

EXPERIMENTAL.



ESQUEMA I

VI. MATERIALES Y METODOS.

A.1) Preparación de la muestra (24):

Este deberá ser representativa de lo que se vaya a analizar, ya sea el camote ó la biomasa. También deberá homogeneizarse, utilizando el mortero ó el molino según sea el caso, las técnicas darán una explicación más amplia sobre este punto.

A.2) Humedad: (24,25,27).

Fundamento: La humedad se determina por la pérdida de peso que sufre la muestra cuando ésta se ve sometida a condiciones de temperatura, tales que el agua retenida por fuerzas no químicas (agua no esencial) es eliminada, ya que su presencia afecta el porcentaje de los constituyentes analizados. Joslyn (17), acota que los azúcares sufren descomposición arriba de 70°C.

Material: estufa desecador
 charola de papel alumi pinzas de crisol
 nio
 balanza analítica

Técnica: Se colocan las charolas de aluminio dentro de una estufa a 60°C, durante 3 horas, concluido el tiempo se sacan con ayuda de pinzas, se ponen a enfriar en el desecador. Se pesan rápidamente. Meter a la estufa 1 hora más, pesando de nuevo, repetir - hasta peso constante. En la charola se pesa 1 g. de muestra (si es el camote, en tiras lo más fino posible y escogidas al azar, la biomasa se muestrea - representativamente), se deja secando a 60°C, por - 12 horas. Al término de éstas, las charolas se dejan enfriar en el desecador, pesándose rápidamente.

La determinación se hace por duplicado.

Cálculos:

% de humedad: $\frac{A-B}{A-C}$

A: peso de muestra húmeda
B: peso de muestra seca
C: peso de charola, tara

A.3) Cenizas: (24,25,17)

Fundamento: Cuando los alimentos se incineran a temperatura entre los 500-600°C, el agua y otros constituyentes volátiles se desprenden como vapores, -- los orgánicos se incineran en presencia del oxígeno y se van a la atmósfera como CO₂, óxido de N₂, así como H₂ en el agua.

Se debe evitar la temperatura por arriba de los 550 °C para evitar la volatilización de los cloruros.

Material:	balanza analítica	tripié
	mechero Fisher	triángulo de porcelana
	crisoles de porcelana	guantes de asbesto
	dsecador	pinzas para crisol
	mufla	

Técnica: Los crisoles perfectamente lavados y secos se ponen a peso constante metiéndolos en la mufla a 550°C por dos horas. Dejar enfriar a temperatura ambiente en el desecador, pesar rápidamente. En los crisoles puestos a peso constante pesar 2 g. de muestra seca. Colocar en un tripié con triángulo de porcelana, se calienta poco a poco con un mechero hasta la carbonización completa de la muestra. Evitar la flama directa en la muestra o alguna corriente de aire que puedan alterar el contenido de cenizas. Con ayuda de las piezas introducir en la mufla e incinerar por 2 horas a 550°C o hasta cenizas blancas o grises ho--

mogéneas. Transcurrido el tiempo, poner los crisoles en el desecador para que se enfríen a temperatura ambiente, se pesan lo más rápidamente posible. Las determinaciones se hacen por duplicado.

Cálculos:

% de cenizas: $\frac{P-R}{M} \times 100$ P: peso de crisol más cenizas calcinadas.
R: peso tara de crisol.
M: peso de muestra.

A.4) Grasa Cruda (24,25,17).

Fundamento: Esto depende de la diferencia de solubilidad de 2 ó más componentes de un material sólido ó semisólido en un solvente en particular, uno de los cuales es más soluble ó se extrae más rápidamente que los otros. Las grasas son solubles en éter, este se calienta, volatiliza y al hacer contacto -- con una superficie fría se condensa pasando por la muestra arrastrando sustancias solubles. Este proceso es repetido en forma continua hasta que no queden residuos de lo extraíble; finalmente el éter se destila y recupera quedando un residuo en el vaso conocido como grasa cruda.

Material: aparato de extracción Soxhlet estufa
fuente de calor (foco) cartuchos de celulosa
balanza analítica pinzas
desecador soporte universal

Reactivo: éter etílico anhidro

Técnica: 1. Poner a peso constante los metracos del aparato Soxhlet en una estufa a 60°C. - Calentar 2 horas. Enfriar en desecador

y pesar rápidamente. Usar pinzas.

2. Pesar 500 mg de muestra seca, colocar en el cartucho de celulosa que tiene fondo de fibra de vidrio y se le pone una tapa del mismo material.
3. Armar el aparato Soxhlet, poner en el matraz 20 ml de éter; colocar el cartucho en su lugar. Calentar suavemente, extraer por 16 horas.
4. Recuperar el éter por destilación, poner a secar en una estufa los matraces a 60°C, por 2 horas. Enfriar en desecador a temperatura ambiente, pesar rápidamente, manejar con pinzas.
5. El cartucho ponerlo a secar en las mismas condiciones, pero hasta total evaporación del éter. Recuperar la muestra.

Cálculos:

% de grasa cruda: $\frac{I - F}{M} \times 100$

I: peso del matraz con
grasa
F: peso tara del matraz
M: peso de la muestra

A.5) Fibra cruda: (24,17).

Fundamento: La muestra se somete a un proceso de hidrólisis, la primera parte de la cual es una en condiciones ácidas y la segunda se efectúa en condiciones básicas. El residuo de este tratamiento serán entonces los carbohidratos no degradables en dichas condiciones (generalmente celulosa y lignina) de hidrólisis.

Materiales: Matraces de digestión crisolas de porcelana
matraz kitasato de 1000ml embudos de vidrio
pañó de lino estufa
mufla balanza analítica

Reactivos: solución de ácido sulfúrico al 1.25%
solución de sosa al 1.25% alcohol étílico al 96%
alcohol octílico como antiespumante
asbesto

Método: Pesar 0.500 g. de muestra molida libre de --
grasa y humedad, transferirlo a un matraz de diges--
tión; adicionarle 0.250 g de asbesto. Agregar 50 ml
de la solución de ácido sulfúrico hirviendo, unas go
tas de antiespumante y perlas de vidrio. Digerir por
30 minutos, teniendo cuidado de girar el matraz para
evitar que el material se adhiriera a las paredes del
mismo. Pasado el tiempo, retirar el vaso del calor,
filtrar la solución con tela de lino, lavar el resi--
duo con 4 porciones de 12.5 ml de agua caliente, en--
juagando a su vez el vaso. Pasar el residuo de la -
tela de lino a un matraz de digestión, haciendo pa--
sar 50 ml de la solución de NaOH caliente por el pa--
ño con objeto de bajar completamente el residuo. Po--
ner a digerir 30 minutos. Retirar del calor, fil---
trar sobre otro paño limpio lavando con 8 ml de áci--
do sulfúrico caliente después con agua hirviendo. Se
debe lavar el vaso bien para bajar completamente el
residuo, pasando al final alcohol étílico por el va--
so y paño. El residuo se pasa finalmente a un cri--
sol puesto previamente a peso constante. Se seca --
por dos horas a 60-62 °C en una estufa de vacío o --
130 °C en una normal. Se enfría en desecador, se -
pesa. Se coloca en la mufla para calcinar el resi--
duo, lo cual se hace a una temperatura de 800°C por
3 horas. Pasado el tiempo, enfriar en desecador a -
temperatura ambiente, posteriormente pesar.

Cálculos:

$$\% \text{ de fibra cruda: } \frac{A - B}{M} \times 100$$

A: peso del crisol des--
pués del secado.

B: peso del crisol des--
pués de calcinar

M: peso de la muestra

B: peso del crisol después de
calcinar.

M: peso de la muestra.

A.6) Determinación de carbohidratos totales por Antrona:
(25,17,21,19).

Fundamento: Es un método espectrofotométrico que se basa en la conversión de los carbohidratos a furfural o metil furfural, mediante una deshidratación con ácido sulfúrico y la formación de un compuesto colorido que se produce al reaccionar el furfural con la Antrona.

Material: Matraces Erlenmeyer 125 ml tubos de ensayo
 balanza analítica gradilla
 pipetas 1 ml, 5ml, 10ml espectrofotómetro:
 Spectronic
 probetas 20 Bausch & Lob.

Reactivos: a. Antrona: 0.2 g de Antrona en 100 ml. -
 de H_2SO_4 al 95% añadir con cuidado -
 y agitar constantemente. La solución
 se descarta si tiene color verde. Se
 guarda en frasco ámbar protegido de -
 la luz, en refrigeración.

b. Acido sulfúrico-agua: 14 - 6.

c. Solución de glucosa; 100 mg/lt

d. agua destilada.

Técnica: Pesar 10 mg. de la muestra seca, añadir 20 ml de la mezcla ácido sulfúrico-agua. Agitar para solubilizar. Tomar de esta solución 0.1 ml 0.5 ml y 1.0 ml, llevar a 1 ml. Colocar los tubos en un baño de hielo, añadir por las paredes del tubo 2 ml del reactivo de Antrona, de modo que las copas se estratifiquen y no se mezclen, al cabo de 2 a 3 min.

agitar para permitir la mezcla de la Antrona con el problema. La solución no debe adquirir un color -- verde, si ésto ocurre descartar. Llevar los tubos a un baño de agua hirviente, calentar por 10 minutos-exactamente. Enfriar los tubos, leer la absorban--cia en el espectro a 620 nm.

Curva de calibración.- Preparar una solución de glu cosa de 100 mg/litro. Desarrollar la técnica de An trona en c/u.

A.7) Determinación de proteína cruda por método colorimé trico (48,51)

Fundamento: La muestra es digerida con ácido sulfú--rico y catalizadores para destruir toda la materia órganica obteniendo una sal de amonio; la cual en el autoanalizador se hace reaccionar con NaOH para li-brar amoniaco, que reacciona con el fenol en presen cia de nitroprusiato de sodio que es el catalizador y de hipoclorito de sodio como agente oxidante. Se forma un complejo de color azul que se lee a 660 nm.

Material: Autoanalizador II Technicon colorimeter no. 371-
S.C. 74
Balanza Analítica matraces de diges--
Digestor tecator tión.
Agitador Vortex-Genie aparato Soxhlet
molino de martillos.

Reactivos:

a. Catalizadores: Sulfato de potasio ----- 99.0 g
Oxido de mercurio ----- 4.1 g
Sulfato de cobre ----- 0.8 g
se mezclan hasta homogeneizar
Acido sulfúrico ----- 10.0 ml

Para el auto-analizador II de Technicon:

a. Solución de NaOH al 20%:

Hidróxido de sodio 50% p/v	-----	400 g
Agua destilada	-----	1000 ml

el hidróxido se disuelve en 600 ml del agua, se enfría a temperatura ambiente y se diluye a un litro con el agua.

b. Solución de $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-NaCl}$

Acido sulfúrico RA	-----	7.5 ml
Cloruro de sodio	-----	100.0 g
Brij-35 solución 30%	-----	1.0 ml
Agua destilada	-----	1000.0 ml

se disuelve el cloruro de sodio en aproximadamente 600 ml de agua y se adiciona posteriormente el ácido, antes de aforar al volumen, añadir 1 ml de Brij.

c. Solución stock de tartrato de sodio y potasio al 20%.

Tartrato de sodio y potasio	-----	200.0 g
Agua destilada	-----	1000.0 ml

se disuelve la sal en 600 ml de agua, finalmente se lleva a volumen.

d. Solución reguladora:

Solución de tartrato de sodio y potasio al 20%	-----	250 ml
Solución de hidróxido de sodio al 20 %	-----	250 ml
Brij - 35 solución al 30 %	-----	1 ml
Agua destilada	-----	1000.0 ml

exactamente medidos se ponen los mililitros de las soluciones en un matraz aforado de 1 lt; agregando antes de aforar, la solución de Brij-35. Llevar a volumen con agua.

e. Solución salicilato de sodio-nitroprusiato de sodio:

Salicilato de sodio	-----	150 g
Nitroprusiato de sodio	-----	0.3 g
Brij-35 al 30%	-----	1.0 ml
Agua destilada	-----	1000.0 ml

se disuelve primero el salicilato y el nitroprusiato en aproximadamente 600 ml de agua, antes de aforar al volumen agregar el Brij.

f. Solución de hipoclorito de sodio:

Hipoclorito de sodio 5.25%	-----	6 ml
Brij-35 al 30%	-----	0.1 ml
Agua destilada	-----	1000.0 ml

se agrega la solución de hipoclorito en 600 ml de agua, se mezclan y antes de aforar agregar el Brij.

g. Solución de sulfato de amonio para la curva patrón:

Sulfato amonio	-----	236 mg
Agua destilada	-----	50 ml

el sulfato de amonio se disuelve en aproximadamente 30 ml de agua y posteriormente se lleva a un volumen final de 50 ml con agua destilada.

Técnica: Se pesan de 30 a 40 mg de muestra, malla de 60, previamente desengrasada (4-6 horas con éter) dentro de un matraz de digestión. Añadir 1 g de la mezcla de catalizadores y 2 ml de ácido sulfúrico - RA. Digerir por 1-2 horas, enfriar, añadir agua -- destilada hasta un volumen final de 75 ml, agitar -- en vortex. De este tubo se toma una muestra, se me

te al autoanalizador después de la curva patrón.

Curva patrón: de la solución de sulfato de amonio - se toman las siguientes alícuotas:

Alícuotas (ml)	Aforo (ml de agua destilada)	Concentración de Nitrógeno
0.1	50	2 x 10 ppm
0.2	"	4 x "
0.4	"	8 x "
0.6	"	12 x "
0.8	"	16 x "
1.0	"	20 x "
1.2	"	24 x "
1.4	"	28 x "

Cálculos: De la curva patrón se obtiene la pendiente (b_1), y la ordenada al origen (b_0), se sustituye en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de proteína: } \frac{\text{Lectura de la muestra} - \text{lectura del blanco}}{b_1 b_0} \times 75 \times 6.25$$

peso de la muestra x 10

donde: 75 : factor de dilución

10 : conversión de mg a g

6.25 : factor de conversión de Nitrógeno a proteínas.

A.8) Carbohidratos solubles (método de Dubois) (17).

Fundamento: Los monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, dan un complejo de color amarillo-naranja estable cuando se trata con fenol y ácido sul

fúrico.

Material:

1. Fotocolorímetro Leitz
2. Baño de agua a 25°C
3. Tubo de ensayo
4. Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 ml
5. Aparato vortex Genie
6. Matraces aforados de 50 ml

Reactivos:

1. Fenol al 5% en solución acuosa
2. Acido sulfúrico RA
3. Agua destilada

Técnica:

Del filtrado obtenido al separar la biomasa del medio de fermentación; tomar 0.5 ml de filtrado, depositar en un matraz aforado de 50 ml, llevar a volumen con agua destilada y homogeneizar. Tomar 2 ml de esta solución, con pipeta, depositar en los tubos de ensayo. Añadir 1 ml de la solución de fenol y con cuidado 5 ml de ácido sulfúrico. Dejar reposar por 10 minutos, agitar para posteriormente poner en el baño por 15 minutos. Después de eso leer la absorbancia a 490 nm.

Preparar una curva de calibración con puntos que vayan de 0 a 100 ug/ml de glucosa siguiendo el mismo método, graficar contra absorbancia, interpolar los valores obtenidos en los problemas.

A.9) Determinación de pH (17)

Material:

1. Vasos de precipitados de 100 ml
2. Potenciómetro Coleman
3. Piceta

Reactivos:

1. Solución Buffer pH 4.0
2. Agua destilada

Técnica:

Ajustar el aparato con la solución buffer, cuidando que ésta se encuentre a la misma temperatura que el filtrado. Tomar 50 ml de este último y en un vaso de precipitados proceder a la lectura del pH. Anotar resultado. Si hay más de un filtrado, ajustar el aparato entre cada lectura. Adoptar las precauciones necesarias en el manejo del aparato y ejecución de la técnica.

- A.10) Determinación del porcentaje de almidón en el caldo de fermentación (17.25).

Fundamento: El almidón forma un complejo con el I_2 de color azul que puede ser leído en el fotocolorímetro.

Material:

1. Fotocolorímetro Leitz
2. Pipetas graduadas de 1,2 y 10 ml
3. Tubos de ensayo.

Reactivos:

1. Acido clorhídrico IN: diluir el ácido concentrado RA 1:12.

2. Solución de Lugol: disolver 0.3 g de I_2 en 100 ml de una solución de KI al 3%.

3. Solución de almidón soluble al 1%.

Técnica:

Colocar un tubo de ensayo 0.2 ml del filtrado (o -- bien 0.1 ml de la solución de almidón al 1%), añadir 0.5 ml de HCl y 0.1 ml de lugol, llevar a un volumen final de 7 ml leer en el fotocolorímetro a 640 nm.

Cálculos:

Calcular la concentración del problema a partir del valor o obtenido con el testigo aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{conc. } x = \frac{(\text{conc. T}) (\text{lectura X})}{\text{lectura T}}$$

conc. X - concentración del problema
conc. T - concentración del testigo
lect. X - lectura del problema
lect. T - lectura del testigo

A.11) Determinación de sólidos totales (24,25)

Fundamento: Lo que se pretende es lo mismo que en la técnica de humedad, se procurará que el material --- pierda el agua no esencial que pueda alterar las determinaciones.

Material:

Papel filtro poro mediano	Pinzas para crisol
Vidrio de reloj	Mortero
Estufa	Embudo Buchner
Matraz Kitasato	Bomba de vacío

Técnica:

Los papeles filtro se ponen a peso constante en la estufa a 60°C por 3 horas. Enfriar el desecador a temperatura ambiente, pesar rápidamente. Estos se usan para recuperar los sólidos obtenidos en la (s)-fermentación (es), se filtra en un embudo Buchner con ayuda de una bomba de vacío. Lavar perfectamente con agua destilada los sólidos mientras están en el embudo, ésto con el fin de lavar cualquier sal soluble que pudiera interferir en las siguientes determinaciones. Pasar el papel filtro con los sólidos a un vidrio de reloj, poner a secar en la estufa a 60°C por 3 horas. Pasado este tiempo poner en el desecador, enfriar a temperatura ambiente, pesando rápidamente. Recuperar la biomasa, homogeneizar en mortero o molino, hasta polvo, guardar en frascos bien tapados en lugar fresco y seco para las siguientes determinaciones.

Cálculos:

Sólidos totales/volumen de medio A - B A: peso de papel filtro
B: peso tara de papel filtro

- A.12) Determinación de proteína cruda por el método de Nessler (17,25).

Fundamento: La muestra se digiere con ácido sulfúrico y catalizadores para destruir toda materia orgánica, obteniendo una sal de amonio; la cual reacciona con el reactivo de Nessler dando un complejo colorido que se lee a 415 nm.

Material:

Balanza Matraces aforados de 50 ml
Matraces de digestión
Kjeldhal Fotocolorímetro
Pipetas de 1,2,5 y 10ml Tubos de ensayo
Fuente de calor

Reactivos:

1. Mezcla digestora: 2g de CuSO_4 anhidro
 2g de ácido silenioso
 100g de Na_2SO_4
 500ml de agua destilada
 500ml de H_2SO_4
2. Nessler diluído: 300 ml de reactivo de Nessler -
 concentrado se diluyen a 1000 ml con NaOH 5N, des
 pués se lleva a 2000 ml con agua destilada.

Procedimiento:

Pesar mas o menos 25 mg de la muestra, se colocan en un matraz de digestión, adicionar 2 ml de mezcla digestora. Calentar hasta que la muestra dé un color - verde azulado; entonces calentar por 30 minutos más. Pasar al contenido cuantitativamente a un matraz aforado de 50 ml, diluir a volumen con agua destilada. Tomar 2 ml de esta solución, colocarlos en un tubo - de ensayo; a éstos añadir 5 ml de reactivo Nessler, leer inmediatamente en un fotocolorímetro a 415 nm. Interpolan los datos en una curva tipo de sulfato de amonio de 0 a 100 ug.

Curva-tipo:

Se prepara una solución de sulfato de amonio con una

concentración final de 100 ug/ml, se preparan alí--
cuotas de 0 a 100 ug, se les añade 5 ml de Nessler,
se lee a 415 nm en el fotocolorímetro.

A.13) Determinación de fósforo por molibdato de amonio ---
(17,30).

Fundamento:

La muestra se digiere con ácido perclórico para pre-
cipitar el fósforo, que al reaccionar con el molib-
dato de amonio hace que se forme un complejo de co-
lor azul que puede ser leído al fotocolorímetro.

Material:

Balanza analítica	Fuente de calor
Pipetas 1,2,5 y 10 ml	Fotocolorímetro Leitz
Tubos de ensayo grande	

Reactivos:

1. ácido perclórico RA
2. molibdato de amonio al 5% (p/v) en agua destila-
da
3. ácido ascórbico al 10% (p/v) en agua destilada
solución se guarda en refrigerador a 2--5°C y dura
varios meses.
4. ácido ascórbico al 0.02%. Se prepara a partir
de la solución de reserva arriba descrita y se
descarta inmediatamente (1 ml de 10% en 50 ml de
agua destilada).

Técnica:

- a) Poner 25 mg de muestra seca y homogeneizada.
- b) Poner la muestra en tubos de ensayo grandes, aña-
dir 2 ml de ácido perclórico RA.
- c) Calentar suavemente al principio para evaporar el

agua, después con mayor fuerza, hasta obtener un digerido incoloro.

- d) Si persisten partículas carbonizadas; añadir cuidadosamente 1 ó 2 gotas de peróxido de hidrógeno. Asegurarse que el reactivo desaparezca totalmente del medio de reacción.
- d) Remover los tubos de la zona de calentamiento. -- Enfriar y llevar a un volumen final de 5 ml.
- f) Añadir tubo por tubo en este orden:
 - 1. 0.2 ml de ácido ascórbico al 0.02 %
 - 2. 0.4 ml de molibdato de amonio al 5%

Agitar vigorosamente después de cada adición. Reposar por 10 minutos, leer en el fotocolorímetro a 640 nm (máximo 30 minutos después de la reacción).

Curva-patrón:

Se corre una curva-patrón con concentraciones de 0 a 100 mg de fósforo usando KH_2PO_4 , se sigue la técnica desde el paso f. La sal previamente se pone a secar a 105°C durante 2 horas

A.14) Determinación de DNA (desoxipentosas) (25.5,40)

Fundamento:

El ácido tricloroacético nos permite extraer el DNA de las células y su posterior hidrólisis; entonces -- la difenilamina al reaccionar con los azúcares residuales que originalmente estaban unidos a las purinas del DNA nos dan un complejo colorido que puede ser leído en un espectrofotómetro.

Material:

Balanza analítica - Tubos de ensayo

Pipetas de 1,2,5 y 20 ml - Canicas
Equipo para baño María - Espectrofotómetro modelo Spectronic
Centrífuga clínica - 20 de Bausch & Lomb

Reactivos:

1. Reactivo de difenilamina: 1 g de difenilamina recristalizada se disuelve en 100 ml de ácido acético glacial; añadir 2.75 ml de ácido sulfúrico RA. Si se ocupa posteriormente guardar en -- frasco oscuro protegido perfectamente de la luz y en el refrigerador. Procurar usar el reactivo fresco.
2. Acido tricloroacético al 5% de agua destilada -- (TCA)
3. Acido sulfúrico (RA).

Técnicas:

Pesar 25 mg de la muestra seca y homogeizada; adicionar 5 ml de TCA 5% calentar 30 minutos a 90°C. Posteriormente enfriar, centrifugar a 3000 rpm, 15 minutos. Tomar 2 ml del sobrenadante añadiéndoles 4-ml del reactivo de difenilamina, tapar los tubos -- con canicas, calentar en baño de agua a ebullición -- por 10 minutos; leer la absorbancia a 600 nm.

Cálculos:

Usando la siguiente fórmula se encuentra la concentración de DNA expresada como ug de fósforo/ml

$$\text{ug de fósforo/ml} = \frac{(\text{DO})_{600 \text{ nm}} \times \text{diámetro int. de la celda.}}{0.019}$$

También en este método se puede hacer uso de una --

curva patrón, mediante el siguiente procedimiento.

Curva-patrón:

La cepa a estudiar se siembra en tubos inclinados -
co agar Czapeck, se incuban a 29°C por 72 horas. --
Preparar matraces con caldo Czapeck en donde el mi-
croorganismo será propagado. Usando solución sali-
na estéril, inocular los matraces (10%v/v) e incu--
barlos en las siguientes condiciones:

---- temperatura: 29°C
---- agitación: 250 rpm
---- tiempo de incubación: 72 horas

Observar las debidas precauciones de esterilidad, -
los matraces se colocan en una placa de agitación.-
Recuperar el micelio por filtración al vacío, lavar
perfectamente con agua destilada. Secar a 60°C, du
rante 12 horas. Recuperar, moler hasta pulverizar.
Seguir el método para determinar desoxipentosas. Se
obtienen gráficas de: Absorbancia contra peso míce-
lial y absorbancia contra ug de fósforo/ml (usando-
fórmula).

A.15) Preparación del camote (17,25).

Materiales:

Cuchillo

Estufa de secado

Molino de cuchillas: Arthur H. Thomas & Co. Scientific
Apparatus

Frascos de vidrio

Técnica:

El camote es adquirido con un mismo proveedor, de -

ser posible, que lo expenda fácilmente y en suficiente cantidad. Efectuar un muestreo al azar evitando los que presenten algún tipo de pudrición (seca ó húmeda). En condiciones higienicas, el camote se lava, cortándolo en pedazos lo más fino posible. De aquí se harán dos porciones, pedazos con y sin cascara. Se colocan en charolas procediendo a seccarlas según cualquiera de éstos dos métodos:

- A. Las charolas se introducen en una estufa, se dejan secando por 24 horas a 60°C; cuidar que la estufa, tenga buena recirculación de aire para evitar condensaciones.
- B. Las charolas se tapan con gasa, para evitar contaminación por moscas etc., se exponen al sol -- hasta que estén completamente secos; mover de -- vez en cuando los pedazos para aumentar área de exposición.

Los pedazos secos se guardan para la siguiente etapa de molienda.

Se verifica que el equipo de molienda elegido esté completo y limpio, se procede a armarlo. Si es necesario, partir los pedazos secos a un tamaño que pueda pasar por la entrada del molino. Moler recuperando lo más posible del camote. Guardar el molido en frascos de vidrio limpios y en un lugar donde no les afecte la humedad. Preservar así hasta el momento en que será utilizado.

Para obtener una muestra representativa, utilizar el método del cuarteo, un muestreador que nos permita obtener muestras de diferentes partes del frasco; ó mezclar el contenido perfectamente.

croorganismo (2,35,36,49)

A.) Aislamiento:

Material:

Gradilla	Asa
Tubos de ensaye estériles	Matraces erlenmeyer de - 100 y 1000 ml
Pipetas de 1 y 5 ml estériles	Estufa de Secado
Cajas Petri estériles	Balanza
Tamiz malla # 100	

Reactivos:

Solución salina (0.9%) ésteril

Agar Rosa de Bengala (ARB):	Peptona	5 g
	Dextrosa	10 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
	KH ₂ PO ₄	1 g
	Rosa de Bengala (Sigma)		0.35 g
	Agar base (Difco)	20 g
	Agua destilada	100 ml

Disolver en caliente y ajustar pH a 5.4. Añadir --
100 ug/ml de estreptomycin después de esterilizar.

a.1 Frutos contaminados.

Se escogen frutos que tengan colonias sospechosas.
Se preparan las cajas con el ARB cortar con un bisturí una pequeña zona de la fruta donde se encuentre el hongo, de preferencia del centro, con todo y sustrato. Depositar sobre la superficie del agar, - tomar 2 ó 3 muestras para una misma caja, separando las lo más posible. Incubar a temperatura ambiente durante 48 -72 horas, observar resultados, si no -- hay crecimiento, dejar más tiempo, si lo hay seguir el punto (a.4).

a.2 Aire:

Las cajas de ARB se abren al aire durante 15 - 20 -- minutos en las áreas elegidas, pasando ese tiempo se cierran e incuban a temperatura ambiente durante 48-72 horas, observar resultados, si no hay crecimiento incubar más tiempo, si lo hay seguir el paso (a.4).

a.3 Tierra:

Se toman muestras de la tierra en áreas predetermi--nadas y que sean superficiales. Si la muestra de -- tierra está húmeda, dejamos que se seque después de lo cual cernir en un tamiz malla # 100. Se pesan -- 0.5 g de tierra cernida que se vertirán en tubos que contienen 4.5 ml de solución salina ésteril, de la -- siguiente manera: 0.5 g se agregan al tubo # 1, se homogeneiza; con una pipeta ésteril se toman 0.5 - ml del tubo, se pasan al tubo # 2, homogeneizar y -- continuar así hasta el tubo # 5, cuyos 0.5 ml se de--sechan. Las cajas con ARB se tienen ya preparadas, -- pero sin solidificar.

Se numeran éstas con clave, de cada uno de los tubos tomamos 0.5 ml que se vierten en las cajas (una caja para cada tubo), sobre la mesa hacemos un ocho para homogeneizar, dejamos solidificar, metemos a incubar a temperatura ambiente 48 - 72- horas, si al fin de éstas no hay resultados seguimos incubando, si los -- hay, seguir punto (1.4).

a.4 Conservación de cepas.

Una vez que hemos comprobado crecimiento en las ca--jas y que éste no esté extendido procedemos a sepa--rarlas. Preparamos tubos con Agar Inclinado, de ---

esta manera:

NaNO_3	3.0g	
K_2HPO_4	1.0g	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5g	
KCL	0.5g	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01g	Medio Agar Camote Czapeck
Harina de camote	20.0 g	(ACC)
Dextrosa	10 g	
Agar	20 g	
Agua destilada	1000 ml	

Seleccionamos las cepas que por su morfología macroscópica colonial sospechamos que son A. niger, según Raper (36). Con un asa estéril obtenemos una muestra de esporas las cuales depositaremos en el fondo del tubo, raspando la superficie del agar. Primero hacemos una punción, el raspado es del fondo a la salida. Incubamos a temperatura ambiente 48 - 72 horas hasta buena esporulación. Las cepas una vez identificadas se resiembran cada tres meses si no se utilizan con frecuencia. Se guardan en el refrigerador para evitar resequedad del medio y crecimiento abundante.

B.) Identificación macro y microscópica (2,35,36,41,49)

Material:

Cajas petri	Asa recta	Balanza
Triángulos de vidrio	Bisturí	Autoclave
Porta y cubre objetos	Pinzas	
Mechero	Incubadora	

Reactivos:

Agar Czapeck (Difco)	Solución salina (0.9)
Glicerol al 10%	Azul de lactofenol ó azul algodón

Técnica:

b.1 Identificación macroscópica:

- Prepara el agar Czapeck según las instrucciones del proveedor y esterilizar a 15 libras - por 15 minutos. Dejar enfriar sin solidificar para vaciar a las cajas.
- Lavar y esterilizar cajas Petri en número suficiente, vaciar el agar, homogeneizar, dejar solidificar perfectamente. Todo esto en condiciones de esterilidad.
- Tomar con el asa una muestra de los tubos que contienen la cepa pura, transfiriendo las colonias adheridas a posiciones seleccionadas - en el medio sólido, máximo 3 puntos por caja. Observar condiciones de esterilidad.
- Incubar las cajas a temperatura ambiente ---- (23-26°C), e ir observando el desarrollo colonial anotando todas las características que se vayan presentando, ayudándose con una lupa ó microscópio de disección, inclusive hasta - que la colonia esporule y termine de crecer. Comparar las observaciones anotadas con las - características que vienen en la bibliografía; Raper(36), Prescott(35), Alexopoulous (2), Segrétain(41), de esta manera clasificar a nuestros microorganismos.

b.2 Identificación microscópica:

- Lavar y secar perfectamente el material a utilizar; desengrasando con EtOH ó acetona el -- porta y cubre objetos. Disponer el material dentro de la caja de Petri como se indica en-

la figura 1, esterilizar a 15 libras por 15 minutos. ³

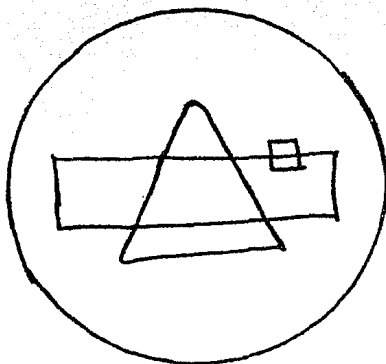


Figura 1

- Por separado preparamos una caja Petri con agar Czapeck. Esterilizamos el medio y la caja, vaciamos dejando solidificar, vigilar condiciones de esterilidad. Una vez sólido cortamos éste con un bisturí estéril, de tal manera que lleguemos a obtener cuadros de 1 cm².
- Con ayuda de pinzas flameadas colocamos el material de tal manera que sea fácil manipular y con el mínimo de movimientos se pueda sembrar. Con ayuda del bisturí se prepara un cuadrado, sin que se rompa, ponerlo sobre el portaobjetos, esto en condiciones estériles, sin abrir mucho la caja.

-- Con el asa recta tomar una muestra del hongo-problema, hacer una leve punción en una de las caras del cuadro de agar y a continuación frotar esa cara con el asa, hacer lo mismo en las otras caras, según la figura 2.

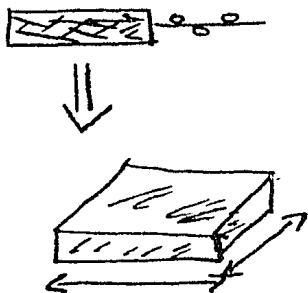


Figura 2

- Colocar el cubre objetos, con las pinzas flameadas, sobre el cuadro y presionar un poco para que se fijen ambos. Poner de 5-10 ml de solución salina estéril ó glicerol al 10% estéril, para evitar resequedad del medio.
- Poner a incubar a temperatura ambiente (23-26°C), observar a simple vista el microcultivo hasta que se observe el desarrollo visible fuera del cuadro; entonces agregamos formol al 10% durante 30 minutos para inactivar.

-- Con las pinzas separamos el cubre objetos del cuadro de agar, colocándolo sobre un porta objetos limpio y desengrasado, usar colorante - si es necesario. Quitar el cuadro de agar -- del porta objetos, ponerlo sobre el formol, - sacar el porta objetos poniéndole encima un - cubre objetos, si es necesario, agregar colorante a la preparación. Sellar la preparaciones con bálsamo de Canadá. Observar al microscopio las características morfológicas comparándolas con las señaladas en la bibliografía, que se especificaron en el punto b.1.

Las cepas que hayan sido positivamente identificadas se rotulan con una clave para su manejo anotando todas sus características observadas. Sacarles, si es posible, fotografías.

A.17) Método general de matraces (32,35).

Material:

Matraces erlenmeyer de 250 ml	
Plancha de agitación-incubación marca New Brunswick Sci. Company	
Tubos de ensayo	Potenciómetro
Asa micológica	Embudo Buchner
Probeta de 100 ml	Matraces Kitasato de 500 ml
Bomba de vacío	Balanza analítica
Pipetas	Autoclave
Vasos de precipitados	Mechero Fisher

Reactivos:

Solución salina estéril (0.85%)
Buffer pH 4.0
Agar base Czapeck, donde la fuente carbono es la harina de camote, en vez de la dextrosa (medio ACC)

Técnica:

3.1 Preparar los tubos de ensayo con agar base

Czapeck cuya fuente de carbono es la hari-
de camote, que será nuestro inóculo, este-
rificar a 15 libras durante 15 minutos.

3.2 Sembrar en condiciones estériles, los tu-
bos con la (s) cepa (s) en estudio e incu-
barlos a 28°C por 72 horas, en este tiempo
abundante esporulación.

3.3 Preparar el medio de fermentación, serán -
100 ml en matraces de 250 ml, tantos como
muestras se realizarán, con la siguiente
formulación:

Camote	3%
KH_2PO_4	0.25%
NH_4NO_3	0.25%
Agua destilada	...	100 ml

El pH inicial se ajusta a 3.5 con HCL, se-
esteriliza a 15 libras por 15 minutos y an-
tes de utilizarse se enfrían. Preparar tu-
bos de solución salina, esterilizarlos, el
volumen será el 10% en relación al volumen
de medio preparado.

3.4 En condiciones estériles inocular los ma-
traces de la siguiente manera:

- Verter 10 ml de solución salina estéril
en cada uno de los tubos de la (s) cepa-
(s) escogida (s) para su estudio; con a-
yuda de un asa estéril raspar la superfi-
cie del medio hasta obtener una suspen-
sión de esporas, una vez conseguido ésto,
vaciar en los matraces, 1 tubo por matraz.

3.5 Los matraces ya inoculado se ponen en la plancha de agitación, ajustando la velocidad de agitación a 250 rpm y la temperatura a 37°C; sacar los matraces desde las 0 horas hasta las 120 horas, según el plan de muestreo.

3.6 La biomasa se recupera por filtración al vacío usando papel filtro poro mediano, lavamos perfectamente los sólidos con agua destilada para que no haya interferencias posteriores por alguna sal. Una vez lavados, secamos en la estufa a 60°C por 12 horas -- (determinación de sólidos totales), posteriormente recuperamos y homogeneizamos para efectuarle las determinaciones acordadas.

3.7 El filtrado recuperado antes de lavar, caldo de fermentación, se guarda en frascos -- estériles, tratando de hacerle las determinaciones inmediatamente, si esto no es posible, guardar en el refrigerador. Hacer el análisis lo más rápidamente posible.

Nota. - el valor de algún parámetro puede -- variar, esto debido al tipo de experimento que se vaya a efectuar y a -- la información que se quiera obtener.

A.18) Método general para fermentador (4,12,32,35,42).

Material:

Tubos de ensayo	Matraz erlenmeyer de 1 lt
Estufa	Embudo Buchner
Autoclave	Matraz Kitasato de -- 250 ml, de 2 lt
Mechero	Bomba de vacío

Potenciómetro	Balanza
Embudo de talle corto	Papel filtro poro mediano
Plancha de agitación-incubación marca New Brunswick Sci. Co	
Fermentador New Brunswick Co Modelo M19 capacidad 5 ltos.	

Reactivos:

Buffer pH=4	Medio ACC (agar camote Czapeck)
Fenol al 10%	CuSO ₄ (solución saturada)
Medio de fermentación e inóculo	Camote 1.5 %
	KH ₂ PO ₄ 0.35%
	NH ₂ NO ₃ 0.5%

Procedimiento:

1. Preparar y esterilizar tubos de ensayo con el medio ACC que nos servirá de preinóculo para obtener las espora. Inóculamos, en condiciones estériles, con la cepa elegida e incubamos a 28°C durante 72 horas.
2. El medio de inoculación se hace en relación 10% (v/v) con respecto al volumen que se vaya a emplear de medio de fermentación, este sterilizamos a 15 libras durante 15 minutos, dejamos enfriar. Al mismo tiempo se prepara solución salina estéril que nos servirá para suspender las esporas, también ésta guarda una proporción 10% con respecto al volumen de inóculo.
3. Manteniendo, condiciones estériles verter la suspensión de esporas en el medio de ino

culación siguiendo los pasos de la técnica de matraces. Ponemos en la placa de agitación, colocamos los controles en los siguientes valores:

Temperatura: 37°C, agitación 250 rpm, dejamos incubando 60 horas.

4. Antes de que se cumplan las 60 horas, preparar el fermentador con el medio:

- Checamos que el equipo esté completo, limpio, que el vaso no presente estrelladuras.

- El medio de fermentación se efectúa como en la técnica de matraces, con la formulación anotada arriba, ajustamos el pH inicial al 3.5 con ácido clorhídrico 10%, posteriormente ensamblamos el fermentador metiéndolo a esterilizar a 15 libras durante 30 minutos, observando las precauciones pertinentes, dejamos enfriar. Una vez que el medio esté a temperatura ambiente, conectamos el aire, agua, etc., dejando aerear el medio por lo menos una hora. La aereación será v/v.

5. Ya teniendo listo procedemos a inocular el fermentador: En condiciones estériles vaciamos el inóculo en el medio de fermentación, nos ayudamos con un embudo estéril. Esto lo hacemos con rapidez y precisión para evitar derrames ó exposición prolongada del medio en el exterior. Los valores de los parámetros se ajustarán en los encontrados experimentalmente.

6. Se toma la muestra de T_0 y subsecuentemente se tomarán éstas cada 6 horas hasta completar 72 horas. Observar condiciones de esterilidad. Las muestras se colectan en frascos estériles, en un volumen igualitario y representativo que permitirá tener la suficiente para los análisis a sólidos y líquidos, (50 ml).
7. Lo colectado se recupera por filtración al vacío, a través de papel filtro poro mediano. El filtrado guardarlo en frascos estériles se analiza rápidamente para seguir el proceso. Los sólidos recuperados se secan a 60°C por 12 horas, analizándolos también rápido, seguir el desarrollo de la fermentación.
8. Una vez que se suspende la fermentación, recuperamos por filtración al vacío, procesamos como en el punto 7. Antes de lavar el equipo esterilizándolo para evitar contaminación.
9. Anotamos tiempos de muestreo, observaciones y cualquier cambio que le hagamos al proceso.

A N E X O

Los reactivos utilizados en la determinación analítica, son producidos por Merck, México. Así mismo, los reactivos líquidos usados.

Los buffers usados son los que fabrica Sigma de México.

Las sales para preparar los diferentes medio son de JT Baker de México.

Los indicadores y colorantes de Merck.

Los medios preparados comercialmente de Difco.

VII. RESULTADOS Y DISCUSION.

I. Obtención del microorganismo a prueba (aislamiento, - identificación, preservación).

CUADRO 1

Cepas obtenidas y procedencia

cepa (clave)	procedencia	observaciones
S-I	suelo (ENEP/Zaragoza campus I)	----
S-II	aire (ENEP/Zaragoza campus I, L-124)	----
S-III	aire (ENEP/Zaragoza campus I, L-122)	----
S-IV	papaya	excreción
S-V	aire (ENEP/Zaragoza campus II)	----
S-VI	suelo (Microbiología Farmacéutica)	----
S-VII	limón (Microbiología Farmacéutica)	excreción
S-VIII	suelo (parque de la Col. Gpe. Tepeyac)	excreción
S-IX	mandarina	----
S-X	naranja	excreción

En el cuadro 1, tenemos las cepas que se aislaron y las fuentes de donde proceden. Vemos que el hongo se encontró en sitios diversos. El aislamiento se hizo en agar Rosa de Bengala, las cepas aisladas se transfieren a tubos de gar -- Czapeck hasta las pruebas de identificación. De las cepas - aisladas 4 presentan excreción y 3 de estas provienen de - frutos contaminados; pero no tenemos en este trabajo eviden- cia como para establecer una relación entre la producción de la excreción y el sustrato. Tampoco poseemos la técnica para dilucidar la composición de la excreción.

Cuadro 2

Identificación y preservación de las cepas.

cepa (clave)	Identificación	coloración en ACC°	coloración conta (12 días)	minación
S-I	<u>Aspergillus niger</u>	variable	uniforme	(-)
S-II	<u>Aspergillus niger</u>	variable	uniforme	(-)
S-III	<u>Aspergillus niger</u>	variable	variable	(/)
S-IV	<u>Aspergillus niger</u>	variable	variable	(/)
S-V	<u>Aspergillus niger</u>	variable	uniforme	(-)
S-VI	<u>Aspergillus niger</u>	variable	uniforme	(-)
S-VII	<u>Aspergillus niger</u>	variable	variable	(/)
S-VIII	<u>Aspergillus niger</u>	variable	variable	(/)
S-IX	<u>Aspergillus niger</u>	variable	uniforme	(-)
S-X	<u>Aspergillus niger</u>	variable	uniforme	(-)

El cuadro 2 nos presenta los resultados de la identificación macro y microscópica de las cepas aisladas. Las 10 se caracterizan como Aspergillus niger, ya que tienen llenados los requisitos señalados por Raper (36) y Alexopolous (2) para este hongo.

Una vez identificadas las cepas se transfieren a tubos con agar Camote Czapeck (según fórmula del método), resembrándolas cada 3 meses y guardándolas en el refrigerador. Se toman microfotografías de las preparaciones y fotos a las cajas con el hongo aislado. Vemos también que al transferir el hongo al medio de mantenimiento se presentó coloración variable; que pensamos se podía deber a 3 causas: contaminación, adaptación o sensibilidad a la ausencia de algún elemento mineral en el medio, (36), (2), (35); de tal manera --

alargamos el período de incubación hasta obtener coloración uniforme del hongo. A los 12 días, 6 cepas uniformaron su color y 4 permanecieron igual. Se volvieron a tomar muestras para microcultivo, observándolas al microscopio, viéndose que las 6 estaban puras; y las otras 4 contaminadas. Este fenómeno de variabilidad no se volvió a presentar en las etapas posteriores de experimentación, aún cuando la resiembra era frecuente. La razón de la variación fue la adaptación al medio.

II. Preparación del sustrato (secado, molienda, preparación y análisis bromatológico del camote).

Cuadro 3

Análisis bromatológicos (% en base seca) CAMOTE.

%humedad	%prots.	%grasas	%fibra	%cenizas	%c.h.	%almidón	referencia
70.9	1.575	0.76	1.61	2.425	23.43	----	experimental
----	1.0	0.4	----	----	24.0	----	(14)
68.5	1.8	0.7	1.00	1.07	27.9	20.2	(28)

En el cuadro 3, tenemos los resultados del análisis bromatológicos del camote, las cuales servirán para contrastar con los que se obtendrán sobre la biomasa, para ver en que grado se cumplieron los objetivos planteados. Junto a los datos experimentales pusimos los resultados obtenidos en México (14) y E.U.A. (28), para situar los valores experimentales. Vemos que éstos no están muy distantes de los teóricos. Constatamos la preeminencia de los carbohidratos sobre las proteínas y que la mayor parte de éstos se encuentran en forma de almidón.

Se utilizaron 2 métodos de secado, el primero fue en es-

tufa, pero se tuvieron problemas de espacio, además el camote se oscureció, presentando caramelización de algunos trozos. Por lo tanto, se optó por secarlo al sol, en donde no tuvimos estos problemas.

La molienda se efectuó sin problemas, guardando el molido en frascos de vidrio en lugar fresco y seco.

III. Selección de cepa, temperatura y medio.

Cuadro 4

Sólidos totales (g/100 ml)

Tiempo horas	cepa medio	I		II		III		Temperatura
		α	β	α	β	α	β	
0		0.1508	0.1382	0.1998	0.1875	0.1803	0.1056	37 °C
12		0.6769	0.6966	0.6227	0.6545	0.7297	0.5920	
24		0.9605	1.1067	0.7631	0.8496	0.8190	0.9707	
48		1.0861	1.1091	1.0824	1.1448	0.9689	0.9121	
72		1.1621	1.1872	1.2142	1.2274	1.5090	1.5410	
0		0.0681	0.0714	0.0629	0.0561	0.1368	0.2429	45 °C
12		0.0963	0.0792	0.1071	0.0980	0.1640	0.2770	
24		0.1489	0.0986	0.1630	0.1778	0.2382	0.8806	
48		0.8173	0.8588	0.8116	0.8564	0.9894	0.0094	
72		0.9022	0.9541	1.1491	0.0946	1.1678	1.1497	
0		0.0463	0.0646	0.0920	0.0520	0.0263	0.0711	50 °C
12		0.1682	0.1617	0.1264	0.1225	0.1492	0.1447	
24		0.3714	0.4385	0.4294	0.4598	0.4375	0.4532	
48		0.6306	0.6527	0.5897	0.5954	0.6367	0.6971	
72		0.6727	0.6880	0.6529	0.6051	0.6884	0.6947	

En este cuadro tenemos los resultados del incremento de sólidos totales con respecto al tiempo. Vemos que los mejores se inclinan hacia la cepa III en todas las temperaturas; de éstas la que demostró mejores resultados fué la de 37°C.

Con respecto al medio no hay una definición clara, aunque -- los valores más altos, de todos, los observamos con el medio B. Sin embargo, hay que integrar éstos resultados con los -- demás para obtener las conclusiones pertinentes.

Cuadro 5

Fósforo (desoxipentosas) ug/ml.

cepa	I		II		III		Temperatura
	α	B	α	B	α	B	
tiempo medio horas							
0	442.10	236.84	300.00	205.36	300.00	157.89	
12	489.47	457.89	489.47	236.84	442.10	236.84	
24	552.63	552.63	552.63	300.00	489.47	394.73	37°C
48	572.44	157.89	647.36	615.78	647.36	489.47	
72	489.47	600.00	710.52	552.63	615.78	631.57	
0	205.26	173.68	17.78	173.68	75.94	142.10	
12	331.57	457.5	159.47	236.84	142.10	300.00	
24	300.00	331.57	394.73	159.47	473.68	489.47	45°C
48	331.57	331.57	489.47	505.26	584.21	505.26	
72	394.73	615.57	631.57	805.26	615.785	552.63	

Aquí se presentan los resultados del incremento de las desoxipentosas, expresadas como fósforo, con respecto al --- tiempo. No hay una clara definición de una tendencia específica que señale un valor en especial de cualquier parámetro; por lo que hay que esperar el análisis de los demás resultados. En el cuadro 6 tenemos lo mismo, pero esta vez restándose el valor de T_0 de los demás, para señalar como se ven las curvas de ése modo.

Cuadro 6

Fósforo (desoxipentosas) (tx-To) ug/ml.

cepa		I		II		III		temperatura
tiempo horas	medio	α	B	α	B	α	B	
0		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
12		47.36	221.05	189.47	31.58	142.10	78.95	
24		110.52	315.79	252.63	94.74	189.47	236.85	
48		-	-	347.36	410.25	347.36	331.58	37 °C
72		47.36	363.36	410.52	347.35	315.78	473.68	
0		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
12		126.31	283.82	143.68	63.24	66.10	157.89	
24		94.74	157.89	348.95	-----	397.73	347.42	45 °C
48		126.31	-----	473.68	331.58	508.25	363.15	
72		189.47	442.10	615.79	631.58	539.78	410.62	

Cuadro 7

% de proteína cruda (mg/100 mg)

cepa		I		II		III		temperatura
tiempo horas	medio	α	B	α	B	α	B	
72		21.24	23.25	20.65	29.96	23.86	29.94	37 °C
72		24.89	23.51	19.09	33.31	26.90	21.60	45 °C
72		11.76	9.32	14.31	15.4	8.58	9.32	50 °C

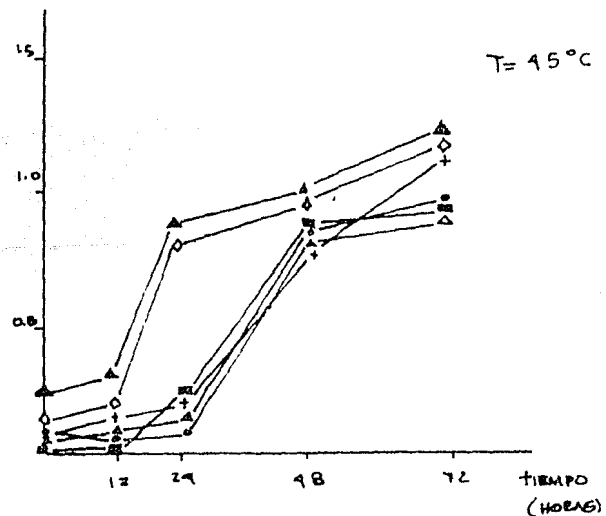
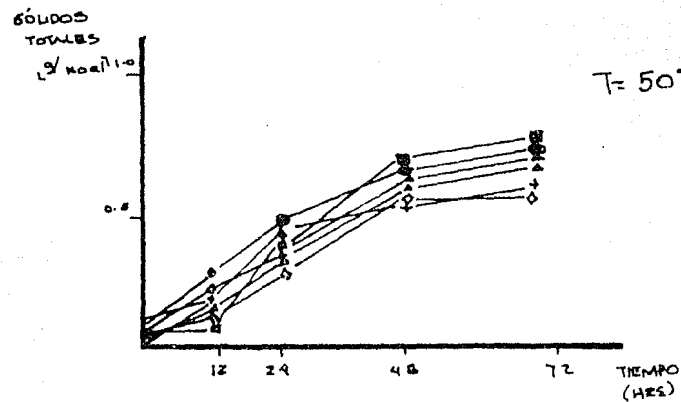
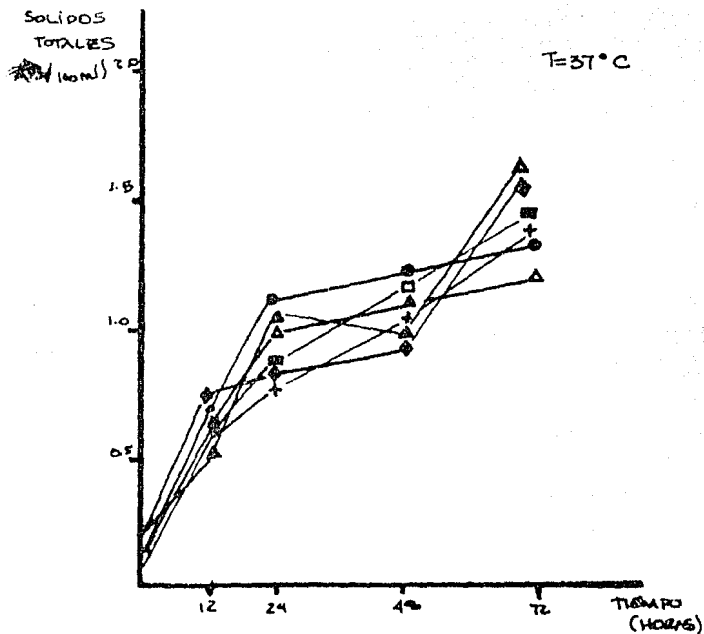
Se presentan los resultados de % de proteína cruda en -- las muestras de 72 horas. Como vemos los mejores se dan en -- cepa II, medio B en 37 y 45 °C.

Cuadro 8

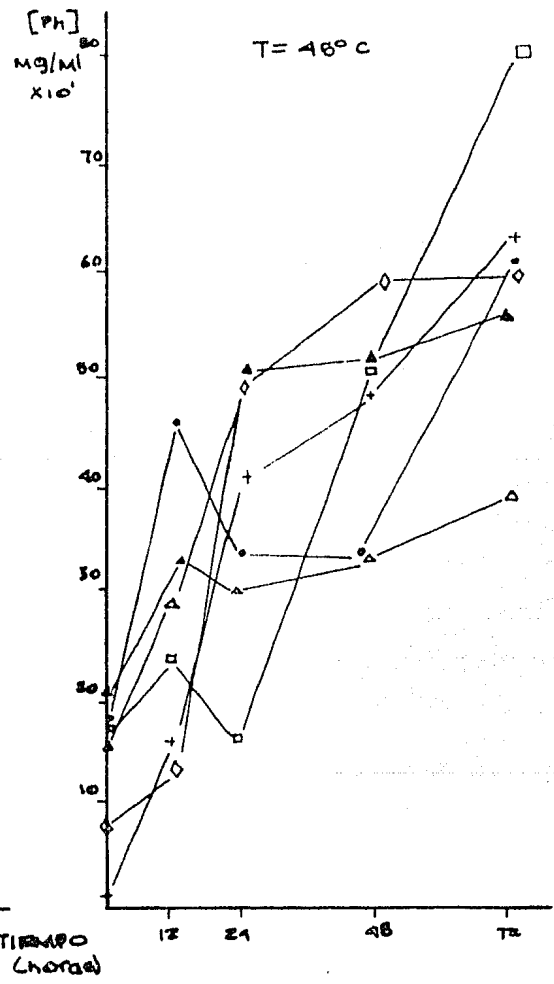
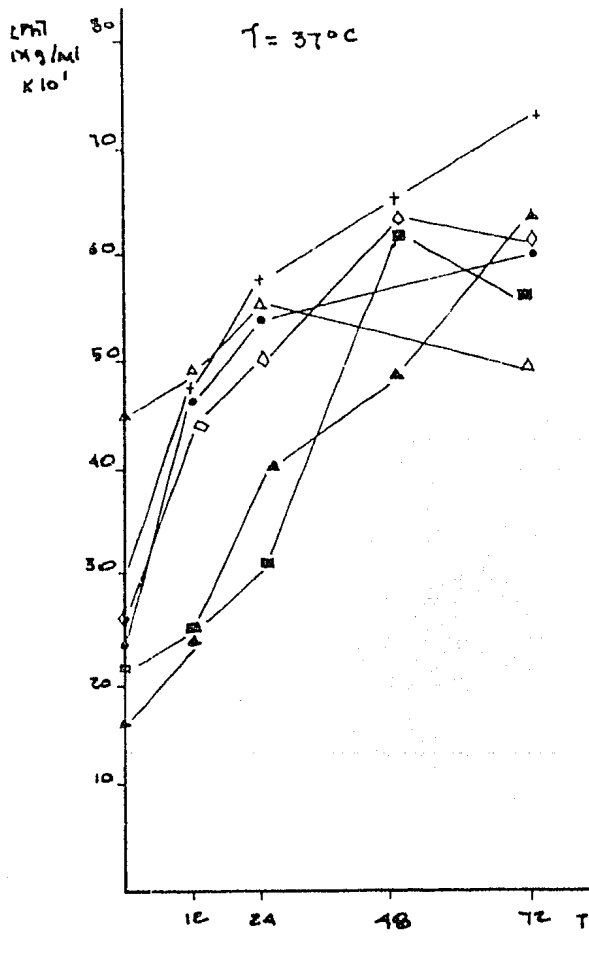
Resultados individuales de cepa II a 37 °C.

tiempo--medio--	vol. de crec.--	c. h. solubles--	prots. solubles--	pH --	
0	5.9	92.63	35.16	4.3	
12	6.2	53.27	52.30	3.5	
24	8.7	43.14	60.35	3.35	
48	20.0	29.58	48.28	3.39	
72	29.0	17.67	43.85	3.1	
0	B	5.7	92.32	52.30	4.2
12	B	6.5	51.18	60.35	3.51
24	B	9.5	40.40	68.22	3.35
48	B	18.0	28.58	48.28	3.25
72	B	30.0	18.06	40.63	3.21
horas		ml/100ml	ug/ml	ug/ml	unidades

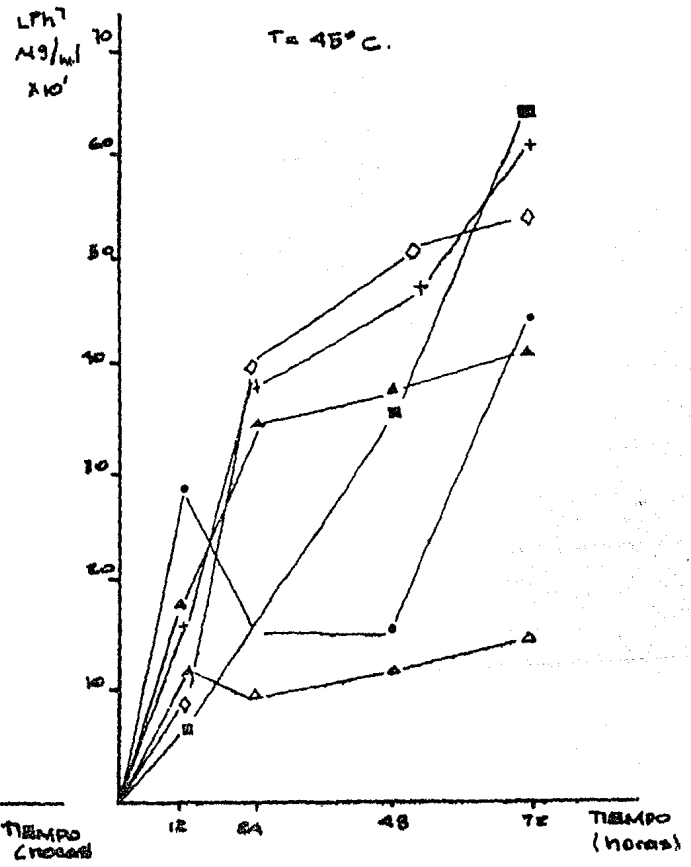
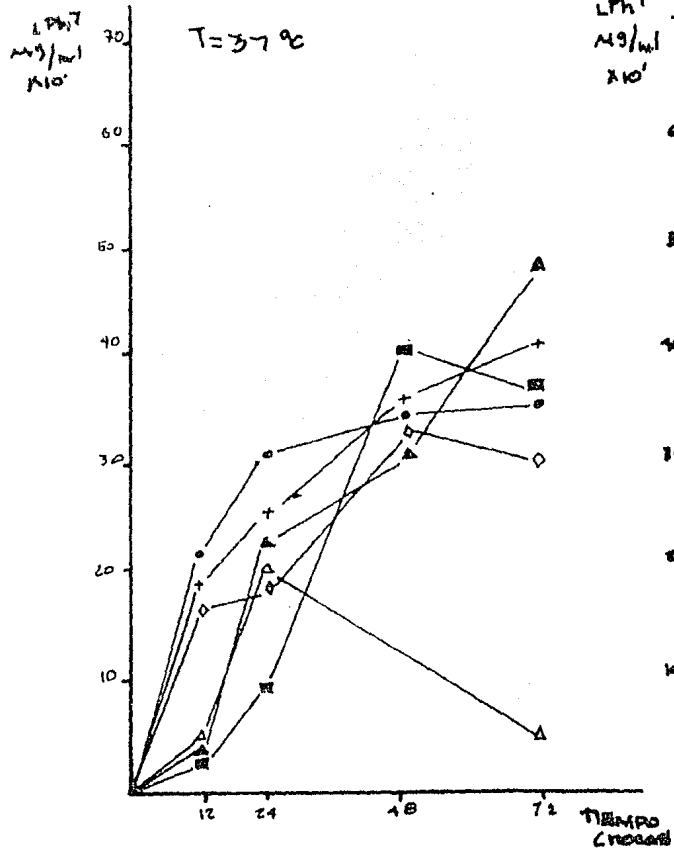
Para probar los métodos analíticos que se podrían usar se utilizaron las biomasas obtenidas con la cepa II a 37 °C. Los resultados los vemos en cuadro 8.



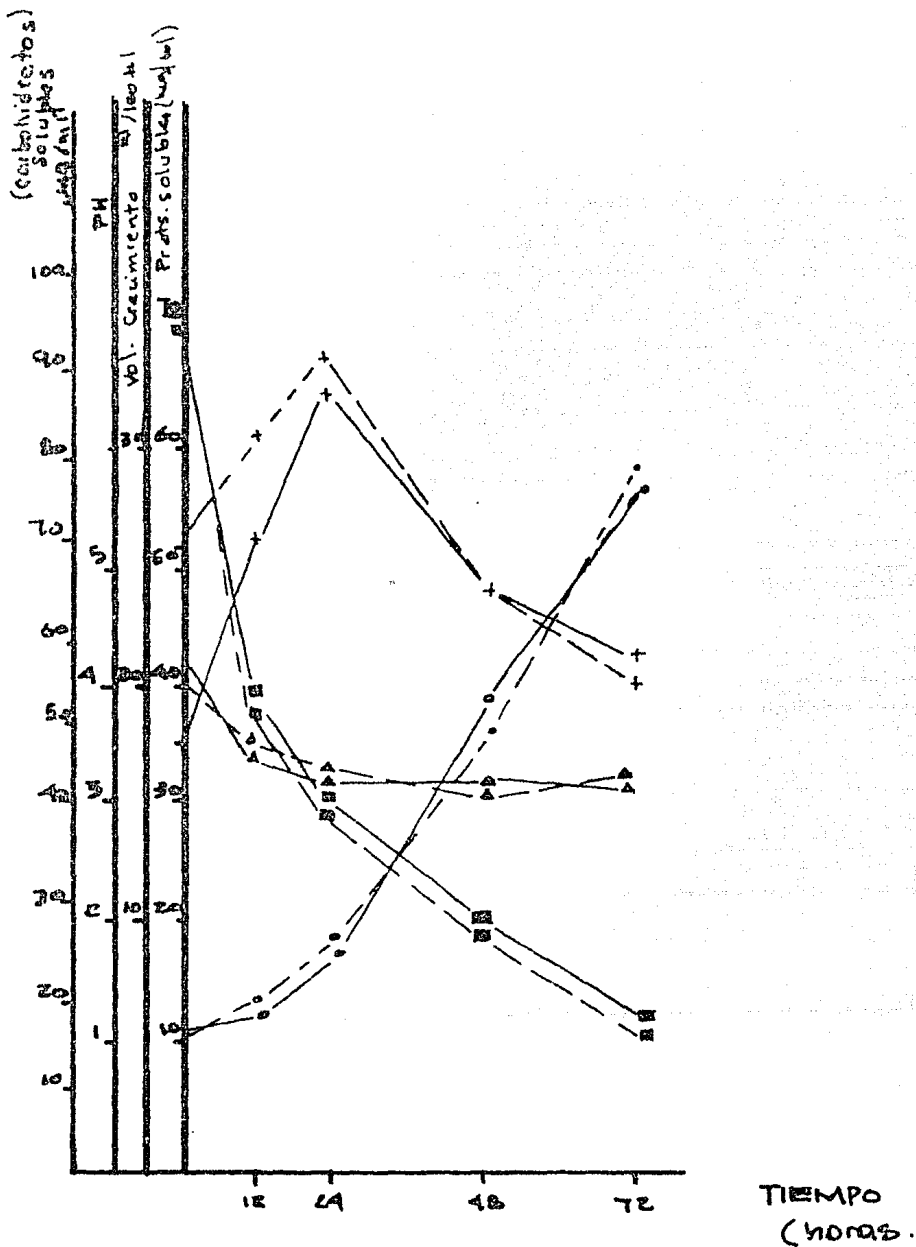
Gráfica A: Incremento de sólidos totales contra tiempo en el experimento de selección de cepa, temperatura y medio. (Δ - Δ : cepa I, medio α ; \bullet - \bullet : cepa I, medio β ; + - +: cepa II, - medio α ; \square - \square : cepa II medio β ; \circ - \circ : cepa III, medio α ; \triangle - \triangle cepa III, ϕ medio).



Gráfica B: Crecimiento del hongo reportado como incrementos de desoxidentosina (unidad de fósforo) a diferentes temperaturas. (A-Δ: cepa I, medio α, ●-○: cepa I, medio β, +: cepa II, medio α, ■-■: cepa II, medio β, ◆-◆: cepa III, medio β, ▲-▲: cepa III, medio α, ○-○: cepa III, medio β).

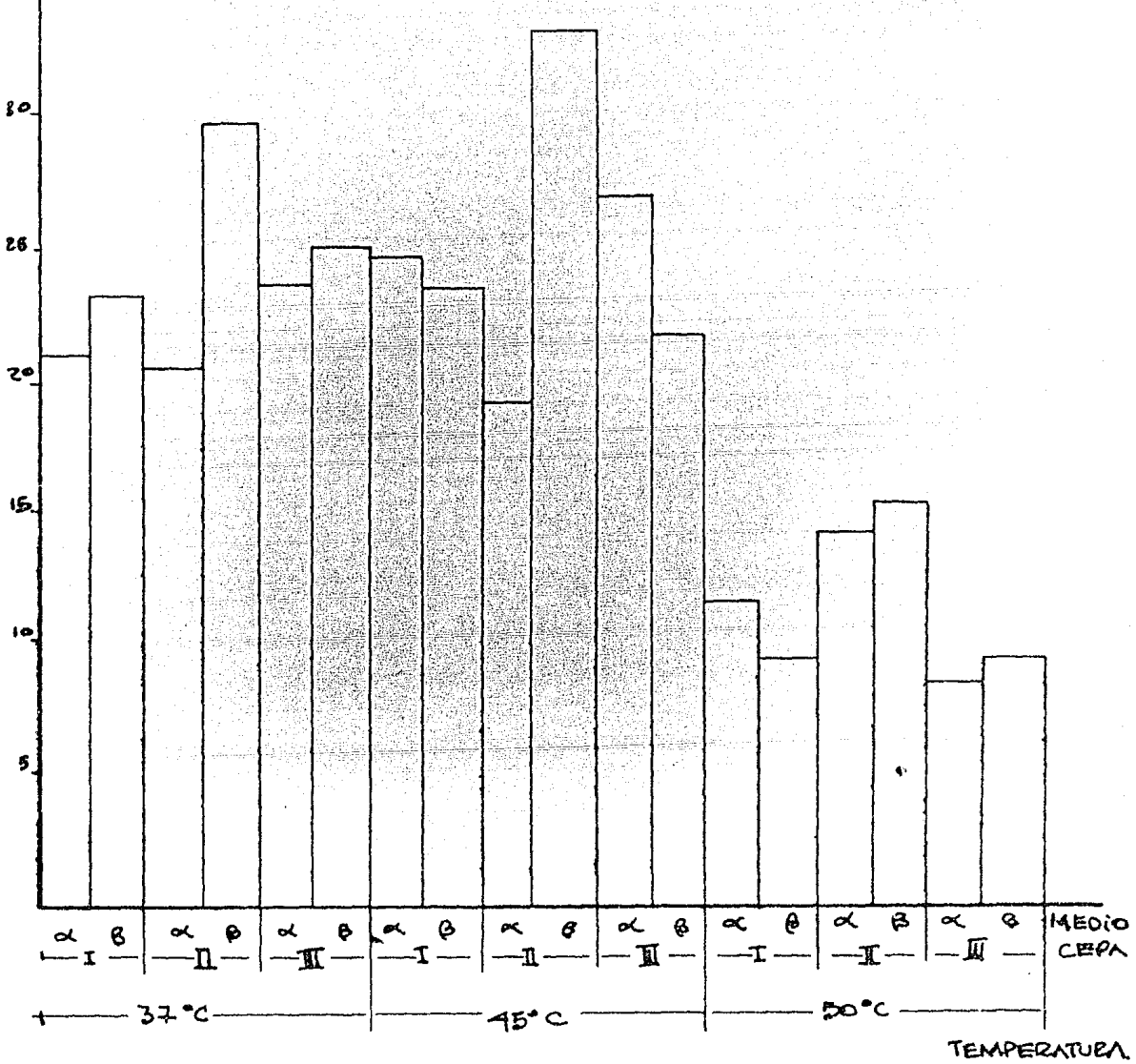


Gráfica C : Crecimiento del hongo donde (Phen-PhtO).
 (▲-▲ : cepa I, medio α , ●-● : cepa I, medio β , +--+ : cepa II, medio α , ■-■ : cepa II, medio β , ○-○ : cepa III, medio α , ▲-▲ : cepa II, medio β).



Gráfica D: Resultados individuales de cepa II, t=37°C en diferentes medios. (Δ - Δ): pH, (+) proteínas solubles, (o) volumen de crecimiento, (\square) carbohidratos solubles, (—) medio α , (---) medio β).

% Proteína
Cruda
(Cálculo)



Gráfica E: % proteína cruda obtenida en diversas condiciones de fermentación.

TEMPERATURA

Con respecto a los resultados obtenidos, vemos que éstos no nos definen qué temperatura utilizar entre las de 37 y 45 °C, aunque la de 50°C se descarta por valores bajos en todas las determinaciones. En el cuadro 4, observamos, en sólidos totales, que la mayoría de los valores más altos los tenemos en 37°C, lo que corroboramos en gráfica A. Por el contrario, los valores de fósforo no siguen el mismo comportamiento, teniendo una distribución de los valores más altos en ambas temperaturas; ya graficados, el crecimiento más regular lo obtuvimos en las cinéticas corridas a 37°C, gráficas B y C. Pero sobre todo al ver los valores de proteína, cuadro 7 y gráfica E, nos podríamos inclinar por usar 45°C, ya que ahí aparece el valor más alto de % de proteína, empero el de 37° no está muy lejano; por esto con los resultados anteriores, tenemos necesidad de aclarar cual de las 2 temperaturas se usarán. Hay que añadir la búsqueda de lo variable de las curvas de crecimiento, entonces hay que montar un experimento que despeje estas dudas.

En relación al medio, la mayoría de los resultados señalan hacia el uso de B como el adecuado, con ésto reforzamos la idea de aprovechar, en esta clase de procesos, el sustrato escogido integralmente. También se comprobó, en cierta medida, que la cáscara permite el crecimiento del hongo no descubriendo algún efecto inhibitorio por parte de la misma.

Los resultados obtenidos señalan a la cepa II como la indicada para usarse, ya que tuvo el porcentaje más alto de proteínas, buenos valores de sólidos totales y regularidad en su curva de crecimiento; el factor de decisión o fiel de la balanza para decidir usar esta cepa fué el contenido de proteínas.

Por lo tanto, 2 de las 3 variables buscadas, tienen va-

lor asignado ya, quedando pendiente la tercera: temperatura, a ser dilucidada en el siguiente experimento. Como tenemos medio en suspensión y no soluble, los sólidos totales se componen de micelio y partículas que no han sido degradadas, por eso se busca un método alternativo para medir crecimiento, ya que peso seco se vería interferido por esas partículas, no pudiendo garantizar que lo obtenido sea puro micelio, reflejo fiel del crecimiento.

Los métodos a utilizarse en los siguientes experimentos se prueban en los matraces de la cinética de cepa II a 37°C. En cuanto a proteínas solubles, es notorio un incremento y decremento de ellas, como vemos en gráfica D, la explicación más plausible, es que se debe a la excreción de exoenzimas degradantes que permiten aprovechar las partículas del medio al hongo. En esa misma gráfica vemos los resultados de otros métodos; carbohidratos solubles refleja la disminución de éstos en el medio, señal del aprovechamiento de éstos por el hongo. El volumen de crecimiento se descarta como método de crecimiento, ya que resultó ser inexacto por las características del micelio que no se compactó al centrifugar, lo que dio pie a suspicacias de su eficiencia. Vemos que el pH baja conforme transcurre la fermentación.

VI. Series de corroboración.

Cuadro 9

Resultados de series de corroboración.

tiempo--- horas	pH---	peso seco ---	fósforo ---	c. h. soluble	% prot.--- cruda	temperatura
0	4.2	0.7871	0.00	797.36	96.71	37
12	3.85	0.8331	110.52	907.89	62.34	37
24	3.25	0.8886	157.89	955.26	41.58	37
48	3.20	1.0669	339.19	1136.84	27.63	37
72	3.05	1.3799	488.64	1286.05	18.84	37
96	3.00	1.3825	615.79	1413.55	12.45	37
120	3.05	1.4282	647.37	1444.73	8.21	37
0	4.25	0.6451	0.00	621.05	98.94	45
12	4.20	0.6651	50.00	671.05	80.45	45
24	4.20	0.6833	16.57	637.625	69.33	45
48	4.00	0.7163	34.21	655.26	55.22	45
72	3.80	0.7309	26.31	647.36	44.89	45
96	3.60	0.9709	302.63	923.68	19.73	45
120	3.50	1.0634	444.58	1028.33	10.63	45

(g/100 ml)

ug/ml

ug/ml

mg/100 mg

En el cuadro 9 y gráfica F, G, H, podemos apreciar la diferencia en los resultados obtenidos a 37°C y 45°C; siendo mejores aquéllos resultantes de emplear 37°C. Las curvas de -- crecimiento se observan más regulares que en el experimento anterior y en este caso, guardan cierta similitud con las de sólidos totales, especialmente las de 37°C. Vemos que la curva de crecimiento a 45 °C nos indica que la fase de adaptación es mayor que a 37 °C y a las 120 horas; todavía nos encontramos en fase de crecimiento, lo que no ocurre en 37 grados, donde podemos considerar las 96 horas como el punto en el cual la curva se acuesta y entra en fase estacionaria, por lo que en los siguien

tes experimentos este va a ser nuestro tiempo máximo de incubación.

Es de comentar la capacidad que tiene el hongo para bajar el pH del medio. Se ajusta a 3.5 antes de esterilizar -- y tenemos que el pH sube después de esta operación. A lo largo de la fermentación el hongo produce ácidos (cítrico principalmente) que bajan el pH del medio. Esta baja en los valores fué más notoria a 37 que a 45 °C. El valor de proteína - obtenido a los 37°C es más alto que a 45 °C. Como éste parámetro es el fiel de la balanza nos la inclina definitivamente a utilizar 37°C como temperatura de incubación en el resto -- del proyecto.

Este experimento se denominó: "series de corroboración", ya que sirvió para decidir la temperatura a utilizar en los - futuros experimentos. Esta vez se contó con mayor espacio - en la plancha de agitación, por lo que se aumentó el tiempo - de incubación a 120 horas. Hay que hacer notar que en el ex - perimento hay un cambio respecto al anterior en lo que se re - fiere al inóculo. Este se propagaba en un medio especial -- (Moyer) y se agregaba un cierto volumen de micelio (10% v/v) al matraz de fermentación. Como lo que se adicionaba era po - co, se tenían problemas de manejo, especialmente variabili - dad en la cantidad de micelio agregado. Posiblemente esto - causó la irregularidad que presentaban algunas curvas de cre - cimiento. Esta ocasión lo que hicimos fue utilizar las espo - ras como inóculo, tal cual lo señala el método general de ma - trices.

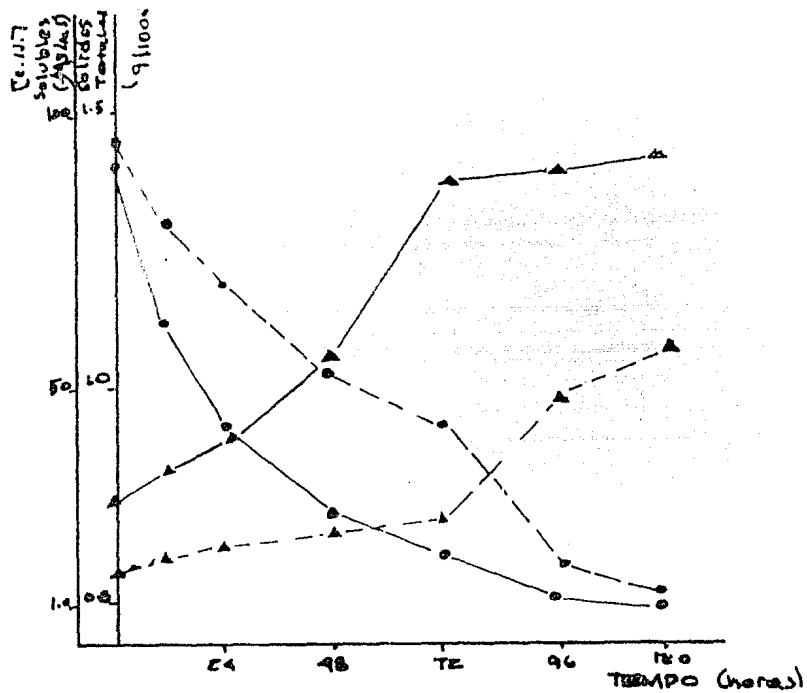


Figura 1: Resultados de series de corroboración, disminución de carbohidratos solubles y aumento de sólidos totales contra tiempo.
 (▲-▲) = carbohidratos solubles, (●-●) = sólidos totales, (—) = 37°C, (---) = 45°C.

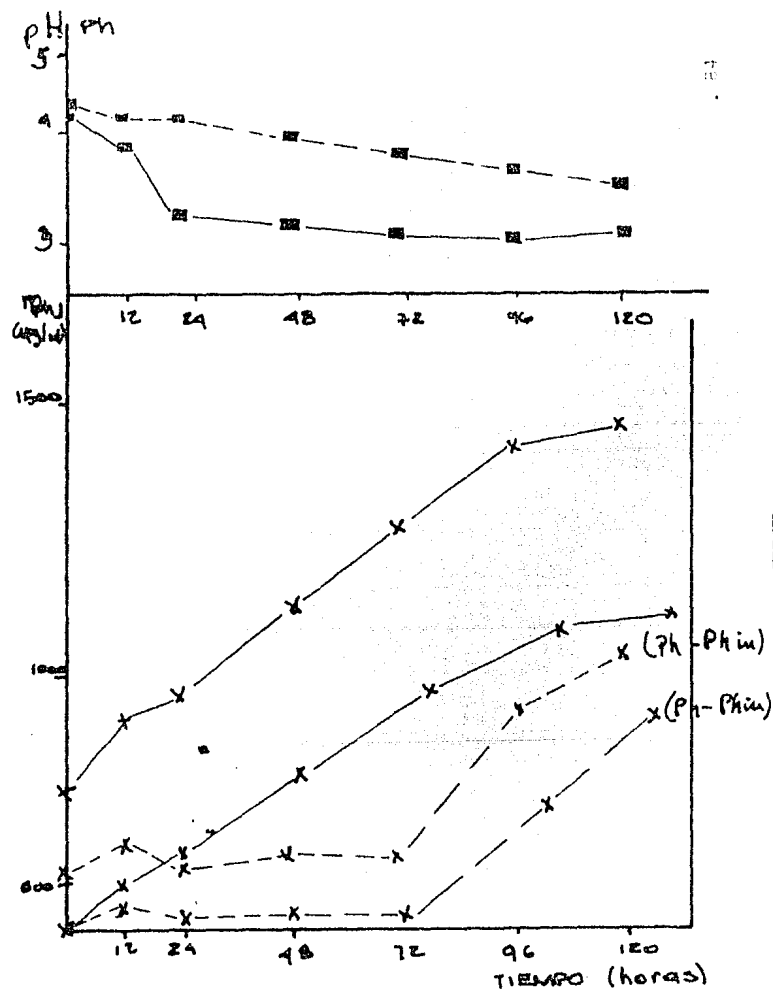
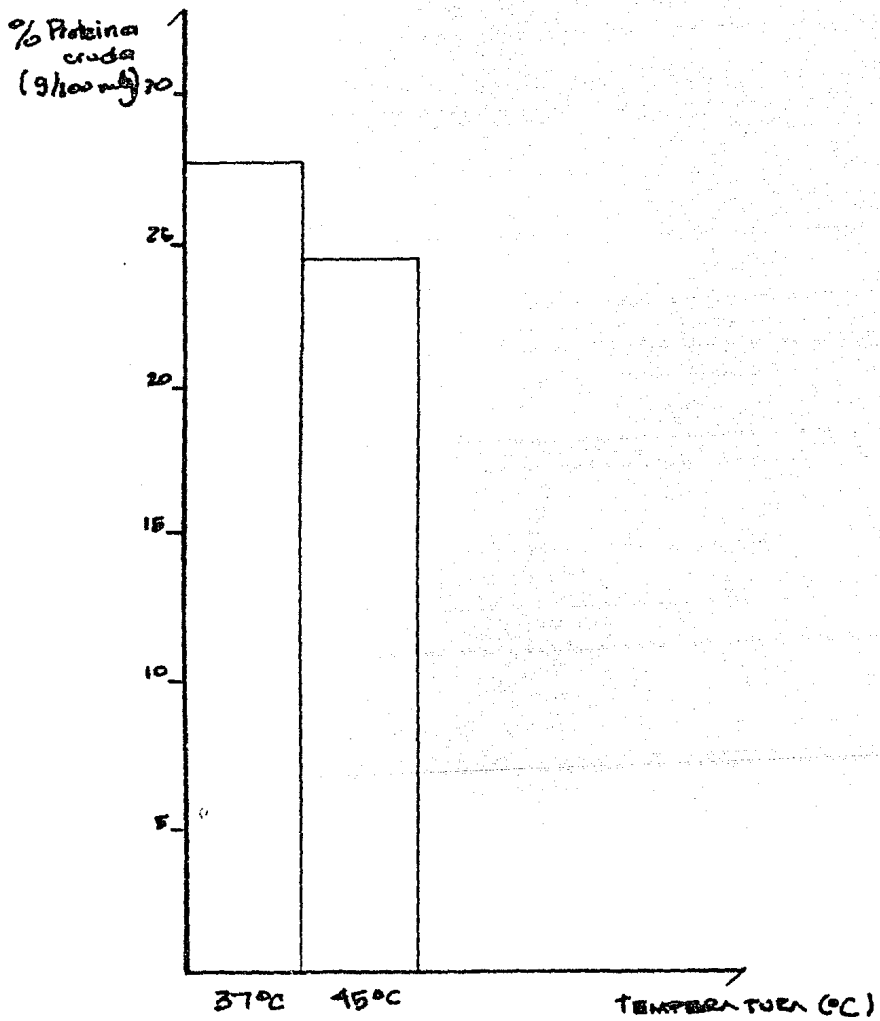


Figura 2: Variación del pH del residuo y aumento del contenido de fósforo.
 (■-■) pH, (x-x) fósforo, (—) = 37°C, (---) = 45°C.



Gráfica H: Contenido de proteína cruda en la biomasa obtenida a las 96 horas.

V. Efecto del pH sobre el crecimiento.

Cuadro 10

Resultados experimentales

tiempo/pH (horas)	sólidos totales (g/100 ml)				pH			
	2.5	3.5	4.5	6.0	2.5	3.5	4.5	6.0
0	0.3576	0.3029	0.2194	0.2962	3.4 ^a	4.5	4.7	5.55
12	0.7773	0.8206	0.8923	0.6428	3.00	3.31	3.45	3.8
24	0.9537	1.0043	1.0627	1.0079	2.85	3.45	3.51	3.5
48	1.1279	1.2127	1.1399	1.0728	3.05	3.1	3.1	3.25
72	1.1417	1.2175	1.2667	1.2258	2.75	3.05	3.11	3.19
92	1.1788	1.2066	1.1870	1.1386	2.8	3.2	3.2	3.3

En este cuadro tenemos los resultados experimentales de la variación del pH inicial del medio, vemos los correspondientes a sólidos totales y pH.

Cuadro 11

Resultados experimentales

tiempo/pH (horas)	carbohidratos solubles				fósforo (ug/ml)			
	2.5	3.5	4.5	6.0	2.5	3.5	4.5	6.0
0	93.73	92.43	89.51	88.39	1215.78	892.10	876.31	844.73
12	80.54	79.5	68.14	68.37	8468.83	3165.78	4776.31	7997.36
24	62.13	64.84	59.99	60.33	1547.36	2778.94	1839.46	1736.84
48	53.49	52.03	49.73	51.25	1042.10	1466.41	2922.94	2313.15
72	43.93	38.65	41.73	40.48	2105.60	3434.20	2257.99	3268.41
92	22.83	16.15	20.45	23.76	4073.68	2652.62	2115.78	1957.89

Aquí vemos al consumo de carbohidratos solubles, y por otro lado el comportamiento de las desoxipentosas reportadas como fósforo.

Cuadro 12

	% de Proteína Cruda (mg/100 mg)			
tiempo/pH horas	2.5	3.5	4.5	6.0
72	20.7	23.41	21.07	21.74

En este experimento, se hacen 4 variaciones sobre el pH inicial del medio para determinar cual de los valores propuestos es el que dá mejores resultados.

En el cuadro 10 y gráfica I vemos, el comportamiento de los sólidos totales. A 2.5 de pH, éstos continúan aumentando a las 92 horas, lo que en 3.5 se nota como un estancamiento y en los valores superiores de pH una franca disminución de sólidos en el mismo tiempo. Tenemos, así mismo, los resultados de proteínas, cuadro 12, obteniendo el valor más alto en pH -- 3.5, que es el que se había manejado desde el principio con lo que confirmamos su uso subsecuente. Comparada con otros experimentos, la cantidad de proteínas es menor, esto puede deberse a que entre las 12 a las 24 horas, se disminuyó la velocidad de agitación, restableciéndose la correcta (250 rpm) a partir de ese tiempo.

Sigue mostrando el hongo su capacidad de producción de ácidos, y según vemos en el cuadro 10, al aumentar el pH inicial, al parecer se incrementa la eficiencia de síntesis y excreción de ácidos para bajar el pH del medio a valores alrededor de 3.0. Los carbohidratos solubles se consumen y decrece su concentración, cuadro 11 y gráfica J, pero todavía queda un remanente al momento que la curva se acuesta como en los experimentos pasados, además, de sólidos sin desgrasar, ---

cosas que podrían ser aprovechadas en otro tipo de fermentación y nos hace sospechar que el nutriente limitante es otro diferente a la fuente de carbono. En cuadro 11 y gráfica L, vemos que se volvió a mostrar irregularidad en los resultados de fósforo, destacándose el valor a las 12 horas, que --- está muy por encima de los demás. Se hicieron varias modificaciones al método de desoxipentosas, basándonos en los artículos originales, (5) y (40), pero no desapareció la interferencia. Se observó que en los tubos de desarrollo de color correspondientes a 12 horas, se presentaba un color diferente al de los demás, aparte de ser más intenso; por lo que se decidió cambiar de método para determinación de crecimiento, montándose un experimento para probarlo.

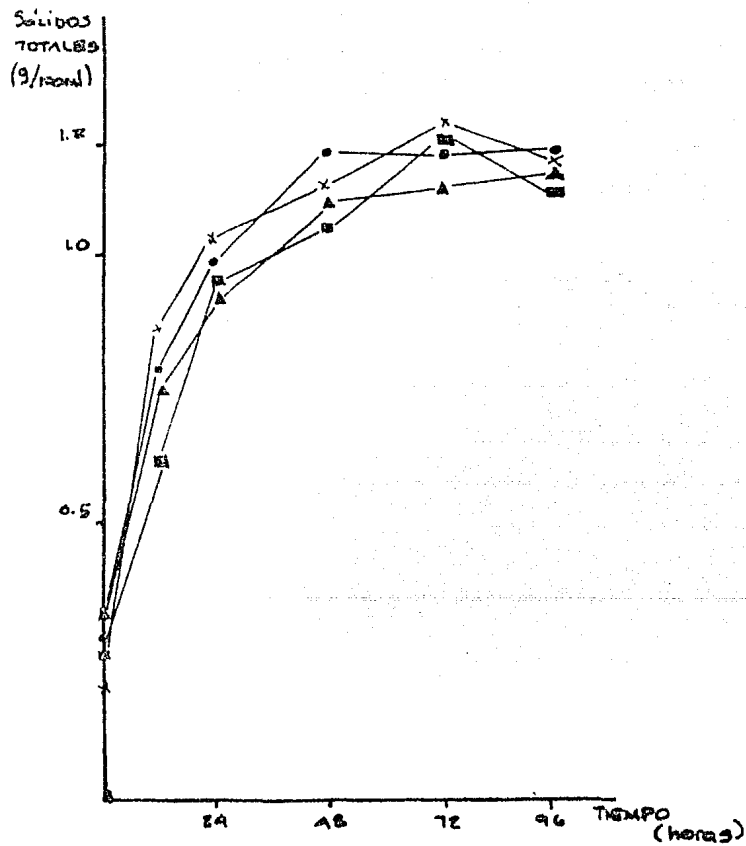


Gráfico 1: Aumento de sólidos totales a diferentes pH's iniciales del medio.
 (▲-▲ = pH 2.5, ●-● = pH 3.5, x-x = pH 4.5, ■-■ = pH 6.0).

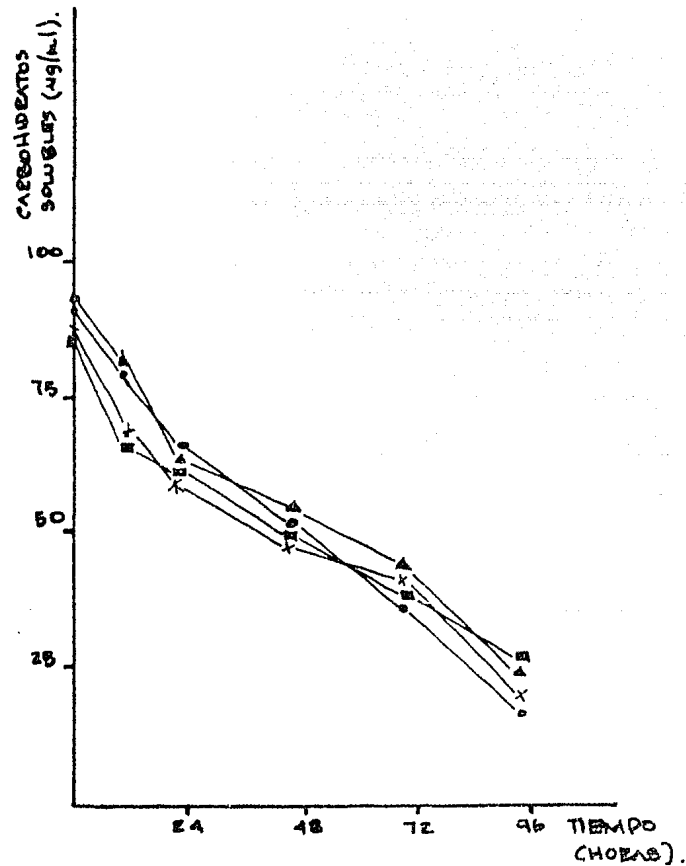
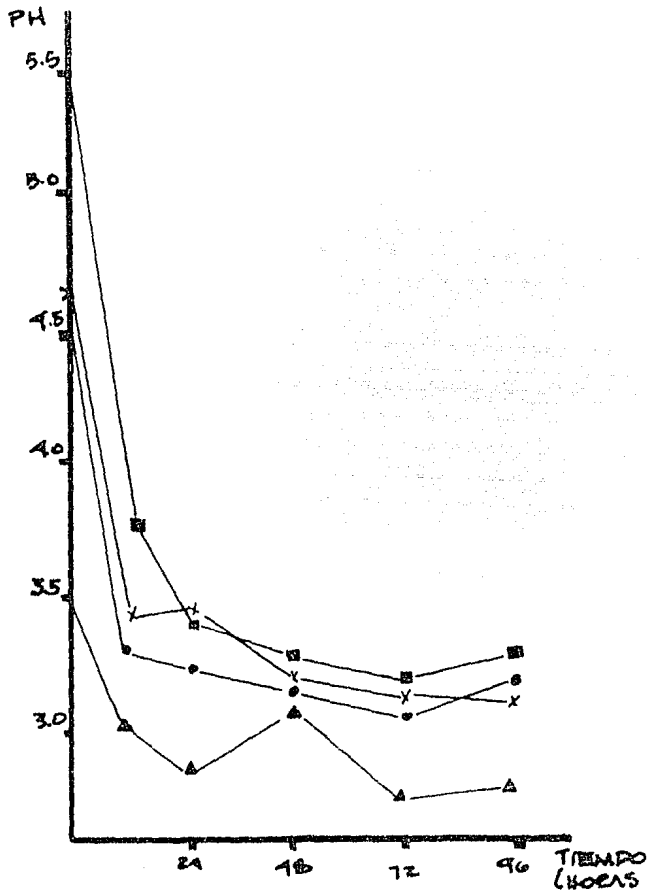
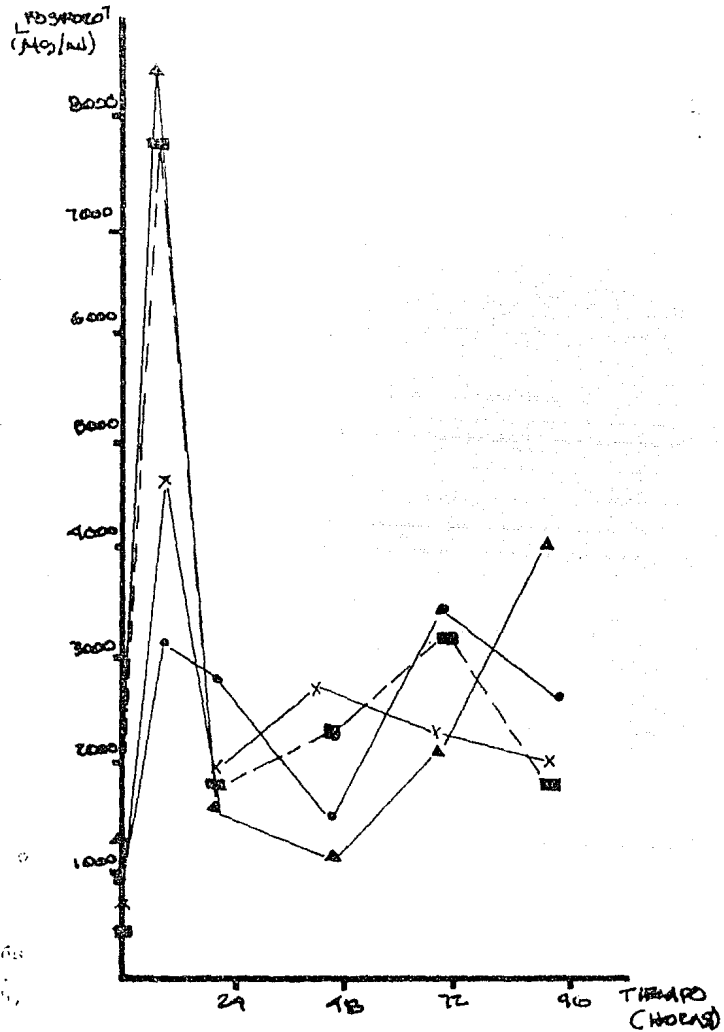


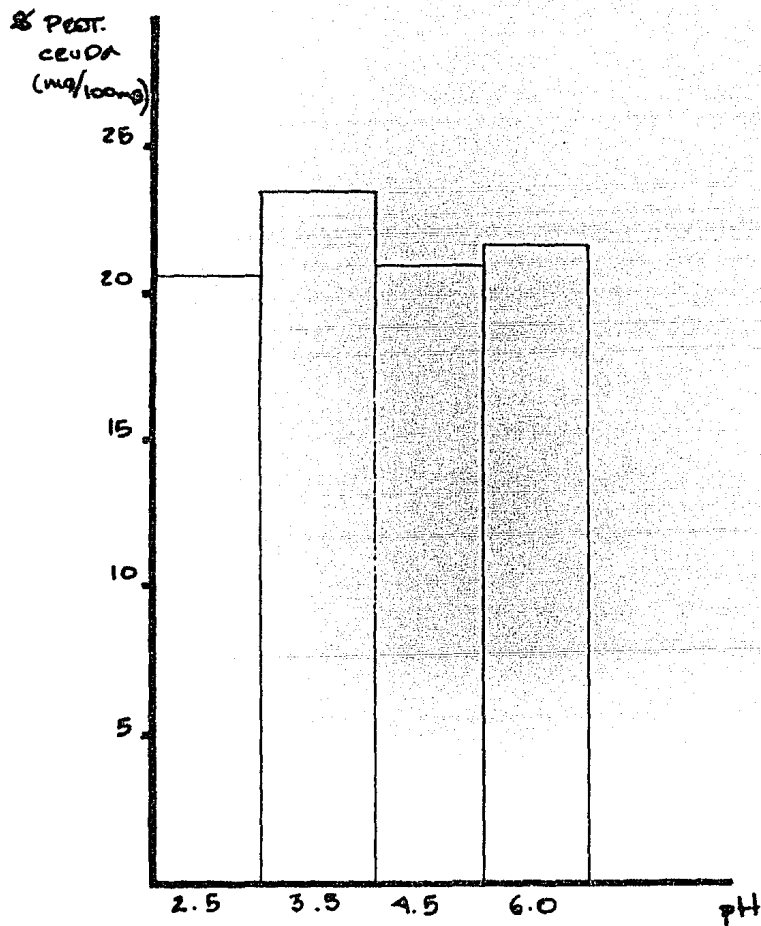
Gráfico 2: Consumo de carbohidatos solubles a diferentes pH's iniciales del medio.
 (▲-▲ = pH 2.5, ●-● = pH 3.5, x-x = pH 4.5, ■-■ = pH 6.0).



Gráfica K: Comportamiento del pH del medio a través del tiempo a diferentes pH's iniciales.
 (▲-▲ = pH 2.5, ●-● = pH 3.5, x-x = pH 4.5, ■-■ = pH 6.0).



Gráfica L: Comportamiento de la ósmosis a diferentes pH's iniciales.
 (▲-▲ = pH 2.5, ●-● = pH 3.5, x-x = pH 4.5, ■-■ = pH 6.0).



Gráfica M: Contenido de proteína cruda en la biomasa obtenida a las 72 horas, a diferentes pH's.

VI.- Prueba de método de crecimiento.

Cuadro 13

tiempo/medio horas	Resultados experimentales							
	pH		sólidos totales		c.h. solubles		fósforo	
	α	B	α	B	α	B	α	B
0	4.7	4.5	0.1693	0.1807	91.34	96.49	1.5	2.7
12	3.8	4.1	0.3088	0.3423	77.45	79.35	6.7	7.5
24	3.6	3.5	0.5578	0.6093	52.14	68.33	12.1	12.8
48	3.4	3.4	0.7563	0.7512	47.12	51.48	15.2	15.5
72	3.4	3.5	0.8911	1.1535	39.53	37.86	18.5	20.2
96	3.5	3.5	1.1997	1.4152	20.33	17.77	19.9	22.4

(g/ 100ml)

(ug/ml)

(ug/ml)

En cuadro 13 y gráficas N y O, vemos los resultados de las cinéticas que nos permitieron obtener la biomasa para probar el método de crecimiento seleccionado para reemplazar al de las desoxipentosas.

Este consiste en la determinación de fósforo total por el método de molibdato. Como se observa en las gráficas, el problema de la interferencia que teníamos con el método anterior desapareció, logrando además curvas con trazado regular. Para ver el comportamiento se efectúan pruebas con biomasa en medio α y B.

Aparte se volvió a comprobar la conveniencia de utilizar el medio B como fuente de nutrientes para nuestro hongo, ya que, según cuadro y gráficas ya citados, se obtienen mayor cantidad de sólidos totales, presentando la curva de crecimiento valores más altos en medio B. Pensamos que en el paso de la digestión en ácido perclórico, es en donde eliminamos la probable causa de la interferencia, ésta podría ser un pigmento que conforme avanza la fermentación desaparece, pero que aún a las 12 horas se encuentra en cantidad aprecia

ble como ser extraído por el método anterior y se refleja con la interferencia

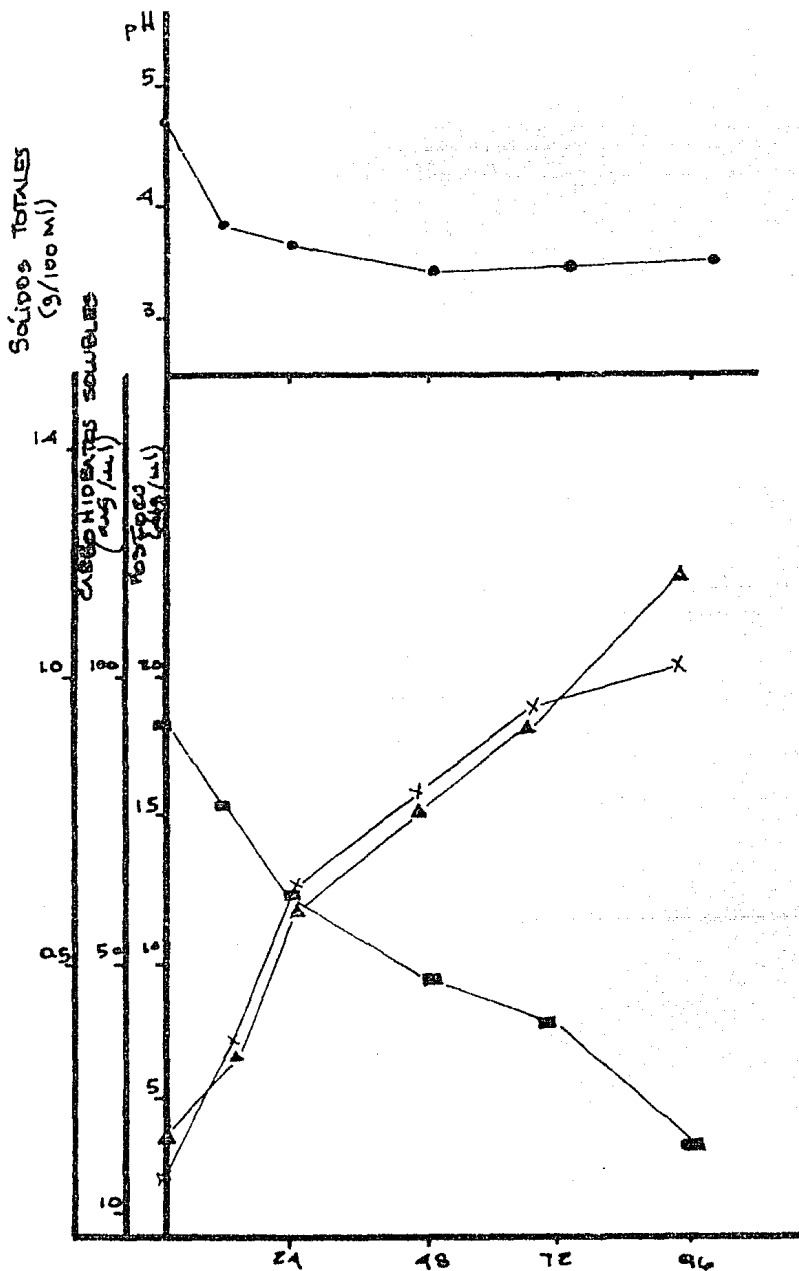


Gráfico N: Resultados experimentales de prueba de método, medio (■-■ = carbohidratos solubles, ▲-▲ = sólidos totales, x-x=fósforo, ●-● = pH).

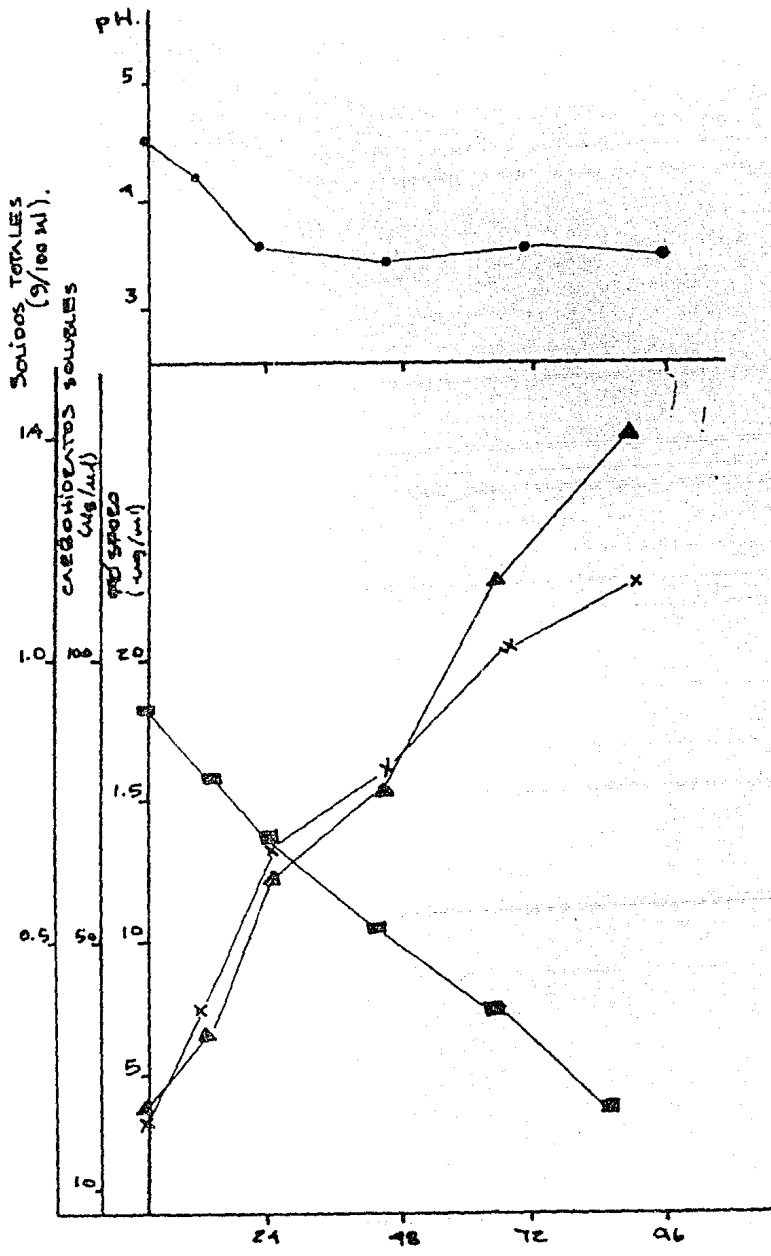


Gráfico 9: Resultados experimentales de prueba de método, medio .
 (■-■ = carbohidratos solubles, ▲-▲ = sólidos totales,
 x-x=fósforo, ●-● = pH).

VII.- Optimización de medio: fuente de carbono.

Cuadro 14

Resultados Experimentales.

peso de camote--	sólidos tots.--	pH --	% proteínas--	c.H solubles--	fósfo rc
0.00	0.176	3.8	-----	3.0	----
0.5	0.1853	5.2	19.25	8.5	6.1
0.8	0.2921	4.9	19.43	10.1	6.7
1.0	0.3828	4.1	20.00	12.0	8.3
1.5	0.5461	4.2	20.75	27.0	24.8
2.0	0.7411	2.6	20.25	32.0	24.0
2.5	0.9186	3.2	20.37	61.0	24.8
3.0	1.2443	3.1	21.06	75.00	26.2
3.5	2.1999	3.3	16.12	79.00	9.0
4.0	1.4665	3.4	19.23	86.00	14.1
4.5	1.3116	3.1	18.94	105.00	13.0
5.0	1.2349	3.05	16.95	134.00	7.0
(g/100ml)	(g/100 ml)		mg/100 mg	ug/ml	ug/ml

En cuadro 14 y gráficas P,Q,R, y S, tenemos los resultados del primer experimento de optimización del medio, en este caso se trata de la fuente de carbono, la cual fué probada en diferentes concentraciones para encontrar la óptima.

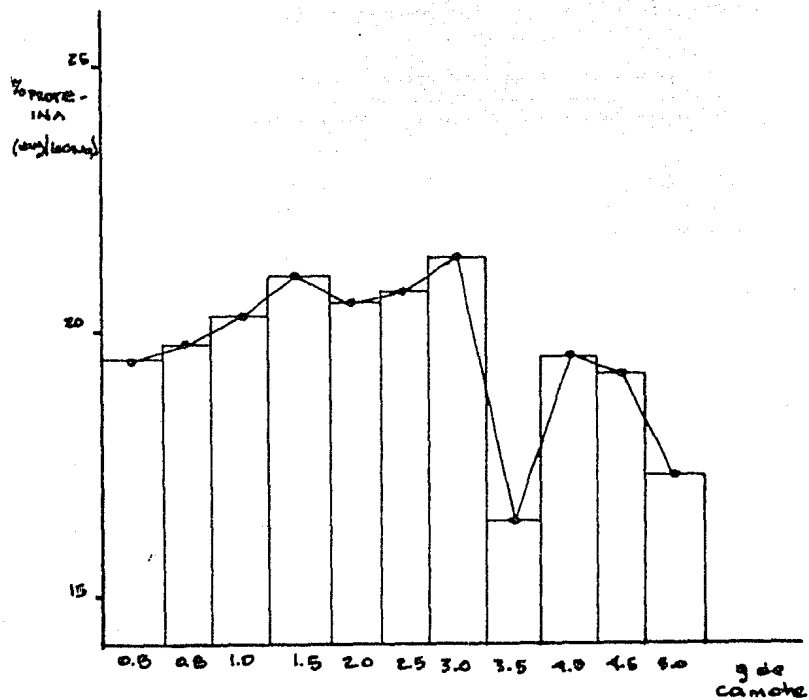
Los valores experimentales señalan que a una concentración de 3g/100 ml se obtienen los mejores resultados, tanto en proteínas como en fósforo, pero si observamos con mayor detenimiento, vemos que los resultados en el rango 1.0 a 2.5 g son muy cercanos a los de 3.0; destacándose 1.5 como el más próximo. Es decir, con la mitad de la concentración original de fuente de carbono obtenemos una cantidad de proteínas muy cercana. Ahora bien, éste intervalo de concentraciones de fuente de carbono en donde hay resultados similares, nos dá

oportunidad a tener opciones en cuanto al manejo del camote, por ejem.: alto contenido de proteínas en muchos sólidos totales, buen porcentaje de proteínas en baja cantidad de sólidos totales, etc. Todo esto a consecuencia de los requerimientos del proceso, la demanda y el modo de utilización de la biomasa.

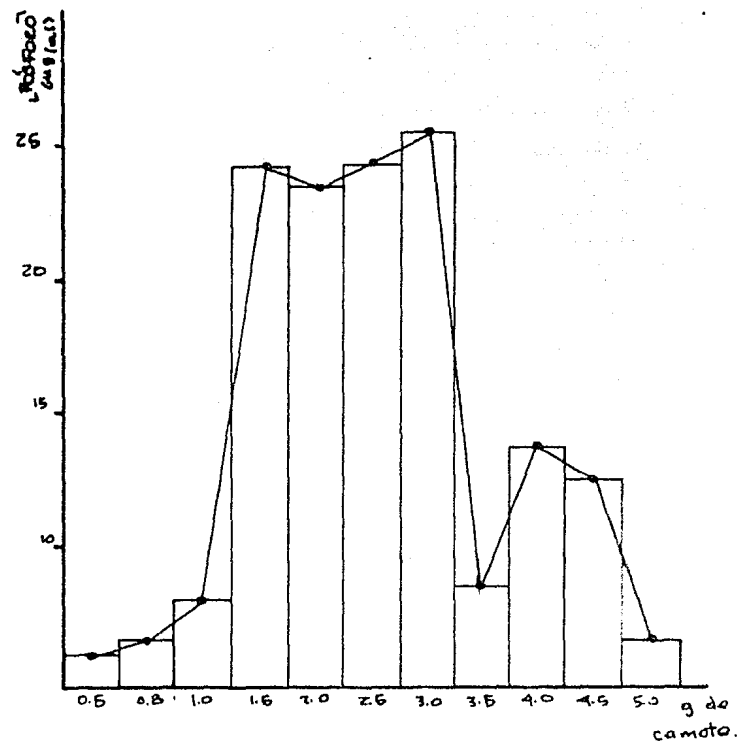
En el matraz con 0 g de camote no hubo crecimiento apreciable, lo que era de esperarse. Los sólidos reportados corresponden seguramente al inóculo, pues no se agregó ninguna otra sustancia insoluble. Se observa una clara disminución en la curva de proteínas y fósforo a partir de la concentración de 3.5 g/100 ml, sufriendo este punto una depresión más allá de lo esperado. Recordemos que cada matraz es un sistema aparte, único e independiente de los otros que, aún cuando se trata de tener condiciones uniformes en todos, tenemos diferencias, pensamos que el inóculo es la causa del bajo aprovechamiento del medio, lo que nos dá los resultados obtenidos.

Los carbohidratos solubles van aumentando conforme se incrementa la fuente de carbono, ésto es obvio, ya que mayor disponibilidad de almidón para que el microorganismo lo hidrolize, apareciendo los carbohidratos en el medio como consecuencia. Es de notar, también, la coincidencia en el trazado de las curvas de proteína y fósforo presentando las mismas variaciones y picos.

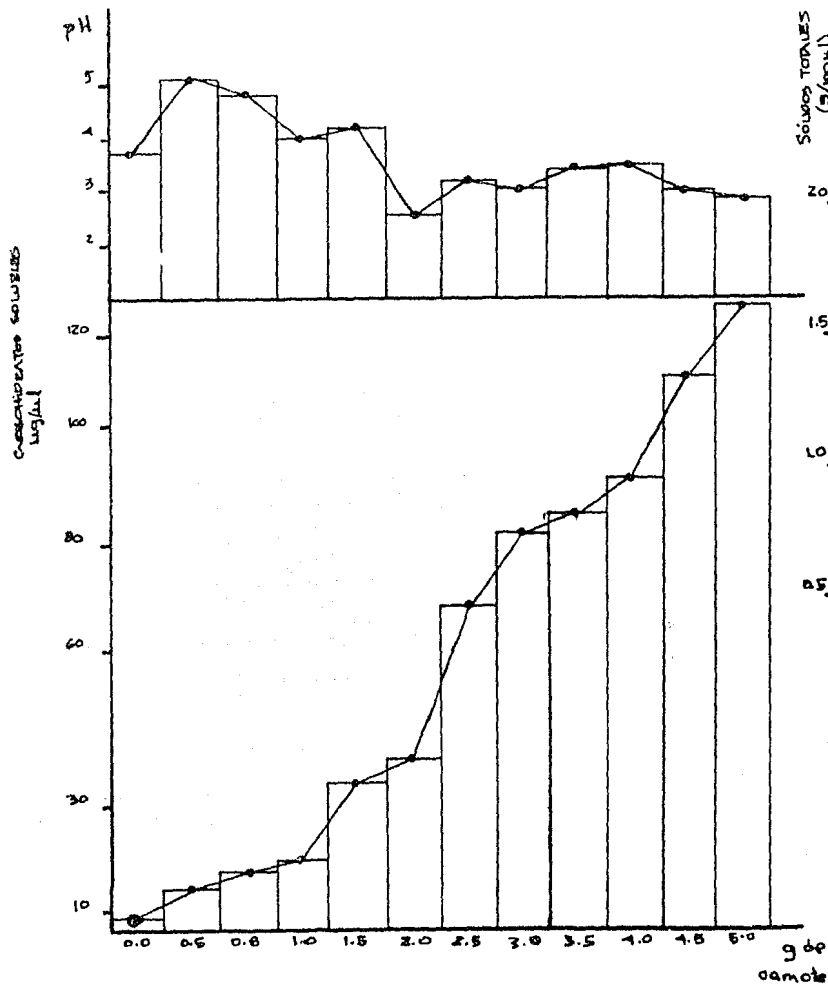
En los experimentos subsecuentes se usarán 1.5 g/100 ml de camote como fuente de carbono en el medio de crecimiento.



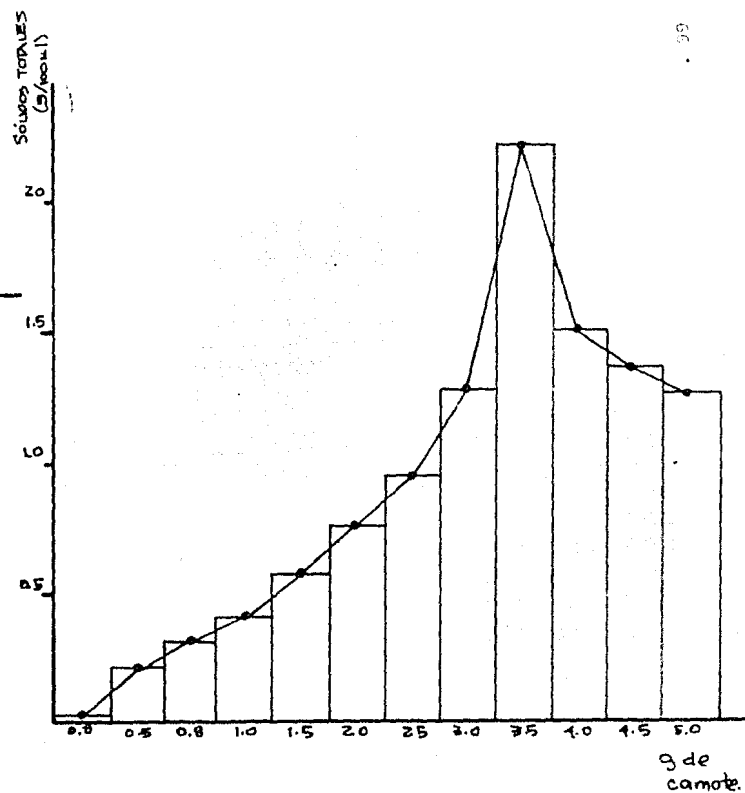
Gráfica P: Resultados de % de proteínas a diferentes concentraciones de camote en el medio de cultivo. Determinado a 96 horas.



Gráfica Q: Resultados de (fósforo) a diferentes concentraciones de camote en el medio de cultivo. Determinado a 96 horas.



Gráfica R: Resultados (carbohidratos solubles) y pH a diferentes concentraciones de camote en el medio de cultivo. Determinado a 96 horas



Gráfica S: Resultados de sólidos totales a diferentes concentraciones de camote en el medio de cultivo. Determinado a 96 horas.

VIII.- Optimización del medio: fuente de nitrógeno

Cuadro 15

Resultados Experimentales.

F. de N ₂	sols. totales	pH	%de prots.	c. h. solubles	fósforo
0.000	0.2216	3.85	12.81	80.15	2.3
0.100	0.4927	4.5	18.43	19.14	5.2
0.150	0.4682	4.45	19.86	15.23	5.4
0.200	0.4777	4.4	20.34	17.5	10.2
0.250	0.4606	4.1	20.63	10.1	10.52
0.300	0.4849	3.75	20.42	9.14	9.8
0.350	0.4794	3.6	21.059	7.94	10.2
0.400	0.4903	3.8	22.75	6.93	10.4
0.500	0.4672	3.8	24.9	4.52	10.9
0.800	0.4401	3.5	19.25	18.37	6.4
1.000	0.4088	3.89	16.18	23.58	2.2
1.500	0.3784	4.4	15.86	24.89	2.4

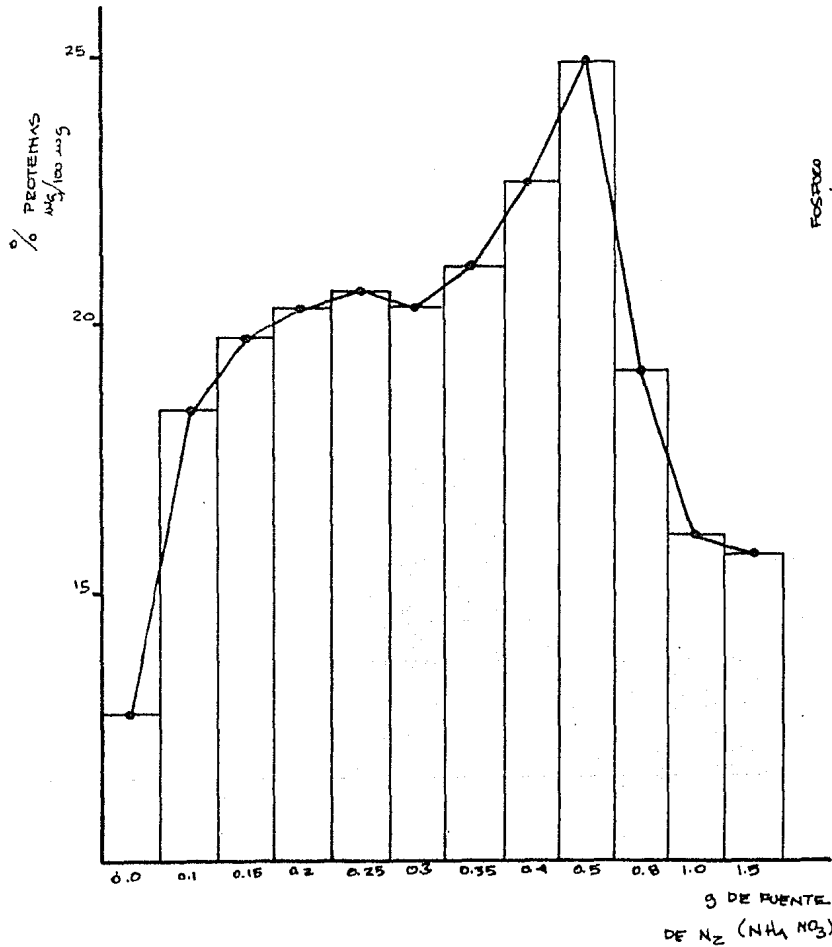
En el cuadro 15 y gráficas T, U, V, W; tenemos los resultados del siguiente experimento en la serie de optimización del medio. En este caso, conocer la concentración más adecuada de la fuente de nitrógeno (nitrato de amonio).

Fijándonos en éstos, vemos que los mejores resultados, tanto en proteínas, como en fósforo los obtuvimos con 500 mg/100 ml, es decir, se tuvo que aumentar la cantidad suplementada de nitrógeno al doble de la originalmente usada para obtener una leve mejoría en el contenido de proteínas de la biomasa, comparado con lo reportado en el experimento anterior. Según vemos en las gráficas T y U, los puntos de fósforo y proteínas después de 500 mg/100 ml manifiestan una baja, lo mas probable debido a que llegamos a concentraciones

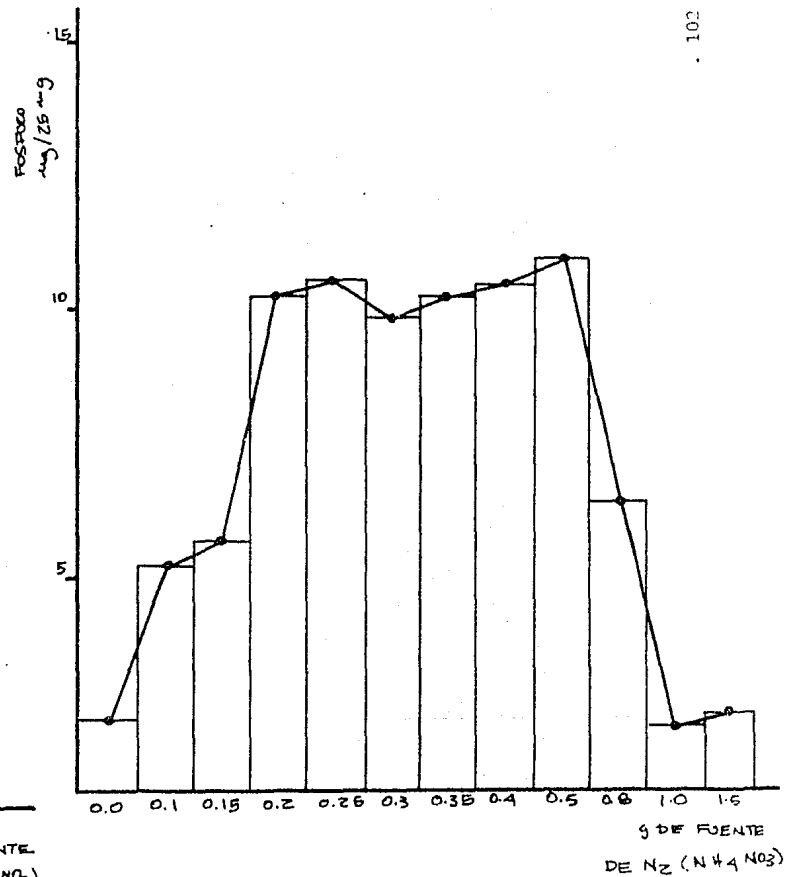
que producen efectos inhibitorios en el crecimiento. Esto se ve, corroborando en la curva de carbohidratos, en donde se ve el menor aprovechamiento de éste, a partir de valores mayores del anteriormente señalado.

Volvemos a tener la gran similitud en las curvas de fósforo y proteínas que, como observamos, presentan las mismas depresiones y picos. Ahora también se agrega la de carbohidratos solubles que presentan un trazado semejante, pero en forma decreciente. Lo sólidos totales son menores que los obtenidos en experimentos anteriores, esto ya se había anticipado al escoger una menor cantidad de fuente de carbono. También se había visto que con la nueva concentración de camote el pH no bajaba de 4.0, pero con la adición de más fuente de nitrógeno y al haber mejor aprovechamiento de los carbohidratos, este ya bajó de valor.

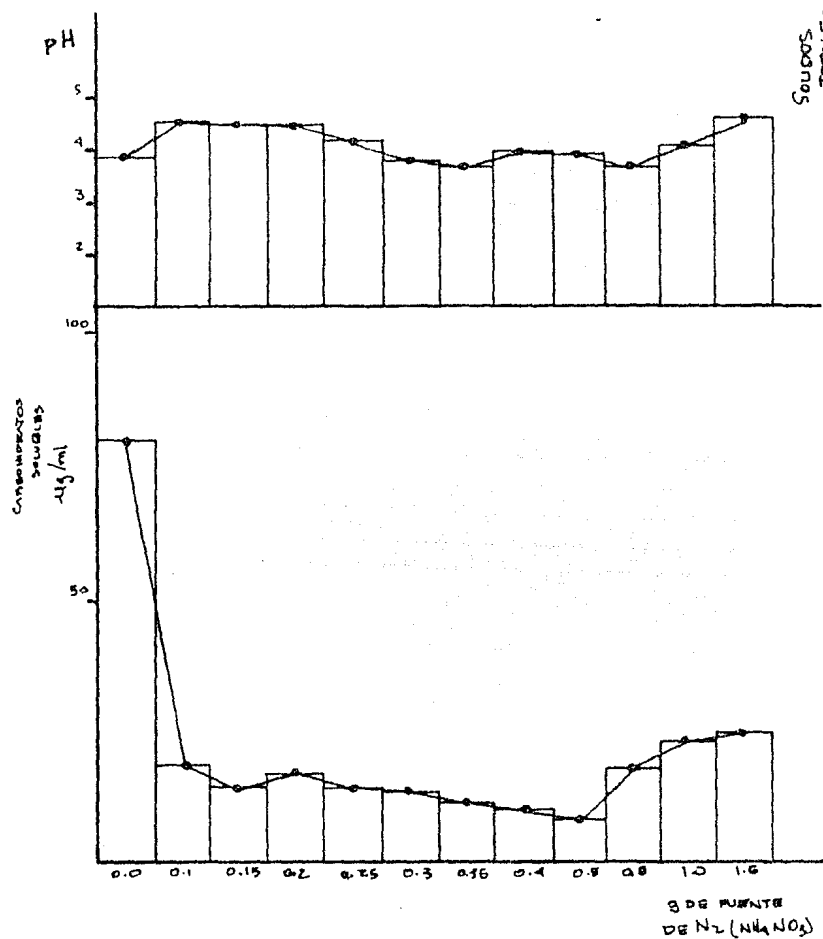
El matraz en donde no se agregó fuente de nitrógeno, manifiesta crecimiento y aumento en el contenido de proteínas de la biomasa. Lo que significa que el aporte dado por el camote, en cuanto a nitrógeno, es aprovechado por el hongo, resultado además suficiente para llegar a los valores obtenidos, pero si quisiéramos incrementar más éstos, se hace necesario suplementar fuente de nitrógeno al medio de crecimiento.



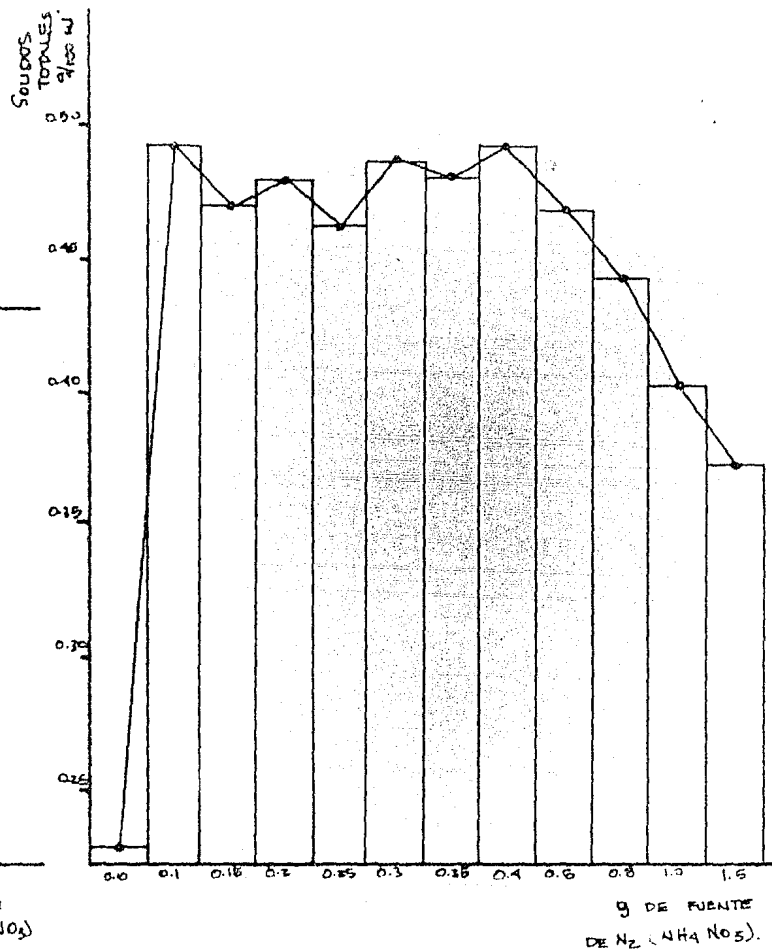
Gráfica T: Resultados de % de proteínas a diferentes concentraciones de nitrato de amonio en el medio de cultivo. Determinado a 96 horas.



Gráfica U: Resultados de concentración de fósforo a diferentes concentraciones de nitrato de amonio en el medio de cultivo. Determinado a 96 horas.



Gráfica V: resultado de carbónhidratos solubles y pH a diferentes concentraciones de nitrato de amonio en el medio de cultivo. Determinado a 96 horas.



Gráfica W: resultados de sólidos totales a diferentes concentraciones de nitrato de amonio en el medio de cultivo determinado a 96 horas.

IX.- Optimización del medio: Fuente de fósforo.

Cuadro 16

Resultados Experimentales

F.dePh	--- sols.tots.	-- pH	--%de prots.	--fósforo	--% de almidón
0.000	0.4551	4.85	16.58	6.51	0.2903
0.100	0.4827	4.5	19.175	13.83	0.0344
0.150	0.5290	4.0	20.61	20.25	0.1043
0.200	0.4957	4.59	20.925	23.5	0.1724
0.250	0.5257	4.0	21.027	30.51	0.0344
0.300	0.5280	4.3	21.431	37.10	0.1724
0.350	0.5315	4.4	22.141	27.28	0.3103
0.400	0.5213	4.3	21.645	12.00	0.0689
0.500	0.5187	3.9	20.500	10.50	0.0344
0.800	0.5167	4.1	20.100	7.11	0.0344
g/100ml	g/100 ml		mg/100 mg	ug/ml	mg/100mg

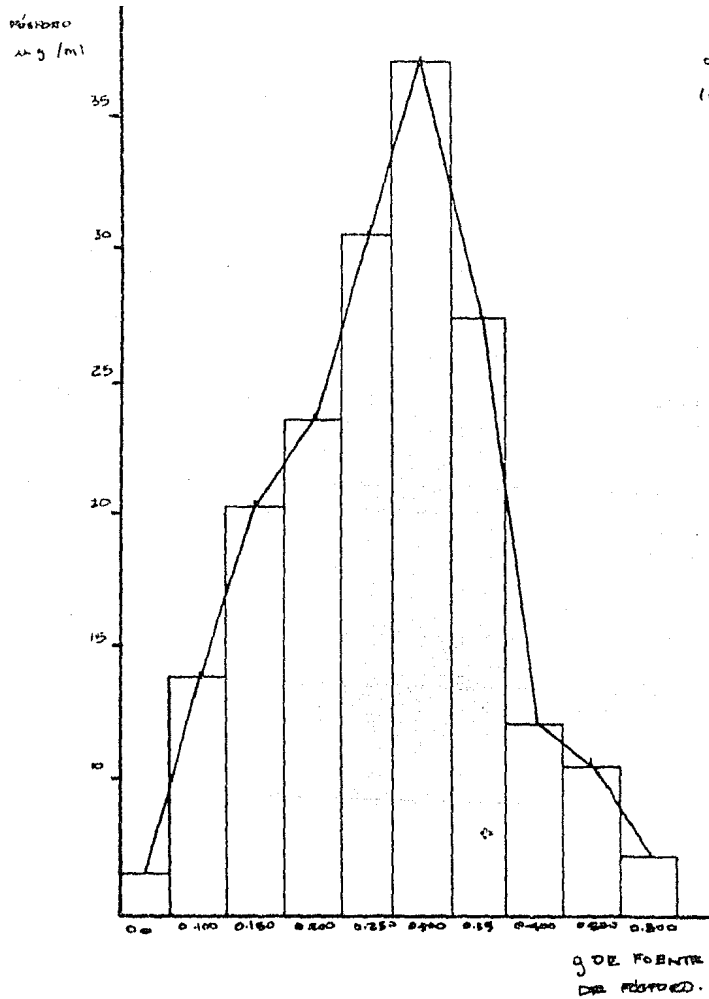
En el cuadro 16 y gráficas X, Y, Z y α ; tenemos los resultados de la última parte de la serie de experimentos sobre optimización del medio, la que se refiere a la concentración de la fuente de fósforo.

Como apreciamos en la gráfica, esta vez las curvas de fósforo y proteínas no señalan los mismos máximos, aunque éstos se encuentren cerca. El criterio que prevaleció en la selección fué el de contenido de proteínas, mismo que se ha manejado en todo el proyecto. Por lo tanto, el punto que dió más alto porcentaje de proteínas se escogió como la concentración óptima de fuente de fósforo. Respecto al medio original, aumentó en 100mg.

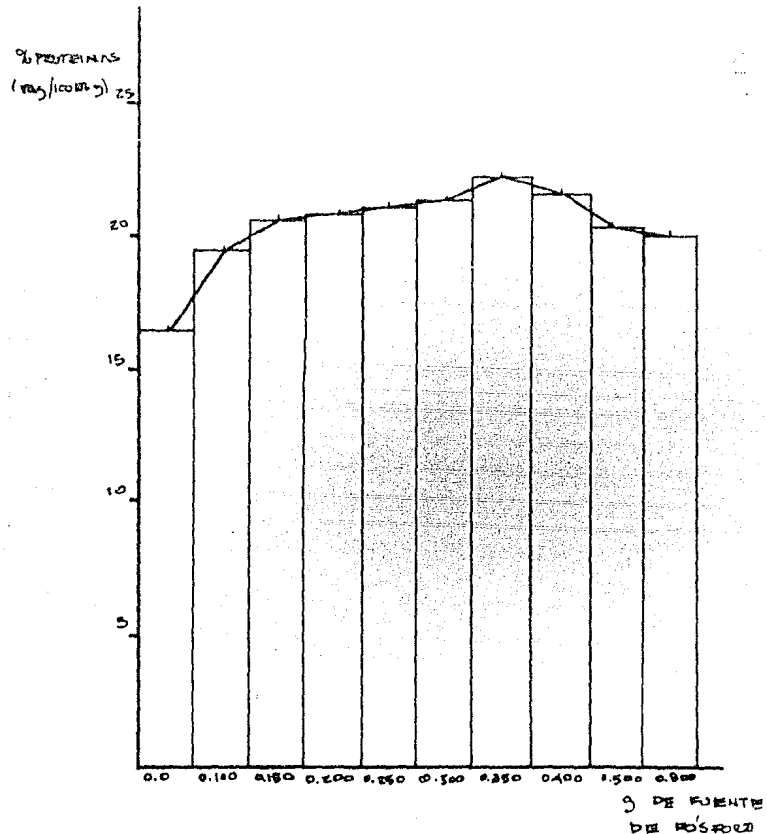
El pH en el punto escogido está por encima de 4.0, lo que nos hace pensar en tener mas cuidado con este factor en

el siguiente experimento. Esto porque a pH's altos, el hongo produce ácido oxálico, Prescott (35), sustancia que no deseamos en la biomasa. Esta vez el valor más alto de proteínas - corresponde con el de sólidos totales. En vez de cuantificar carbohidratos totales, lo que se hizo fué probar la técnica - para determinar el % de almidón en el medio de cultivo. Como vemos en cuadro 16 y gráfica α , éste ha desaparecido completamente, casi, del medio. La gráfica parece enseñar una gran variación en los resultados obtenidos, pero hay que fijarse - que la gráfica va de 0---0.3 %.

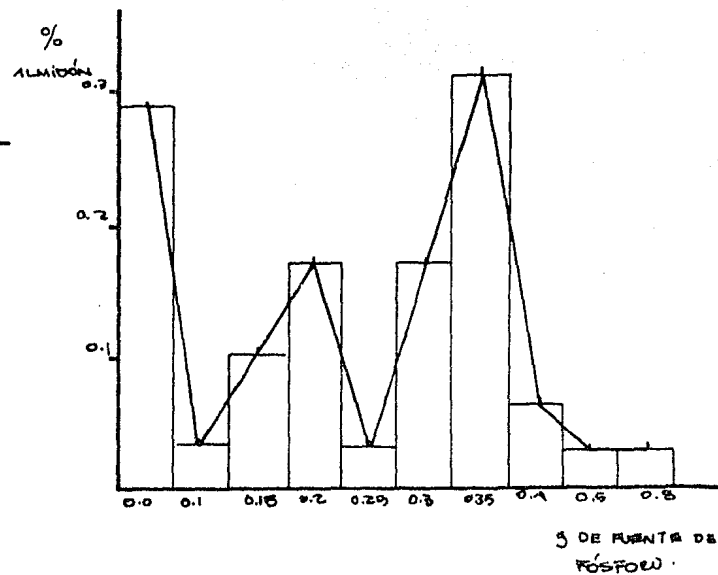
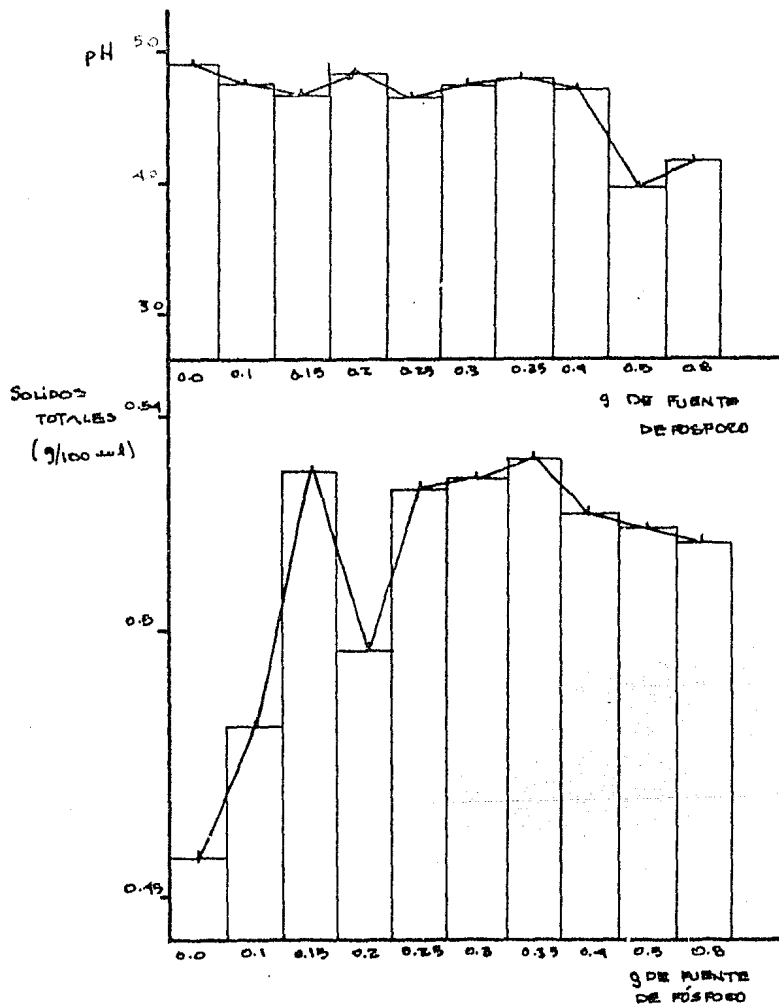
En el matraz que hay 0% de fósforo; tenemos registrado - crecimiento y un contenido de proteínas más alto que cuando - no se agregó camote o nitrógeno.



Gráfica X: Resultados de concentración de fósforo a diferentes concentraciones de fosfato mono básico de potasio en el medio. Determinado a 96 horas.



Gráfica Y: Resultados de % de proteínas a diferentes concentraciones de fosfato mono básico de potasio en el medio de cultivo. Determinado a 96 horas.



Gráfica 3: Resultados de % de almidón a diferentes concentraciones de fosfato mono básico de potasio en el medio de cultivo. Determinado a 96 horas.

X. Fermentación.

Cuadro 17

Resultados Experimentales

tiempo--pH--	sols.tots.--	% de almidón--	c.h.solubles--	%prots.--	fósforo		
0	3.65	0.0893	13.15	66.00	9.601	3.9	24.49
6	3.60	0.0954	11.92	80.5	16.196	5.4	27.21
12	3.30	0.1525	9.12	77.5	20.311	6.0	28.97
24	3.20	0.2190	0.701	65.0	22.97	7.1	35.78
30	3.10	0.2535	0.264	62.1	23.52	9.0	45.00
36	3.4	0.2639	0.175	35.0	25.37	11.6	57.08
50	3.20	0.2789	0.087	35.5	23.38	14.4	70.58
52	3.10	0.2796	0.087	33.0	23.78	15.2	72.59
horas	g/50 ml de muestra	mg/100 mg	ug/ml	mg/100mg	ug/ml	ug/25mg de muestra	

En el cuadro 17 y gráficas β y γ , tenemos los resultados de la fermentación, en donde se usan los valores obtenidos en anteriores experimentos recalcamos que se tomaron --- muestras de 50 ml.

Uno de los puntos de interés en este experimento era observar el comportamiento del pH, ya que como señalamos en la fundamentación, se debe procurar mantener un pH bajo desde el inicio para evitar la formación de ácido oxálico, Prescott (35), y también prevenir contaminaciones de otros microorganismos. Ahondando un poco mas en lo referente a la producción de micotoxinas, podemos decir que según la literatura revisada, Pore (34), Ciegler (7), Rosiles y Pérez (37), el A. niger tiene reportada la producción de una sustancia de este tipo ya señalado: el ácido oxálico.

De antemano encontramos que el pH óptimo de crecimiento del hongo es 3.5, siendo reforzado el buscar tener este valor inicial en el medio, por la razón antes citada. Entonces establecimos condiciones tales en nuestro proceso, basados en la bibliografía presentada, que nos permitan suponer que el ácido oxálico se encuentra ausente, casi, del caldo y la biomasa. Como vemos en la tabla y gráfica, además en los experimentos en donde también tenemos pH contra tiempo, si logramos un pH inicial de 3.5 o cercano, se hace innecesario agregar ácido durante la fermentación para controlar el pH, ya que el microorganismo se encarga de bajar éste y mantenerlo. Obviamente, además en la literatura se reporta, el hongo produce ácidos orgánicos para lograr este propósito incliñándonos a pensar por los antecedentes que tenemos, que dentro de éstos, el que se encuentra en mayor proporción es el ácido cítrico. Esto nos dá una nueva posibilidad de aprovechamiento del proceso, investigando la capacidad productora de ácido cítrico, usando como sustrato camote, del Aspergillus niger.

La curva de sólidos totales nos muestra un aumento regular en estos, sin tener puntos que se salgan del trazado, -- como ocurría en otros experimentos, especialmente los primeros. El valor que obtenemos de éstos en la muestra tomada -- se equipara con lo obtenido desde que se optó por usar una -- concentración de 1.5% de fuente de carbono. Ya habíamos con-- signado que sacrificábamos sólidos totales para tener simi-- lar cantidad de proteínas que si usáramos el doble de fuente de carbono, como se hacía en los primeros experimentos. Por supuesto que si deseamos mayor cantidad de sólidos totales -- regresamos al valor original (3% de fuente de carbono). Por el incremento de la biomasa se hizo patente la necesidad de -- aumentar la velocidad de agitación durante el proceso. Al --

inicio eran 250 RPM y se concluyó en 450 RPM. Debido a que se veía, a partir de las 24 horas, que la velocidad inicial no era suficiente para mezclar adecuadamente el contenido del fermentador. Esto implica que la viscosidad del medio fue -- cambiado conforme pasaba el tiempo y se desarrollaba el hongo. Entonces para contrarestar este aumento y permitir que el microorganismo recibiera la aereación pertinente, aprovechando los nutrientes completamente, se subió la velocidad de agitación.

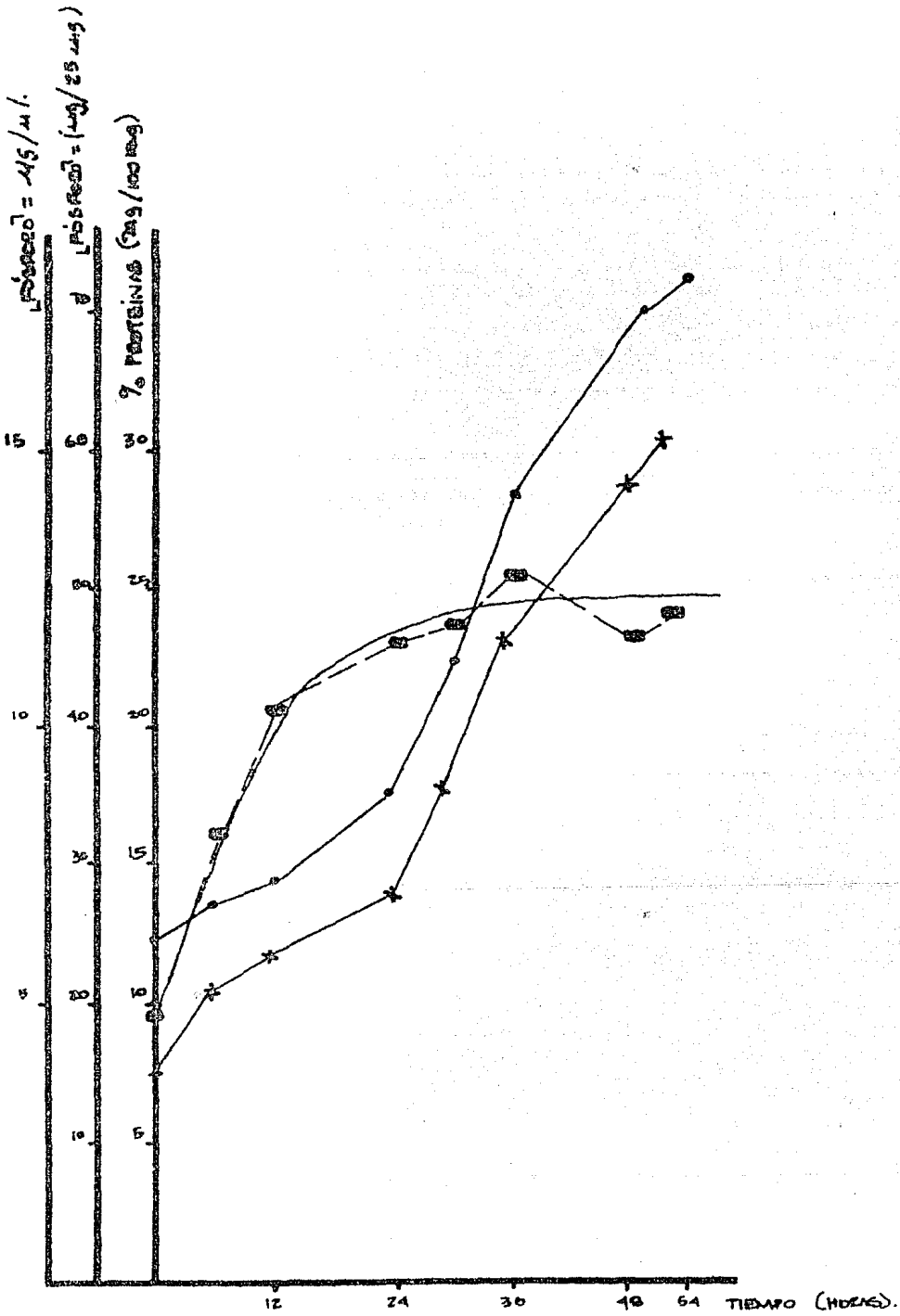
Los carbohidratos que proporcionan el camote al medio de cultivo se encuentran en forma de almidón, de tal manera que el hongo tiene que degradarlo primero para poder utilizarlos. Este hecho lo vemos representado en la gráfica y cuadro 17, que nos dice que el porcentaje de almidón en el medio baja -- con el tiempo, siendo menor al 1% en 24 horas. Esto se refleja en la concentración de carbohidratos solubles, donde vemos que hay un aumento en el lapso de 0---6 horas, a continuación la curva declina como signo de aprovechamiento de éstos por el hongo. Esto significa que las amilasas del hongo degradan el almidón, cuyos productos se incorporan al medio y podemos aventurar que este aumento se debe a que la velocidad de degradación del almidón es mayor que la de aprovechamiento de carbohidratos por el hongo. Además, si nos fijamos con detenimiento en la gráfica, sólo hasta las 24 horas la concentración de carbohidratos solubles se encuentra por debajo de la que se registró a tiempo 0, éste coincide con que a las 24 horas el almidón ha desaparecido casi completamente del medio. Es decir, la reserva no existe y no hay carbohidratos que se incorporen al medio supliendo a los que ya se han -- aprovechado. Este hecho, teóricamente lo sabíamos, nos indica que el almidón es la fuente principal de carbohidratos, --

pero no se utiliza directamente. El Aspergillus niger es productor de amilasas, lo que le permite aprovechar el almidón. Entonces surge la pregunta: ¿Qué tanta actividad tienen las enzimas del hongo? Por lo tanto tenemos otro punto de aprovechamiento del proceso, la producción de amilasas.

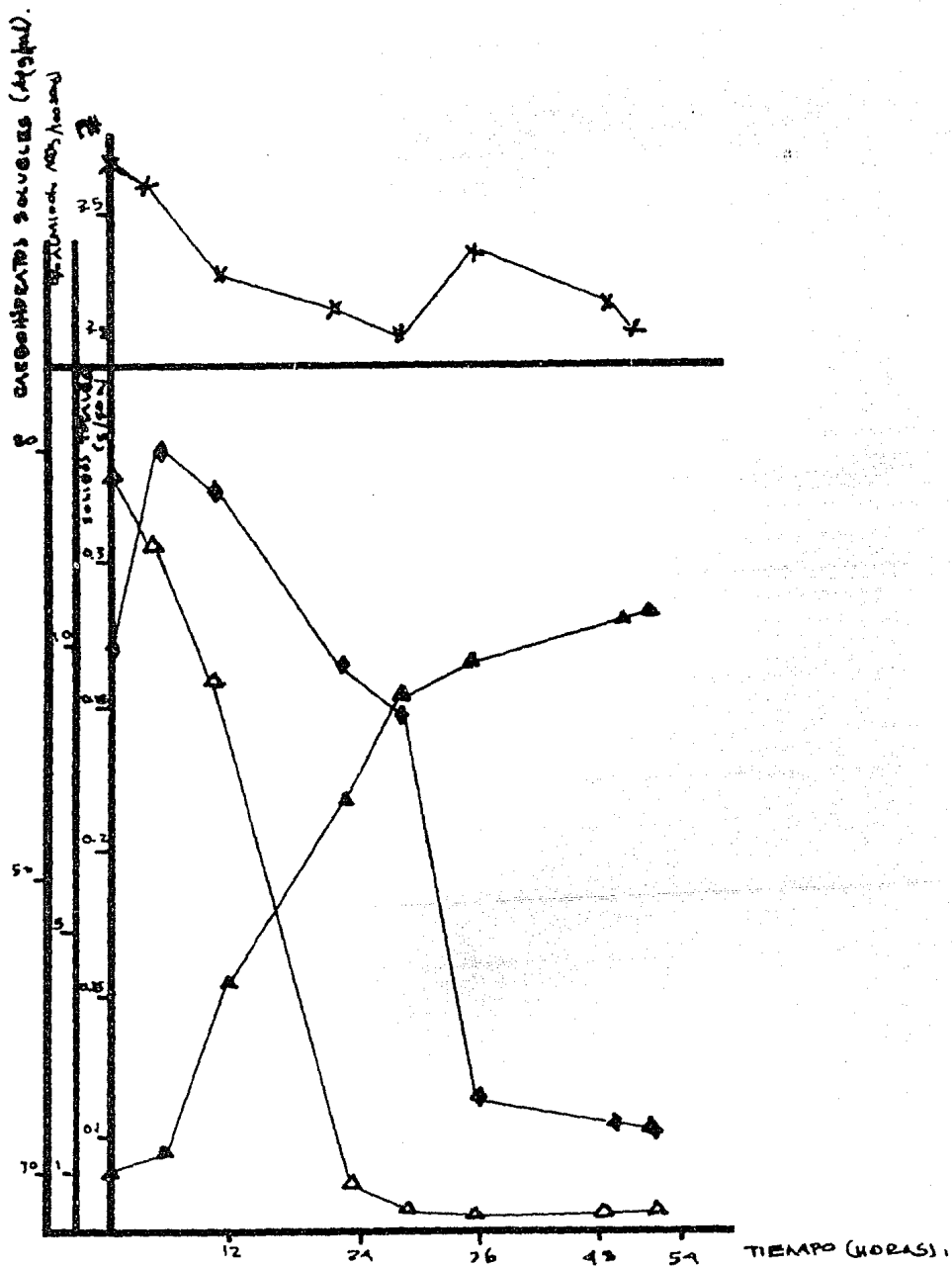
Ahora pasando a la revisión de los resultados de las proteínas, tenemos que el punto máximo lo observamos a las 36 horas, pero que la curva de fósforo indica que el crecimiento no ha concluido. Este valor máximo está dentro del rango que se ha venido obteniendo en los experimentos anteriores. Las curvas de fósforo se reportan de dos maneras diferentes, con el fin de ver como es el trazado de las mismas. En la representación gráfica vemos que ambas formas son similares cualitativamente, distinguiéndose las fases: lag, no muy claramente, de crecimiento y estacionaria. Lo mismo acontece con la de sólidos totales, pero ya habíamos anotado que éstos no indicaban el crecimiento real por contener partículas de camote no degradado, además de biomasa.

Una de las cosas que se tiene en mente es la posibilidad de que el hongo sintetice alguna sustancia tóxica. Generalmente éstas son productos del metabolismo secundario, manifiesto en la fase estacionaria del crecimiento. El tener la posibilidad de suspender la fermentación alrededor de las 36 horas y en plena fase de crecimiento agrega un seguro más al proceso; -- pues vemos que se llega al objetivo; % de proteínas aumentando antes de la fase en que se reportó la producción de micotoxinas. Hasta la actualidad, el A. niger no tiene reportadas micotoxinas diferentes al ácido oxálico, pero nunca se puede descartar la posibilidad de que las sintetice, ya sea por mutaciones, sustrato empleado o porque las técnicas de análisis no sean lo precisas y específicas que se necesita, -

entonces entre más prevención se tenga es mejor. Hay que ---
agregar que en la bibliografía citamos un trabajo de Bean & -
McFall (3), en donde se menciona que cuando el Aspergillus ni-
ger crece junto con Aspergillus flavus o Aspergillus parasi--
ticus inhibe la producción de aflatoxinas.



Gráfica β : Resultados experimentales de la fermentación, en muestra de 50 ml a diferentes tiempos $\square-\square$ = proteínas, $\bullet-\bullet$ = (Fósforo) = mg/25mg, $+ + +$ (Fósforo), mg/ml).



Gráfica 8: Resultados experimentales de la fermentación, en muestra de 50 ml a diferentes tiempos. (x-x=pH, Δ-Δ-Δ = %almidón (mg/100 ml), ♦-♦ = c.h. solubles, (mg/ml). Δ-Δ = sólidos totales (g/50 ml).

RESULTADOS FINALES.

A). Análisis de la biomasa obtenida en la fermentación.

	%humedad	%prots.	%c.h.tots.	%cenizas	%grasa	% fibra cruda
camote	70.9	3.83	57.08	5.9083	1.46	3.92
biomasa	90.43	25.47	14.25	4.91	7.85	2.15

(% en base seca)

B). Coeficiente de aumento de proteína:

$$\frac{\text{proteína inicial}}{\text{proteína final}} : \frac{25.37}{3.83} = 6.62$$

C). Rendimientos: se utilizan resultados de la fermentación para efectuar los cálculos:

c.1 Rendimiento sobre el sustrato

$$\frac{\text{g de sólidos totales}}{\text{g de camote agregado}} : \frac{10.33}{45.00} = 0.229$$

c.2 Rendimiento sobre fuente de nitrógeno (nitrato de amonio):

$$\frac{\text{g de sólidos totales}}{\text{g de nitrato de amonio}} : \frac{10.33}{15.00} = 0.68$$

c.3 Rendimiento de proteínas sobre fuente de nitrógeno:

$$\frac{\text{g de proteínas obtenidas}}{\text{g de fuente de nitrógeno}} : \frac{(10.33) (0.2537)}{15} : \frac{2.62}{15} : 0.174$$

Tenemos los resultados del análisis de biomasa en contraste con los del camote; vemos que en casi todos los renglones -

hay un aumento. La humedad parece alta, pero recordemos que la biomasa se recupera de un medio líquido, aparte de la humedad natural del hongo hay que sumar la que proporciona el medio. El valor de proteínas está arriba de la obtenida por Senez (42) y Deschamps (8).

Vemos la disminución de carbohidratos totales, lo que explica el aumento de proteínas y grasas. Cenizas y grasas caen dentro de los valores reportados por Kihlberg (20).

El % de proteína cruda se incrementa 6.62 veces, a partir de la cantidad inicial; este dato es mayor del obtenido por Gray (11), que fue de 4x.

Los rendimientos obtenidos pueden mejorarse si aumentamos la cantidad de sustrato agregado como vimos en el experimento de optimización de fuente de carbono.

VIII. CONCLUSIONES

I.- Conclusiones

1). Como fruto de los experimentos realizados se obtuvieron parámetros del proceso:

- # ----- temperatura: 37 °C
- # ----- pH (inicial): 3.5
- volumen de inóculo: 10% (v/v)
- # ----- medio: B (camote íntegro, con cáscara)
- # ----- % de fuente de carbono: 1.5 (g/100 ml)
- # ----- % de fuente de nitrógeno: 0.5% (g/100 ml)
- # ----- % de fuente de fósforo: 0.35% (g/100 ml)
- # ----- tiempo de fermentación 52 horas (con posibilidades de suspender a las 36 horas).
- aereación: v/v (3 lts de O₂/minuto//3 lt de medio).
- agitación: 250 -- 450 RPM
- cepa: Aspergillus niger (aislado de mandarina).

Los valores seleccionados eran incorporados en el método para desarrollar el experimento siguiente. Los marcados con un asterisco son los obtenidos experimentalmente.

2). Se obtuvo un incremento en el valor de proteína de 6.62 veces sobre el contenido inicial del sustrato utilizado. El % de proteína cruda obtenida por nosotros es mayor a lo anotado por Senez (42), 19--20%, pero menor a lo reportado por Perlman (32) y Gregory (12), 50 y 44% respectivamente.

3). La cepa utilizada demostró ser termotolerante, ya que aún cuando su temperatura óptima de crecimiento reportada es de 26 °C, Raper (36), creció bien a 37 °C. Coincidiendo con la temperatura utilizada por Senez (42), Perlman (32) y Gregory (12), aunque éste último señala una temperatura más alta.

4). El sustrato limitante del medio es la fuente de nitrógeno, ya que ésta tuvo que ser aumentada con respecto al medio original. Al terminar la fermentación tenemos una concentración de carbohidratos solubles alrededor de 30 ug/ml. Esto nos lleva a pensar en que el caldo recuperado puede utilizarse en un proceso de fermentación mixta con algún otro microorganismo, de esta manera, se aprovecha hasta lo último, la fuente de carbono aportada por el camote.

5). La ventaja del medio B, estriba en el aprovechamiento integral del camote, no generándose con ello basura o desperdicio del mismo; además, de evitar la molestia de tener -- que despojar al tubérculo de su cáscara, operación que elevaría los costos. Hay que acotar que la cáscara dá el mayor -- aporte de sales minerales y vitaminas que contiene el camote.

6). El proceso no necesita de un control de pH con adición de ácido ó álcali, ya que el microorganismo se encarga de bajar el pH por medio de la producción de ácidos orgánicos. Se plantea la recomendación de profundizar en el estudio de este hecho, cualificar y cuantificar los ácidos producidos.

7). Se tiene un intervalo de % de fuente de carbono, 1 a 3%, que nos posibilita tener semejantes porcentajes de proteína, pero con diferencia en sólidos totales. Esto nos permite tener, a voluntad, buen contenido de proteína en "muchos" o "pocos" sólidos. El proceso es flexible en cuanto a la concentración de fuente de carbono.

8). El hongo presenta capacidad para degradar y aprovechar el almidón del camote, fuente de carbono primaria en el proceso. En la literatura, se reporta al A. niger como productor de enzimas amilolíticas, por lo tanto, se sugiere ahondar en la investigación de este punto: ¿Qué enzimas se produ-

cen y cuanta actividad tienen?

9). El tiempo que se dejó el proceso abarcó, en el fermentador, 52 horas, pero se vió que el valor máximo de proteínas se alcanza a las 36 horas; pudiendo detenerse el proceso alrededor de este tiempo y evitar llegar a la fase estacionaria en donde se producen los metabolitos secundarios, entre ellos las micotoxinas.

10). El camote es un medio de crecimiento complejo que aporta suficientes elementos para soportar el crecimiento del hongo por sí solo. Pero como se vió en los experimentos correspondientes, es necesario suplementar con fuente de nitrógeno y fósforo para optimizar el crecimiento y llegar a los resultados esperados.

11). Las técnicas analíticas y experimentales empleadas sufrieron cambios de como se reportan en la literatura, con el fin de adecuarlas a las condiciones del proyecto.

II. Recomendaciones:

a.- Concluir con los estudios del proceso en las variables faltantes del mismo: concentración del inóculo, fuentes alternas de nitrógeno y/o fósforo mas baratas; condiciones de aereación, velocidad de agitación, viscosidad del medio, etc. Una vez determinados éstos, pasar a la siguiente etapa: las pruebas en planta piloto y comenzar los estudios de factibilidad del proceso, así como las rutas de comercialización, distribución y abasto de materias primas.

b.- Efectuar las pruebas nutricionales con la biomasa obtenida: digestibilidad, aprovechamiento y tolerancia por el organismo, % de proteína verdadera, contenido y calidad de

los aminoácidos.

c.- Llevar a cabo los estudios toxicológicos pertinentes: rastreo de posibles micotoxinas o ácido oxálico en producto final y durante el proceso; contenido de ácido nucléicos, tolerancia al producto por parte de las especies animales a las cuales se les piensa dar; rastreo y búsqueda de signos patológicos (aspergilosis) en los animales de prueba.

d.- El producto obtenido en la fermentación puede usarse en:

- Desviar a consumo humano una gran cantidad de -- proteína vegetal que se utiliza en la preparación de alimentos balanceados.
- Abatir costos de cría y manutención de animales - de pastoreo, lo que necesariamente rebajaría el - precio de los productos primarios y derivados de ellos.
- Lograr que el país sea autosuficiente en recursos alimentarios, disminuyendo la importación de granos y alimentos.
- Recuperar y engordar animales que actualmente se sacrifican por carecer de alimentos para mantenerlos.
- Probar que el producto para saber si llena los requerimientos para su incorporación a la dieta humana.

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

1. Alexander Martin "Soil Microbiology"
Ed. Wiley & sons 2nd. ed. 1972
USA p. 287-330.
2. Alexopoulos John "Introducción a la Micología"
Ed. Universitaria 2^{nda}. reimpresión
Argentina p. 274-281
3. Bean George & MacFall Janet "Microbial interactions as they affect
aflatoxin production"
Dev. in Ind. Microbiol.
vol. 23, 1981
4. Brok Elizabeth, Stanton
W.R. & Wall Bridge Ann "Fermentation methods for protein --
enrichment of cassava"
Biot & Bioeng. 11,1271 (1969)
5. Burton K. "A study of the conditions and ----
mechanism of the diphenilamine ---
reaction for the colorimetric ----
estimation of deoxyribonucleic acid"
Biochem J. 62,315 (1956)
6. Carter B.L.A & Bull T. Alan "Studies of fungal growth and inter-
mediary carbon metabolism under stea-
dy conditions".
Biot & Bioeng. 5,785 (1969)
7. Ciegler Alex & Benett J.W. "Mycotoxines and mycotoxicosis"
Bioscience 8,512 (1980)
8. Deschamps F. & Meyer F. "Nouveau fermenteur pour milieux soli-
des".
pat. # 2 447 965 France,
febrero 1979
9. Forage & Righelato R. C. "Microbial protein from carbohydrate
wastes"
Progr. in Ind. Microbiol. vol. 14
p. 59 (1978)
10. Frazer Imrie "Proteínas extraídas de desechos agrí-
colas"
Ciencia y Desarrollo 5, 73 (1975)

11. Gray D. William "The use of fungi as food and in food processing"
CRC Critical reviews in food technology. 1,225 (1970)
12. Gregory KF., Reade A. E. "Conversion of carbohydrates to protein by high temperature fungi"
Food techn. marzo 30(1976)
13. Heckly Robert "Preservation of microorganismes"
Adv. in appl. Microb, 24,1 (1978)
14. Hernández Mercedes "Valor nutritivo de los alimentos mexicanos"
Publicaciones de la división de nutrición. INN 8a. ed. México p. 12
15. Hesseltine C. W. "A millenium of fungi, food and fermentation"
Mycologia 57,149 (1965)
16. Humphrey Arthur "Current developments in fermentation"
Chem. Engin. 26,98 (1978)
17. Joslyn Maynard "Methods in food analysis"
Academic Press London 2nd. ed. 1970
caps: XVI, XVII, XVIII, XXI.
18. Karatyan Svetlana "Microbes as food for humana"
Ann. Rev. of Microbiol
27, 301 (1978)
19. Keleti & Teaderer "Handbook of micromethods for the biological sciences"
Van Nostrand Reinhold Toronto
1974 p. 73
20. Kihlberg Reinhold "The microbes as a source of food"
Ann. Rev. Microbiol. 23,427 (1972)
21. Loewus Frank A. "Improvement in Anthrone method for determination of carbohydrates"
Anal. Chem. 24,219 (1952)
22. Lowry Oliver, Rosenbrough "Protein measurement with the Folinphenol reagent"
J. Biol. Chem. 193,265 (1951)

23. Luiselli Casio "Proteína unicelular: una respuesta al problema de la alimentación"
Inf. Cient. y Tec. 3,5 (1979)
24. Manual del Laboratorio de Bromatología ENEP Zaragoza/UNAM 7o. sem.
1981. México
25. Manual de Prácticas de Laboratorio de Bioquímica Microbiana ENCB/IPN México 8o. sem.
26. Matsuoka Hiroshi et al "Alcoholic fermentation of sweet potato without cooking"
J. ferm. technol 6,599 (1982)
27. Monod Jacques "The growth of bacterial cultures"
Ann Rev. Microbiol (3),371 (1949)
28. Morris Jacob "The chemistry and technology of food and food products"
Interscience publishers 2nd. ed
USA 1951 vol. III p. 1345-1346
29. Norris J. R. and Robbins D.W. "Methods in microbiology"
Academic press USA 1971 vol. 58
p. 225 - 229
30. Muñoz David "Proteínas para la yuca"
Inf. cient. y tec. 26,19 (1980)
31. Peberdy John "Development Microbiology"
Blackie & sons Ltd 1st Ed.
Scotland p. 153
32. Perlman & Pepler "Microbial Technology"
Academic Press 1st. ed. London
1979 vol. I p. 93-155
33. Pirt John sir "Principles of Microbe and cell cultivation"
Blackwell scientific publication
London 1st. ed 1975 p. 1-20
34. Pore Scott R. "Microbial toxins, their functional role and phylogenetic validity"
BioSystems 10, 189 (1978)

35. Prescott Cate Samuel & Gordon Dum Cecil "Microbiología Industrial"
ed. Aguilar 3a. ed. 1962 España
p. 560-606
36. Raper & Farnell "The Aspergilli"
Krieger publishing Co. la reim.
USA 1973 caps: II, III, IV, XVI.
37. Rosiles Rene H. y Pérez H. "Consideraciones generales sobre algunas micotoxinas en alimentos para animales domésticos"
Veterinaria Mex 12, (1981)
38. Sánchez Marroquín Rev. Latamer. Microbiol. y Paras
8,197 (1966)
39. Schmidell Neto W. "Producción de amiloglucosidasa de Aspergillus niger"
reporte presentado en "Primer simposium sobre tecnología enzimática"
IIBM UNAM, México 1982
40. Schnaider Walter C. "Extraction and estimation of desosypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid"
J. Biol. Chem. 161,293 (1945)
41. Segretain "Diagnostico de Laboratorio en Micrología médica"
Prensa médica mexicana la reim.
1977 México p. 85-88
42. Senez J. C. Raimbault M. and Deschamps F. "Protein enrichment of starchy substrates for animal feed by solid state fermentation"
comunicación personal
43. Srivastava "Optimal conditions of growth and production of citric acid by A. niger"
J. Indian Bot Soc. 58 (3), 208 1975
44. Stainer Roger, Adelberg E.A., Ingraham J.L. "The Microbial World"
Ed. Prentice-Hall 4 th ed. 1975
USA cap. 9, y p. 851-853
45. De la torre María Mayra "Producción de Proteínas a partir de residuos lignocelulósicos"
Ciencia y Desarrollo 37, 111
(1981)

46. Whitaker & Tannenbaum "Food proteins"
AVI publishing co. 1st ed
USA p. 315-331
47. Grupo asesor FAO/OMS/UNICEF "La escasez mundial de proteínas"
 reporte WHO cronicle 24 (2), 69 (1970)
48. Sánchez Meza Adriana "Composición química de la semilla
del huazontle (Chenopodium quinua)"
Tesis ENEP-Zaragoza/UNAM 1983
México
49. Manual de Laboratorio de ENEP-Zaragoza/UNAM 7o. sem.
 Microbiología General II 1981 México
50. Villee A. Claude "Biología"
Ed. Interamericana 6a. ed.
México 1974