

146
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO DE CULTIVOS INTENSOS DE
UN HONGO USTILAGO *zeae* CON
FINES ALIMENTICIOS

471

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO QUIMICO
P R E S E N T A N

MARIA ELENA ZARATE RAMIREZ
MARIO CESAR PEREZ LEDESMA

1 9 7 6



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

M.T.

CLASS Tesis
AÑO 1916
PÁGINAS 77

343



QUÍMICA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

Presidente	Julio Terán Zavaleta
Vocal	Jorge Soto Soria
Secretario	Alfredo Echegaray Alemán
1er. Suplente	Rubén Berra García Coss
2º Suplente	Alejandro Garduño Torres

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química

NOMBRE DE LOS SUSTENTANTES:

Maria Elena Zárate Ramírez

Mario César Pérez Ledesma

NOMBRE DEL ASESOR DEL TEMA:

Jorge Soto Soria.

AL Q.B.P. JORGE SOTO SORIA

Por el apoyo que proporcionó
en el desarrollo de éste
trabajo.

A LA DRA. EVANGELINA VILLEGAS
Jefe del Lab. de Control de Calidad
del CIMMYT por la ayuda valiosa
y desinteresada que prestó para
realizar éste trabajo.

A NUESTROS
PADRES Y
HERMANOS

I N D I C E

	PAG.
I.- INTRODUCCION	1
II.- GENERALIDADES	6
III.- MATERIALES Y MEDIOS DE CULTIVO	28
IV.- METODOS	34
V.- RESULTADOS Y DISCUSION	50
VI.- PLANTA PILOTO	75
VII.- CONCLUSIONES	81
VIII.- BIBLIOGRAFIA	84

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

I.- INTRODUCCION

El problema de la alimentación para animales de consumo alimenticio y como consecuencia, para la población mexicana, ha sido, y es, una preocupación que atañe a todos los habitantes de nuestro país.

El mismo problema ha venido a recudarse debido al aumento sorprendente de la población mundial y particularmente en nuestro país, provocando que la existencia de alimentos de buena calidad sea cada vez más limitada (8.1).

Datos del año de 1969, mostraban que más de mil millones de hombres sufrían de mala nutrición, y la FAO señala -- que actualmente no están adecuadamente nutridos el 62% de -- los niños mexicanos.

Lo anterior se debe más que nada a la falta de fuentes de productos con suficientes proteínas que eleven la calidad de los alimentos, y además, a que la mayoría de los -- mismos carecen de suficientes vitaminas y minerales que necesita el organismo diariamente (8.2).

Actualmente las industrias dedicadas a producir grandes cantidades de alimentos proteicos tanto para animales de consumo como para el hombre mismo, han tenido una gran dificultad de proveerse de materia prima. Por lo tanto, con---

ciendo la existencia de éste problema, la comunidad científica y técnica de nuestro país, debe de tratar de descubrir -- nuevas fuentes de elementos necesarios para el buen desarrollo del organismo humano, como son las proteínas, vitaminas y minerales, mejorando así la dieta del mexicano, pues creemos que ésto es básico para el buen desarrollo de nuestro país.

Por tal motivo en éste trabajo se investiga la posibilidad de obtener una fuente de proteínas, utilizando el hongo Ustilago zeae, comunmente llamado "Huitlacoche", haciéndolo crecer en cultivo intensivo, dadas ciertas cualidades de este hongo que se mostrarán a través de éste trabajo; además de que en comparación con levaduras y bacterias, los hongos tienen varias ventajas que hacen atractivo el trabajar con ellos, la recuperación de la biomasa a partir del medio de cultivo es menos difícil, el hongo tiene una estructura filamentosa que facilita su uso en la manufactura de materiales texturizados con fines alimenticios sin extracción ni filatura (8.3).

Este estudio está encaminado también, ha encontrar algunos factores básicos que ayuden a la producción a gran escala del Ustilago zeae, tratando de lograr un bajo costo de producción para obtener un compuesto que se use como aditivo

en alimentos balanceados ya sea para alimentos de animales - de consumo o bien, si sus cualidades proteínicas fueran adecuadas, también para alimento humano, ya que próximamente -- fuentes de proteína no convencionales deberán ser utilizadas en la alimentación humana según puede observarse en el cuadro número I (8.2).

Este trabajo puede ser punto de partida para que otros investigadores sigan estudiando no solo éste alimento mexicano, sino también otros alimentos, con la finalidad de que -- puedan darse a conocer a todo el pueblo mexicano y principalmente al campesino que es la parte de la población que más -- difícilmente puede adquirir proteínas, a partir de la carne de animales de consumo.

C U A D R O I
FUENTES DE PROTEINA

Tipo	<u>Convencional</u>	<u>No convencional</u>
Animal	Carne, pescado	Concentrado proteínico del pescado
	Huevos	Albúmina de huevo
	Leche, productos lácteos	Caseinato de sodio

Vegetal	Cereales	Glutén de trigo
	semillas oleaginosas	Concentrados oleaginosos.
	Legumbres (no grasosas)	Aislado del haba común
	Hojas (por ejemp. la col)	Concentrado proteínico de las hojas
	Raíces, tubérculos (por ejem: papas)	-----

Unicelular	Levadura	Proteína de levadura (cultivada en petróleo crudo)
	Hongos (superiores)	Proteína de los hongos (cultivados en residuos del almidón)
	-----	Proteína de las bacterias (a partir del metano)
	-----	Algas (cultivadas en soluciones salinas)

GENERALIDADES

II.- GENERALIDADES.

CLASIFICACION

Reino	:	Vegetal FUNGI
División	:	Talofitas EU
Clase	:	Basidiomicetes
Subclase	:	^{HETERO} Hemib basidiomicetes
Orden	:	Ustilaginales
Familia	:	Ustilaginaceae
Género	:	Ustilago
Especie	:	Ustilago scae (U. maydis)

Propiedades Biológicas

Como se ve en su clasificación, el Ustilago pertenece a la subclase de los Hemibasidiomicetes que son los hongos más primitivos, todos son parásitos, por lo que destruyen los cultivos de cereales, siendo en éstos donde encuentran el medio adecuado para su crecimiento.

Ustilaginales: Hongo parásito de los vegetales, que penetran generalmente en las plantas cuando éstas son muy jove-

nes, y cuyo micelio, extendiéndose por todas partes llega hasta las anteras, el ovario y otras partes de la flor, donde las esporas forman un polvo negro parecido al carbón, que llega al órgano atacado, cuyos tejidos normales son completamente devorados por el parásito. (8.3)

Ustilago: Género de los ustilaginales al cual da nombre cuyas esporas nacen en filas unas debajo de otras en la extremidad de los filamentos fructíferos. Sus especies atacan principalmente a los cereales produciendo en ellos enfermedades tales como el tizón. (8.4).

El Ustilago zeae es un parásito del maíz y es conocido popularmente con el nombre de "Huitlacoche" (8.5)

El hongo produce una hinchazón en el maíz, y la fructificación puede ser en el tallo, raíces adventicias, hojas, mazorca s ó panículo. Esta hinchazón es el resultado del desarrollo abundante de hifa en el tejido del huésped.

Estas hifas constituyen el micelio que es como se encuentra en la planta de maíz, las hifas tienen células mononucleares ó binucleares y la reproducción se realiza por medio de las ^{TELEUTERIOSPORAS} basidiosporas, que son capaces de germinar tan pronto como están maduras. Esta germinación es caracterizada por la producción de cuatro células por micelio y cada célula produce esporidios.

En el micelio, se encuentran millones de esporas que son de color negro y de aspecto pulverulento y le dan el color característico al *Ustilago zeae* cuando se está reproduciendo en el maíz. Estas esporas son transportadas por el viento, cuando se llega a romper el tumor y producen la infección en otras plantas.

Generalmente crece en forma unicelular cuando se cultiva en el laboratorio (8.6). En éste trabajo sólo se realizaron pruebas con *Ustilago*, cultivado en medios sintéticos.

Bajo ciertas condiciones de cultivo, aparecen en el *Ustilago*, unos cristales insolubles de ácido ustilágico que tienen propiedades antibióticas; ésta actividad inhibe el crecimiento de microorganismos contaminantes, pero aún no se ha logrado introducir como antibiótico de aplicación al ser humano principalmente por ser insoluble. (8.7)

Se han encontrado reportes ocasionales de producción de vitamina B-12 en el *Ustilago zeae* (8.6), pero el aspecto de mayor importancia en éste trabajo es conocer más a fondo las propiedades del *Ustilago zeae* como complemento en la alimentación de animales y aún para el hombre.

Requerimientos para Crecimiento en Cultivos y Formulación de Medios de Cultivo.

La microbiología industrial ofrece al hombre moderno, métodos más sencillos para obtener en algunos casos, mejores productos industriales y alimenticios.

Estos métodos están basados en conocer lo que los microorganismos tales como los hongos, las bacterias y los virus son capaces de transformar; es decir. si los hacemos reproducir en un medio determinado, obtendremos como producto de su crecimiento sustancias tan importantes como antibióticos proteínas útiles al hombre, solventes, polímeros, etc.

Es por eso que es importante encontrar ciertos factores para un mejor crecimiento y además medios adecuados, lo cual sólo se logra mediante la investigación, haciendo que esta ciencia esté en constante desarrollo, por lo que la industria en general y la industria química en particular tienen en los microorganismos una herramienta para encontrar nuevos productos industriales y alimenticios que disminuyan el problema de falta de materia prima que nos aqueja en la actualidad.

Las condiciones de cultivo, varían según el microorga-

nismo pues en muchas ocasiones, las condiciones óptimas para lograr el máximo crecimiento en masa celular, no siempre dan la máxima producción de algún producto del metabolismo (8.8).

En el caso del Ustilago zeae se escogió como temperatura de crecimiento entre 25 a 30 grados centígrados, ya que se ha visto que los microorganismos que viven en el medio ambiente, crecen mejor a ésta temperatura; sin embargo microorganismos de importancia industrial como son los lactobacilos y los productores de metano, crecen mejor a temperaturas altas, entre 40 a 45 °C, con lo que se inhibe el crecimiento de otros microorganismos contaminantes.

Con respecto al pH, se ensayaron varios grados de acidez entre 3 y 6, encontrándose que un pH de 4 fué el óptimo para obtener un buen crecimiento de éste microorganismo, aunque para los hongos en general se recomienda un pH ligeramente ácido para inhibir la contaminación bacteriana. (8.9).

Es importante también, controlar el pH durante el crecimiento, sobre todo en fermentaciones de tiempo largo, para lo cual es recomendable usar en forma conveniente, HCl, Na_2CO_3 ó NaOH; y en caso que se requiera aumentar la fuente de nitrógeno, se puede usar amoníaco, el cual también ayuda a controlar el pH.

Es ante éstas condiciones de cultivo para el mejor crecimiento de los microorganismos, donde el ingeniero que desea obtener productos a gran escala, se encuentra en la necesidad de conocer mejor a los microorganismos y sus interrelaciones, y es de aquí donde nace una nueva ciencia que según la definición de Bugliarello (8.14) se llama Bioingeniería.

La aereación, debido a la demanda de oxígeno de los microorganismos, es vital para su metabolismo; idealmente se debería especificar las proporciones de aereación expresadas como mM O_2 por litro por hora. (8.10) La aereación es una de las operaciones que mayor atención ha recibido por parte de los ingenieros bioquímicos.

El *Ustilago zeae*, es un ^{m. *zeae*} microorganismo necesariamente aerobio, ya que los hongos, las algas y algunas bacterias son obligadamente aerobias. Se ha visto que la producción de células es más abundante durante una fermentación aerobia; por lo que la producción a gran escala de los microorganismos aerobios requiere diseños de plantas más complicadas pues hay que pensar en la forma en que se va a suministrar aire, y además, la forma de esterilizarlo.

Formulación de los Medios de Cultivo

Para poder encontrar un medio económicamente adecuado, es necesario la investigación de la forma en que se desarrolla un microorganismo en diferentes medios; para lo cual, hay que hacer pruebas con ellos.

Estos medios, aparte de cualquier sustancia que se quiera probar en ellos, necesitan esencialmente de una fuente de energía, de una fuente de carbono, de una fuente de nitrógeno y de una fuente de minerales.

Fuente de Energía y de Carbono: Se conocen dos formas de producción de energía por los microorganismos durante su crecimiento; la oxidación de compuestos orgánicos e inorgánicos y por la captación de energía luminosa.

Es importante que exista una fuente de energía ya que de ella se sirven las células para formar el trifosfato de adenosina (ATP), como es el caso de los hongos y las levaduras, que lo hacen a partir de compuestos orgánicos.

La fuente de carbono es importante pues se ha visto -- que en el caso de una fermentación aerobia, el 50% de la fuente de carbono se convierte en células.

Biomasa

Ya que a nivel industrial es esencial tomar en cuenta el factor económico, se han vuelto muy populares como fuentes

de energía y de carbono, los almidones y las melazas. En este trabajo se usa la melaza con buenos resultados. Las melazas son las aguas madres de las cuales se ha removido por cristalización la mayor parte del azúcar. Cuando la producción de células es el único factor a considerar en una fermentación, la variabilidad en la composición de las melazas no es importante; pero por ejemplo, para producir ácido cítrico, esa variación es muy importante y afecta el rendimiento (8.11) El análisis químico de melazas se muestra en el cuadro II.

Fuente de Nitrógeno: La fuente de nitrógeno es importante en el crecimiento de los microorganismos, que aunada a la fuente de carbono sirve para la síntesis de aminoácidos y proteínas. Aunque para algunos microorganismos es esencial tener una fuente casi pura en nitrógeno, la mayoría de los microorganismos de importancia industrial son capaces de asimilar nitrógeno a partir de sales inorgánicas y amoníaco, de compuestos orgánicos como pirimidinas, las levaduras, vitaminas, agua de cocimiento de maíz y otros.

Se ha encontrado que el crecimiento es mejor con fuentes orgánicas de nitrógeno pero industrialmente son poco económicos, de aquí que se use un compuesto inorgánico mezclado con uno orgánico en menor proporción. El agua de cocimiento de maíz es probablemente el producto orgánico más usado como fuente de nitrógeno y es un subproducto de la obtención de --

glucosa y almidón a partir del maíz (8.12). El análisis químico del agua de cocimiento del maíz se muestra en el cuadro -- III.

Fuente de Minerales: Ya que en las reacciones energéticas que ocurren en las células para formar el trifosfato de adenosina (ATP) se necesita tanto fósforo como magnesio, es necesario adicionarlo al medio en forma de sales.

Otros minerales usados por las células en pequeñas cantidades son: Ca, K, S, Fe, Mn, Zn, y Cu; y son importantes para el crecimiento de ciertos hongos (8.9).

C U A D R O II

ANÁLISIS DE MELAZAS. (expresado como %) (Solomons, G. L.: 1969)

	<u>Remolacha</u>	<u>Caña</u>	<u>Caña Refinada</u>
Sólidos Totales	78 - 85	78 - 85	78 - 85
Azúcar Total (como invertido)	48 - 58	50 - 58	70 - 86
N	0.2 - 2.8	0.08 - 0.5	0.05 - 0.25
P ₂ O ₅	0.02 - 0.01	0.009 - 0.07	0.03 - 0.22
CaO	0.15 - 0.7	0.15 - 0.8	0.15 - 0.35
MgO	0.01 - 0.1	0.25 - 0.8	0.12 - 0.25
K ₂ O	2.2 - 2.45	0.8 - 2.2	0.2 - 0.7
SiO ₂	0.1 - 0.5	0.05 - 0.3	0.07 - 0.25
Al ₂ O ₃	0.005 - 0.06	0.01 - 0.04	0.002 - 0.01
Fe ₂ O ₃	0.001 - 0.02	0.001 - 0.01	0.001 - 0.005
C	28 - 34	28 - 33	28 - 36
Cenizas Totales	4 - 8	3.5 - 7.5	1.8 - 3.6

C U A D R O III

COMPOSICION DEL AGUA DE COCIMIENTO DE MAIZ, (expresado en % p.v) --
(Solomon, G. L. 1969)

	MUESTRA A	MUESTRA B
Sólidos totales	52	50.7
Nitrógeno Total	4.3	3.7
Acidez como ácido láctico	15	17.4
Azúcares reductores libres	5.6	- -
Azúcares reductores Totales (después de hidrólisis)	6.8	<0.2
Dióxido de Azufre	- -	0.067
Cenizas	7.5	- -
Gravedad específica	1.25	1.22
pH	4.0	3.9

FERMENTACION.

Definición: Proceso de descomposición de las sustancias orgánicas por enzimas producidas por diversos microorganismos (8.13).

Una fermentación puede considerarse como una serie de reacciones químicas, en las cuales, las enzimas son catalizadores orgánicos (Biocatalizadores).

División.- La fermentación puede dividirse en dos clasificaciones:

1) Fermentación continua; donde las transformaciones de la sustancia orgánica, suceden en un proceso que se interrumpe lo menos posible. Lo ideal es trabajar en fermentación continúa pero es el proceso menos frecuente por las dificultades inherentes al manejo de materiales biológicos, los cuales presentan problemas poco conocidos en la industria de fermentadores, como son las mutaciones.

2) Fermentación Intermitente. Es aquel proceso de fermentación donde la transformación de los materiales orgánicos, se interrumpe para separar el producto deseado. Es un proceso muy usado, ya que facilita en mucho, la resolución de problemas propios de los microorganismos, como son la adición de nutrientes, aereación, temperatura mutación, etc. Este pro-

ceso es llamado también por lotes.

Operaciones Unitarias que intervienen en la Fermentación: (8.5)

a).- Esterilización. Aunque la esterilización en sí, no es una operación unitaria, el hecho de que se necesite calor y un equipo donde efectuar la transferencia de calor, se debe tomar como un paso importante dentro del diseño de un proceso de fermentación.

El medio en que se desarrolla un microorganismo, puede que sea satisfactorio también para otros, el problema es que - estos microorganismos contaminantes pueden causar un crecimiento celular limitado y un rendimiento bajo ó nulo de los productos deseados. Es por ésto que es importante tener un medio esterilizado, con ésto estaremos seguros que solo se desarrollará el microorganismo que nos interesa.

Los microorganismos contaminantes pueden ser separados- por medios mecánicos, como son la filtración y la centrifuga- ción, pero es más usual y más seguro esterilizar el mosto, es- decir, matar a los microorganismos extraños que pudieran estar presentes. Estos microorganismos pueden ser destruídos por ca- lor, agentes químicos u ondas electromagnéticas; en el medio - industrial se usa comunmente el calor.

Normalmente, en una fermentación industrial, el medio se esteriliza pasando vapor de agua en el medio de cultivo bajo presión.

Es importante determinar el tiempo mínimo de esterilización, así como la temperatura, ya que un calentamiento prolongado puede afectar los azúcares presentes en el medio y tal vez hasta provocar reacciones entre los componentes del medio. En la esterilización el suministro de calor es una función del grado de contaminación inicial y del grado de contaminación deseado.

Además de la esterilización, el flujo de calor se utiliza también con el objeto de mantener una temperatura óptima durante el desarrollo de la masa celular (Biomasa) ya que se necesita calentar el recipiente donde se lleva a cabo la fermentación o bien, cuando se quiere eliminar el calor de la reacción de la fermentación.

Otra etapa del proceso donde interviene la transferencia de calor es en el secado al final del proceso, ó en la liofilización.

b).- Aereación - Transferencia de Masa.

La aereación es una de las operaciones unitarias que más atención ha recibido por parte de los científicos. El propósito de la aereación es proporcionar a los microorganismos el oxígeno necesario para su desarrollo durante la fermenta--

ción, ya que al obligar el hombre a los microorganismos a reproducirse en condiciones diferentes a la de su medio normal de desarrollo, sumergiéndolos en medios ricos en nutrientes con objeto de que produzcan cantidades considerables de biomasa o compuestos químicos; tiene que ser introducida una aereación artificial vigorosa, ésto se debe a que la capacidad de los medios de cultivo para almacenar oxígeno disuelto, es baja.

La forma de introducir el oxígeno al medio de cultivo es por medio de burbujas, por lo que muchos investigadores se han dado cuenta que es importante que el oxígeno en la burbuja de aire introducida en el medio de cultivo, sea capaz de disolverse primero en el medio y despues debe transportarse a la célula para que ésta pueda efectuar una respiración adecuada.

Uno de los problemas mas importantes en lo que respecta a la transferencia de oxígeno y a la aereación en sí, es el de producir dispersiones gas-líquido, en las cuales se tenga una superficie de contacto suficiente. Esto incluye la determinación de la extensión de tales superficies y la relación que tiene con la potencia consumida y con las propiedades físicas de los fluidos que participan. Es importante también, determinar los coeficientes de transferencia de masa para los casos de dispersiones de burbujas, que serian solutos-

gaseosos en líquidos y dispersiones de sólidos en líquidos.

Agitación.- El propósito de la agitación, es mezclar - los productos de la fermentación de tal forma que pueda ser - alcanzada una uniformidad en la suspensión de microorganismos y la velocidad de transferencia de masa de los productos - del metabolismo puede ser acelerada.

Así vemos que la agitación es una operación que va unida a la aereación. También es indispensable en las industrias de fermentación, contar con el equipo de agitación que ayude a mejorar la transferencia de oxígeno.

Algo realmente difícil de determinar, es la potencia - que consume el agitador debido a que los gases y sólidos en - suspensión afectan su eficiencia, pero sobre todo, porque la - biomasa se comporta como un fluido no newtoniano, confiriendo - ésta propiedad al medio de cultivo.

c).- Flujo de Fluidos.

El oxígeno necesario para la fermentación aerobia, requiere del suministro y manejo de grandes volúmenes de aire - bajo condiciones estériles. Esto nos conduce al estudio de - filtración de aire ó al flujo de gases a través de los medios de esterilización; al estudio de las caídas de presión a tra--

vés de ductos y orificios y del manejo de líquidos newtonianos y no newtonianos.

d).- Recuperación de productos y operaciones de acabado.

Las principales técnicas de recuperación, implican la aplicación de operaciones unitarias que abarcan desde operaciones mecánicas hasta transferencia de masa, siguiendo a continuación operaciones de acabado. Entre las operaciones unitarias más utilizadas tenemos; filtración, precipitación centrifugación, que son separaciones mecánicas; y, secado cristalización, adsorción, extracción y recuperación con solventes, que implican transferencia de masa y calor.

Cinética de la Fermentación.

La cinética estudia la velocidad con que se produce el material celular o bien los productos obtenidos durante el metabolismo de los microorganismos.

La fermentación, consiste en una serie de reacciones enzimáticas por medio de las cuales se realizan la mayoría de las reacciones bioquímicas. Las enzimas son catalizadores biológicos producidos por células vivientes; siendo su actividad

independiente de las células mismas.

Las reacciones enzimáticas realmente son muy complejas, es por ésto que la investigación de la cinética de las reacciones bioquímicas se concreta a mecanismos enzimáticos de etapas intermedias. Esta complejidad se debe en gran parte a que el peso molecular de las enzimas es muy elevado, y por otra parte su estructura química aún no es bien conocida.

Reconociendo todos los problemas que hasta ahora se han señalado para llevar a cabo una fermentación, es importante que nos demos cuenta de las posibilidades futuras de la fermentación. En el Cuadro IV, se muestra una serie de compuestos químicos que debido a su gran demanda tienen que importarse pero que pueden ser obtenidos a partir de microorganismos. Es posible también que con ayuda de los microorganismos se aminore la falta de abastecimientos de energéticos y de productos alimenticios, pues sabemos que existen microorganismos capaces de producir sustancias alimenticias para el hombre, y otros capaces de proporcionar fuentes de carbono, de hidrocarburos y gas natural, por biosíntesis. Consideremos lo siguiente, el ganado tarda de uno a dos meses en producir el mismo peso de proteínas que organismos tales como levaduras, bacterias, algas y hongos producen en un tiempo que varía de 20 mins. a 48 hrs. Esto nos permite apreciar el valor e importancia de la Microbiología Industrial y como su aliado

más importante a la Ingeniería Bioquímica. (Ver Cuadro No. V)

Lo anterior nos muestra que nuevos campos de acción se habren a la práctica de la Ingeniería Bioquímica, ya que aprovechando los conocimientos de las ciencias biológicas para -- producir sustancias de muy diversa índole, se plantea la necesidad de capacitar una parte de los ingenieros químicos para abordar y resolver los problemas que surgen y surgirán en ésta interacción de ciencias y técnicas.

C U A D R O IV.

DATOS ESTADISTICOS (1972)

ANUARIO ESTADISTICO DE LA SECRETARIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

ALCOHOL Y DISOLVENTES

(Acetona, Butano y Glicerina)

Total Importaciones 8 526 503.00 pesos mex.

ACIDOS ORGANICOS Y SALES DERIVADAS

(Cítricos, Pumárico, Glucónico, Láctico, Oxálico y Tártico)

Total Importaciones 20 401 488.00 pesos mex.

AMINO ACIDOS

(Glutámico y Metionina)

Total Importaciones 23 168 582.00 pesos mex.

ANTIBIOTICOS

(Neomicina, Penicilina, Estraptomicina, Tetraciclina, Tirotricina)

Total Importaciones 37 030 324.00 pesos mex.

VITAMINAS

(Acido Ascórbico, Vitamina B₁₂ y Riboflevina)

Total Importaciones 24 638 211.00 pesos mex.

VARIOS

(Levaduras, Dihidroxiacetona, Dextrana, Efedrina y Alcaloides)

Total Importaciones 4 132 724.00 pesos mex.

TOTAL DE IMPORTACIONES DE ESTOS PRODUCTOS 117 897 832.00 pesos mex.

CUADRO V

Ia

CRECIMIENTO COMPARATIVO DE PLANTAS Y ANIMALES PARA LA OBTENCION DEL - -
MISMO PESO DE PROTEINA, (Aiba, S. : et al. 1965)

<u>ORGANISMO</u>	<u>TIEMPO DE CRECIMIENTO</u>
Levaduras y Bacterias	20 a 120 minutos
Microorganismos complejos como algas	2 a 48 horas
Cultivos de pastos y alfalfa	1 a 2 semanas
Pollos	2 a 4 semanas
Cerdos	4 a 6 semanas
Ganado	1 a 2 meses

MATERIALES Y MEDIOS
DE CULTIVO

III.- MATERIALES Y MEDIOS DE CULTIVO

3.0.- Material Biológico: Cepa de *Ustilago zeae*.

Equipo:

- 3.1.- Cristalería en general.
- 3.2.- Matraces Erlenmeyer de 300 ml. bafleados. (8.11)
- 3.3.- Equipo para la determinación de Nitrógeno por el método macrokjeldhal modificado.
- 3.4.- Autoclave, Marsh Instrument Co. (160° , 1.5 Kg/cm^2)
- 3.5.- Balanza Analítica, Mettler.
- 3.6.- Agitadores rotatorios; Leland Motor, de 24 matraces y Cutler - Hammer, de 40 matraces.
- 3.7.- Bomba de vacío, H.O. Velman.
- 3.8.- Estufa, Robershaw (0° - 300°C)
- 3.9.- Separador centrífugo Westfalia (12000 r.p.m.)
- 3.10.- Microscopio, Ernest Leitz Welzlar.
- 3.11.- Compresora, Kellog Mexicana, 120 lts. de cap., presión de trabajo: 14 Kg/cm^2 ; Motor: 0.5 H.P.
- 3.12.- Mesa de Fermentación, marca Kinet. Con motor de 0.5 H.P. Y tina para mantener agua a temperatura constante controlada por termostato Robertshaw.
- 3.13.- Autoclave, AC -IAB Equipment Co. (40 - 150°C)
- 3.14.- Fermentador de acero inoxidable, con capacidad de 10 lts., con agitador, tubo muestreador y bafles.

3.15.- Potenciómetro Corning (1 - 14 pH), modelo 7.

3.16.- Autoanalizador de Aminoácidos: Beckmann Mod. 116.
Automático.

MEDIOS DE CULTIVO

3.A.- Medio de Conservación

Dextrosa	10 %
Sulfato de Amonio	0.5 %
Fosfato de Potasio	0.3 %
Extracto de levadura	0.5 %
Proteosa Peptona	1.0 %
Agar	2.0 %
Sulfato de magnesio	0.2 %
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

pH : 4.5

Esterilizar al 120°C durante 15 min.

3.B.- Medio de Propagación.

Sacarosa Comercial	10 %
Sulfato de Amonio	0.5 %
Fosfato de potasio	0.3 %
Extracto de levadura	0.5 %
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

pH : 4.2

Esterilizar a 120°C durante 20 min.

Los siguientes medios de fermentación se prepararon -tratando de sustituir los ingredientes costosos por otros -- más económicos, observando el crecimiento del hongo en cada uno de ellos.

En todos los medios se hidrolizaron los azúcares con 0.5 ml. de HCl (8.16), ajustando el pH a 4.0 ya que los hongos crecen mejor en medios ligeramente ácidos. (8.9)

3.C.- Medio de Melaza.

Melaza Comercial	5.0 %
Sulfato de Amonio	0.5 %
Fosfato de Potasio	0.3 %
Agua de Cocimiento de Maíz	1.0 %
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

pH : 4.0

Esterilizar a 120°C durante 15 min.

3.D.- Medio de Harina de Maíz.

Harina de Maíz	5.0 %
Sulfato de Amonio	0.5 %
Fosfato de Potasio	0.3 %
Agua de Cocimiento de Maíz	1.0 %
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

pH : 4.0

Esterilizar a 120°C durante 15 min.

3.E.- Medio de Harina de Trigo.

Harina de Trigo	5.0 %
Sulfato de Amonio	0.5 %
Fosfato de Potasio	0.3 %
Agua de Cocimiento de Maíz	1.0 %
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

pH : 4.0

Esterilizar a 120°C durante 15 min.

3.F.- Medio de Almidón.

Almidón en polvo	5.0 %
Sulfato de Amonio	0.5 %
Fosfato de Potasio	0.3 %
Agua de Cocimiento de Maíz	1.0 %
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

pH : 4.0

Esterilizar a 120°C. durante 15 min.

3.g.- Medio de Harina de Arroz.

Harina de Arroz	5.0 %
Sulfato de Amonio	0.5 %
Fosfato de Potasio	0.3 %
Agua de Cocimiento de Maíz	1.0 %
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

pH : 4.0

Esterilizar a 120°C durante 15 min.

M E T O D O S

IV.- METODOS

DIAGRAMA GENERAL DEL METODO DE TRABAJO



METODOS ANALITICOS

4.1.- Determinación de nitrógeno total

Se empleó el método de Kjeldhal (8.17)

y para el cálculo de proteína la fórmula:

$$\% \text{ de proteína} = N\% \times 6.25$$

- 1.- El micelio se pulveriza.
- 2.- Se elimina la humedad hasta peso constante.
- 3.- Se pesa una cantidad conocida de muestra.
- 4.- Se digiere durante 30 a 40 mins. con una mezcla -
de sulfato de potasio, mercurio (mezcla selénica)
como catalizador y ácido sulfúrico concentrado; -
hasta observar desprendimiento de pocos vapores -
blancos e incolora la solución.
- 5.- Diluir con 200 ml. de agua y agregar de 50 a 60 -
ml. de una solución de NaOH al 50% y de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -
al 5%, el NaOH sirve para neutralizar y formar -
el NH_4OH por desplazamiento del SO_4 con OH^- , el -
 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ es para precipitar el mercurio.
- 6.- Se destila, recibiendo en 20 ml. de H_2SO_4 N/20.
- 7.- Titular el exceso de sulfúrico con NaOH N/20, ---
usando rojo de metilo como indicador.
- 8.- Se calcula el porciento de nitrógeno.

9.- Se calcula el porcentaje de proteínas.

4.2.- Determinación de azúcares reductores totales.

La determinación de azúcares reductores totales se -- realizó usando el método de Underkoffler (8.18) ya que a --- través de varias investigaciones se ha encontrado que éste - método es satisfactorio para determinación de azúcares redug tores en medios de fermentación.

Este método es una modificación del método de Shaffer Somogy (8.19) y determina un máximo de 11 mgs. de azúcar en- 5 ml. de solución.

REACTIVOS:

- 1.- Solución que contiene, 12.5% de KI y 25% de $K_2C_2O_4 \cdot H_2O$
- 2.- Solución de H_2SO_4 7.5 N.
- 3.- Solución estándar de $Na_2S_2O_3$, 0.05 N.
- 4.- Solución indicadora de almidón al 1% en solución- saturada de NaCl.
- 5.- Reactivo Underkoffler - Guyman (U/G).

Reactivo U/G

COMPONENTES	PESO en g/lt.
$\text{CuSO}_4 \cdot \frac{5}{2} \text{H}_2\text{O}$	37.5
$\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ (Sal de Rochella).....	125.0
Na_2CO_3 (Anhidro)	53.0
KI	1.0
Na_2SO_4 (Anhidro)	50.0
KIO_3 (Exactamente)	3.56665
Solución saturada de NaOH para ajustar en el potenciómetro el pH a 9.48.	

PROCEDIMIENTO:

Se toman con pipeta volumétrica. 5 ml. de reactivo U/G y se colocan en frascos de vidrio de 250 ml. de capacidad con un tapón de rosca de bakelita, se adicionan después, 5 ml. de la solución problema o bien, una disolución conveniente, de tal manera que se tengan 5 ml. en total. Se agita, se tapan bien los frascos y se ponen en baño de agua a ebullición durante 30 mins. Se enfrían, a $\pm 30^\circ\text{C}$ sumergiéndolos en agua fría y luego se adicionan 2 ml. de la solución de KI - $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ agitando la solución.

Se añaden 2 ml. de H_2SO_4 7.5 N, resbalando lentamente

por las paredes para evitar el desprendimiento de CO_2 que significaría pérdida de yodo. Se deja reposar el tiempo necesario para permitir la disolución total de óxido cuproso y la clarificación de la solución. Por último se titula el exceso de yodo con la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.05 N usando el indicador de almidón cerca del punto final.

Es necesario construir una curva estandar que nos relacione ml. de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastados, con los mg/ml de azúcares reductores del problema, usando en vez de muestras, soluciones preparadas de azúcar, en nuestro caso utilizamos dextrosa.

METODOS DE TRABAJO

4.A.- Conservación de la Cepa

El objetivo era mantener el *Ustilago zeae* en forma activa, libre de contaminantes y en crecimiento típico y reconocible (8.21).

Para lo anterior se preparó el medio 3.A., el cual se distribuyó en tubos de ensaye de 15 x 150 mm., éstos se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos, luego se inclinaron y se dejaron enfriar para que solidificaran, posteriormente se pusieron en la estufa a 28°C durante 24 horas, con objeto de comprobar si su esterilización fué correcta. Después de ésto, se procedió a inocular con una asada de la cepa, evitando cualquier tipo de contaminación y se incubaron a 28°C durante 6 días. Las resiembras de la cepa se llevaron a cabo cada 15 días.

4.B.- Propagación de la Cepa.

Se preparó el medio 3.B., en matraces erlenmeyer ba---fleados con cantidades de 100 ml. cada uno, se probó su esterilidad durante 24 horas a 28°C. Los matraces se inocularon con nueve asadas de micelio de los tubos anteriores y después de tapanlos con una lámina de algodón y gasa (8.11), se incubaron en agitación durante trece días.

La inoculación se llevó a cabo en un cuarto cerrado, - sobre una mesa cuya superficie fue flameada con el mechero; - la atmósfera que rodea a la mesa también fue flameada. Con el asa esterilizada, se tomó un poco del hongo que se encuentra dentro de los tubos y se pasó a un matraz evitando tocar la - parte del algodón que queda en la boca del matraz. Toda la ma - niobra se realizó junto al mechero para evitar contaminacio-- nes.

Por cuantificación de la producción de micelio, se ob - servó la propagación de la cepa con el fin de determinar el - tiempo óptimo de mayor producción.

4.C.- Preparación de la Semilla

Se preparó el medio 3 B., colocando una cantidad de - 100 ml. en un matraz erlenmeyer bañeado, se probó su esteril - lidad durante 24 h. incubando a una temperatura de 28°C. El - matraz se inoculó con una asada de micelio obtenida de los - tubos de conservación; se incubó durante tres días en agita - ción y a 28°C., enseguida se pasó al cuarto frío para dete-- ner el crecimiento y así evitar que al agotarse el medio co - menzara a lisarse el micelio del hongo.

Se decidió detener el crecimiento micelial al tercer día para que al inocular en otros matraces aprovecharamos la etapa de mayor crecimiento del hongo, esto se observa claramente en la curva núm. 1.

De ésta semilla se tomaron porciones de 10 ml. para inocular en diferentes matraces con el fin de que al estandarizar el inóculo se notara el comportamiento del microorganismo en su crecimiento. Esta estandarización es importante para poder realizar pruebas de crecimiento en diferentes medios de propagación.

4.D.- Preparación de los Medios de Cultivo. (Del 3.C al 3.G)

Se prepararon los medios de melaza, harina de maíz, - harina de trigo, almidón y harina de arroz, en cantidad de -- 100 ml. por cada matraz, en matraces erlenmeyer bafleados, - se probó su esterilidad durante 24 hrs., a 28°C.; como inicialmente la concentración de la fuente de carbono era de 10% en los medios de cultivo, se encontró que a las 24 hrs., en todos los medios se había formado una gel, lo cual impedía el crecimiento del hongo y su observación.

Por tal motivo, se hidrolizaron los medios con 0.5 ml. de ácido clorhídrico concentrado y la composición inicial -- del medio se mantuvo constante; dicha prueba dió también resultados negativos, por lo que se optó por reducir la concentración de la fuente de carbono al 5%.

El HCl no inhibió el crecimiento del hongo, ya que se utilizó en concentración baja, ésto se debe a que los hongos en general, crecen mejor en medios ligeramente ácidos (8.9).

Después de agregar el HCl a los medios, se procedió a esterilizarlos, probándose su esterilización por incubación durante 24 hrs. a 28°C. Finalmente se determinó el pH de los medios.

4.E.- Valoración de los Medios probados por Observación.

Los medios ya preparados de acuerdo a lo indicado en 4.D., se inocularon con 10 ml. de la semilla cuya preparación se describe en 4.C. y se incubaron con agitación durante 11 días a 28°C., observando el crecimiento del hongo al microscopio en los días 2, 4, 6, 8 y 11 en todos los medios. Esta observación nos permitió tener un criterio para seleccionar-

el medio que se habría de usar en los fermentadores ya que dicha selección se hizo en base al grado de población observado.

Una pequeña muestra de cada matraz se diluyó con agua destilada, y se colocó entre lámina y laminilla para ser observada al microscópio.

Debido al crecimiento de éstos hongos en forma de hifas, fué fácil reconocer un aumento en el crecimiento de los hongos al observarlos a través del microscópio.

4.F.- Fermentación en Matraces.

Se prepararon los medios de cultivo en dos matraces bafleados, que de acuerdo a la observación, como se indicó en 4 E, fueron los que tuvieron un mejor rendimiento.

Los medios de harina de maíz y de melaza ya preparados, se inocularon con 10 ml. de la semilla cuya preparación se describe en 4.C. y se incubaron con agitación durante 9 días a 28°C.

Transcurrido éste período, se separó el micelio mediante filtración al vacío y se le determinó por ciento de proteína así como aminoácidos presentes.

4.G.- Fermentación Final.

Ya que los resultados obtenidos en la experiencia anterior fueron satisfactorios, se hicieron pruebas en fermentadores de 10 lts. mejorando con esto la agitación y la ag--reación.

Se utilizaron los mismos medios que en 4.F. (melaza y harina de maíz) y la preparación de dichos medios se realizó de acuerdo a los siguientes pasos:

a).- Se pesaron los componentes de los medios 3.C. y 3.D. considerando cantidades de acuerdo a un volumen de 10 - lts.

b).- Se esterilizó la melaza contenida en dos matra--ces de dos litros de capacidad, durante 15 minutos y después se filtró para eliminar las impurezas que como partículas sólidas se encuentran en todas las melazas.

c).- Se agregaron los componentes de los medios de --cultivo a los fermentadores de 10 litros de capacidad, aña--diendo 10 ml. de TWEEN - 80 como antiespumante.

d).- Se acidularon los medios de cultivo con ácido --clorhídrico concentrado bast. un pH de 5.0.

e).- Se esterilizaron los fermentadores con los filtros de aire colocados, durante 30 minutos, a 120°C .

f).- Se probó la esterilidad durante 24 hrs. a 28°C .

En seguida se preparó la semilla de acuerdo al método 4.C., en 10 matraces bafleados con 100 ml. de medio de cultivo cada uno, éstos matraces se incubaron durante 6 días para después inocular en los fermentadores.

La inoculación en los fermentadores se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento: Con un mechero se flamea la zona de muestreo que está en la tapa del fermentador, se abre la compuerta de inoculación y se agrega a cada fermentador el contenido de cinco matraces semilla, cada matraz se vierte a través de la flama del mechero; al final, se flamea toda la tapa del fermentador para evitar contaminaciones.

Efectuada la inoculación, los fermentadores se acoplan a una flecha, la cual mueve el agitador de paletas que está dentro del fermentador. Se proporcionó aire por medio de una compresora que inyecta hasta 4 Kg/cm^2 de presión a la descarga pero, se mantuvo una presión de 0.2 Kg/cm^2 a la entrada del fermentador y se le inyectaron más o menos 9 piescúbicos estandar de aire por hora, logrando esto y el control de la presión por medio de unas válvulas reductoras.

Antes de entrar el aire al fermentador, se le hizo pa

sar a través de los filtros de algodón comprimido que previamente se habían esterilizado junto con el fermentador.

Los fermentadores se colocaron dentro de la tina con agua a 35°C., ésta temperatura se controló por medio de un termostato eléctrico.

Toma de muestra: Los tubos muestreadores se cerraron con tubos de ensaye que contenían alcohol etílico desnaturalizado, éste alcohol tenía la finalidad de mantener estéril la descarga de los tubos muestreadores. Antes de los tubos esterilizadores, se colocaron pinzas de Mohr tal que antes de iniciar la toma de muestras se provocó el sifón para así obtener las muestras con solo abrir las llaves.

Los pasos en que se puede dividir la toma de muestras son:

- a).- Se separó el tubo esterilizador de la descarga de los tubos muestreadores.
- b).- Inmediatamente se colocó el tubo colector, previamente catalogado de acuerdo a la hora y fecha de la toma de la muestra.
- c).- Se abrió entonces la pinza de Mohr.
- d).- Se separó el tubo colector, después de obtener -- 10 ml. de muestra.
- e).- Se cerró la pinza de Mohr.
- f).- Se colocó el tubo esterilizador finalmente.

Las muestras se tomaron cada 8 horas durante 9 días - que duró la fermentación.

4.H.- Peso del Micelio.

Efectuada la fermentación, la separación del micelio se efectuó en un separador centrífugo a 12000 r.p.m., el micelio se lavó cuatro veces con agua destilada obteniéndose - un filtrado casi transparente, después se secó a 28°C durante 24 horas y se le determinó humedad pasado éste tiempo, se pesó finalmente, para obtener el rendimiento para las dos -- pruebas, harina de maíz y melaza.

4.I.- Valoración de las Muestras.

De las muestras obtenidas cada 8 horas de los fermentadores se hicieron las siguientes valoraciones:

(a).- Azúcares reductores totales,

a.1).- Las muestras se filtraron en un embudo Buchner con papel filtro Whatman del número 5, obte--- niéndose un filtrado claro (8.18).

a.2).- Se aforó una alícuota de éste líquido a un volumen cuya concentración quedó dentro de la -- sensibilidad del método para determinar azúca-

res.

a.3).- Se determinaron azúcares reductores en ésta so-
lución por el método de Underkoffler.

a.4).- Se compararon los resultados con una curva es-
tandar de sacarosa, siguiendo después con el -
método de trabajo aquí descrito.

(b).- Micelio producido.

b.1).- De acuerdo a (a.1), en el papel filtro quedó el sed-
imento.

b.2).- Se procedió a lavarlo con agua destilada.

b.3).- Se secó el sedimento a 50 - 60°C durante 45 minutos.

b.4).- Se pesó el sedimento (micelio + papel filtro - papel
filtro). Los valores obtenidos fueron graficados.

RESULTADOS Y
DISCUSION.

V.- RESULTADOS

Y DISCUSION.

TABLA NUM. I.

CRECIMIENTO DE USTILAGO ZEAE EN EL MEDIO 3.B.

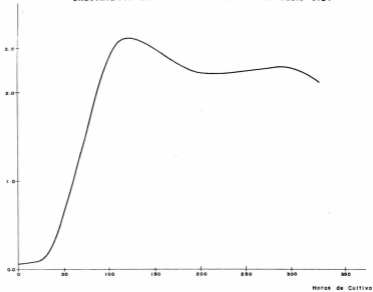
Horas de cultivo	Peso del Micelio en gramos.
24	0.09
72	1.52
120	2.55
144	2.14
168	2.08
288	2.20
312	2.10

TABLA NUM. II.

VALORES DE LA CURVA ESTANDAR PARA LA DETERMINACION DE
AZUCARES REDUCTORES TOTALES.

mg. de dextrosa/ml.	ml. de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.05 N usados
1	2.80
2	3.40
3	4.30
4	4.30
5	5.35
6	6.00
7	6.90
8	7.65
9	8.75
10	9.15

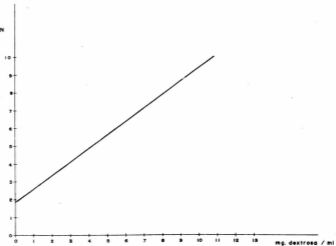
CRECIMIENTO DEL USTILAGO ZEAE EN EL MEDIO 3.B.

Peso del Micelio
en g.

GRAFICA Nº 2

CURVA ESTANDAR PARA LA DETERMINACION DE
AZUCARES PRODUCTORES TOTALES

ml.
 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.05 N
GASTADOS



Gráfica Núm. 1.-

Esta gráfica nos muestra el crecimiento del *Ustilago zeae* en el medio de propagación (3.B) usando sacarosa comercial como fuente de carbono.

Este experimento nos sirvió para conocer el punto de máximo crecimiento del microorganismo en ese medio, en relación al tiempo. Este dato es importante cuando se desean hacer experimentos para conocer el comportamiento del microorganismo en medios de cultivo de diferente composición química, ya que de ésta manera se puede suponer un rango de crecimiento con respecto al tiempo en dichas experiencias, en base a lo mostrado en ésta gráfica.

Es una curva bastante típica, que muestra una fase de adaptación pequeña, más o menos de 24 hrs.; seguida de una fase logarítmica ó de crecimiento constante, que llega al punto de máximo crecimiento a las 120 hrs. En seguida se nota una fase de decrecimiento que es de corta duración, ésto puede deberse a que en el punto de máximo crecimiento la reproducción se llevaba a cabo a una gran velocidad, lo que ocasionó que el alimento no fuera suficiente para la gran población obtenida, ocurriendo un colapso que realmente no fue de importancia negativa para el crecimiento, puesto que después de otras 24 hrs., se logra una fase estacionaria con una ligera-

tendencia superior. Finalmente se alcanza la fase de decadencia logarítmica a las 290 hrs.

Gráfica Núm. 2.-

Se elaboró una curva estandar, graficando mg./ml. de sacarosa contra ml. de una solución de tiosulfato de sodio 0.05-N, la cual tuvo como objetivo, encontrar una equivalencia de los ml. de tiosulfato usados y los ml. de cada muestra del medio de fermentación cuando se determinaron azúcares reductores por el método de Underkoffler.

La curva se elaboró utilizando sacarosa como estandar, hidrolizándola con un ácido para liberar sus azúcares reductores y comparar así, éstas soluciones estandar con los medios de cultivo usados, que debido a su composición compleja, también necesitan de previa hidrólisis ácida para la liberación de los azúcares reductores totales, existiendo de ésta forma, mayor similitud en ambas determinaciones y por lo tanto menor error.

Para llegar a la concentración original de azúcares en la muestra, se tomó una alícuota del hidrolizado, se neutralizó y se aforó para su determinación por el método de Underkoffler; se obtuvo la equivalencia por medio de la curva estandar y se usó la siguiente fórmula para obtener dicha concentra

ción en forma porcentual.

$$\text{gr. \% sacarosa} = \frac{\text{mg./ml. de la curva} \times \text{aforo}}{\text{ml. de alicuota problema}} \times \frac{1 \text{ gr.}}{1000 \text{ mg.}} \times 100$$

SELECCION DEL MEDIO DE CULTIVO PARA USAR EN FERMENTADQ
RES POR OBSERVACION AL MICROSCOPIO.

La observación al microscopio del *Ustilago zeae*, durante las diferentes etapas de su desarrollo en varios medios, nos permitió seleccionar el medio más favorable para el crecimiento del hongo. La selección fué en base al grado de población observado.

El procedimiento seguido, fué poner una gota del medio inoculado y una gota de agua destilada en un portaobjetos, -- luego se cubrió con un cubreobjetos y se llevó inmediatamente al microscópio.

Observado al microscópio, el *Ustilago zeae* es de aspecto fibroso; pequeños filamentos unidos como articulaciones que se extienden en todas direcciones.

Los resultados son resumidos en la Tabla III, en la -- cual se dieron valores de 1 + a 5+, que significan el grado de población. En seguida se muestra la clave de ésta tabla.

CLAVE.-

5 + :	Muy abundante en número de microorganismos				
4 + :	Abundante	"	"	"	"
3 + :	Medio	"	"	"	"
2 + :	Pobre	"	"	"	"
1 + :	Muy pobre	"	"	"	"
0 :	No se observa crecimiento.				

TABLA NUM. III

SELECCION DEL MEDIO DE PROPAGACION POR
OBSERVACION AL MICROSCOPIO.

MEDIO	48 hrs.	96 hrs.	144 hrs.	192 hrs.	264 hrs.
MAIZ A	2 +	4 +	1 +	0 5 +	0.5 +
MAIZ B	2 +	5 +	2.5+	2.5 +	1.5 +
TRIGO A	1 +	3 +	3 +	2 +	1 +
TRIGO B	1 +	3 +	2.5+	2 +	1 +
MELAZA A	2 +	4 +	4 +	3 +	2 +
MELAZA B	2 +	4 +	4 +	2.5 +	2 +
ALMIDON A	0	1 +	2 +	2.5 +	3 +
ALMIDON B	1 +	2 +	1.5+	2 +	3 +

Los medios elegidos fueron el de harina de maíz y el -

de melaza pues, como se observa en la tabla, el crecimiento del hongo, fue más rápido y en forma abundante en ellos.

TABLA NUM. IV

COMPOSICION DE AMINOACIDOS EN LAS MUESTRAS DE MICELIO DE *USTILAGO ZEAE* CULTIVADO EN LOS MEDIOS DE MELAZA Y HARINA DE MAIZ.
(Determinación hecha en el Analizador de Aminoácidos)

AMINOACIDO	MEDIO MELAZA		MEDIO HARINA DE MAIZ	
	% en muestra	% en proteína	% en muestra	% en proteína
LISINA	0.637	5.14	0.210	3.82
HISTIDINA	0.226	1.82	0.103	1.97
ARGININA	0.522	4.21	0.097	1.77
AC. ASPARTICO	0.870	7.01	0.349	6.34
TRONINA	0.501	4.04	0.241	4.38
SERINA	0.443	3.55	0.186	3.38
AC. GLUTAMICO	0.942	7.60	0.300	5.45
PROLINA	0.407	3.29	0.217	3.94
GLICINA	0.436	3.52	0.211	3.84
ALANINA	0.558	4.50	0.315	5.73
CISTINA	0.058	0.47	-	-
VALINA	0.446	3.60	0.252	4.58
METIONINA	0.139	1.12	0.019	0.34
ISOLEUCINA	0.385	3.10	0.184	3.35
LEUCINA	0.631	5.09	0.309	5.61
TIROSINA	0.366	2.95	0.258	4.69
FENILALANINA	1.504	12.13	0.279	5.07
TRIPTOFANO	0.131	1.06	0.072	1.31

Tabla Núm. 4.

Esta tabla nos muestra el contenido de aminoácidos en porcentaje de la proteína del *Ustilago zeae*; en éste caso, se uso el factor 6.25 para convertir el contenido de nitrógeno a proteína y así computar el contenido proteico en la misma -

base que en la literatura se reportan para alimentos humanos y ganado.

Tabla Núm. 5.

En ésta tabla, se comparan las composiciones de aminoácidos presentes en el hongo *Ustilago zea* cultivado en los medios de melaza y harina de maíz con otros hongos comestibles.

Es interesante indicar que en el *Ustilago* se presentan la mayoría de los aminoácidos llamados indispensables. (arginina, histidina, lisina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano, treonina y valina) (3.23), sucediendo - ésto tanto en el micelio cultivado en el medio de melaza como en el de harina de maíz.

Con respecto a la comparación con otros hongos, se puede decir lo siguiente:

El micelio obtenido en el medio de melaza, muestra una buena cantidad de lisina y su valor va de acuerdo con los obtenidos en los demás hongos. Sin embargo, en el micelio obtenido en el medio de harina de maíz, éste valor es más bajo.

En cuanto a contenido de leucina, ambos micelios están ligeramente abajo de los otros valores.

En lo que respecta a la metionina, solo el micelio obtenido en el medio de melaza compete con los otros valores. -

Composición (gr/100 gr de nitrógeno total)

Aminoácido	Ustilago zeae Medio Melaza	Ustilago zeae Medio Harina de Maíz	Agaricus campestris	Morchella esculenta	Morchella spp.	Tricholoma nudum	Pleurotus (8.20) ostreatus
Alanina	4.50	5.73	-	4.81	11.12	-	6.51
*Arginina	4.21	1.77	6.49	7.95	4.32	4.63	5.37
Ac. Aspártico	7.01	6.34	-	4.97	6.02	-	9.49
Cistina	0.47	-	-	0.27	0.80	-	-
Ac. Glutámico	7.60	5.45	-	14.81	13.45	-	10.96
Glicina	3.52	3.84	-	2.94	2.75	-	4.79
*Háistidina	1.82	1.87	-	2.12	1.94	2.96	2.43
*Isoleucina	3.10	3.35	14.7	2.7	3.45	3.15	3.99
*Leucina	5.09	5.61	7.77	5.12	6.06	6.66	8.39
*Lisina	5.14	3.82	-	3.84	5.38	6.66	5.38
*Metionina	1.12	0.34	4.64	0.90	1.41	1.66	1.61
*Fenilalanina	12.13	5.07	-	2.51	2.82	3.7	15.93
Prolina	3.29	3.94	-	4.15	4.78	-	4.86
Serina	3.55	3.38	-	3.05	3.90	-	5.64
*Treonina	4.04	4.38	-	2.98	3.37	3.70	5.08
Tirosina	2.95	4.69	-	1.72	2.49	-	3.54
*Valina	3.60	4.58	10.5	3.36	3.86	3.89	4.73
*Triptófano	1.06	1.31	1.64	0.86	1.43	3.52	0.74

Tabla # 5.- Tabla comparativa del contenido de Aminoácidos de Ustilago zeae con otros hongos (8.24)

*Aminoácidos esenciales (8.23)

Lo mismo sucede con la arginina.

La fenilalanina se encuentra en buena cantidad en el micelio obtenido en el medio de harina de maíz, pero es mayor el valor encontrado en el medio de melaza.

El triptófano se encuentra en valor intermedio con respecto a los valores encontrados en los otros hongos.

Con lo que respecta a la treonina, valina, isoleucina e histidina, los valores encontrados son semejantes a los valores reportados para los otros hongos.

Tabla NÚM. 6.

Algunos valores de los aminoácidos esenciales son menores en el *Ustilago zeae* en ambos medios, con respecto a los reportados para proteínas animales y vegetales y la proteína ideal de la F.A.O.; en éste caso se encuentran los siguientes: lisina, en el caso de harina de maíz, y arginina, metionina, leucina e isoleucina para ambos casos.

Valores semejantes se encuentran con la valina, la histidina y la treonina para ambos medios, y la fenilalanina en el micelio del medio de harina de maíz.

Cabe notar que el valor de la fenilalanina encontrado en el micelio obtenido del medio de melaza es bastante aceptable.

Composición (g/100 g. de Proteína)

Aminoácido	Ustilago zeae Medio Melaza	Ustilago zeae Medio Harina de Maíz	FAO Proteína Ideal	Gluten de Maíz	Gluten de Trigo	Proteína de Soya	Proteína de Levadura	Músculo de Buey	Caseína	Albúmina de huevo
Alanina	4.50	5.73	-	-	5.0	-	-	5.0	5.5	72.0
Arginina	4.21	1.77	-	3.1	3.9	7.1	5.4	7.2	4.3	5.9
Ac. Aspartico	7.01	6.34	-	-	-	-	-	6.1	6.1	8.1
Ac. Glutámico	7.60	5.45	-	24.5	40.0	21.0	-	15.6	23.3	17.5
Cistina	0.47	-	-	1.5	1.9	1.2	1.0	1.1	0.35	1.9
Glicina	3.52	3.84	-	4.3	7.2	-	-	5.1	0.5	3.2
Histidina	1.82	1.87	-	1.6	2.2	2.3	2.9	2.9	2.1	1.7
Isoleucina	3.10	3.35	4.2	5.0	3.7	4.7	6.0	6.3	6.3	7.1
Leucina	5.09	5.61	4.8	25.0	7.5	6.6	73.0	7.7	9.7	10.0
Lisina	5.14	3.82	4.2	0.8	1.9	5.8	7.6	8.2	7.6	5.0
Metionina	1.12	0.34	2.2	2.5	2.3	1.9	2.0	3.4	3.4	5.1
Fenilalanina	12.13	5.07	2.8	6.4	5.5	5.0	4.4	5.0	5.0	5.4
Prolina	3.29	3.94	-	-	-	-	-	-	7.8	4.5
Serina	3.55	3.38	-	-	-	-	-	5.5	7.7	7.4
Treonina	4.04	4.38	2.8	4.0	2.7	4.2	5.5	5.0	3.8	4.0
Tirosina	2.95	4.69	-	6.7	3.8	4.4	3.7	4.4	6.7	4.3
Valina	3.60	4.58	4.2	4.5	4.2	4.2	5.0	5.8	6.5	6.8
Triptófano	1.06	1.31	1.4	0.7	1.0	1.2	1.4	1.4	1.2	1.5

Tabla # 6.- Tabla comparativa del contenido de Aminoácidos de la proteína del Ustilago zeae con algunas proteínas animales y vegetales (8.26), - y con la proteína ideal de la FAO.(8.25)

Gráficas Núms. 3 y 4.

En éstas gráficas se muestra el comportamiento del *Ustilago zeae* en el medio de melaza (3.C).

TABLA NUM. 7
COMPORTAMIENTO DEL *USTILAGO ZEA*E DURANTE LA
FERMENTACION EN EL MEDIO 3.C.

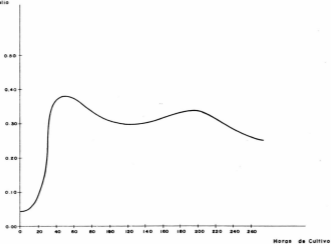
Horas de Cultivo	Peso de micelio grs.	Azúcar inicial %	Azúcar residual %	Azúcar consumido %
0	0.045	5.275	5.275	0
48	0.380	5.275	2.000	3.275
72	0.345	5.275	1.755	3.515
96	0.320	5.275	1.750	3.525
120	0.295	5.275	1.800	3.475
144	0.300	5.275	1.850	3.325
168	0.320	5.275	1.750	3.525
192	0.340	5.275	1.250	4.025
216	0.315	5.275	0.700	4.575
240	0.295	5.275	0.250	5.025

La gráfica núm. 3 nos muestra una fase de adaptación - pequeña, seguida por una fase logarítmica de crecimiento, dicha fase corresponde a una disminución bastante marcada de -- azúcares en la gráfica núm. 4.

Después de la fase logarítmica, continúa una fase con-tendencia estacionaria, que nos muestra un pequeño incremento al octavo día, éste incremento en micelio corresponde también

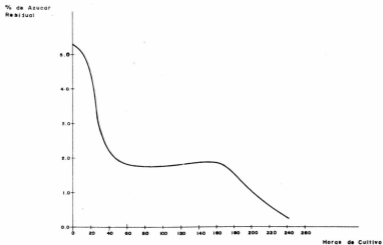
GRAFICA Nº 3

CRECIMIENTO DELUSTILAGO ZEA E EN EL MEDIO S. C.

Peso del Micelio
en g.

GRAFICA N° 4

DETERMINACION DEL CONSUMO DE AZUCAR
EN EL MEDIO S.C.



a una disminución de azúcares. Finalmente vemos una fase de decadencia en la gráfica núm. 3, debido a que como lo indica la gráfica núm. 4, el alimento casi se ha agotado.

Aunque en éstas gráficas no interesa la parte económica, debido a que se trata de un estudio de comportamiento del *Ustilago zeae* en éste medio, durante una fermentación vigorosa, de todas formas, es conveniente señalar que, las 50 horas obtenidas para el máximo crecimiento son aceptables para fines industriales. El resto del tiempo utilizado para ésta fermentación, sirvió para estudiar el comportamiento del microorganismo hasta agotar el medio, observándose un nuevo aumento en micelio a las 190 horas, el cual coincide con un consumo casi total de los azúcares.

Gráficas Núms. 5 y 6.

En éstas gráficas se muestra el comportamiento del *Ustilago zeae* en el medio de harina de maíz (3.D).

La gráfica núm. 5 muestra una fase de adaptación pequeña igual a la de la gráfica núm. 3, seguida por una fase logarítmica de crecimiento, ésta fase es correspondiente a una disminución de azúcares como lo indica la gráfica núm. 6.

Después de la fase logarítmica, continúa una fase de tendencia estacionaria y se observa un pequeño incremento al-

quinto día, lo cual corresponde a una ligera disminución de azúcares.

Posterior a la fase estacionaria, tenemos una fase de decadencia en la gráfica núm. 5, mientras que en la gráfica núm. 6, se observa que el azúcar casi se ha agotado.

En la gráfica núm. 6 se observó que a pesar de haber partido de harina de maíz (azúcar no reductor), una parte de éste se hidrolizó, debido a el ajuste de pH y a la esterilización del medio, esto nos lo indicó la cantidad de reductores presentes al inicio de la prueba.

Al disminuir el azúcar aprovechable, el hongo comienza a hidrolizar y consumir por su cuenta el resto del almidón, - siendo más veloz la hidrólisis que el consumo, esto está indicado en los aumentos de reductores a las horas 90 y 140 de la misma curva. Se observa que el segundo aumento es inferior al primero lo que indica que la harina de maíz está por agotarse. Otra observación interesante es el tiempo para llegar al máximo crecimiento, ya que en ambos medios es aproximadamente el mismo.

TABLA NUM. 8

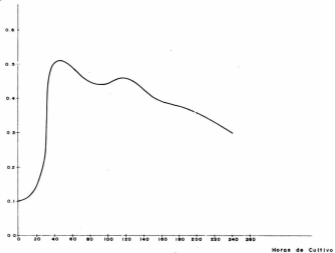
COMPORTAMIENTO DEL USTILAGO ZEAE DURANTE

LA FERMENTACION EN EL MEDIO 3.D.

Horas de cultivo	Peso de micelio grs.	Azúcar inicial %	Azúcar residual %	Azúcar consumido %
0	0.100	4.85	4.85	0
48	0.520	4.85	1.60	3.25
72	0.435	4.85	1.80	3.05
96	0.425	4.85	2.00	2.85
120	0.450	4.85	0.90	3.95
144	0.380	4.85	1.20	3.65
168	0.360	4.85	0.70	4.15
192	0.370	4.85	0.50	4.35
216	0.355	4.85	0.30	4.55
240	0.320	4.85	0.20	4.65

GRAFICA Nº 5

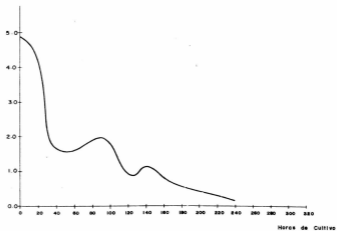
CRECIMIENTO DEL USTILAGO ZBAE EN EL MEDIO 3. D.

Peso del Micelio
en g.

GRAFICA Nº 6

DETERMINACION DEL CONSUMO DE AZUCAR
EN EL MEDIO 3. D.

% Azucar Residual



DETERMINACION DE HUMEDAD

De la masa de micelio obtenido, después de haber cen--
trifugado, se tomó una muestra sobre la cual se determinó la-
humedad:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{muestra húmeda} - \text{muestra seca}}{\text{muestra húmeda}} \times 100.$$

$$\text{Para harina de maíz: } \frac{3,2597 \text{ gr.} - 0.7587 \text{ gr.}}{3,2597} \times 100 = 79.7\%$$

$$\text{Para melaza: } \frac{2.230 \text{ gr.} - 0.5047 \text{ gr.}}{2.230} \times 100 = 77.3\%$$

Determinación del porcentaje de proteína en el micelio obtenido en fermentadores de 10 lts.

La determinación fué hecha sobre una muestra seca y siguiendo el procedimiento indicado por el método 4.1.

% proteína = % nitrógeno x 6.25.

$$\% \text{ nitrógeno} = \% \text{ N} = \frac{\text{ml. de H}_2\text{SO}_4\text{N}/20 \text{ usados} \times \text{Normalidad de H}_2\text{SO}_4}{\text{peso de la muestra}} \times \frac{\text{miliequivalente de Nitrógeno.}}{100}$$

$$\text{Para harina de maíz: } \% \text{ N} = \frac{16.0 \times 0.05 \times 0.014 \times 100}{0.20}$$

$$\% \text{ N} = 5.6$$

$$\% \text{ proteína} = 5.6 \times 6.25 = 35\%$$

$$\text{Para melaza : } \% \text{ N} = \frac{7.35 \times 0.05 \times 0.014 \times 100}{0.0703}$$

$$\% \text{ N} = 7.31$$

$$\% \text{ proteína} = 7.31 \times 6.25 = 45.68 \%$$

RENDIMIENTO

El rendimiento de la fermentación se ha determinado en función de la cantidad de micelio obtenido con respecto a la cantidad de fuente de carbono usada; todo ésto para un volumen de 10 lts. de medio.

Para Melaza:

De la tabla núm. 7, tenemos 5.27% de azúcares reductores iniciales que corresponden a 10.54 mg/ml.

$$10.54 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times 10\,000 \text{ ml.} \times \frac{1 \text{ gr.}}{1000\text{mg.}} = 105.4 \text{ grs. de azúcares reduc. iniciales.}$$

Por otra parte, obtuvimos 310.0 g. de micelio con una humedad de 77.3% en el fermentador, y que corresponden a -- 70.37 g. de micelio

$$\begin{aligned} \text{RENDIMIENTO} &= \frac{\text{gr. de micelio obtenido}}{\text{gr. de azúc. reduc. iniciales}} \times 100. \\ &= \frac{70.37}{105.4} \times 100 = \underline{66.76\%} \end{aligned}$$

Para Harina de Maíz:

De la tabla núm. 8, tenemos 4.85% de azúcares reductores iniciales que corresponden a 9.7 mg/ml.

9.7 mg/ml. = 97.0 g. de azúcares reduc.
iniciales.

Para éste medio, se obtuvieron 407.0 g. de micelio los que con una humedad de 79.7% corresponden a 82.62 g. de micelio base seca, de aquí el rendimiento es:

$$\text{RENDIMIENTO} = \frac{82.62}{97.0} \times 100 = \underline{85.17\%}$$

Al comparar las diferencias en por ciento de proteína obtenida en el micelio cultivado en los medios de harina de maíz y de melaza, es interesante observar que es mayor el valor encontrado en el medio de melaza.

Sin embargo, el rendimiento en micelio, es mayor en el medio con harina de maíz como fuente de carbono que cuando se usó melaza.

PLANTA PILOTO

VI.- PLANTA PILOTO

Planteamiento de una Planta Piloto para producir 150 - Kg. de Masa Celular por Módulo.

Como el principal motivo de ésta tesis, es encontrar - factores apropiados para producir masa celular en grandes can - tidades, creemos necesario mostrar el estudio de una planta - piloto desde el punto de vista de interés a la ingeniería, -- sin detallar tamaño de equipo ni análisis de costos.

La planta piloto es el punto intermedio entre la inves - tigación de laboratorio y la creación de una planta a escala - industrial. Por ésto mismo representa una base para los pro - yectos industriales. En vista pues, de que el objetivo de una planta piloto es afinar las etapas encontradas en laboratorio para la obtención de un producto, hemos pensado mostrar en -- una forma simplificada dichas etapas, para mostrar los puntos de mayor interés en la ingeniería de una planta piloto; es -- por ésto que se eligió un proceso por lote y una producción - de 150 Kg. por corrida.

Para el caso particular de producción de Ustilago zeae, el proceso puede describirse en la siguiente forma:

Para la conservación de cepas de Ustilago zeae en el - laboratorio, se mantiene vivo el microorganismo en tubos de -

ensaye con medio de cultivo sólido; de aquí se prepara la semilla en 6 matraces bafleados con 100 ml. de medio de cultivo de propagación cada uno, que de acuerdo a las curvas de crecimiento estarán listos a los cuatro días a partir de la inoculación, éste tiempo es el mismo para todos los pasos durante el proceso de propagación y en el proceso final de producción.

Para dar una mejor idea del proceso, éste se indica en un diagrama anexo.

Por pruebas realizadas en el laboratorio, se llegó a la relación óptima de semilla a capacidad de fermentador y es de: 1 : 20, no pudimos emplear algunas relaciones recomendadas por la literatura (por ejemplo 1 : 10) porque obtuvimos un producto muy espeso, difícil de manipular durante la fase de propagación.

Una vez preparada la semilla en los 6 matraces, se pasa a un fermentador de 12 lts. (F_1). Al alcanzar el máximo crecimiento, la masa celular obtenida se pasa a otro fermentador de 240 lts. (F_2). la biomasa obtenida aquí, es inoculada en un fermentador final de 4800 lts. (F_3). El conjunto de los tres fermentadores formará un módulo de producción. Durante ésta operación, el microorganismo se mantendrá en la fase de crecimiento logarítmico.

Al obtener el máximo desarrollo, la biomasa pasa a una o varias centrifugas ó separadores de centrifugado continuo; - el producto obtenido deberá pesar 150 Kgs. con una humedad de 77%.

Cada fermentador se carga con nutrientes en solución - además de la semilla, por lo que dichos nutrientes junto con la cepa son las materias primas.

Otros equipos industriales necesarios en el proceso -- son: (8.22)

- Una caldera que genere vapor a una presión arriba de 4 Kg/cm^2 , para la esterilización de los medios y el módulo en sí, y además para mantener la temperatura de 32° C en los fermentadores.

Debemos mencionar que cuando sea necesario bajar la temperatura, debiera contarse con agua fresca circu-lante a través del equipo.

- Una compresora con filtros de aire que descargue ai-re estéril en el fondo de los fermentadores para ace-lerar el crecimiento de los microorganismos (aerobios), y reducir los tiempos de propagación y de producción.
- Tanques de almacenamiento para la melaza ó la harina de maíz y tanques de preparación para los medios de cultivo. Pueden ser necesarios también, tanques para

hacer las soluciones de las sales (de amonio, fosfatos, etc.)

- Una centrifuga continua en la descarga del último fermentador y un secador spray (por aspersión en aire caliente) para obtener un producto seco.
- Bombas para el transporte de la biomasa.
- Tuberías, válvulas y otros accesorios.
- Ya que es importante mantener controladas las variables que intervienen en el proceso, son necesarios los instrumentos de medición y control de variables tales como temperatura, presión, volumen de aire, velocidad de agitación, pH, oxígeno disuelto en el medio, etc..

Ya dijimos que la obtención por módulo será de 150 kgs, de biomasa al 77% de humedad por día. Para obtener una producción diaria superior en cantidad, de masa celular, el número de módulos tendrá que ser aumentado.

Con dos o tres módulos, se podrá tener una producción más continua, alternando la producción de un módulo con la propagación de biomasa en otro y la preparación para iniciar el proceso de un tercer módulo, se obtiene una producción cada 4 días en lugar de 12 días, tiempo de operación de un solo módulo.



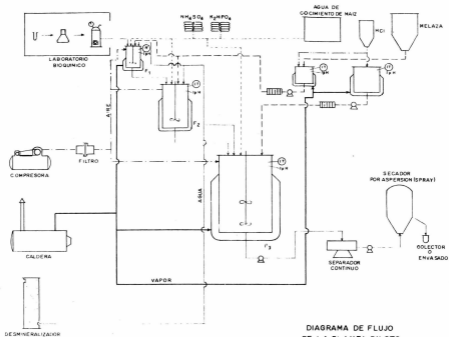


DIAGRAMA DE FLUJO
DE LA PLANTA PILOTO

CONCLUSIONES

VII.- CONCLUSIONES

De acuerdo a los valores obtenidos en el aminograma y considerando los valores de otras sustancias ricas en aminoácidos esenciales, se puede considerar de interés, continuar estudiando al *Ustilago zeae* para en lo futuro, considerarlo como importante fuente de proteínas. Sin embargo no hay que olvidar, que dada su popularidad en nuestro país, se podría explotar como un producto gastronómico, como se hace actualmente con los champiñones.

Además, de acuerdo a un reporte, (8.27) su contenido en vitaminas es el siguiente; Vitamina B₁₂ (Cianocobalamina), Vitamina B₂ (Riboflavina), Biotina (Vitamina H) y Acido Nicotínico (Niacina); lo cual hace al *Ustilago zeae* más interesante.

Sin embargo, es probable que existan o que se encuentren otros microorganismos que contengan mayor cantidad de proteínas por lo que éste trabajo debe ser aliciente para que otros ^{2.5.30.20} técnicos tengan interés en estudiar a los microorganismos en general, en busca de nuevas fuentes de proteínas que sirvan para alimento.

A menos que un estudio económico demuestre que es incoesteable la producción de *Ustilago zeae* a nivel industrial,

creemos que éste hongo puede usarse como complemento de alimentos balanceados para animales comestibles del ser humano y puede en algunos casos, competir con sustancias que se -- usan para alimento humano directamente.

SP

BIBLIOGRAFIA.

VIII.- BIBLIOGRAFIA.

- 8.1.- Symposium: Microorganism as Potential Food Sources.-
Fungi Imperfecti as Sources of Protein. Capitulo 28
William D. Gray.
Society for Industrial Microbiology. Vol., 7, A.I.B.
S., Washington D.C. 1966.
- 8.2.- Investigación Sobre Nuevas Proteínas.
Dr. B.J. Hudson.
Publicación del Departamento de Ciencia de la Alimen
tación de la Universidad de Reading, Inglaterra. - -
1972.
- 8.3.- Protein Production by Micro - Fungi.
Arnold Spicer.
Tropical Science, Vol. XIII, No. 4, 1971. Pag. 239 -
250.
- 8.4.- Diccionario Enciclopédico Ilustrado.
Editorial Sopena, Barcelona, España.
- 8.5.- Principales Hongos Comestibles de México. Taxonomía-
y Ecología.

Herrera, T.; Guzmán, G.
An. Inst. Biol. Mex. XXXII.
Mex. 1961.

- 8.6.- Industrial Microbiology.
Anthony Rose.
Butterwords, London, 1961.
- 8.7.- Industrial Microbiology.
Samuel Cate Prescott.
Mc. Graw - Hill, New York. 1959.
- 8.8.- Biochemical Engineering.
S. Aiba, A. E. Humphrey, N. F. Mills.
Academic Press. New York. 1965.
- 8.9.- Mushrooms Mycelium Production by Sumerged Propagation.
Humfeld T. F.; Sugihara, F.
Western Research Lab. Albany.
California, Food Tech. 3, 355, 1949.
- 8.10.- Litchfield, J.H., et. al., J. Arg. Food Chem.
11, 158 1963.
- 8.11.- Materials and Methods in Fermentation.
Solomons. G. L.

Academic Press New York. 1969.

- 8.12.- Chemicals from Fermentation.

Hahn, P. A.

Doubleday and Co. Inc.

New York, 1968.

- 8.13.- Enciclopedia Británica Barsa.

Enciclopedia Britannic, Inc. London. (1974)

- 8.14 "Engineering and the Bio-Machine Interfase", in Bioengineering and Engineering View.

San Francisco Press, Inc.

San Francisco, Cal. 1968.

- 8.15.- El ingeniero Bioquímico y la Bioingeniería.

Ing. Genina, S.P.; Ing. Montemayor, E.R.

Revista del IMIQ; Feb. - Marzo 1974. No. 2

Vol XV. Pag. 58 - 66.

- 8.16.- Nutrición Animal. Manual de Métodos Analíticos.

Bateman, J. V.

Herrero Hnos. Sucesores S. A.

México 1970.

- 8.17.- Análisis Químico Cuantitativo.
Willard, H. H.; Furman, H. N.; Bricker, E. C.
Editorial Marín . A.
México 1956.
- 8.18.- Semimicromethod for the Determination of Reducing Sugars in Fermentation Media.
Underkoffler, L. A. et. al.
Iowa State College. J. Sci. 17, 251 - 256. 1943.
- 8.19.- Copper - iodometric reagents for Sugar Determination
Shaffer, P. A. and Somogy, M.
J. Biol. Chem.; 100, 695 - 713, 1933.
- 8.20.- Producción Comparativa de Micelio de *Pleurotus ostreatus* por el Método de Cultivo Sumergido, con Pines Alimenticios Humanos.
Cabrera, S. M. S.; Moeller, Ch. G. E.
Tesis UNAM. 1974
- 8.21.- Manual of Microbiological Methods.
Society of America Bacteriologists.
Mc. Graw - Hill Boork Co. Inc.
New York. 1957.

- 8.22.- Chemical Engineering Handbook.
Perry, J., et. al.
Fourth Edition.
Mc. Graw - Hill New York. 1970
- 8.23.- Enciclopedia Familiar de la Medicina y la Salud.
Morris Fishbein, M. D.
H. S. Stuttman Co. Inc. Editores.
New York. 1967.
- 8.24.- Microbial Technology.
Pepler H. J.
Reinhold Publishing Co.
New York. 1967.
- 8.25.- FAO, Nutritional Studies No. 16.
Food & Agricultural Organization of the United Nations
Rome. 1957.
- 8.26.- Química Fisiológica Práctica.
Hawk, P. B., et. al.
Ed. Interamericana, S. A.
México, 1949.

- 8.27.- Estudio de la Liberación de Vitaminas en el medio de-
Cultivo por Cepas del Basidiomiceto *Ustilago zese*,
Aislado de Maíz Mexicano.
Courret Espinoza E.
Tesis. UNAM. 1973.