
FACULTAD DE QUIMICA

U.N.A.M.

**Influencia del Agua de Cocimiento de Maíz y
de Agentes Emulsificantes en la Propagación
de una Levadura que Utiliza Derivados del
Petróleo Como Fuente de Carbono**

T E S I S

Que para obtener el título de :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a :
SERGIO DANIEL FREGOSO AMEZCUA MANJARREZ

México, D. F.

1975





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.

TESIS

ADQ _____
FCHA 1975 _____
FRC M.I. 111 _____
• _____



QUIMICA

HONORABLE JURADO :

PRESIDENTE , PROFA . NATALIA SALCEDO OLAVARRIETA .

VOCAL , PROF . ENRIQUE GARCIA GALEANO .

SECRETARIO , PROF . ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN .

1er . SUPLENTE , PROF . RUBEN BERRA COSS .

2^o . SUPLENTE , PROF . JORGE SOTO SORIA

SITIO EN DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :

EL PRESENTE ESTUDIO SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO
DE BIOINGENIERIA DE LA RAMA DE REFINACION Y PETRO -
QUIMICA DEL INSTITUTO MEXICANO DEL PETROLEO .

ASESOR DE TEMA :

PROF. , ENRIQUE GARCIA GALEANO .

A MI MADRE

A MI ABUELITA CON CARÍÑO

A MIS TIOS : ADRIAN , GUADALUPE , MAGDALENA ,
JOSE , JULIAN Y RAFAEL .

A MIS TIAS Y PRIMOS .

A AURORITA .

A MIS MAESTROS , COMPAÑEROS Y AMIGOS .

EL AUTOR AGRADECE LAS FACILIDADES PRESTADAS PARA EL
DESARROLLO DEL PRESENTE TRABAJO AL ING. FERNANDO
MANZANILLA S., SUB-DIRECTOR GENERAL DEL INSTITUTO
MEXICANO DEL PETROLEO .

ASIMISMO AGRADECE AL ING. FELIPE OCAMPO T. ,
SUB - DIRECTOR DE LA RAMA DE TECNOLOGIA DE REFINA -
CION Y PETROQUIMICA DEL INSTITUTO MEXICANO DEL
PETROLEO .

MI GRATITUD , RESPETO Y ADMIRACION PARA EL
ING. BRAULIO VILLAGOMEZ A. , SUPERINTENDEN-
TE GENERAL DE CONTROL QUIMICO DE LA GEREN-
CIA DE PETROQUIMICA DE PETROLEOS MEXICANOS ,
POR SUS VALIOSOS CONSEJOS Y AYUDA PROPORCIO-
NADA SIN LOS CUALES NO HUBIESE SIDO POSIBLE -
LA REALIZACION DEL PRESENTE TRABAJO .

AL Dr. HIRAM MEDRANO R . , POR LA PACIENCIA
Y LOS CONOCIMIENTOS QUE ME BRINDO EN EL —
TRANSCURSO DEL PRESENTE ESTUDIO

AL ING. ANTONIO VILLAGOMEZ A. , DIRECTOR
GENERAL DE LA FACULTAD DE QUIMICA DE 'LA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA , POR EL
APOYO QUE SIEMPRE HE TENIDO DURANTE TODA
MI FORMACION ACADEMICA .

AL Dr. BENITO COURIEL POR SUS CONSEJOS QUE
SIEMPRE HAN SIDO MUY VALIOSOS .

A MIS SINODALES :

Q . F . B. NATALIA SALCEDO OLAVARRIETA .

ING . QUIM . ENRIQUE GARCIA GALEANO .

Q . B . P . ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN .

C O N T E N I D O

	<u>Pág.</u>
INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS.....	12
PARTE EXPERIMENTAL	30
DISCUSION	48
RESUMEN	55
FIGURAS	58
BIBLIOGRAFIA	116

INTRODUCCION

En años recientes se han logrado muchos avances para conocer a fondo la utilización y degradación de hidrocarburos por parte de microorganismos. La capacidad de los microorganismos para degradar hidrocarburos como única fuente de carbono y energía fué señalado por Miyoshi a fines del siglo pasado (46). Estudios posteriores realizados por Söhngen (63) y Tausson (67), confirmaron ampliamente las primeras observaciones.

A partir de la década de los cincuentas muchas publicaciones acerca del tema han aparecido; Zobell (81), Beestecher (5), Davis (20), Finnerty (24), Thijse (69), Fuhs (26), Foster (25), Lukins (41), Coty (16), Miller (44), Hepple (34), Wang (76), Aiba (1), Munk (49), Yamada (79), -- Klug (39). También durante la última década los estudios microbiológicos en relación al petróleo y sus derivados han tomado diversas orientaciones basadas en la potencialidad biosintética de los microorganismos y en su capacidad de transformación de moléculas complejas, ventaja que ha sido aprovechada y perfeccionada para procesos en la Microbiología Industrial (80).

El hombre moderno está mirando ahora mas allá de la agricultura, ganadería y pesca para satisfacer las demandas alimenticias mundiales. Como

posibles fuentes que están resultando satisfactorias, son las de gas natural (16), (30), (32) parafinas normales (79), fracciones de petróleo (13) así como también alcoholes de bajo peso molecular como única fuente de carbono y energía para microorganismos que posean la propiedad de metabolizarlos produciendo — compuestos orgánicos útiles. A éste respecto puede citarse, como de mayor — importancia, la producción microbiológica de antibióticos (71), aminoácidos — (70), carbohidratos (33), ácidos grasos (58) y coenzimas (40)

La importancia de los procesos fermentativos quedó reflejada en el — Segundo Congreso Internacional de Cultivo Continuo efectuado en Londres, In — glaterra (36). Problemas en ingeniería de fermentaciones, nuevos procesos mi — crobiológicos y genética microbiana, fué el tópicó de discusiones en el Pri — mer Simposium Internacional en Avances en Ingeniería microbiana desarrollada — en Checoslovaquia (66). De ésta manera han surgido nuevos conocimientos — que hacen posible el uso del petróleo y sus derivados en la producción de con — centrados proteínicos y vitamínicos, ácidos nucleicos, lípidos y enzimas. La — producción de concentrados de proteína y vitaminas, revisten una extraordina — ria importancia en los problemas cada día más agudos de la desnutrición en el — hombre.

Actualmente la gran mayoría de la población de los países en vías — de desarrollo carece, no solo de alimentos en cantidades adecuadas, sino que — la calidad de éstos se encuentra muy por debajo de los requerimientos necesarios

para una salud y supervivencia normal. La F.A.O. (Food and Agriculture Organization) señala que el 50% de la población infantil no recibe una adecuada nutrición proteica. Además, el déficit de alimentos proteicos entre los años 1970 y 1985, se podría incrementar en un 40-50%. Explican que los requerimientos de proteína para la India, aumentarán en dichos años en un 90-100%, 100-150% para Pakistán y que para Brasil el aumento será de 90-100% (74). -- Informaciones similares proporcionada por el World Budget del departamento -- Norteamericano de Agricultura, indican que habrá de requerirse además de proteínas de cereales, más de 10 millones de ton. de proteína desecada, 7 millones de ton. de soya y 8 millones de ton. de proteína de pescado. Autret (2), -- Borgstrom (8), Brown (9), Blaxter (7), Carter (11), Gavan (29), Poleman -- (53), Sanderson (60), Walters (73), Woodham (78), Crosson (17) entre -- otros, han enfatizado la magnitud del problema de la escasez mundial de víveres de alta calidad nutricional.

Independientemente de otras medidas que actualmente tienden a desarrollarse para incrementar la producción de concentrados proteínicos y vitamínicos tales como el mejoramiento de la tecnología agrícola (3), nuevas especies y productos vegetales e incremento en la producción animal, se afirma -- (37) (74) que la producción microbiológica de proteínas constituye una gran -- ayuda, a largo plazo, para resolver el problema de la desnutrición humana. La posible producción de biomasa rica en aminoácidos, lípidos, carbohidratos y vi

taminas a partir de derivados de petróleo, está basada en el mismo principio utilizado para la obtención de proteína de levadura para uso en la industria de la panificación.

Muchas son las razones que hacen de la producción de petroproteínas (proteínas a partir del petróleo) un esquema razonablemente atractivo (23) (35) (43) (76). La producción se realiza independientemente de muchos factores, tales como la localización geográfica y el clima, además la cantidad de personal que se requiere para el cuidado de la planta, es mínimo. El proceso requiere de mucho menor tiempo de duplicación de la masa, en comparación con el requerido en otras fuentes de proteína y vitaminas. (Tabla Núm. 1)

De todos los microorganismos que han sido estudiados en la utilización de hidrocarburos como fuente de carbono y que posean la propiedad de oxidarlos, las levaduras tienen probablemente las características más favorables para emplearse como fuente de alimentación.

Las necesidades de proteína alimenticia para los ejércitos alemanes entre los años 1932 y 1945, dieron origen a la construcción de plantas de producción de alimentos de alta calidad nutricional, a partir de fermentaciones con levaduras, empleando licores sulfúricos u otras fuentes ricas en carbohidratos como única fuente de carbono y energía. La levadura empleada por los alemanes fué una cepa de Candida utilis (56).

Las contribuciones más notables en el empleo de hidrocarburos gaseo

TABLA NUM. 1

Tiempo en que se duplica la biomasa en
diversos organismos

ORGANISMO		
Bacterias y Levaduras	12.5 - 90 minutos
Algas microscópicas	2.0 - 48 horas
Plantas superiores (ej. alfalfa)	1.0 - 2 semanas
Aves (pollos)	2.0 - 4 semanas
Porcinos	4.0 - 6.0 meses
Bovinos	1.0 - 2 años

Datos tomados de Vilenchich & Akhter (72).

solos y líquidos en el desarrollo de procesos tecnológicos de biosíntesis proteica, son los proporcionados por el consorcio Franco-Inglés (18) y por investigadores soviéticos (19) y japoneses (68).

En todo el mundo han sido estudiadas las patentes de producción de petroproteínas. (Tehnishe Hochschule, Suiza; Farbenfabriken Bayer A.C., Alemania; Czechezlovakia Akad. Ved., Checoslovaquia (57); Mobil Oil, Gulf Oil, Shell Oil en Estados Unidos). Estudios muy intensos se vienen realizando por parte del Instituto Francés del Petróleo (21), British Petroleum Co. (6), Regional Research Laboratory (India), Kyowa Hakke (Japón), Chinesse Petroleum Corp. (Taiwan) y en centros de investigación de la U.R.R.S., en donde se reporta la utilización de 15 ton. diarias de petroproteína por día para llenar los requerimientos nutricionales en la producción animal.

En México los estudios se han encaminado hacia el uso de levaduras (13), bacterias termófilas (12) y hongos filamentosos (14).

Las levaduras en la producción de petroproteínas tienen la ventaja de que forman proteínas de alta calidad nutricional, lípidos, carbohidratos y vitaminas en cantidades abundantes, pues tan sólo la proteína constituyen el 45-55% de su peso seco (59). La digestibilidad de la proteína de levadura se han comprobado en estudios nutricionales efectuados en The Medical Research Council de la Gran Bretaña (Bunker, 1964). Dos organizaciones japonesas, han realizado pruebas de seguridad de la petroproteínas, Cancer Research Section -

of The Medical Department of Osaka University y The Medical Department of Keio University. (43). De esta manera, la carencia de toxicidad en la composición de aminoácidos, vitaminas y demás compuestos orgánicos, hace de las petroproteínas un complemento alimenticio crucial en la dieta humana y animal.

La cinética del crecimiento microbiano al utilizar sustratos insolubles, como medio de cultivo que contengan alcanos, es mucho más compleja que la desarrollada en medios de cultivo que posean fuente de carbono solubles.

Recientemente han aparecido publicaciones acerca del transporte de los hidrocarburos en éste tipo de sistemas. Erickson y col (22), publicaron una serie de análisis teóricos de los posibles mecanismos de consumo de hidrocarburos en un sistema disperso. Miller y col (45), estudiaron el crecimiento de dos levaduras, Candida intermedia y Candida lipolytica, sobre una mezcla de parafinas y en presencia de agentes que abaten la tensión superficial. Yamada y col. (79), también estudiaron la cinética de crecimiento de una bacteria y de una levadura (Corynebacterium hydrocarboblustus S-12-B2 y Candida tropicalis S-315-Y1, respectivamente), sobre una mezcla de parafinas, obteniendo una alta concentración celular, pero con una baja velocidad específica de crecimiento en presencia de altas concentraciones de agentes modificadores de la tensión superficial.

Wang y col (75), estudiaron el crecimiento de Candida intermedia y

comprobaron que la velocidad específica de crecimiento de la levadura, está directamente relacionada con el área de superficie interfacial del hidrocarburo. En sus experiencias emplearon hexadecano como fuente de carbono y tween 80 como agente emulsificante, el cuál ocasionó una mejor distribución del hidrocarburo dentro del caldo de fermentación. Whitworth y col (77), publicaron un estudio acerca de los niveles de oxidación de diversos alcanos por la levadura Candida lipolytica ATCC-8661 empleando span 20, span 80, tween 80 y triton X-100 como agentes emulsificantes. Los resultados demostraron que la oxidación de los alcanos empleados como fuente de carbono fué más satisfactoria cuando se adicionaron emulsificantes. La disociación de los hidrocarburos se efectuó con mayor efectividad en menor o mayor grado, cuando se encontraban en presencia de agentes modificadores de la tensión superficial.

En base a todos los estudios realizados sobre hidrocarburos empleados como fuente de carbono en la propagación de microorganismos, se ha podido comprobar que el hidrocarburo se encuentra como una fase dispersa y que la cantidad de nutrientes que la célula podría aprovechar, ya sea por contacto directo o por transferencia de masa, depende en gran parte del área de superficie interfacial del hidrocarburo, lo que ocasionaría una mejor metabolización de la fuente de carbono. Por lo tanto, existe una estrecha relación entre la cinética del crecimiento celular y la superficie de área interfacial del hidrocarburo, dicha área varía linealmente con la concentración de hidrocarburo y la concen

tración microbiana (52)

Por otro lado, en el crecimiento y propagación de levaduras se requiere en la mayoría de los casos, de una fuente de vitaminas que pueda ser utilizada para llevar a cabo su actividad enzimática.

Estas vitaminas son principalmente del complejo "B", como biotina, tiamina, niacina, inositol, ácido pantotéico, piridoxina, riboflavina etc., las cuales se han administrado originalmente en la propagación de la levadura Candida BE-L-1, tanto a nivel de laboratorio como de planta piloto. Sin embargo, se pensó en la posibilidad de sustituir dicha fuente de vitaminas por otra de igual efectividad pero más económica.

La fuente de vitaminas que se estudió en el presente trabajo, fué agua de cocimiento de maíz en suspensión; concentrado que ha sido ampliamente utilizado en innumerables procesos microbiológicos no sólo por ser una fuente rica en vitaminas, aminoácidos y minerales, sino también por el bajo costo que representa su obtención. La composición del agua de cocimiento de maíz se ha estudiado desde la década de los cuarentas. Cardinal y col en 1948 (10) efectuaron un estudio microbiológico para determinar el contenido de aminoácidos en un concentrado de agua de cocimiento de maíz. Los aminoácidos que identificaron fueron leucina, lisina, arginina, treonina, valina, ac. glutámico, histidina, metionina, cistina, alenina, tirosina y prolina. Myers y col en 1948 (51) efectuaron un estudio acerca de los nutrientes del agua de coci--

miento de maíz. Barret y col. (4) determinaron los sólidos totales de un concentrado de agua de cocimiento de maíz.

Muchas publicaciones desde entonces mencionan la inclusión de --- agua de cocimiento de maíz como factor de crecimiento. En la Tabla Núm. 2, se citan algunos procesos microbiológicos para la obtención de sustancia útiles- y en los que se emplea agua de cocimiento de maíz como fuente de vitaminas.

Con éstos hechos en mente, una serie de experimentos efectuados -- con diversas concentraciones de agua de cocimiento de maíz y agentes emulsifi- cantes como tween 40, tween 60, tween 80 y tween 85, fueron estudiados sobre la propagación de una cepa de Candida BE-L-1 para de ésta manera, poder establecer el comportamiento de la levadura empleando como fuente de carbono- petróleo incoloro en una concentración de 5% (v/v).

TABLA NUM. 2

Procesos de obtención de sustancias útiles en los que se incluye agua de cocimiento de maíz como fuente de vitaminas.

PROCESO	MICROORGANISMO	REFERENCIA
Obtención de vitaminas del complejo "B"	<u>Ashbya gossipi</u>	(55)
Producción de antibióticos	-	(28)
Producción de ac. tartárico	<u>Acetobacter suboxidans</u>	(31)
Producción de ac.-glutárico	<u>Pseudomonas fluorescens</u>	(64)
Producción de ac. cítrico	<u>Aspergillus wentii</u>	(38)
Producción de ac. grasos	<u>Penicilium soppi</u>	(50)
Producción de lisina	<u>Escherichia coli</u> ATCC-12,408	(15)
Producción de penicilina	<u>Penicilium notatum</u>	(48)

Datos tomados de Prescott & Dunn (54)

MATERIALES Y METODOS.

MATERIALES Y METODOS

A).- MICROORGANISMO

En el presente trabajo, se empleó una cepa de levadura del género - Candida sp, aislada de muestras de suelos impregnados de hidrocarburos, a la cual se le asignó la clave de Candida BE-L-1. (13).

B).- CONSERVACION DE LA CEPAS

La cepa de levadura Candida BE-L-1 se conservó en tubos de gelosa Sabourand-dextrosa inclinado. Las resiembras se hicieron cada mes, modificándose ésta frecuencia de acuerdo a las necesidades experimentales.

C).- MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo empleado en todas las experiencias efectuadas - fue :

KH_2PO_4	5.0 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2.5 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.8 g/l
NH_4Cl	7.0 g/l

+ Vitaminas	variable
++ Petróleo incoloro	5 % (v/v)
Agua de la llave	1000 ml
pH	4.6

+ La fuente de vitaminas que fue utilizada al estudiar los efectos de agentes emulsificantes sobre la propagación de Candida BE-L-1, fué extracto de levadura (DIFCO), en una concentración -- 300 mg/l (Medrano R.H.- Comunicación Personal 1975). Así mismo, con el objeto de proporcionar una fuente de vitaminas -- de similar efectividad, se procedió al estudio de diferentes -- concentraciones de agua de cocimiento de maíz en suspensión (Glú -- cosa y Fécula de México S.A.) y los efectos que produce en la -- propagación de Candida BE-L-1; usando petróleo incoloro como -- única fuente de carbono.

++ Las características del petróleo incoloro usado, se encuentran -- resumidas en la tabla Num. 3.

D).- PREPARACION DE INOCULO.

A partir de un tubo que contiene a la cepa conservada, se preparó -- una suspensión celular empleando una pipeta y agua destilada estériles. La -- cantidad de agua fué de 4 ml aproximadamente, colocando la suspensión en un -- matraz Erlenmeyer de 500 ml de capacidad conteniendo 100 ml de medio de cul -- tivo.

Esta operación se realizó bajo las mejores condiciones de esterilidad, para lo que se emplearon dos mecheros Bunsen. Una vez que se añadió la sus--

TABLA NUM. 3

Características del petróleo incoloro empleado
(Reynosa F - 52)

<u>Análisis Físico</u>	
Densidad a 20°C	0.7920
Peso específico 60/60 °F	0.7952
Viscosidad cinemática 37.8 °C	1.63
Índice de refracción	1.4421
<u>Composición química (% en volumen)</u>	
n-parafinas (decano, undecano, dodecano, tridecano, tetra- decano, hexadecano, otros)	45.6
Iso-parafinas	10.4
Cicloalcanos no condensados	11.73
Cicloalcanos condensados	11.32
Aldohilbencenos	7.10
Indanos tetralinas	1.96
Alcoholnaftalenos	10.61
benzotiofenos	1.45

pensión celular, el matraz fue colocado en un agitador rotatorio New Brunswick Sci. Co., modelo G-53, a una velocidad de 150 rpm (revoluciones por minuto); a una temperatura de 30°C. El crecimiento de la levadura apareció en un lapso de 48-72 h. aproximadamente, después de lo cual, 10 ml de cultivo se transfirieron a otro matraz Erlenmeyer de 500 ml de capacidad con 100 ml de medio de cultivo. El crecimiento en ésta ocasión apareció a las 30 h. Se realizó una resiembra más en igualdad de condiciones para tener así un mejor crecimiento a las 20 h. aproximadamente.

E).- ESTERILIZACION DE MATERIAL Y EQUIPO.

La presencia del hidrocarburo como única fuente de carbono y energía determinó el establecimiento de condiciones de esterilización propicias y no necesariamente drásticas para el equipo de fermentación. En las experiencias realizadas a nivel de matraz, éstos fueron esterilizados con el medio de cultivo a 1 kg/cm² durante 15 min. Los fermentadores de 14 l, se esterilizaron eventualmente a 1.5 Kg/cm², durante 20-25 min. En ambos casos se empleó una autoclave ASMED, tipo APIVD.

Los resultados obtenidos a lo largo de todo el trabajo demostraron que la contaminación bacteriana que se presentó en algunas ocasiones fué prácticamente despreciable.

F).- MATRACES ERLLENMEYER CON MAMPARAS.

Todos los matraces Erlenmeyer empleados en cada experimento, fueron de 500 ml de capacidad conteniendo 100 ml de medio de cultivo y 5% (v/v) de petróleo incoloro. Asimismo los matraces tenían tres mamparas hechas a base de hundir la parte inferior de su cuerpo a una profundidad de 1.5 cm aproximadamente y a una altura de 3 cm, las cuales por la acción rotatoria, ayudaron a tener una mejor distribución del hidrocarburo; durante ése tiempo se tomaron muestras del cultivo más o menos a intervalos de 2 a 5 h, con el fin de seguir la cinética del crecimiento microbiano y se realizaron determinación de la biomasa seca (g/l) (65).

G).- ESTUDIOS A NIVEL DE PLANTA PILOTO.

Se desarrollaron experimentos para conocer el efecto del agua de crecimiento de maíz en suspensión sobre la propagación de Candida BE-L-1 a nivel de planta piloto utilizando para ello un aparato de 14 l. de capacidad -- New Brunswick Sci. Co. modelo CFS-314. Esta planta está constituida por un sistema triple de fermentadores, el cuál consiste del siguiente equipo de instrumentación :

1.- aeración - ésta se mide mediante un rotámetro el cuál está calibrado directamente en litros / minuto.

2.- agitación - se evalúa mediante un tacómetro en revoluciones --

por minuto, lográndose aplicar una agitación de 0 a 100 rpm.

3.- Temperatura - la planta piloto cuenta con un baño en el que se encuentran colocados los tres fermentadores. El calentamiento se realiza mediante unas resistencias, las que se regulan por medio de un termostato; permitiendo de esta manera llevar a cabo experimentos a diversas temperaturas, que oscilan entre 0° y 60°C.

4.- Indicador de pH.- éste sistema de fermentación dispone de un indicador de pH, con una escala de 0 a 14 con el que es posible seguir el curso de la propagación, tomando en cuenta los cambios de ésta variable.

5.- Espuma - ésta se regula mediante un sistema de sensores electrónicos de nivel, los cuales al entrar en contacto con ella, cierran un circuito - que hace accionar unas bombas peristálticas para la adición de antiespumante a base de silicones FG-10 (Dow Corning de México S.A.).

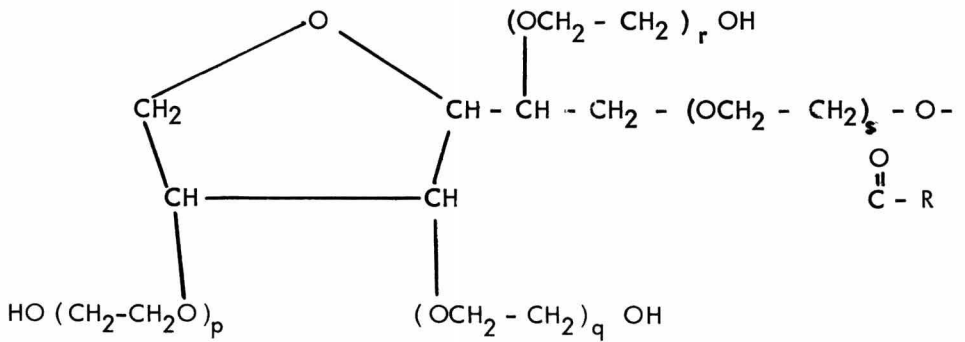
H).- EFFECTOS DE AGENTES MODIFICADORES DE LA TENSION SUPERFICIAL.

Una vez que la cepa se adaptó al medio líquido, se procedió a estudiar su propagación bajo la acción de agentes que alteran la tensión superficial, tales como tween 40, tween 60, tween 80 y tween 85, que difieren cada uno de ellos en su fórmula química. La estructura química y propiedades de éstos agentes, se encuentra resumidos en la tabla Núm. 4.

TABLA NUM. 4

Estructura química y propiedades de agentes
Emulsificantes (TWEENS).

TWEEN : Derivados polioxietilénicos de ésteres de ácidos grasos de sorbitan.



en donde : $p + q + r + s = m$, número de residuos polioxietilénicos /mol-
de éster.

	m	R	HLB	Peso Molecular.
Tween 40	20	monopalmitato	6.7	1210
Tween 60	20	monoestearato	4.7	
Tween 80	20	monooleato	4.3	1309
Tween 85	20	tri-oleato	1.8	

Dichos agentes emulsificantes fueron escogidos para la realización - del presente estudio, en base a sus propiedades no tóxicas y debido a que no inhiben la actividad enzimática del microorganismo en estudio (77), además - por la habilidad que presentan como modificadores de la tensión superficial, propiedad ya bien establecida y ampliamente aprovechada en procesos de la cosmetología y de la industria alimenticia, en donde se les emplea como aditamento-alimenticio.

Este estudio se realizó en matraces con diversas concentraciones de - los diferentes agentes modificadores de la tensión superficial. La concentraciones usadas oscilaron entre 16 mg/l y 1000 mg/l. Los matraces contenían 100-ml de medio de cultivo, petróleo incoloro 5 % volumen a volumen, como fuente de carbono y extracto de levadura 300 mg/l. Los matraces fueron agitadosa 150 rpm durante 70 h. a una temperatura de 30°C. Los muestreos se efectuaron cada 2 a 4 h.

1).- PREPARACION DEL AGUA DE COCIMIENTO DE MAIZ.

Con el fin de emplear ésta en la fermentación, se preparó en la forma siguiente: un volumen de un litro aproximadamente, se colocó en un matraz - Erlenmeyer de 2 l de capacidad. El matraz se colocó en el autoclave subien-do la presión a 1,5 Kg/cm², dejándola bajar lentamente. Posteriormente se - filtró con el objeto de eliminar los sólidos siendo el filtrado el que se empleó en

este estudio. La concentración de sólidos en el filtrado representó el 13,8 %- el cual fué descontado en las determinaciones de peso seco.

La composición del agua de cocimiento de maíz en suspensión se encuentra en la tabla Núm. 5.

J).- DETERMINACION DE SOLIDOS TOTALES EN EL FILTRADO DEL AGUA DE COCIMIENTO DE MAIZ.

Para efectuar esta determinación, se colocó 1 ml de la suspensión en un crisol puesto previamente a peso constante y calcinado por acción directa de un mechero. Posteriormente se llevó a una mufla a temperatura entre 500° y 550° C durante 2 h ; transcurrido este tiempo se retiró el crisol de la mufla -- conservándose en un desecador hasta que alcanzara la temperatura ambiente. -- Finalmente se pesó.

Empleando la ecuación siguiente, se calculó la cantidad de sólidos en la muestra.

$$\% \text{ material sólido} = \frac{(A-B)}{M} \times 100$$

en donde A = Peso del crisol + cenizas

B = Peso del crisol vacío

M = Cantidad de muestra

TABLA NUM. 5

Descripción de la composición del agua de
cocimiento de maíz

Es un líquido espeso, amarillo rojizo, de sabor y olor característicos.-

pH	_____	3.9 - 4.2
Acidez (como ac. Láctico)	_____	12.0 - 14.0 %
Sólidos totales	_____	48.9 %
Proteína (N x 6.25) (B.S.)	_____	45.0 - 50.0 %

Valores Analíticos

Humedad _____	50.0 %
Proteína, min. _____	23.0 %
Cenizas, max. _____	10.0 %
Grasas, min. _____	0.00 %
Fibras, max. _____	0.00 %
Nitrógeno _____	16.0 %
pH _____	3.7 - 4.2
Densidad _____	1.25

Vitaminas

Tiamina _____	0.28 mg/%
Riboflavina _____	0.58
Niacina _____	8.16
Piridoxina _____	0.88
Ac. Pantoténico _____	1.50
Ac. Fólico _____	0.13
Biotina _____	0.02
Inositol _____	753.86
Cloruro _____	148.00

Aminoácidos Esenciales

Lisina _____	1.0 %
Triptófano _____	0.1 %
Isoleucina _____	1.3 %
Valina _____	1.5 %
Arginina _____	1.0 %
Metionina _____	0.5 %
Cistina _____	0.3 %
Treonina _____	1.3 %
Leucina _____	2.2 %
Fenilalanina _____	10.0 %
Histidina _____	1.5 %

Minerales

Potasio _____	2.40 %
Magnesio _____	1.00 %
Sodio _____	0.10 %
Fósforo _____	1.80 %
Sulfuros _____	0.40 %
Calcio _____	0.660 %
Cloro _____	0.40 %
Hierro _____	0.01 %
Cobre _____	0.005%

K).- OBTENCION DE BIOMASA.

Con el fin de obtener biomasa en volúmenes suficientes para estudiar su composición química, la levadura Candida BE-L-1 obtenida en el estudio de la influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de la misma; - la biomasa fué centrifugada a 2 000 r.p.m. durante 5 min y lavados dos veces - con agua caliente y tres veces con iso-propanol.

L).- EVALUACION DEL CRECIMIENTO DE Candida BE-L-1

a).- Determinación de peso seco.- Con el fin de evaluar la biomasa seca producida en los cultivos, tanto a nivel de matraz como de planta piloto, se empleó un sistema de filtración triple con membranas Millipore de 0.45- de poro y 47 mm de diámetro tipo HAWP-4740 a través de las cuales y previamente puestas a peso constante, se filtró una muestra de 1 ml de cultivo, lavando posteriormente con agua destilada. Las membranas fueron llevadas a peso constante a una temperatura de 90-92^o C en un horno-estufa (J.M. Ortiz) durante 2-3 h.

b).- Determinación de unidades Klett.- Otra forma de evaluar el crecimiento microbiano fué el empleo de un fotocolorímetro Klett-Summerson - modelo 800-3, empleando filtro rojo para la determinación de unidades klett, - debido al color que presenta el agua de cocimiento de maíz, propiedad que aumenta con el incremento en la concentración de dicha fuente de vitaminas en -

estudio. A causa de ésto, se podrá observar que al graficar el crecimiento de Candida BE-L-1, el punto de partida (a las cero horas) no es el mismo. Sin embargo, el color del agua es cocimiento de maíz en el medio de propagación no intervino en la cinética de la levadura.

Debido a la presencia del hidrocarburo, el cual es insoluble en agua, para la determinación de unidades klett fué preciso añadir ácido propiónico - - (J. T. Baker Chemical Co.) con el fin de romper la emulsión formada por aire - agua - hidrocarburo (42).

Ambos datos, peso seco (g/l) y unidades klett, fueron graficados sobre papel semi-logarítmico para dilucidar la cinética del crecimiento mediante la determinación de la velocidad específica de crecimiento (μh^{-1}) así como el tiempo de generación (T_g, h^{-1}). (47)

M).- DETERMINACION DE LA COMPOSICION DE LA BIOMASA.

Aunque no se efectuaron estudios nutricionales en el presente trabajo, la biomasa fué sometida a procedimientos analíticos con el fin de evaluar su composición química.

a).- Determinación de nitrógeno total.- La determinación de nitrógeno total se hizo siguiendo la técnica de Kjeldahl; para lo cual se pesaron -- 0.5 g de muestra en papel glacine y se pasaron cuidadosamente a matraces digestores Kjeldahl de 800 ml de capacidad; se adicionaron a la muestra 8.5 g de -

mezcla digestora compuesta de sulfato de cobre 20 g y 200 g de sulfato de potasio) y 25 ml de ácido sulfúrico concentrado. En seguida la muestra se llevó a la parrilla de digestión, calentándola durante 45 min hasta obtener totalmente la decoloración. Efectuada la digestión, se dejó enfriar; posteriormente se adicionó 300 ml de agua destilada, una pizca de zinc en polvo y solución de hidróxido de sodio. Una vez hecho esto, se procedió a conectar el sistema de destilación. La muestra fue agitada y puesta sobre la parrilla caliente, efectuándose una destilación por arrastre de vapor. El nitrógeno fue recibido en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, conteniendo 100 ml de solución de ácido bórico al 2% y 2 gotas de indicador de rojo de metilo. La destilación se dió por terminada, cuando se hubieron recolectado 300 ml del destilado. El producto obtenido en la destilación fue valorado con una solución de ácido sulfúrico 0.1 N hasta producir el vire de amarillo a rojo. Finalmente, empleando la siguiente ecuación se calculó la cantidad de nitrógeno total.

$$\% N = \frac{(A - B) \times N \times \text{Meq.} \times 100}{M}$$

en donde

A = Volumen en ml gastados de solución valorada de H_2SO_4

B = Volumen en ml de H_2SO_4 empleados para valorar el testigo.

N = Normalidad del H_2SO_4 empleado.

M = Cantidad de muestra en g.

Meq = Miliequivalente del nitrógeno cuyo valor corresponde a 0,014.

N).- DETERMINACION DE LIPIDOS CRUDOS.

Se hizo de la forma siguiente : se pesaron de 2 a 5 g. de muestra -- dentro de cartuchos de papel filtro (Whatman de 20 x 90 mm) previamente so-- metidos a peso constante. El cartucho se colocó en un aparato de extracción - Sexhlet. Se adicionaron al matraz (seco y bien lavado) 40 ml de éter.

La muestra fué sometida a una extracción con éter en reflujo durante 8 h; al final de éste tiempo, el éter fué destilado, inclinando el matraz hasta eliminar el excedente de éter que aún estuviese presente. Realizado ésto, se enfrió en un desecador y el matraz se pesó.

Cálculos :

$$\text{Peso del matraz.} + \text{Extracto etéreo} - \text{Peso del matraz.} = \text{Peso de la grasa.}$$

$$\text{Peso del cartucho lleno.} + \text{Peso del cartucho vacío} = \text{Peso de la muestra.}$$

así :

$$\% \text{ de grasa} = \frac{\text{Peso de la grasa en gramos}}{\text{Peso de la muestra en gramos}}$$

O).- IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE AMINOACIDOS.

La identificación y cuantificación de aminoácidos se efectuó usando un autoanализador Perkin Elmer-Hitachi. La muestra fué preparada de manera siguiente : en un matraz balón de 125 ml de capacidad se pusieron exactamente 10 mg de biomasa seca, se adicionaron 10 ml de ácido clorhídrico 6 N y se reflujo la muestra durante 24 h.; al cabo de éste tiempo la muestra hidrolizada fué evaporada hasta sequedad, eliminándose el ácido clorhídrico en un desecador al vacío conteniendo hidróxido de sodio.

El residuo obtenido fué disuelto en 5 ml de agua destilada, se tomaron de ésta solución 2 alícuotas de 1 ml y fueron llevadas a un volumen de 20 ml con una solución reguladora de citrato pH de 4.1 y 5.3 respectivamente. -- Estas soluciones resultantes son las que se introducen al autoanализador para la identificación y cuantificación de los aminoácidos. La composición comparativa de biomasa en Candida BE-L-1 y en otras levaduras, se encuentran reunidas en la tabla Núm. 6 y Núm. 7.

TABLA NUM. 6

Composición comparativa de biomasa en
Candida sp. (BEL-1) y en otras levaduras

	BEL-1 (querosina)	BEL-1 (Melazas)	n-parafinas	Gal oil	C.utilis
Proteína (%) (N x 6.25)	32-40	45-48	65	70.5	51
Lípidos (%)	5.5-26.7	1.8-2	8.1	0.5	3
Cenizas (%)	3.5-19.4	8-8.5	.0	7.9	10
Humedad (%)	--	--	4.2	5.0	7
Aminoácidos (%)					
Lisina	9.0	9.8	7.0	7.8	10.7
Valina	5.7	5.5	5.4	5.8	5.7
Leucina	10.2	7.9	7.0	7.8	8.1
Isoleucina	7.2	4.8	4.5	5.3	7.3
Treonina	5.5	6.5	4.9	5.4	4.8
Metionina	1.6	1.8	1.2	1.1	1.4
Fenilalanina	7.7	3.9	4.4	4.8	4.1
Triptofano	2.0	0.5	1.4	1.3	0.5
Cistina	0.5	0.4	1.1	0.9	0.3
Histidina	—	1.4	2.0	2.1	2.8
Tirosina	2.4	2.9	3.5	4.0	1.4
Arginina	--	5.9	4.8	5.0	4.7

Los aminoácidos están expresados en g/100 g de proteína.
1 y 2 Casas-Campillo - y col.
3 y 4 Levadura del Consorcio francés-inglés (Llewelyn, 1968)
5 Datos condensados por (Peppler, 1970).

TABLA NUM.7

Composición comparativa en aminoácidos en varios tipos de proteína

Fuente de proteína	Sustrato	Cis	Ileu	Leu	Lis	Met	Fen	Treo	Trip	Val	
Bacteria	Metano	-	-	9.5	5.3	3.4	6.2	4.5	-	8.5	*
Bacteria	n-parafinas	0.6	3.6	5.6	6.5	2.0	2.9	4.0	0.9	3.5	*
Bacteria	Gas oil	0.9	5.3	7.8	7.8	1.6	4.8	5.4	1.3	5.8	*
Levaduras	n-parafinas	-	3.6	5.9	7.0	1.2	2.7	2.7	0.5	4.0	*
Levadura	Gas oil	-	5.1	7.0	6.8	1.3	5.1	5.6	2.3	5.0	*
Soya comestible	--	1.2	5.8	7.6	6.6	1.1	4.8	3.9	1.2	5.2	*
Semilla de algodón comestible	--	--	4.0	6.2	4.2	1.5	5.2	3.5	1.6	5.0	*
<u>Candida</u> sp. (BEL-1)	Querosina	0.5	7.2	10.2	9.0	1.2	7.7	5.5	2.0	5.7	*
<u>Candida</u> sp. (BEL-1)	Melazas de caña	0.4	4.8	7.9	9.8	1.1	3.9	6.5	0.5	5.5	**
F.A.O.	---	2.0	4.2	4.8	4.2	2.2	2.8	2.8	1.4	4.2	*

La concentración de aminoácidos está dada en g/100 g de proteína.

* Datos tomados de Wang (1968).

** Casas - Campillo y col.

PARTE EXPERIMENTAL.

PARTE EXPERIMENTAL

En una serie de experiencias se estudió la influencia de cuatro - diferentes derivados polioxietilénicos de ésteres de ácidos grasos de sorbitan_ (tweens), sobre la propagación de la levadura Candida BE-L-1, empleando pe_ tróleo incoloro como fuente de carbono. La segunda serie de experimentos la_ constituye el estudio del efecto de diversas concentraciones de agua de coci_ miento de maíz en suspensión (50% de sólidos) en la propagación de la misma_ levadura y bajo tres diferentes grados de aereación. Al final de los estudios - mencionados se consideró adecuado realizar una prueba empleando los mejores_ resultados obtenidos tanto con los agentes emulsificantes, como con los del - - agua de cocimiento de maíz en suspensión.

Los resultados que se obtuvieron en el estudio de agentes emulsifican_ tes, fueron comparados con los proporcionados por tres testigos que se propaga_ ron en igualdad de condiciones pero en ausencia de tween.

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE TWEEN 40

Se observó una inhibición en el crecimiento de la levadura Candida BE-L-1 en todas las concentraciones empleadas de tween 40. Los resultados de éste efecto se encuentran reunidos en la tabla Núm. 8 y en las figs. 1 a 6, las cuales nos muestran que una inhibición parcial fué provocada por el efecto de 16.6 mg/l y 33 mg/l; un incremento en la producción de biomasa se observó en el empleo de 50.0 mg/l 66.6 mg/l y 83.3 mg/l. La producción óptima bajo la acción de este tween, se presentó con 100 mg/l con una producción de biomasa de 15.4 g/l. Se presentó una inhibición total en el crecimiento celular bajo los efectos de concentraciones que oscilaron entre 200 mg/l y 1000 mg/l.

Las observaciones microscópicas realizadas con regularidad, revelaron que no sólo el crecimiento celular se inhibió sino también la morfología de levadura se alteró, pues su tamaño fue menor en los casos en los que hubo crecimiento.

TABLA NUM. 8

Influencia de la Concentración de tween 60 en la Propagación de Candida BE-L-I en matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad con mamparas .

TWEEN 40 (mg/l)	VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO (μ , h ⁻¹)	TIEMPO DE GENERACION (Tg, h ⁻¹)	PESO SECO (g/l)
16.6	0.099	7.0	8.25
33.3	0.110	6.8	9.80
50.0	0.111	6.2	13.30
66.6	0.113	6.1	14.00
83.3	0.115	6.0	14.70
100.0	0.130	5.3	15.40
200.0	0.090	7.1	6.4
400.0	-	-	negativo
600.0	-	-	negativo
800.0	-	-	negativo
1000.0	-	-	negativo

Condiciones de operación :

Medio mineral	100 ml
Petróleo incoloro	5 % (v/v)
Temperatura	30°C
Agitación	150 rpm

EFECTO DE LA CONCENTRACION DE TWEEN 60

El estudio de diferentes concentraciones de tween 60, se muestra en la tabla Núm. 9, y figuras 6 a 12 las cuales nos muestran que la influencia de éste agente sobre la propagación de Candida BE-L-1 no causó un aumento considerable en la producción de biomasa al compararse con el determinado en los testigos, cuyo promedio de biomasa fué de 16.5 g/1. Si bien el crecimiento se puede considerar como normal en las concentraciones de 50.0 mg/1, 83.3 mg/1 y 100 mg/1 (con 17 g/1 de biomasa) en las observaciones microscópicas la levadura mostró la misma alteración que la observada con el tween 40.

TABLA NUM. 9

Influencia de la Concentración de tween 60 en la Propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml- de capacidad con mamparas.

Tween 60 (mg/1)	Velocidad específica de crecimiento. (μ , h ⁻¹)	Tiempo de generación. (Tg, h ⁻¹)	Peso Seco. (g/1)
16.6	0.015	6.0	14.77
33.3	0.119	5.8	15.80
50.0	0.126	5.5	17.00
66.6	0.121	5.7	17.50
83.3	0.123	5.6	17.10
100.0	0.126	5.5	17.00
200.0	-	-	negativo
400.0	-	-	negativo
600.0	-	-	negativo
800.0	-	-	negativo
1000.0	-	-	negativo

Condiciones de operación :	Medio mineral	100 ml
	Petróleo incoloro	5 % (v/v)
	Temperatura	30° C
	Agitación	150 rpm
	pH	4.6

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE TWEEN 80

Bajo la influencia de 83.3 mg/l, y de 100 mg/l de este tween, la producción de biomasa se incrementó en 2 a 3 g/l, con respecto a los testigos. El crecimiento de la levadura se inhibió por 16.6 mg/l, 33.3 mg/l y 50.0 mg/l de tween 80; el empleo de 66.6 mg/l no tuvo un efecto como para tomarse en cuenta. Las concentraciones por arriba de los 200 mg/l inhibieron totalmente el crecimiento. El tiempo de generación (T_g, h^{-1}) de la producción óptima de biomasa, varió de 5.1 a 5.7 h^{-1} . (Tabla Núm. 10 y figuras 13 a la 19).

Se observó la levadura en el transcurso de la propagación y su tamaño y forma fué siempre normal en todas las concentraciones empleadas de --- tween 80.

TABLA NUM. 10

Influencia de la concentración de tween 80 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad con mamparas.

Tween (mg/l)	Velocidad específica de crecimiento (μ , h ⁻¹)	Tiempo de generación (T _g , h ⁻¹)	Peso seco. (g/l)
16.6	0.111	6.2	- 10.00
33.3	0.111	6.0	10.20
50.0	0.115	6.0	14.70
66.6	0.121	5.7	16.15
83.3	0.199	5.2	18.00
100.0	0.135	5.1	18.30
200.0	0.099	7.0	8.3
400.0	-	-	-
600.0	-	-	-
800.0	-	-	-
1000.0	-	-	-

Condiciones de operación :

- Medio mineral 100 ml
- Petróleo incoloro 5% (v/v)
- Temperatura 30°C
- Agitación 150 rpm
- pH 4.6

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE TWEEN 85

En la serie de estudios que se efectuaron con los niveles de concentración del tween 85 y bajo las condiciones empleadas, (Tablas 11 y figuras - 20 a la 25, fué posible observar que la levadura creció en forma moderada, - cuando se adicionaron 16.6 y 33.3 mg/1 al medio de propagación, incrementándose la producción de biomasa en 2 a 3 g/1 con respecto al de los testigos. El Tg (tiempo de generación en h^{-1}) para cada concentración anterior fué muy similar, fluctuando entre 5.5 y 5.6 h^{-1} .

Una influencia positiva fué observada en concentraciones de 66.6 -- mg/1 a 100 mg/1, pues con un Tg de 5.1 h^{-1} el aumento en la producción de biomasa fué de 21 g/1 a 25 g/1, incremento de 6 a 9 g/1 con el producido en ausencia de tween. Sin embargo, la morfología de la levadura se alteró en -- cuanto a tamaño y ancho, observándose microscópicamente dimensiones mayores que las habituales.

TABLA NUM. 11

Influencia de la Concentración de Tween 85 en la Propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml - de capacidad con mamparas.

Tween 85 (mg/l)	Velocidad específica de crecimiento (, h ⁻¹)	Tiempo de generación (Tg , h ⁻¹)	Peso seco. (g/l)
16.6	0.126	5.5	18.5
33.3	0.123	5.6	19.0
50.0	0.126	5.5	19.70
66.6	0.136	5.1	21.20
83.3	0.135	5.1	21.60
100.0	0.135	5.1	25.00
200.0	-	-	negativo
400.0	-	-	negativo
600.0	-	-	negativo
800.0	-	-	negativo
1000.0	-	-	negativo

Condiciones de operación :	Medio mineral	100 ml
	Petróleo incoloro	5 % (v/v)
	Temperatura	30°C
	Agitación	150 rpm
	pH	4.6

EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AGUA DE COCIMIENTO-
DE MAIZ EMPLEANDO TRES DIFERENTES VOLUMENES DE AEREACION, EN
LA PROPAGACION DE Candida BE-L-1

La levadura Candida BE-L-1 fué propagada a nivel de planta piloto, en una de 14 l de capacidad, empleando agua de cocimiento de maíz en suspensión como fuente de vitaminas. Las concentraciones oscilaron entre los 4 g/l y 40 g/l. Los tres volúmenes de aeración fueron 0,5, 1,0 y 1.5 vvm (volumen de aire / volumen de medio de cultivo x minuto).

EFFECTO DEL AGUA DE COCIMIENTO DE MAIZ EN SUSPENSION EMPLEANDO 0.5 VOL. de aire / vol. de medio x min.

Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla Núm. 12 y en las figuras 26 a la 35. En la figura Núm. 57, se observa que la velocidad específica de crecimiento (μ, h^{-1}) aumenta moderadamente con el efecto de 4 g/l y 12 g/l incrementándose considerablemente desde $0.046 h^{-1}$ hasta un punto máximo de $0.081 h^{-1}$ con 24 g/l. El crecimiento disminuyó desde una velocidad de $0.075 h^{-1}$, hasta $0.034 h^{-1}$ usando mayores concentraciones de dicha fuente de vitaminas. El crecimiento celular fué inhibido totalmente con valores mayores de 40 g/l.

La producción de biomasa también se vió incrementada, ya que se obtuvieron valores de 16-19 g/l 3 a 6 g/l más que los obtenidos con extracto de levadura.

TABLA NUM. 12

Influencia del agua de cocimiento de maíz en suspensión en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 0.5 vvm. - - (vol. de aire/vol. de medio por min.)

Concentración de agua de cocimiento de maíz (g/l)	Velocidad específica de crecimiento (μ , h ⁻¹)	Tiempo de generación (T _g , h ⁻¹)
4	0.040	17.3
8	0.041	16.9
12	0.046	15.0
16	0.063	11.0
20	0.075	9.2
24	0.081	8.5
28	0.069	10.0
32	0.043	16.1
36	0.038	18.2
40	0.034	20.3

Condiciones de operación :	Medio mineral	6 l
	Petróleo incoloro	5 % (v/v)
	Temperatura	30° C
	Agitación	750 rpm
	pH	4.6

EFFECTO DEL AGUA DE COCIMIENTO DE MAIZ EN SUSPENSION EMPLEANDO 1.0 vvm. (Vol. de aire / vol. de medio por min).

Los resultados se encuentran en las tablas Núm. 13 y en las figuras - 36 a la 45, las cuales nos muestran que el efecto de 1.0 vvm no ejerció una influencia satisfactoria en el crecimiento de Candida BE-L-1, en virtud de que - los valores de la velocidad específica de crecimiento fueron muy bajos con respecto a los obtenidos con el empleo de 0.5 vvm. El crecimiento fué moderado desde un valor de 0.025 h^{-1} hasta un valor máximo de 0.046 h^{-1} con 32 g/l. Al usar concentraciones mayores de 40 g/l, se inhibió el crecimiento celular.

En las observaciones microscópicas realizadas periódicamente en cada concentración de dicha fuente de vitaminas, se observó que el aumento en la concentración provocaba una inhibición en el tamaño de la levadura. Asimismo durante las primeras horas de propagación (entre 12 y 24 h), se presentó mucha espuma, problema que disminuyó al subir los agitadores del sistema de - agitación.

TABLA NUM. 13

Influencia del agua de cocimiento de maíz en suspensión en
la propagación de Candida BE-L-1 empleando 1.0 vvm. --
(vol. de aire/vol. de medio por min.)

Concentración de agua de cocimiento de maíz (g/l)	Velocidad específica de crecimiento (μ , h^{-1})	Tiempo de generación (T_g , h^{-1})
4	0.022	31.5
8	0.021	33.0
12	0.026	26.6
16	0.030	23.1
20	0.032	21.6
24	0.036	19.2
28	0.041	16.9
32	0.046	15.0
36	0.040	16.8
40	0.031	22.3

Condiciones de operación :

Medio mineral	6.1
Petróleo incoloro	5% (v/v)
Temperatura	750 rpm
pH	4.6

EFFECTO DEL AGUA DE COCIMIENTO DE MAIZ EN SUSPENSION EMPLEANDO 1.5 vvm (Vol. de aire / vol. de medio por min.).

La influencia de 1.5 vvm fué aún menos significativa. La velocidad específica de crecimiento tuvo valores muy bajos en todas las concentraciones de la fuente de vitaminas en estudio. La velocidad mínima fué de 0.024 h^{-1} con 4 g/l y la máxima de 0.040 h^{-1} con 36 g/l ; además los problemas presentados por la espuma duraron hasta 49 h, haciéndose difícil controlarla hasta que se adicionaron volúmenes mayores de antiespumante. Los resultados se muestran en la Tabla Núm. 14 y Figuras Núm. ; 46 al 55 y 57

TABLA NUM. 14

Influencia del agua de Cocimiento de maíz en suspensión en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 1.5 vvm. --
(vol. de aire / vol. de medio por min.)

Concentración de agua de cocimiento de maíz. (g/l)	Velocidad específica de crecimiento. (μ , h ⁻¹)	Tiempo de generación (T _g , h ⁻¹)
4	0.024	28.8
8	0.024	28.8
12	0.025	27.7
16	0.026	26.6
20	0.030	23.1
24	0.032	21.6
28	0.033	21.0
32	0.038	18.3
36	0.040	17.3
40	0.038	18.2

Condiciones de operación :	Medio mineral	6 l
	Petróleo incoloro	5 % (v/v)
	Temperatura	30°C
	Agitación	750 rpm
	pH	4.6

EFFECTO DE 100 mg/1 DE TWEEN 85 y 24 g/1 DE AGUA DE COCIMIENTO DE MAIZ EN LA PROPAGACION DE Candida BE-L-1 EMPLEANDO 0.5 vvm- (Vol. de aire / vol. de medio por min.).

Una vez concluidos los estudios de diversas concentraciones de los agentes modificadores de la tensión superficial y del agua de cocimiento de maíz, se consideró también conveniente el propagar la levadura en presencia de 100 mg/1 de tween 85 y 24 g/1 de agua de cocimiento de maíz a nivel de planta piloto y utilizando 0.5 vvm de aereación, siendo dichas condiciones con las que se obtuvo mejor crecimiento celular cuando se estudiaron tanto a nivel de matraz como de planta piloto. Los resultados de esta experiencia se encuentran en la figura Núm. 56, la cuál nos muestra que la velocidad específica de crecimiento celular, aumentó hasta 0.091 h^{-1} . Su tiempo de generación fué de 10.5 h^{-1} . La producción biomasa fué de 19.8 g/1.

DISCUSION

Los resultados mostrados en esta serie de figuras, tablas y resultados han podido comprobar lo demostrado por Ochoa (52), Wang (75), Aiba (1), Whitworth (77), Furukawa (27) Miller (45), entre otros, que el empleo de agentes que modifican la tensión superficial (Tweens) puede ejercer una acción inhibitoria o bien influir satisfactoriamente sobre la cinética del crecimiento de levaduras que posean la propiedad de oxidar hidrocarburos. Se ha estudiado también, que la presencia sola de dichos agentes, provoca la oxidación, en cierto grado, de los hidrocarburos de cadena corta. Muchos son los autores que han logrado establecer las condiciones adecuadas de propagación de levaduras en éste tipo de sistemas y empleando diversos modificadores de la tensión superficial. En la tabla 15, hacemos referencia a algunos de estos estudios.

Aunque existen muchas publicaciones acerca del tema, pocas mencionan los posibles mecanismos de acción de los tweens. Whitworth y col (77), mencionan dos posibles mecanismos, los cuales están de acuerdo con lo observado en la práctica. Explican que en su estructura éste tipo de emulsificantes posee dos propiedades; una porción con naturaleza hidrófoba la cual se inserta dentro de la gota del hidrocarburo, permitiendo así que la porción hidrófila es

TABLA NUM. 15

Datos recopilados sobre los efectos de agentes modificadores de tensión superficial sobre la asimilación de n-alcános por levaduras.

Agentes de tensión superficial.	Levadura	Substrato oxidado	Crecimiento Celular	Efecto del tensoactivo en el crecimiento celular	Referencia
Tween 20	C. lipolytica	si	si	estimulado	
Tween 80	C. lipolytica	si	si	estimulado	
Span 20	C. lipolytica	si	si	estimulado	Whitworth (77)
Span 80	C. lipolytica	si	si	estimulado	
Triton X-100	C. lipolytica	no	no	inhibido	
Tween 20	C. guillermondii	N.D.	N.D.	reducido	Aiba (1)
Tween 80	C. intermedia	si	si	estimulado	Ochoa (52)
Tween 20	C. hydrocarbon-fumárica	si	si	estimulado	
Span 80	C. hydrocarbon-fumárica.	N.D.	si	estimulado	Furukawa (27)
Plisurf A-210G	C. tropicalis	si	si	estimulado	Yamada (79)
Tween 40	C. BE-L-1	si	si	inhibido	
Tween 60	C. BE-L-1	si	si	reducido	Manjarrez D. (el presente trabajo)
Tween 80	C. BE-L-1	si	si	estimulado	
Tween 85	C. BE-L-1	si	si	estimulado	

N.D. No determinado.

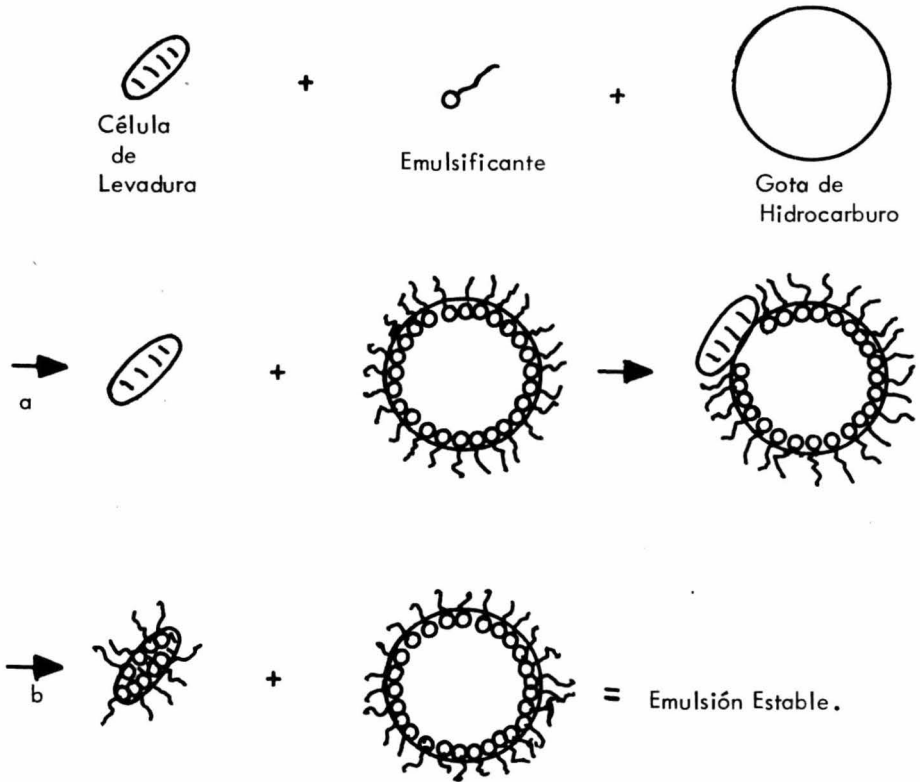
té en contacto con la levadura, facilitando que ésta se adhiera con mayor efectividad a la fuente de carbono, la cual es insoluble en el medio de propagación, provocando una mayor metabolización, lo que ocasiona una mayor producción de biomasa, efecto que se observó con el empleo de tween 80 y tween 85.

El segundo mecanismo explicado por Whitworth, indica que una elevada concentración de tween, puede provocar que la sección hidrófoba se inserte tanto en la gota del hidrocarburo como en la membrana de la levadura a causa del elevado porcentaje de proteína y lípidos de la pared celular (59), provocando la formación de un sistema homogéneo de una emulsión estable; consecuentemente provoca la no degradación del hidrocarburo y la inhibición total o parcial del crecimiento celular, aspectos que fueron observados al adicionar altas concentraciones de los cuatro tweens. Consideramos que posiblemente la inhibición del crecimiento de la levadura fuese debido a éste mecanismo. (esquema Núm. 1)

De esta manera se ponen de manifiesto las conclusiones de Ochoa — en las cuáles explica que la cinética del crecimiento microbiano guarda una estrecha relación con el área de superficie interfacial del hidrocarburo. Cabe hacer notar que estas observaciones son relativas pues en este trabajo no se realizaron pruebas para conocer la estructura molecular del sistema. Un estudio — profundo y que consideramos interesante, es el realizado por Aiba (1) y Ochoa (52).

ESQUEMA NUM. 1

Mecanismo propuesto del efecto de emulsificantes en el crecimiento de levaduras propagadas en hidrocarburos.



- a).- Unión de la levadura con la fuente de carbono. Crecimiento.
- b).- No contacto de la célula con el hidrocarburo. Inhibición en el crecimiento.

Es interesante mencionar que en las observaciones microscópicas apareció un microorganismo cuya morfología corresponde a la de un coco, el cual y según observaciones realizadas por Casas-Campillo y col (13), guarda una estrecha relación de simbiosis con la levadura Candida BE-L-1. Así, en todos los niveles de concentración empleados de los cuatro diferentes tweens en estudio, el crecimiento de dicho microorganismo se presentó en forma inversa con respecto a la levadura. De ésta manera mientras la levadura fué inhibida totalmente, el coco fué el único microorganismo que se presentó en el medio de propagación. El coco apareció en forma abundante con el empleo de tween 60, en concentraciones que oscilaron entre 400 mg/l y 800 mg/l, creciendo en forma moderada en todas aquellas concentraciones de los tweens en que Candida BE-L-1 era parcialmente inhibida.

Con el fin de obtener una mayor propagación de levadura, ésto desde el punto de vista de productividad la formulación del medio de cultivo debe contener nutrientes orgánicos e inorgánicos en cantidades adecuadas. Asimismo, los requerimientos nutricionales de la levadura no involucran sustancias complejas puesto que las fuentes de carbono, nitrógeno y vitaminas, pueden ser suplidas por otras de mayor o igual efectividad. Por ésta razón se consideró que debido a la concentración de aminoácidos y vitaminas contenidos en el agua de cocimiento de maíz, ésta fuese una fuente adicional no sólo de vitaminas sino también de nitrógeno. Este tipo de asimilación ha sido comprobado —

en levaduras de la industria de la panificación (54). Sin embargo y de acuerdo a los resultados obtenidos en la serie de experiencias, se consideró que la levadura no utiliza el agua de cocimiento de maíz y como fuente de nitrógeno que de usarla sería en cantidades muy pequeñas.

Asimismo se pensó que el agua de cocimiento de maíz fuese también una fuente de carbono para la levadura. Para comprobar lo anterior, la levadura Candida BE-L-1 se propagó en igualdad de condiciones y con 24 g/l de cocimiento de maíz empleando 0.5 vvm, pero en ausencia de petróleo incoloro, el cual funje como fuente de carbono. Los resultados obtenidos en ésta experiencia demuestran que la levadura no utiliza el concentrado de maíz como fuente de carbono ya que los valores de pH variaron de 4.6 (pH inicial) a 5.7 y hasta 7.5, en un lapso de 24-32 h; esta variación de pH demuestra también que la levadura se lisó cuando la fuente de carbono (petróleo incoloro) no estuvo presente en el medio.

Es bien sabido también que las levaduras, como todo microorganismo, requieren de ciertos factores físicos, químicos y biológicos para su propagación en óptimas condiciones. Un elemento base en éste proceso es la demanda de oxígeno por parte de Candida BE-L-1.

El oxígeno, para que pueda ser aprovechado por las células, debe estar disuelto en el caldo de fermentación. Por otro lado, la agitación es un factor físico que interviene en la disolución del oxígeno. En el presente traba

jo, la agitación fué siempre de 750 rpm, ya que estudio anteriores (13), demostraron que esta era la óptima agitación en la propagación de Candida BE-L-1 a nivel de planta piloto.

De los resultados obtenidos en la serie de tabla y figuras para el agua de cocimiento de maíz se considera que la demanda de oxígeno para la levadura en estudio es mínima, ya que los valores máximos de velocidad específica de crecimiento fueron obtenidos con el empleo de 0.5 vvm. Los niveles de aeración de 1.0 vvm y 1.5 vvm, ocasionaron valores bajos de velocidad de crecimiento, a causa de la baja demanda de oxígeno.

Es interesante mencionar que las exigencias de la fuente de vitaminas aumentaron cuando los volúmenes de oxígeno eran muy elevados. Esta afirmación puede verse en la gráfica Núm. 57, puesto que el máximo valor en la tasa de crecimiento se presentó al emplearse 0.5 vvm y 24 g/l, de agua de cocimiento de maíz, mientras que para 1.0 vvm y 1.5 vvm de aeración, las exigencias en vitaminas aumentaron hasta 32 g/l y 36 g/l respectivamente.

Se considera también que éste comportamiento de la levadura Candida BE-L-1 se deba a que un exceso de oxígeno pueda inhibir la acción de una enzima específica dentro del metabolismo del microorganismo.

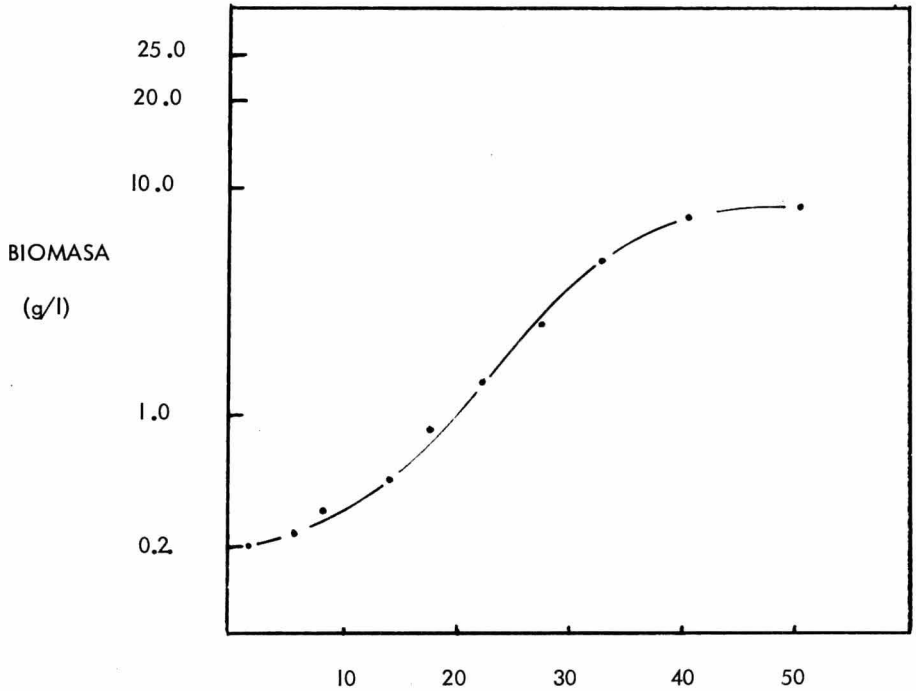
RESUMEN

Se estudiaron los efectos de cuatro diferentes emulsificantes. Los agentes modificadores de la tensión superficial fueron tween 40, tween 60, tween 80 y tween 85. La presencia de los dos primeros en el medio de propagación de la levadura Candida BE-L-1, provocó la inhibición celular, incrementándose con tween 80; un aumento de 6-9 g/l en la tasa de producción de biomasa, se presentó con el empleo de tween 85. De acuerdo a éstos resultados se afirma que el empleo de ciertos emulsificantes, en éste caso tween 80 y tween 85 pueden favorecer la oxidación de la fuente de carbono insoluble, con lo cual el crecimiento celular se incrementa.

La propagación de Candida BE-L-1 en presencia de agua de cocimiento de maíz, se llevó a cabo a nivel de planta piloto, empleando concentraciones que variaron entre 4 g/l y 40 g/l, cada una de ellas con tres volúmenes de aeración (0.5 vvm, 1.0 vvm y 1.5 vvm). Los resultados obtenidos indican que la levadura en estudio utiliza bajos volúmenes de aire, ya que su velocidad específica de crecimiento fué de 0.081 h^{-1} , bajo los efectos de 0.5 vvm. La velocidad de crecimiento aumentó hasta 0.091 h^{-1} cuando la levadura fue propagada con 100 mg/l de tween 85 y 24 g/l de agua de cocimiento de maíz.

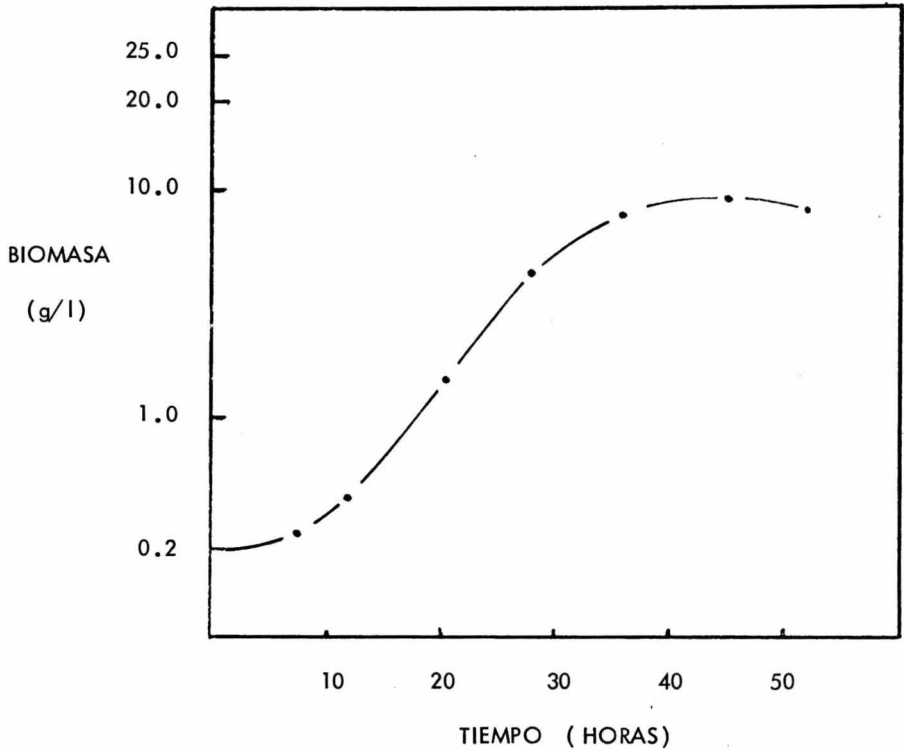
De esta manera se puede afirmar que el agua de cocimiento de maíz y la acción de tween 80 y tween 85, influyen satisfactoriamente en la propagación de la levadura. Candida BE-L-1.

Fig. 1 .- Influencia de la concentración de Tween 40 en la propagación de Candida BE-L-I en matraces Erlenmeyer de 500 ml. con mamparas.



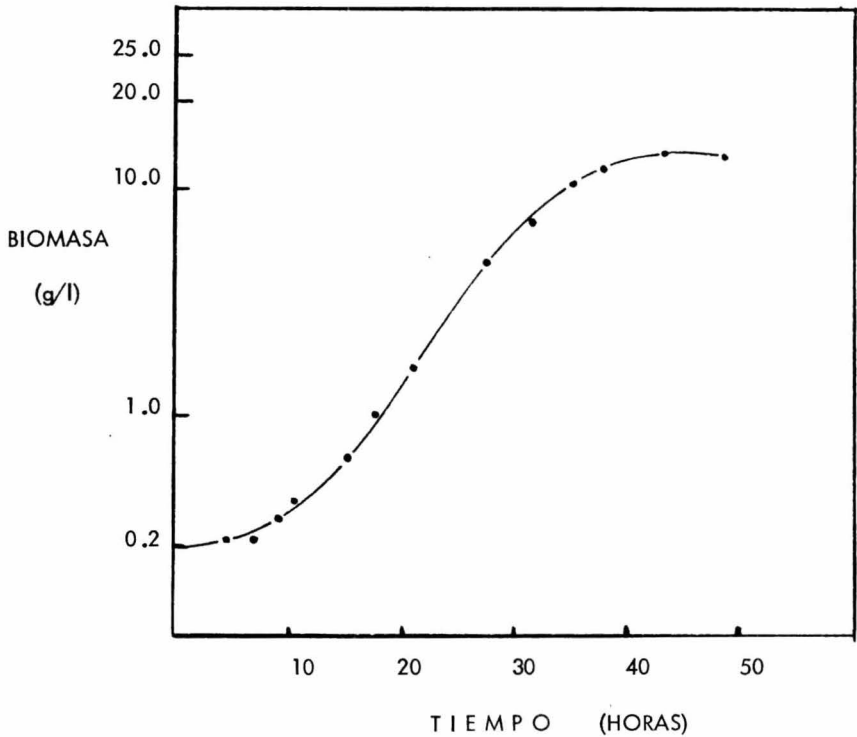
Condiciones de Operación : Volumen de Medio ----- 100 ml
 Concentración de Tween 40 ----- 16.6 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30° C
 pH ----- 4.6

Fig. 2.- Influencia de la concentración de Tween 40 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml. con mamparas.



Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 100 ml.
 Concentración de Tween 40 ----- 33.3 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30°C
 pH ----- 4.6

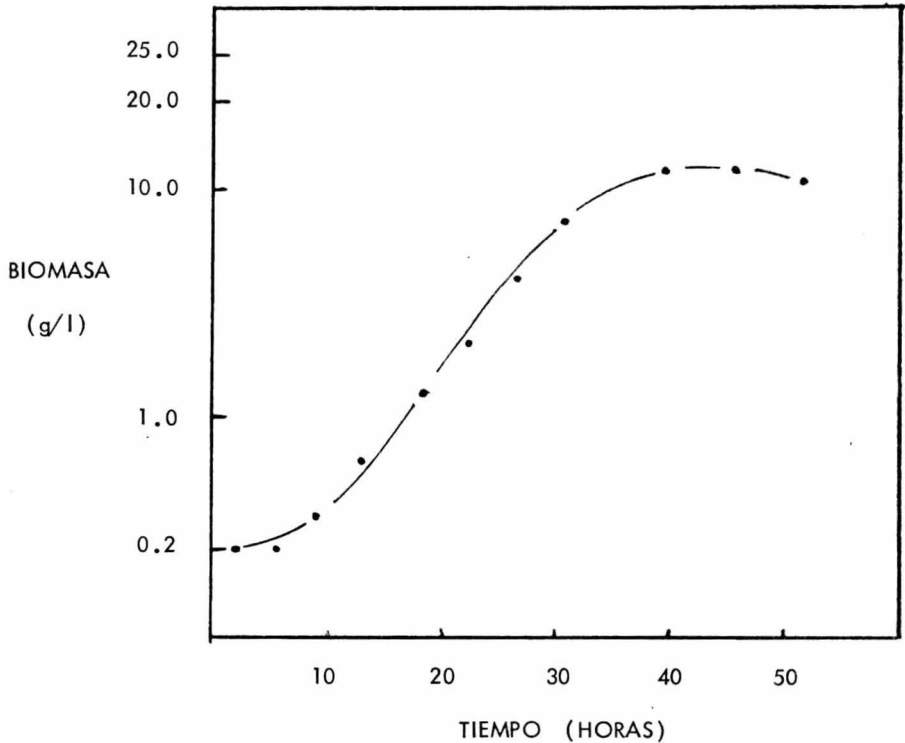
Fig. 3.- Influencia de la concentración de Tween 40 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml con mamparas.



Condiciones de Operación :

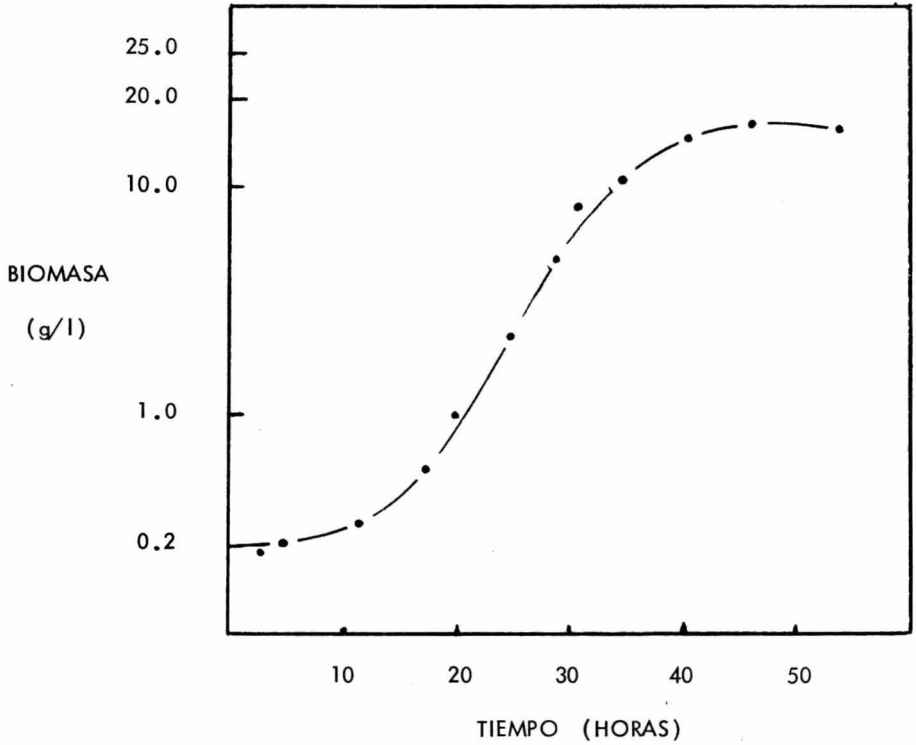
Volumen de Medio	-----	100 ml
Concentración de Tween 40	-----	50.0 mg/l
Agitación	-----	150 rpm
Temperatura	-----	30° C
pH	-----	4.6

Fig. 4.- Influencia de la concentración de Tween 40 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml. con mamparas.



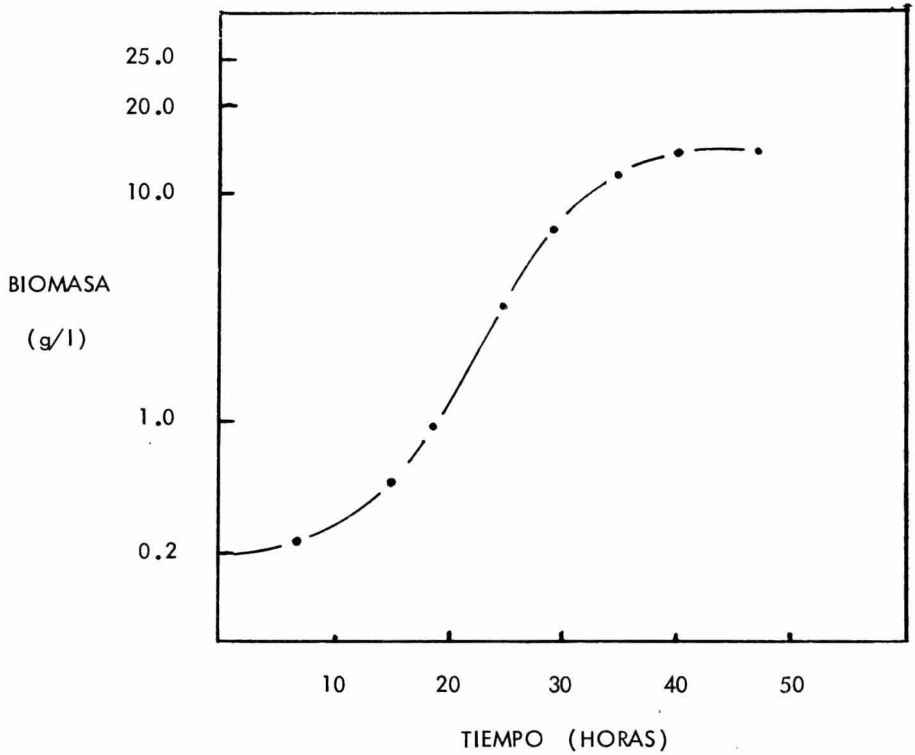
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 100 ml.
 Concentración de Tween 40 ----- 66.6 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30°C
 pH ----- 4.6

Fig. 5.- Influencia de la concentración de Tween 40 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml. con mamparas.



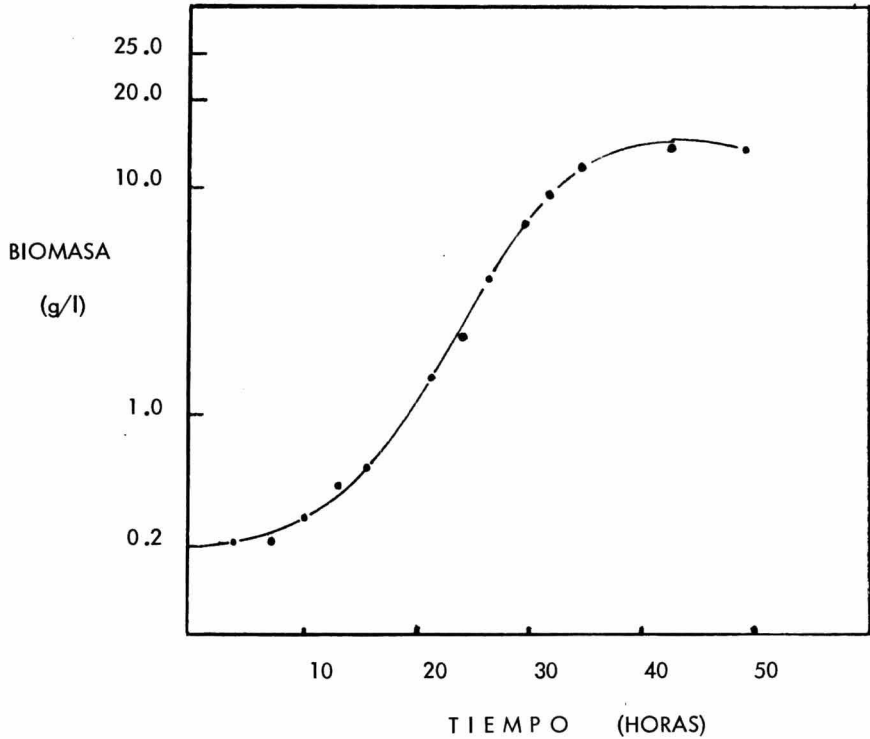
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 100 ml.
 Concentración de Tween 40 ----- 83.3 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30°C
 pH ----- 4.6

Fig. 6.- Influencia de la concentración de Tween 40 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml. con mamparas.



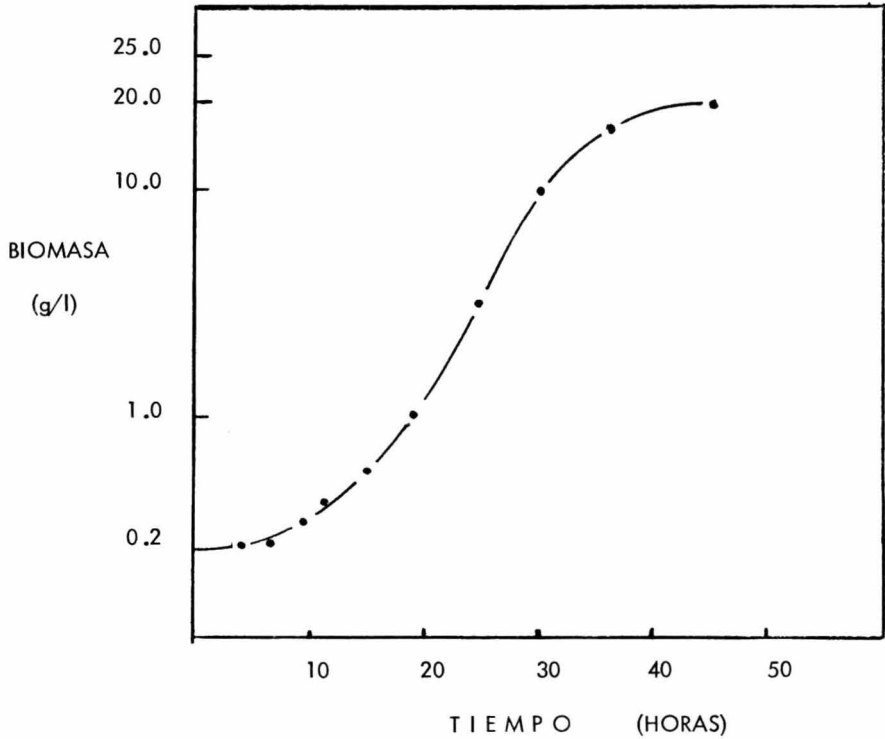
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 100 ml.
 Concentración de Tween 40 ----- 100.0 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30°C
 pH ----- 4.6

Fig. 7.- Influencia de la concentración de Tween 60 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml con mamparas.



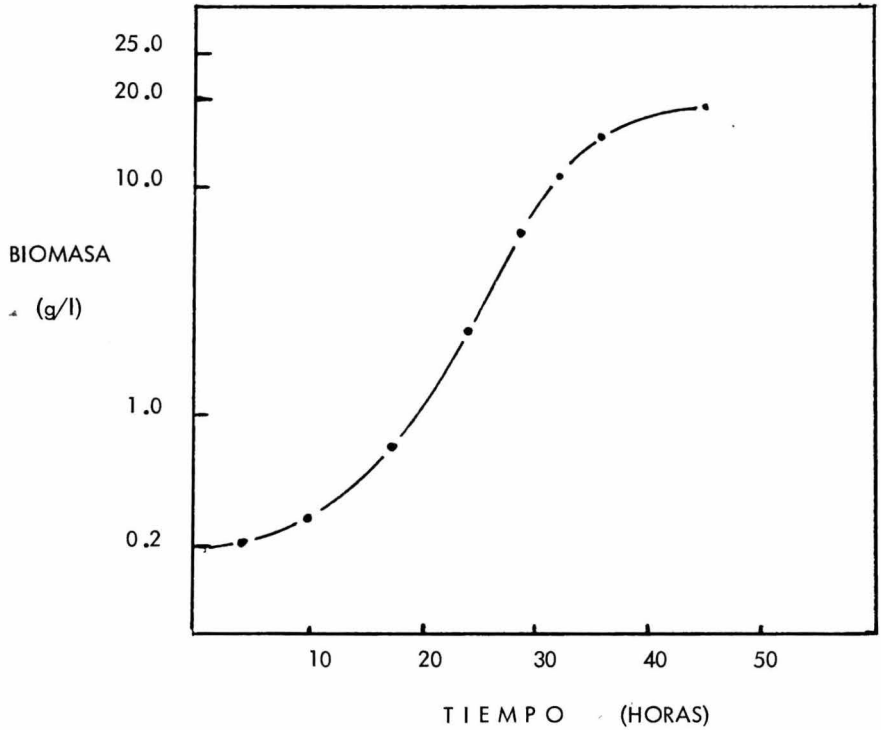
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 100 ml
 Concentración de Tween 60 ----- 16.6 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30° C
 pH ----- 4.6

Fig. 8.- Influencia de la concentración de Tween 60 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml con mamparas.



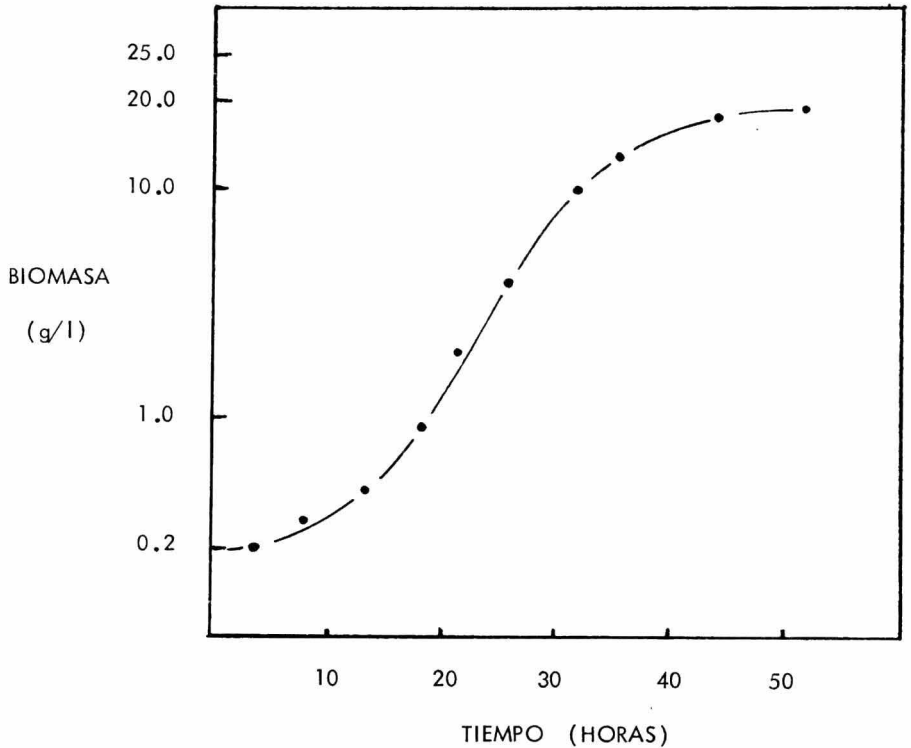
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 100 ml
 Concentración de Tween 60 ----- 33.3 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30° C
 pH ----- 4.6

Fig. 9.- Influencia de la concentración de Tween 60 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml con mamparas.



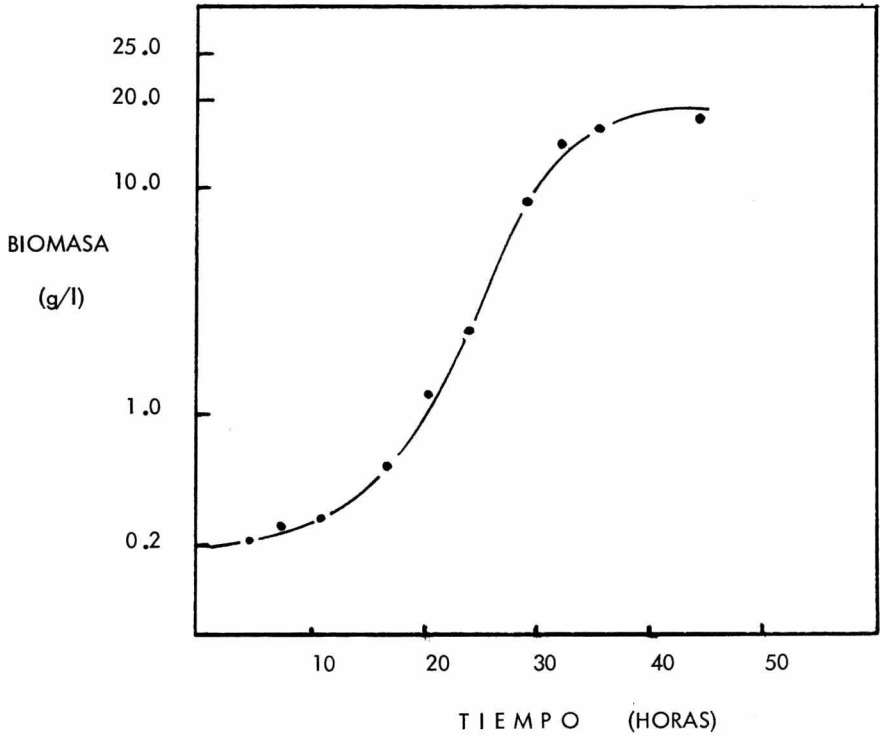
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 100 ml
 Concentración de Tween 60 ----- 50.0 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30° C
 pH ----- 4.6

Fig. 10.- Influencia de la concentración de Tween 60 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml. con mamparas.



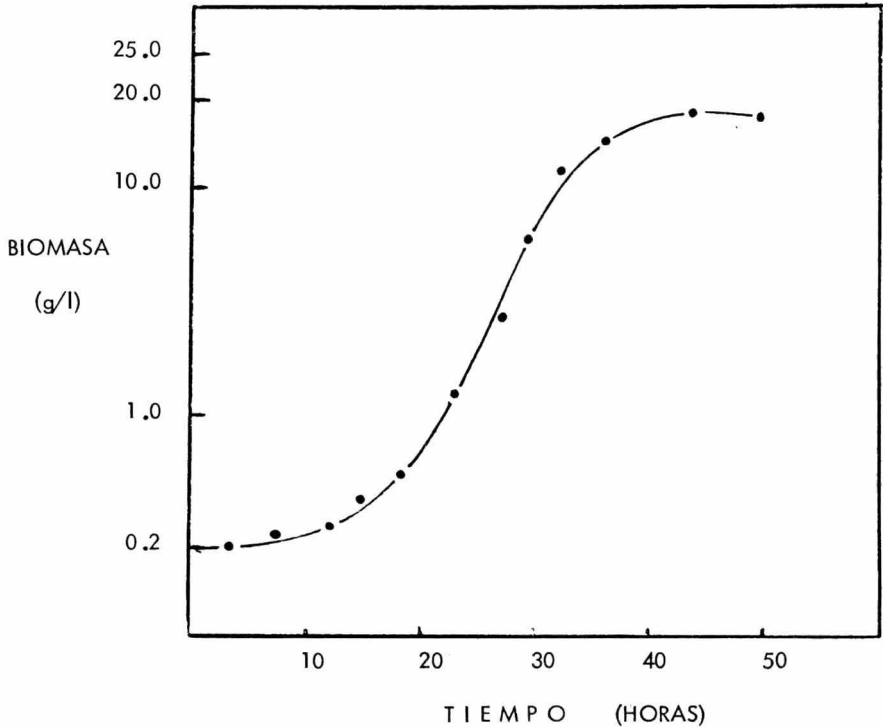
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 100 ml.
 Concentración de Tween 60 ----- 66.6 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30°C
 pH ----- 4.6

Fig. 11.- Influencia de la concentración de Tween 60 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml con mamparas.



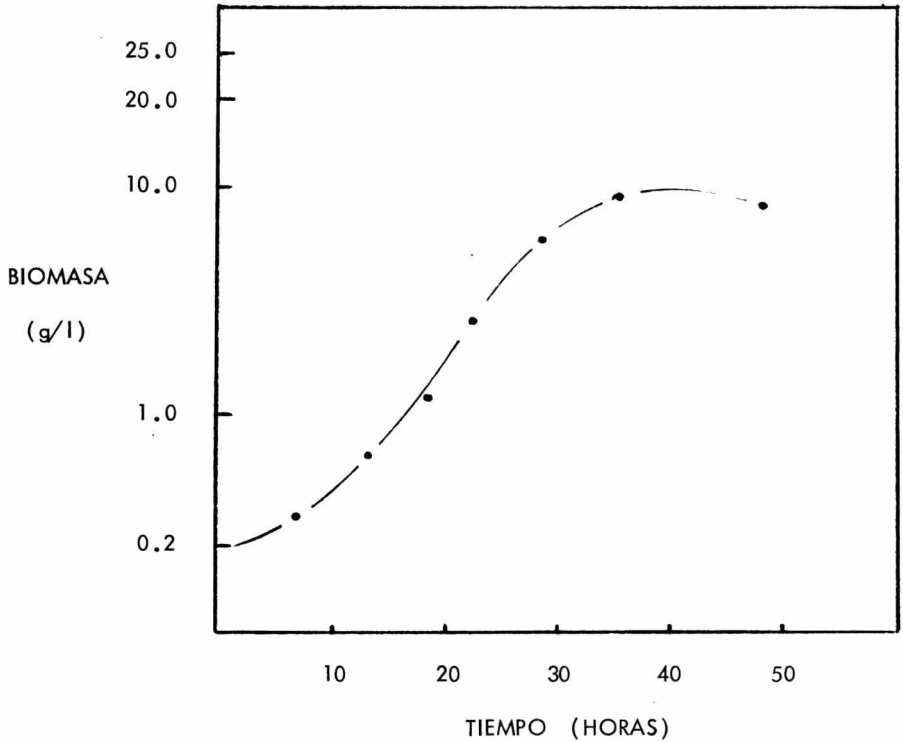
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 100 ml
 Concentración de Tween 60 ----- 83.3 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30° C
 pH ----- 4.6

Fig. 12.- Influencia de la concentración de Tween 60 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml con mamparas.



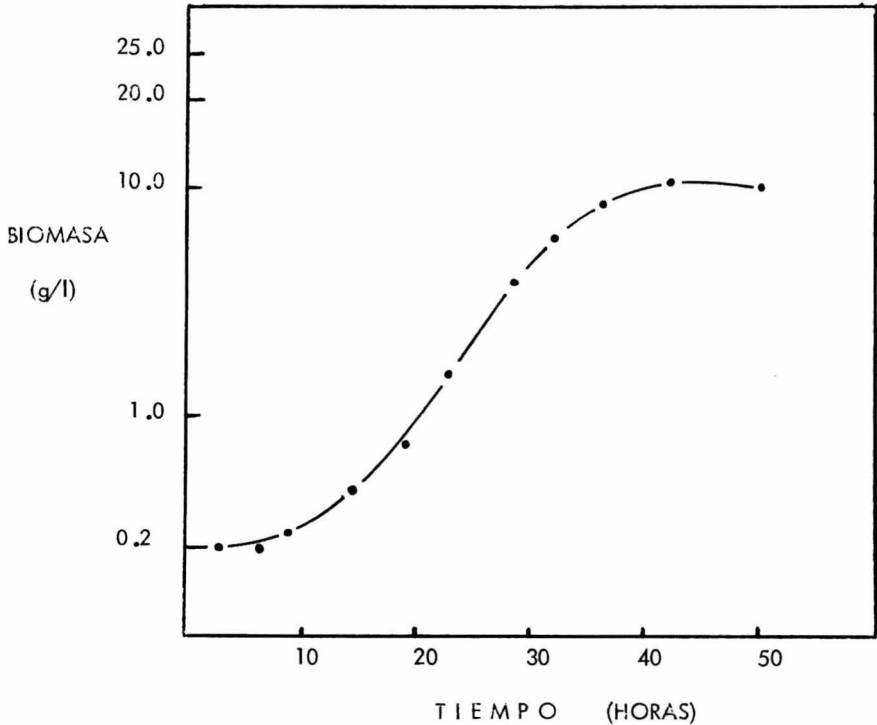
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 100 ml
 Concentración de Tween 60 ----- 100.0 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30° C
 pH ----- 4.6

Fig. 13.- Influencia de la concentración de Tween 80 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml. con mamparas.



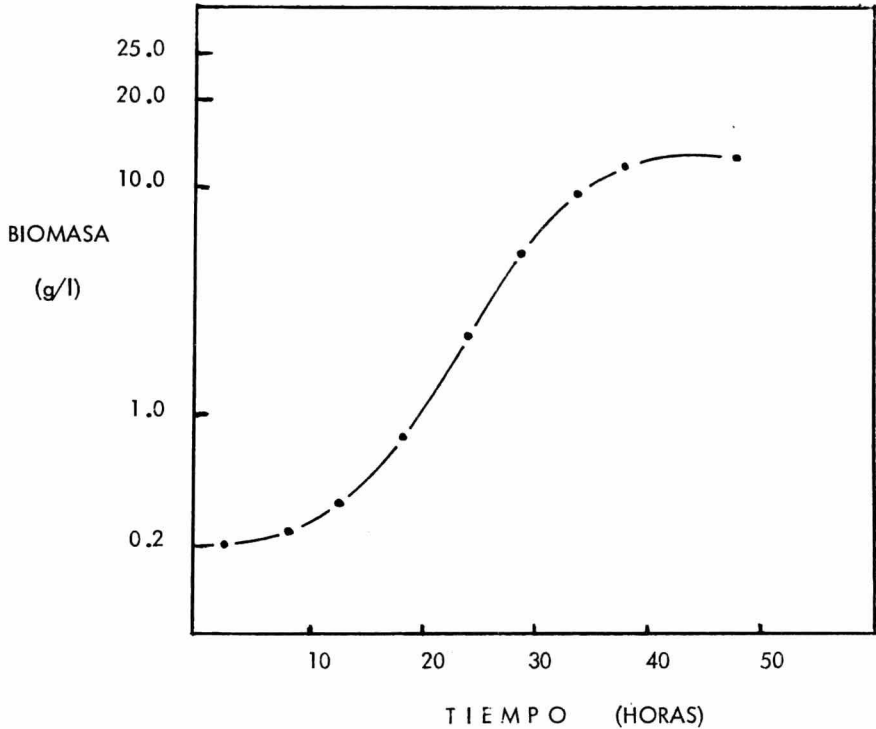
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 100 ml.
 Concentración de Tween 80 ----- 16.6 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30°C
 pH ----- 4.6

Fig. 14.- Influencia de la concentración de Tween 80 en la propagación de *Candida* BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml con mamparas.



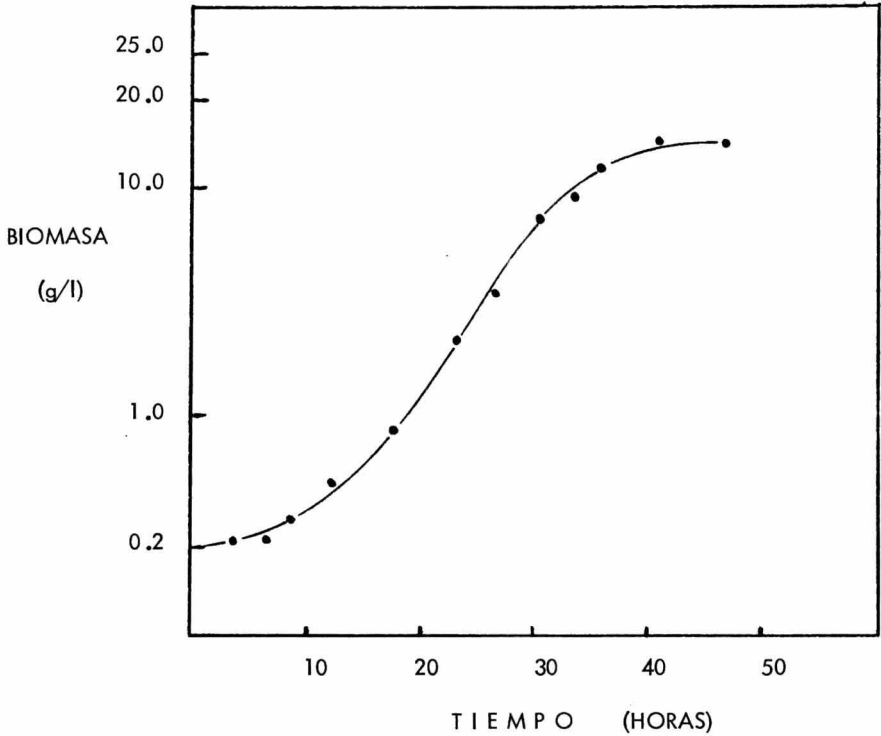
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 100 ml
 Concentración de Tween 80 ----- 33.3 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30° C
 pH ----- 4.6

Fig. 15.- Influencia de la concentración de Tween 80 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml con namparas.



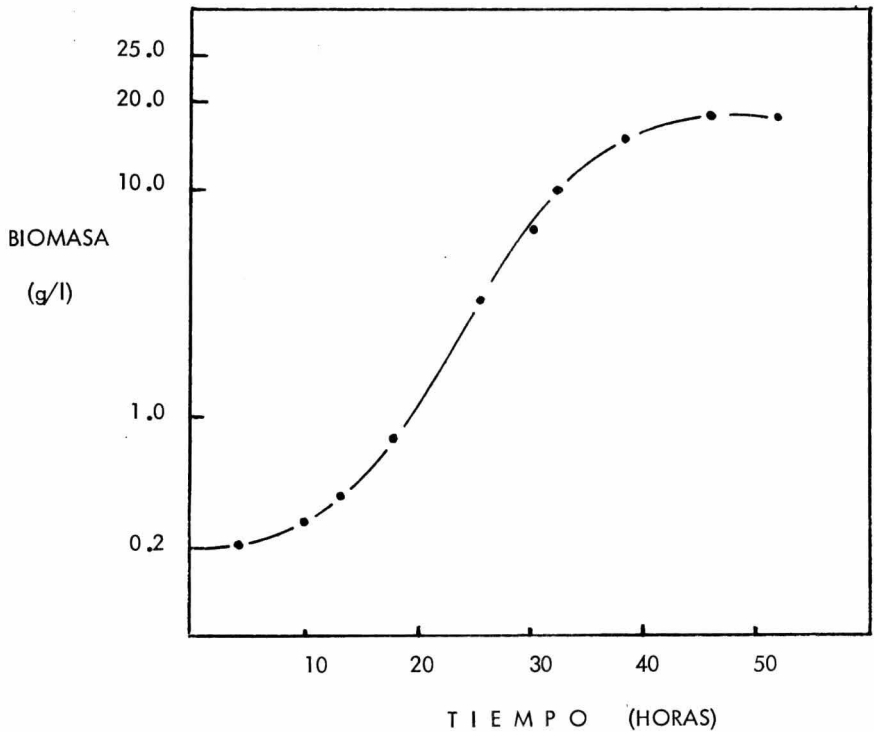
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 100 ml
 Concentración de Tween 80 ----- 50.0 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30° C
 pH ----- 4.6

Fig. 16.- Influencia de la concentración de Tween 80 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml con mamparas.



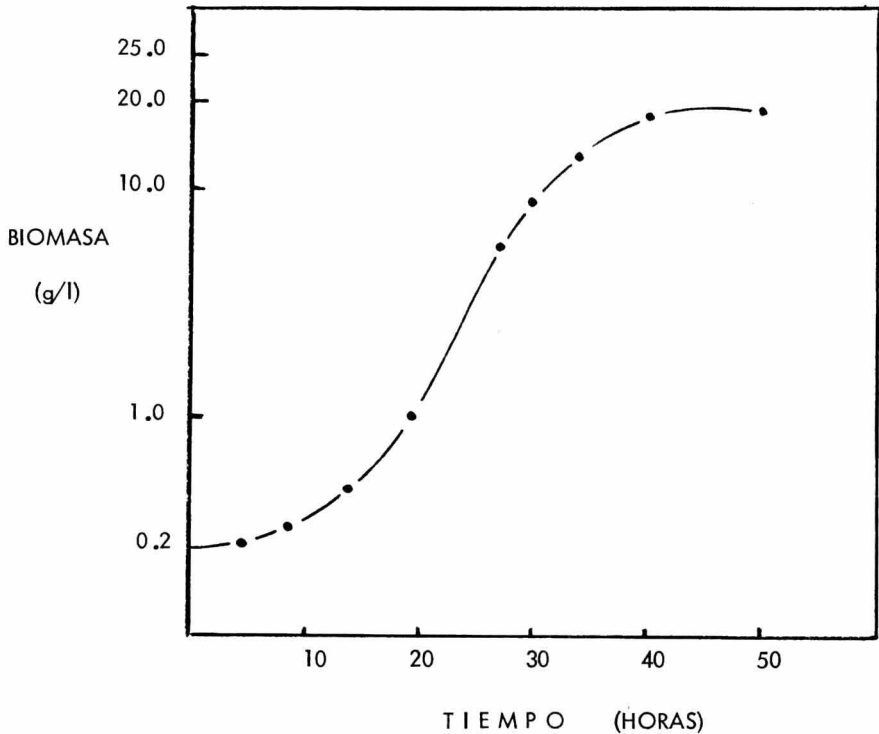
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 100 ml
 Concentración de Tween 80 ----- 66.6 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30° C
 pH ----- 4.6

Fig. 17.- Influencia de la concentración de Tween 80 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml con mamparas.



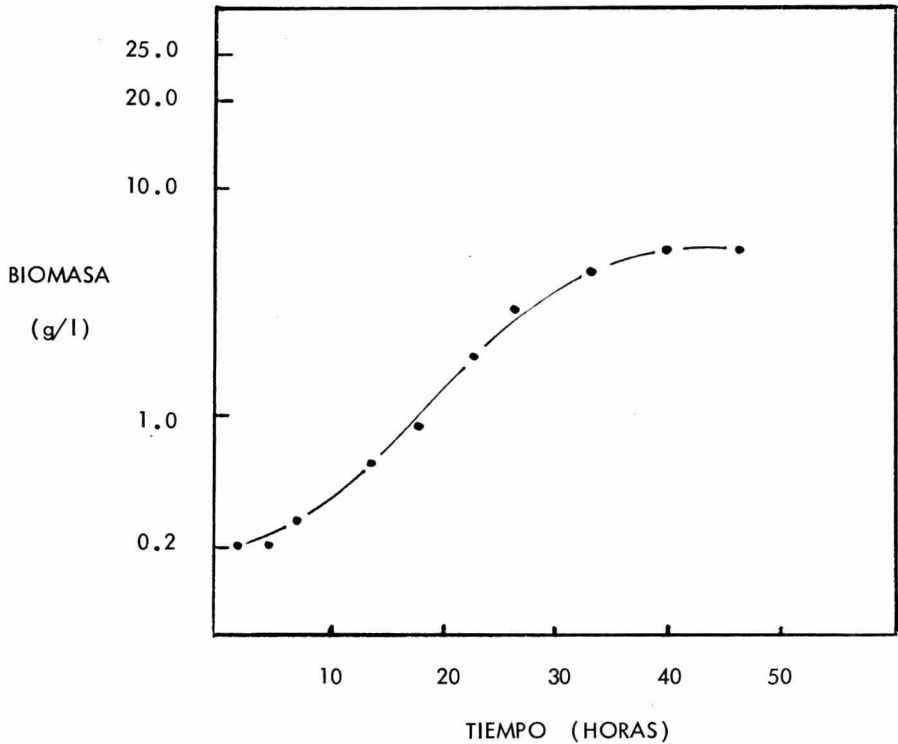
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 100 ml
 Concentración de Tween 80 ----- 83.3 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30° C
 pH ----- 4.6

Fig. 18.- Influencia de la concentración de Tween 80 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml con mamparas.



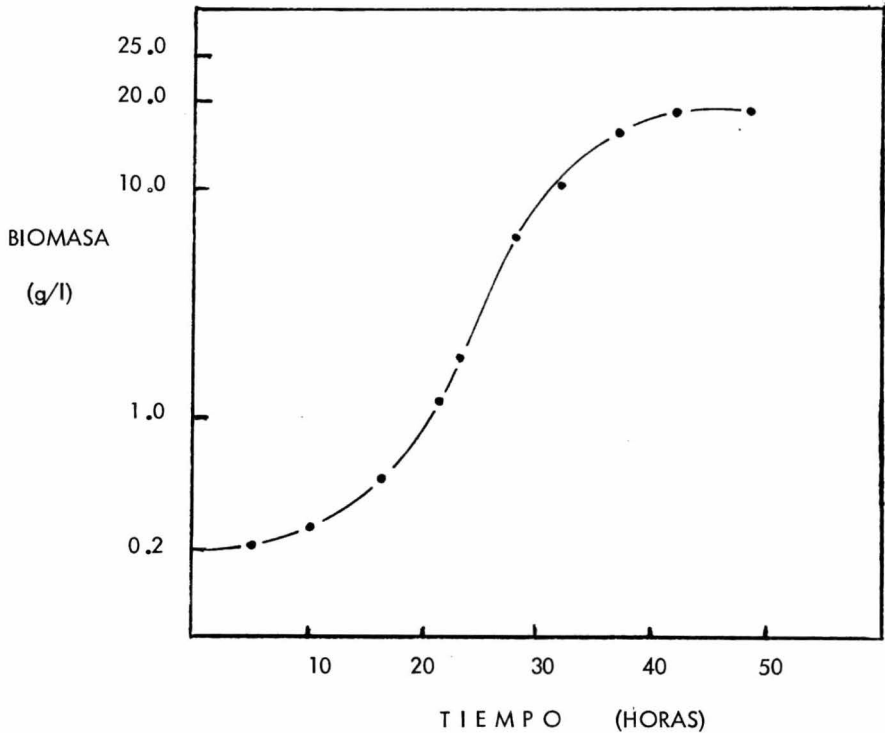
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 100 ml
 Concentración de Tween 80 ----- 100.0 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30° C
 pH ----- 4.6

Fig. 19.- Influencia de la concentración de Tween 80 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml. con mamparas.



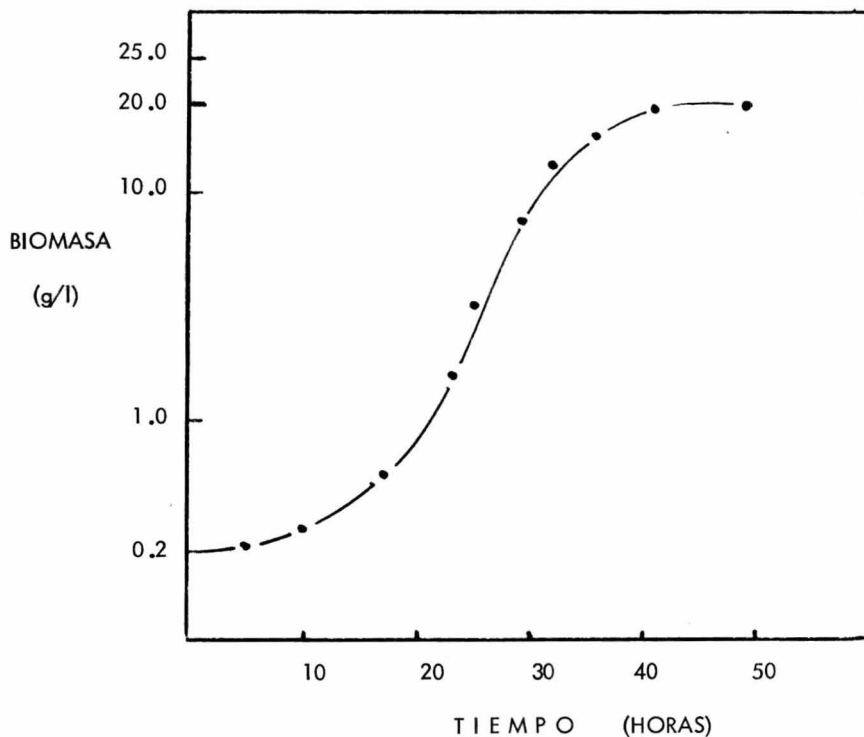
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 100 ml.
 Concentración de Tween 80 ----- 200.0 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30°C
 pH ----- 4.6

Fig. 20.- Influencia de la concentración de Tween 85 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml con mamparas .



Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 100 ml
 Concentración de Tween 85 ----- 16.6 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30° C
 pH ----- 4.6

Fig. 21.- Influencia de la concentración de Tween 85 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml con mamparas.

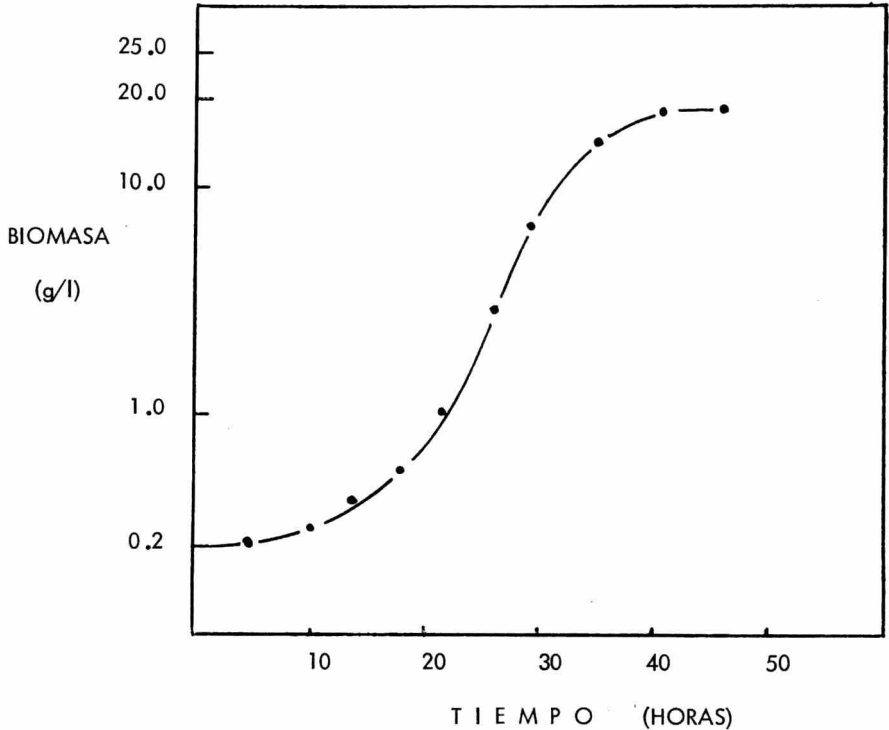


Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 100 ml
 Concentración de Tween 85 ----- 33.3 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30° C
 pH ----- 4.6



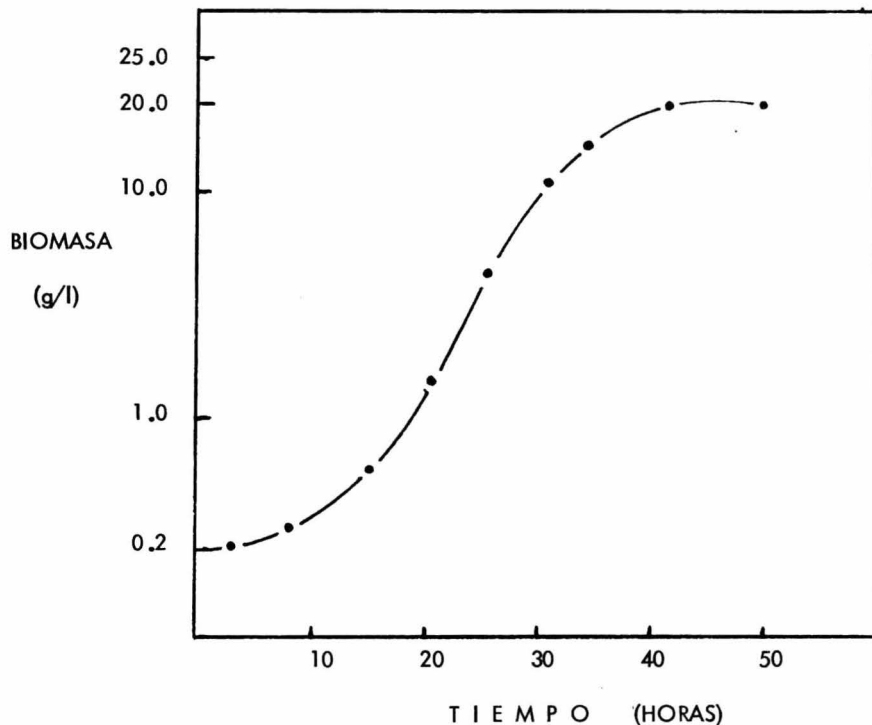
QUINCO

Fig. 22.- Influencia de la concentración de Tween 85 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml con mamparas.



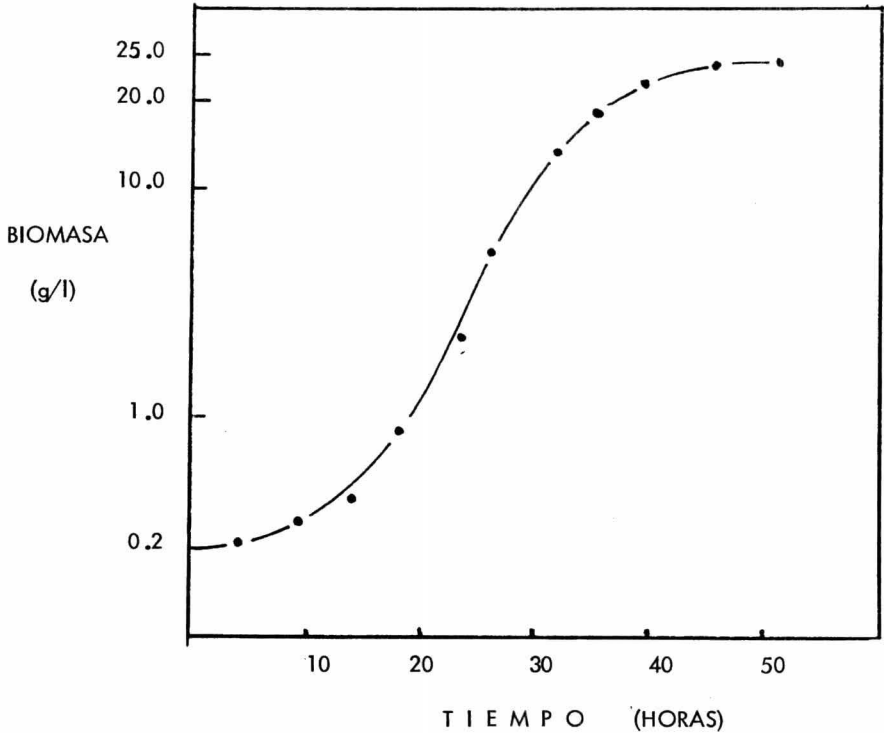
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 100 ml
 Concentración de Tween 85 ----- 50.0 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30° C
 pH ----- 4.6

Fig. 23.- Influencia de la concentración de Tween 85 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml con mamparas.



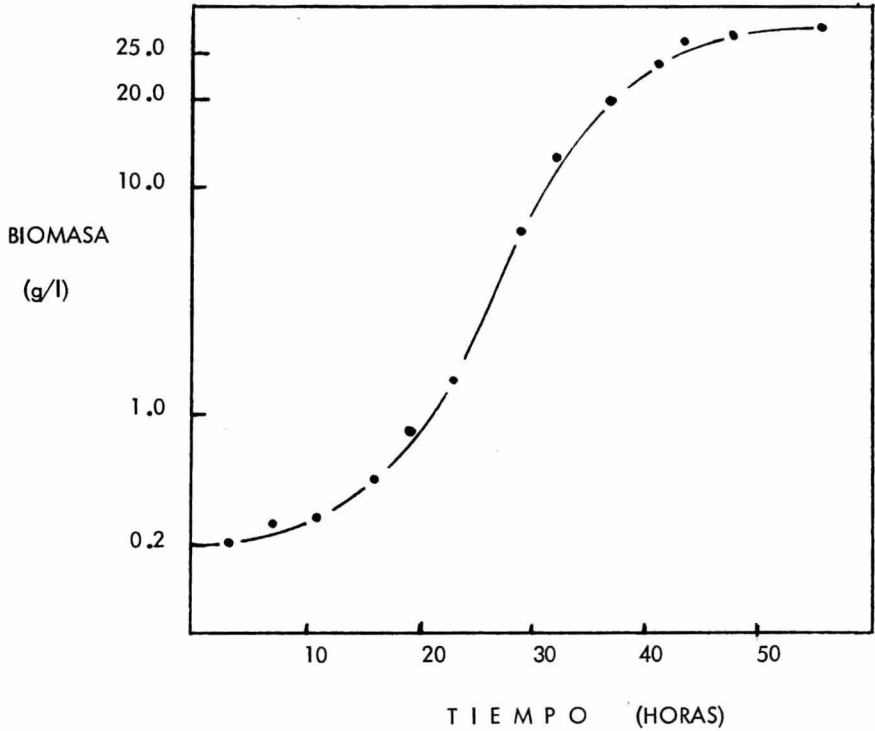
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 100 ml
 Concentración de Tween 85 ----- 66.6 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30° C
 pH ----- 4.6

Fig. 24.- Influencia de la concentración de Tween 85 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml con mamparas.



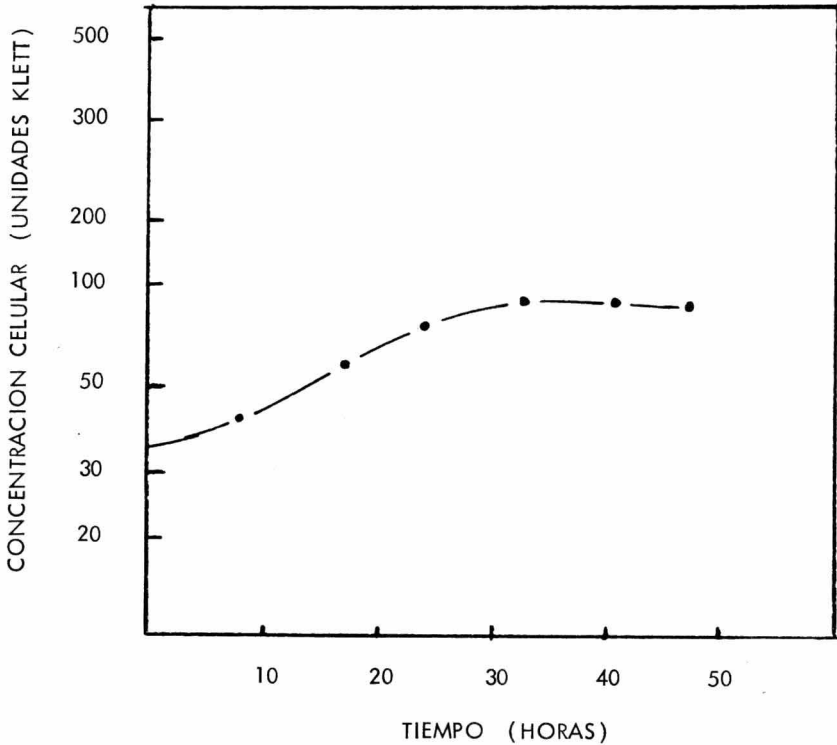
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 100 ml
 Concentración de Tween 85 ----- 83.3 mg/l
 Agitación ----- 150 rpm
 Temperatura ----- 30° C
 pH ----- 4.6

Fig. 25.- Influencia de la concentración de Tween 85 en la propagación de Candida BE-L-1 en matraces Erlenmeyer de 500 ml con mamparas.



Condiciones de Operación: Volumen de Medio - - - - - 100 ml
 Concentración de Tween 85 - - - - - 100.0 mg/l
 Agitación - - - - - 150 rpm
 Temperatura - - - - - 30° C
 pH - - - - - 4.6

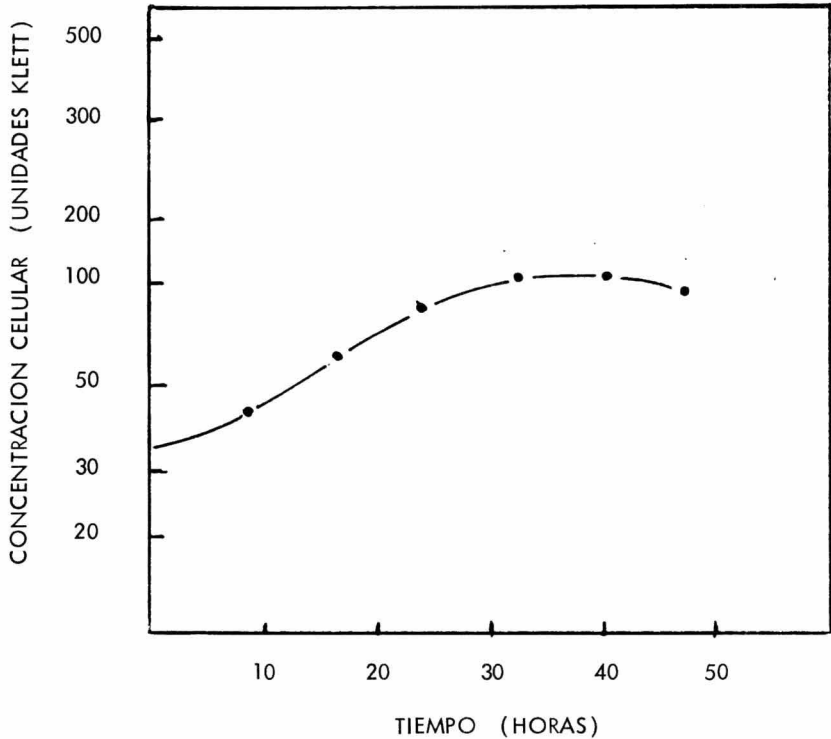
Fig. 26.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 0.5 vvm



Condiciones de Operación:

Volumen de Medio	6 litros
Agua de Cocimiento de Maíz	4 g/l
Agitación	750 rpm
Temperatura	30 °C
pH	4.6

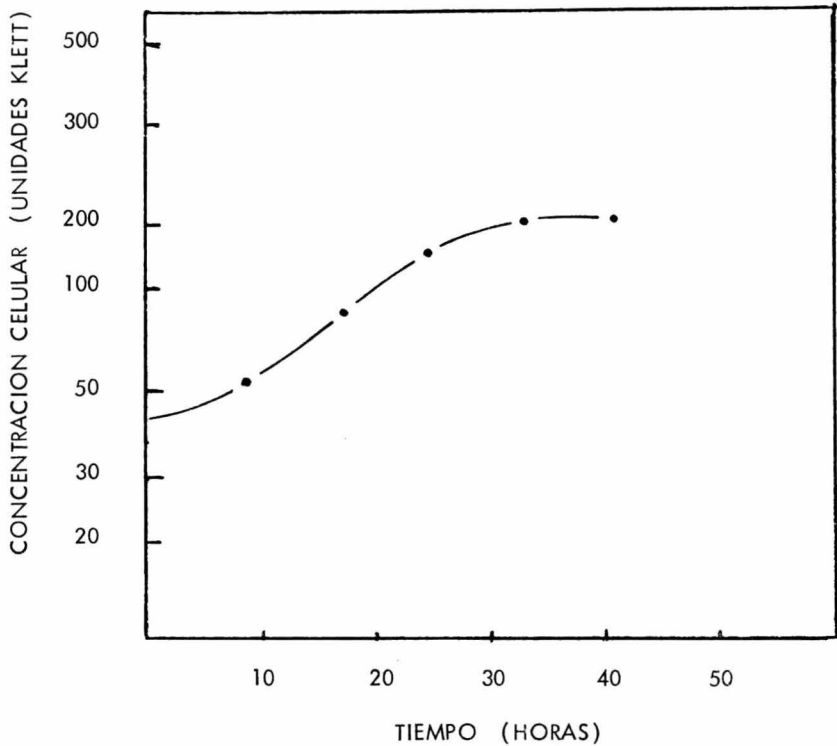
Fig. 27.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 0.5 vvm



Condiciones de Operación:

Volumen de Medio	-----	6 litros
Agua de Cocimiento de Maíz	-----	8 g/l
Agitación	-----	750 rpm
Temperatura	-----	30 °C
pH	-----	4.6

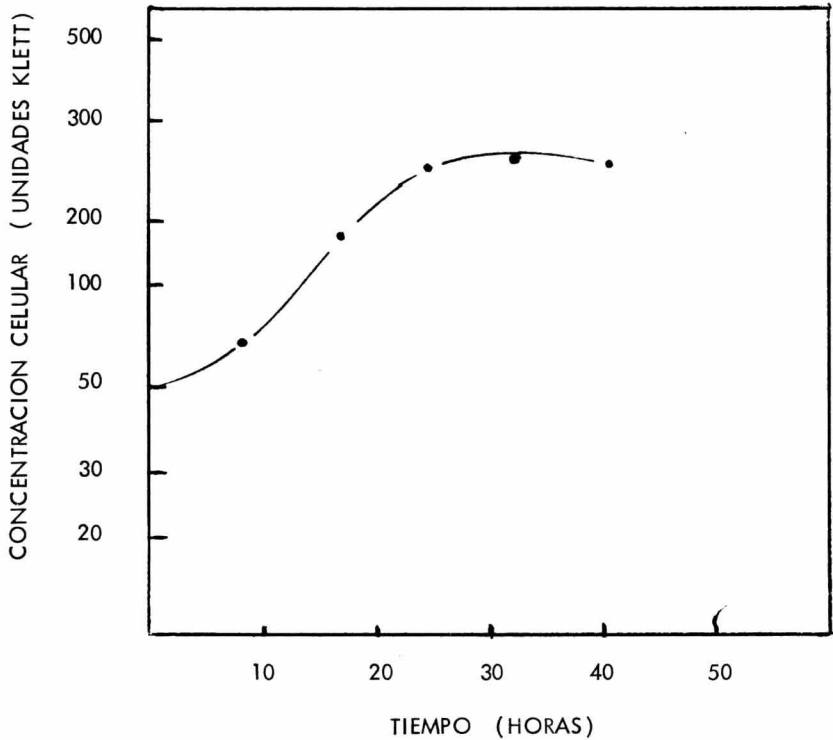
Fig. 28.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 0.5 vvm



Condiciones de Operación:

Volumen de Medio	-----	6 litros
Agua de Cocimiento de Maíz	-----	12 g/l
Agitación	-----	750 rpm
Temperatura	-----	30°C
pH	-----	4.6

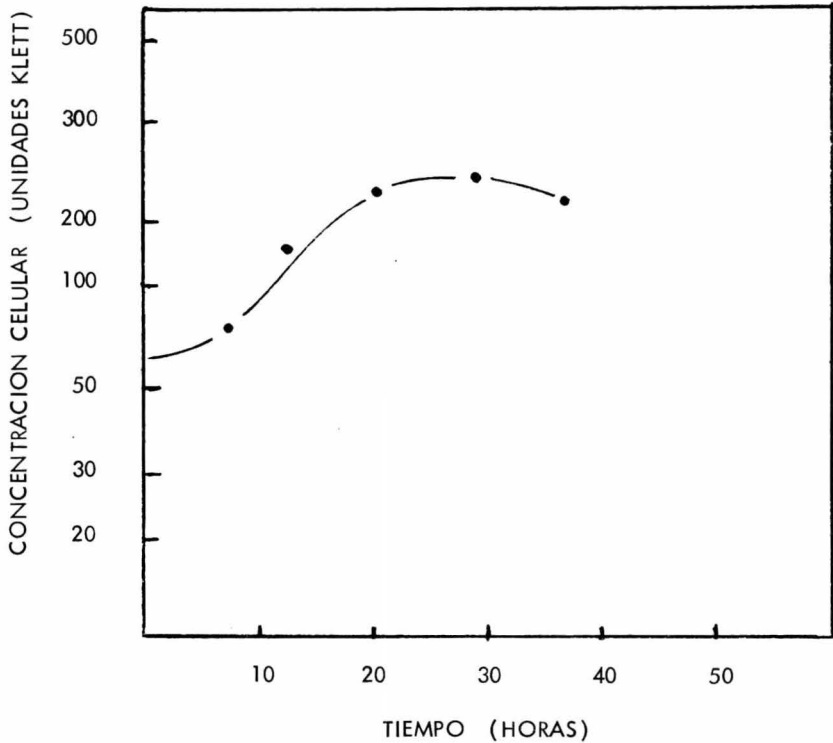
Fig. 29.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 0.5 vvm



Condiciones de Operación:

Volumen de Medio	-----	6 litros
Agua de Cocimiento de Maíz	-----	16 g/l
Agitación	-----	750 rpm
Temperatura	-----	30°C
pH	-----	4.6

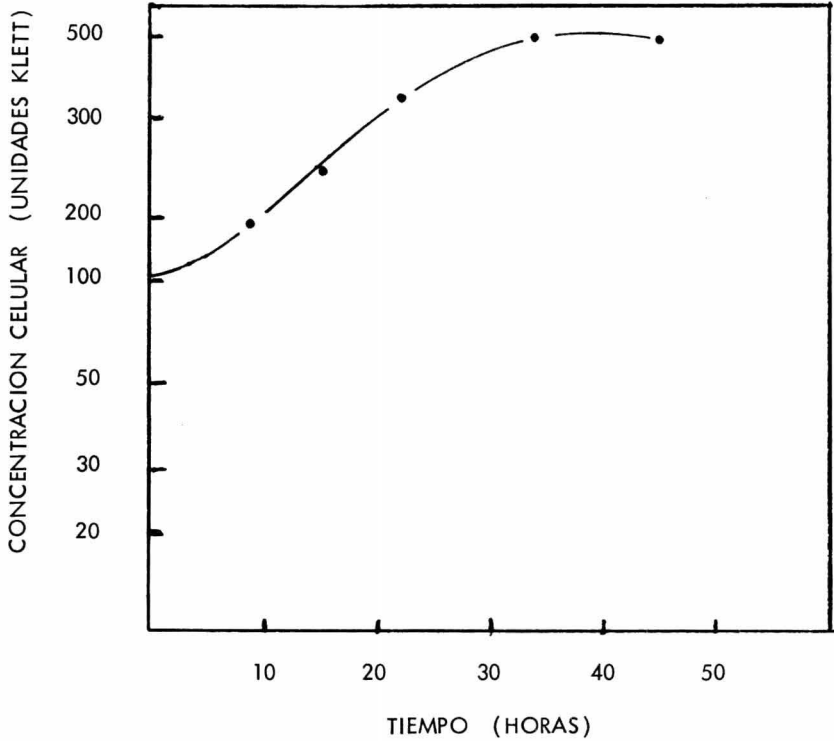
Fig. 30.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 0,5 vvm



Condiciones de Operación:

Volumen de Medio	-----	6 litros
Agua de Cocimiento de Maíz	----	20 g/l
Agitación	-----	750 rpm
Temperatura	-----	30°C
pH	-----	4.6

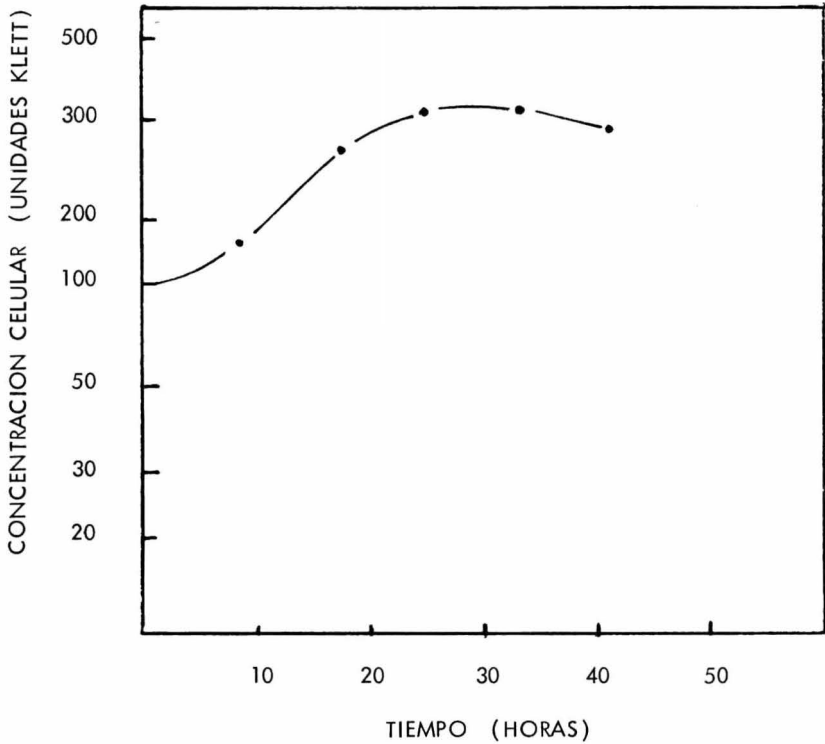
Fig. 31.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 0.5 vvm



Condiciones de Operación:

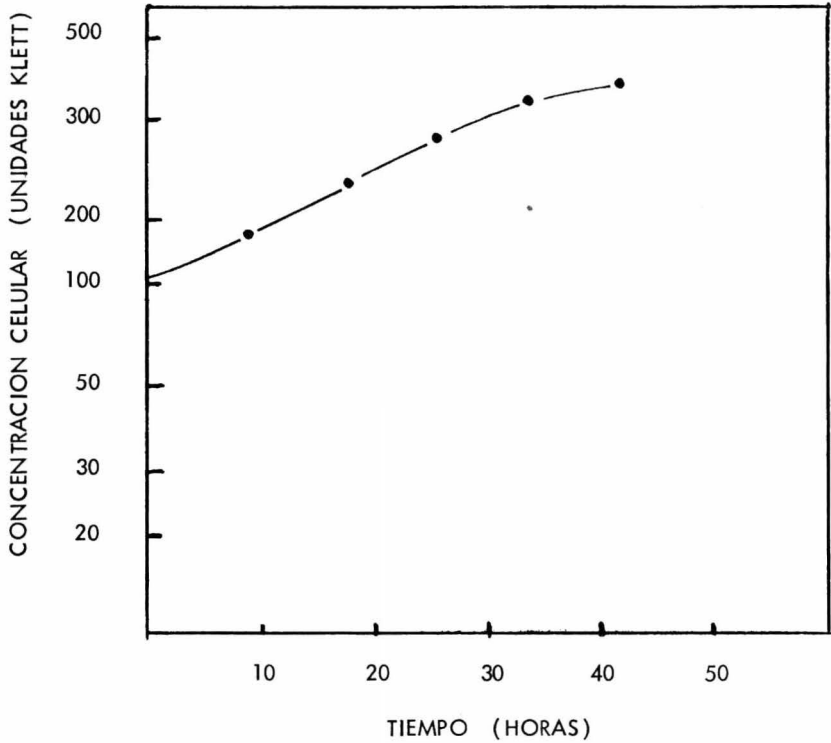
Volumen de Medio	-----	6 litros
Agua de Cocimiento de Maíz	-----	24 g/l
Agitación	-----	750 rpm
Temperatura	-----	30°C
pH	-----	4.6

Fig. 32 .- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 0.5 vvm



Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 6 litros
 Agua de Cocimiento de Maíz ---- 28 g/l
 Agitación ----- 750 rpm
 Temperatura ----- 30°C
 pH ----- 4.6

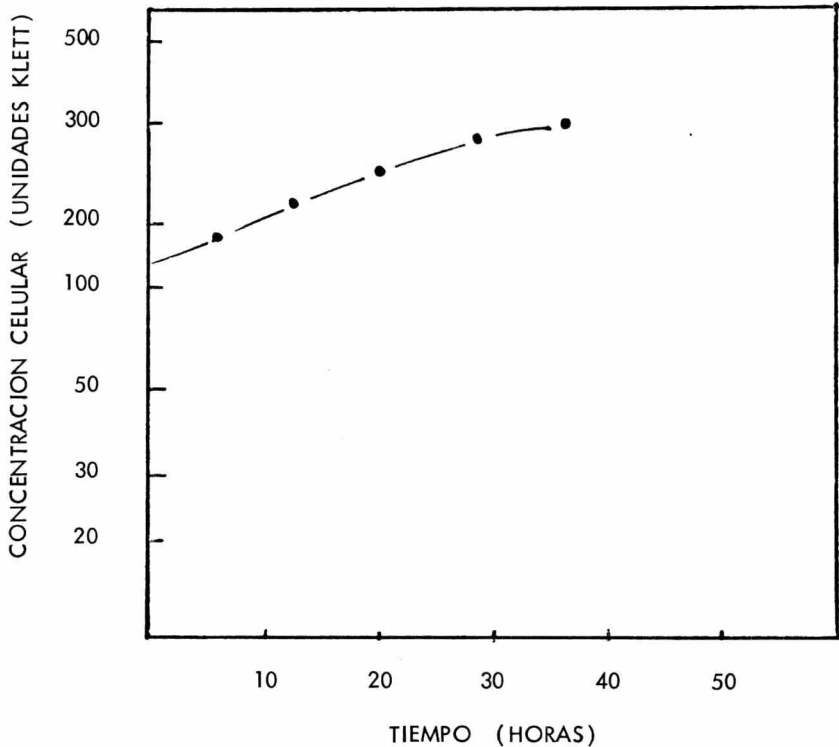
Fig. 33.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 0.5 vvm



Condiciones de operación:

Volumen de Medio	-----	6 litros
Agua de Cocimiento de Maíz	-----	32 g/l
Agitación	-----	750 rpm
Temperatura	-----	30°C
pH	-----	4.6

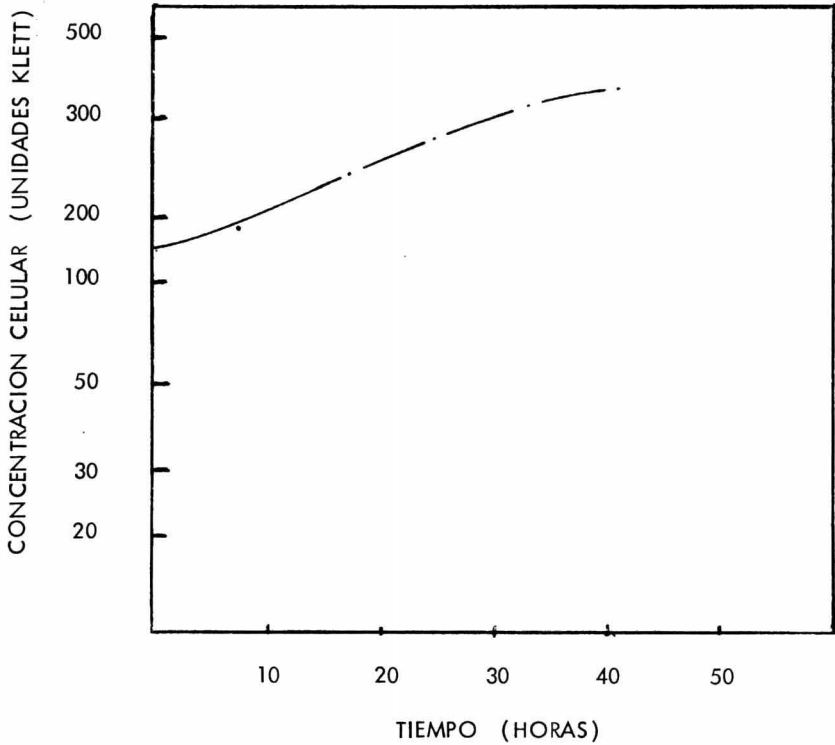
Fig. 34.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 0.5 vvm



Condiciones de Operación:

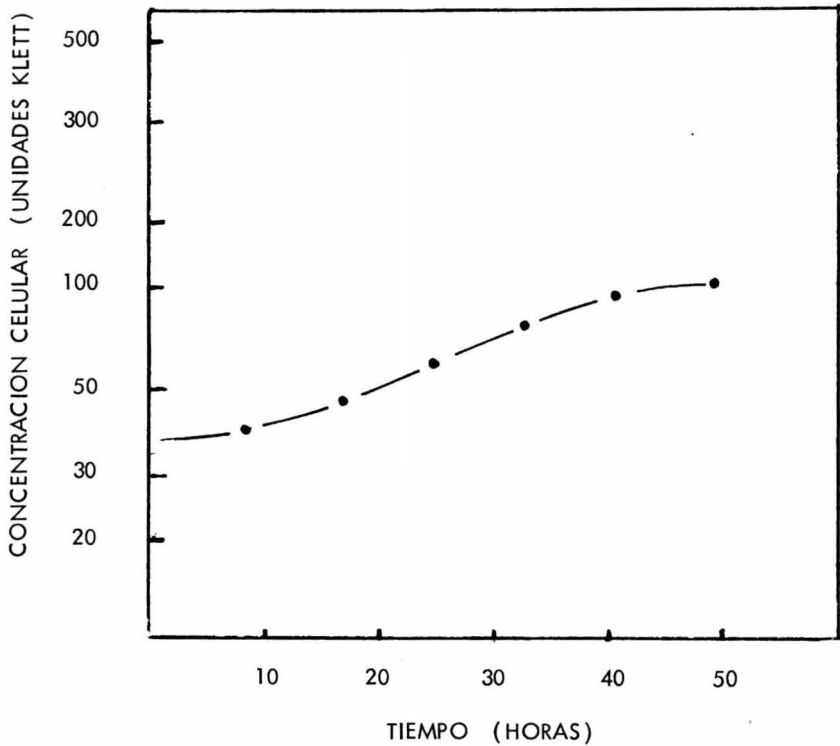
Volumen de Medio	-----	6 litros
Agua de Cocimiento de Maíz	----	36 g/l
Agitación	-----	750 rpm
Temperatura	-----	30°C
pH	-----	4.6

Fig. 35.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 0.5 vvm



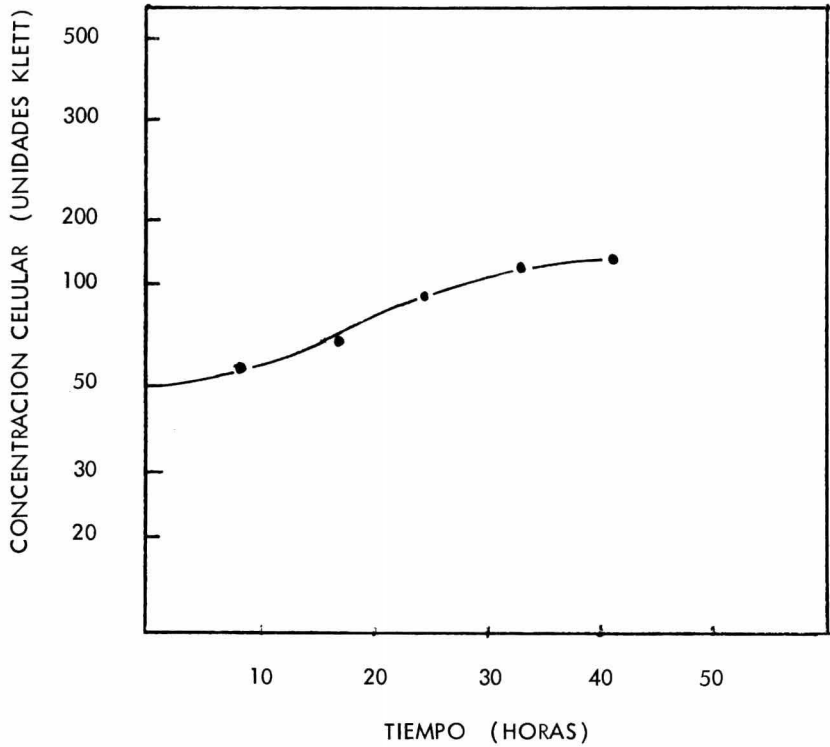
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 6 litros
 Agua de Cocimiento de Maíz ----- 40 g/l
 Agitación ----- 750 rpm
 Temperatura ----- 30°C
 pH ----- 4.6

Fig. 36.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 1.0 vvm



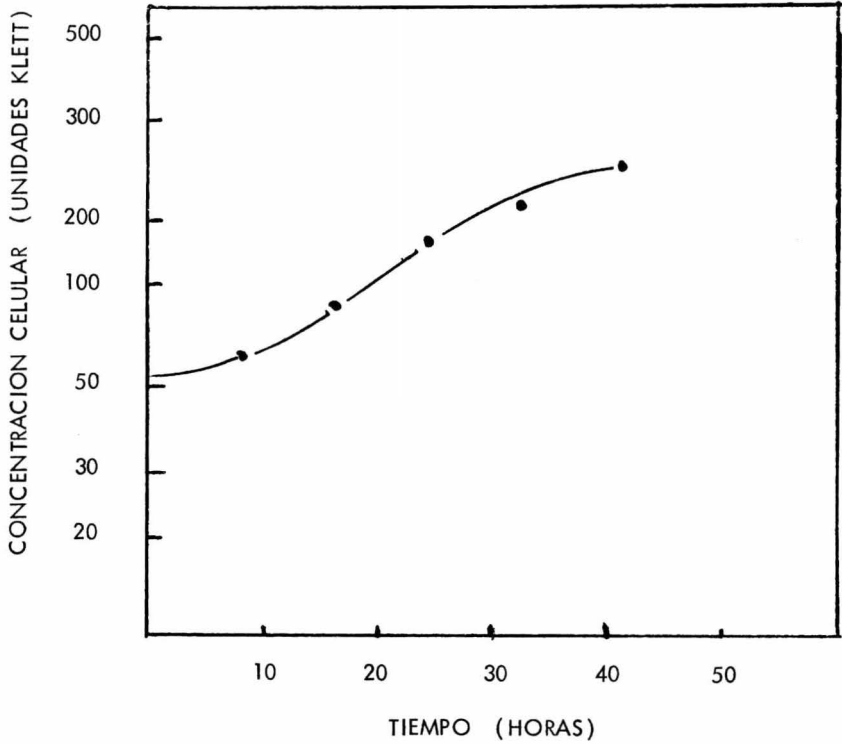
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 6 litros
 Agua de Cocimiento de Maíz ----- 4 g/l
 Agitación ----- 750 rpm
 Temperatura ----- 30°C
 pH ----- 4.6

Fig. 37.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 1.0 vvm



Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 6 litros
 Agua de Cocimiento de Maíz ---- 8 g/l
 Agitación ----- 750 rpm
 Temperatura ----- 30°C
 pH ----- 4.6

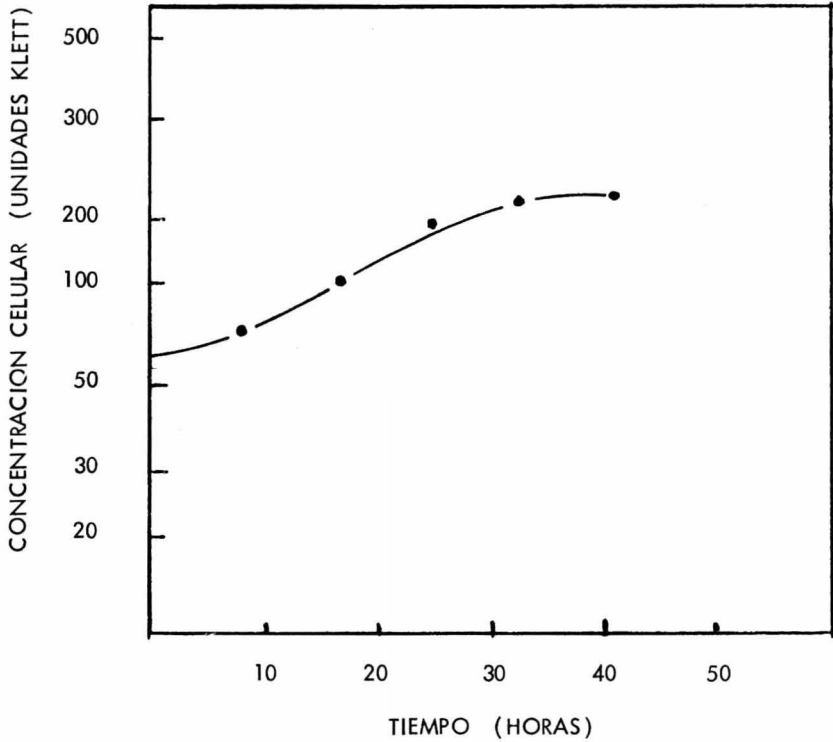
Fig. 38.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 1.0 vvm



Condiciones de Operación:

Volumen de Medio	-----	6 litros
Agua de Cocimiento de Maíz	----	12 g/l
Agitación	-----	750 rpm
Temperatura	-----	30°C
pH	-----	4.6

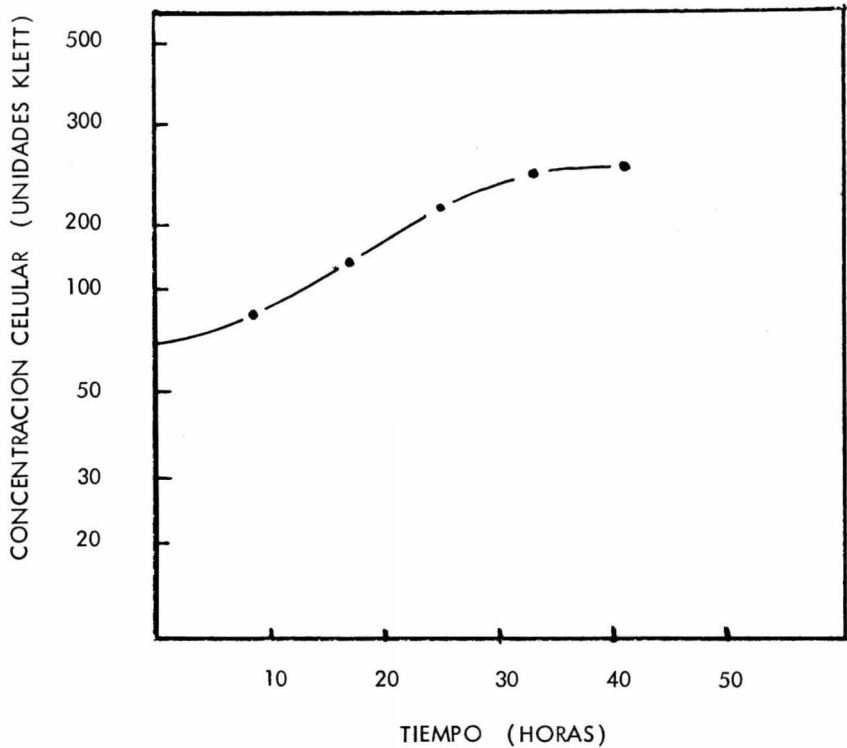
Fig. 39.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 1.0 vvm



Condiciones de Operación:

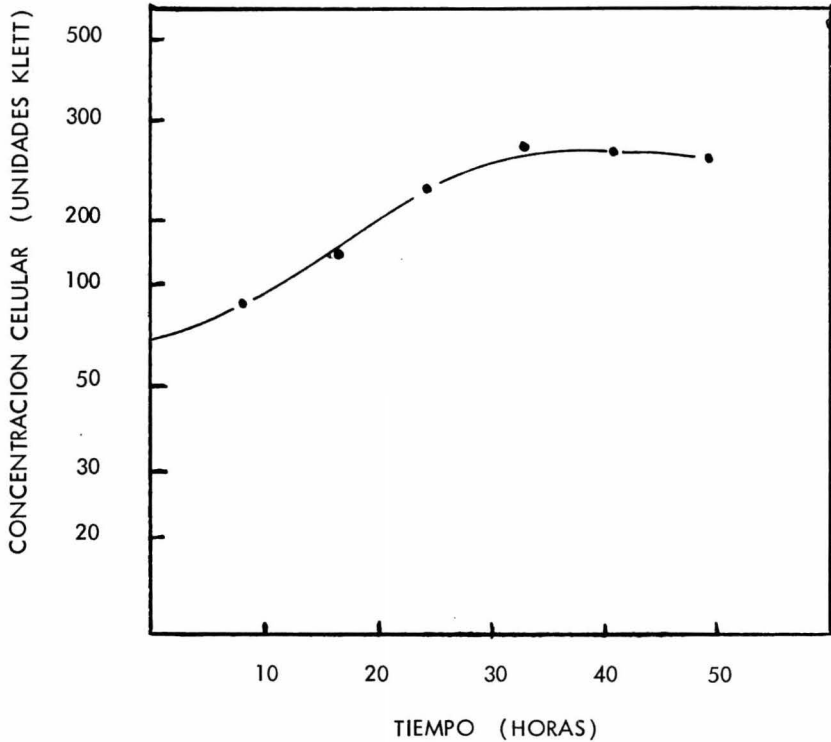
Volumen de Medio	-----	6 litros
Agua de Cocimiento de Maíz	-----	16 g/l
Agitación	-----	750 rpm
Temperatura	-----	30°C
pH	-----	4.6

Fig. 40.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 1.0 vvm



Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 6 litros
 Agua de Cocimiento de Maíz ----- 20 g/l
 Agitación ----- 750 rpm
 Temperatura ----- 30°C
 pH ----- 4.6

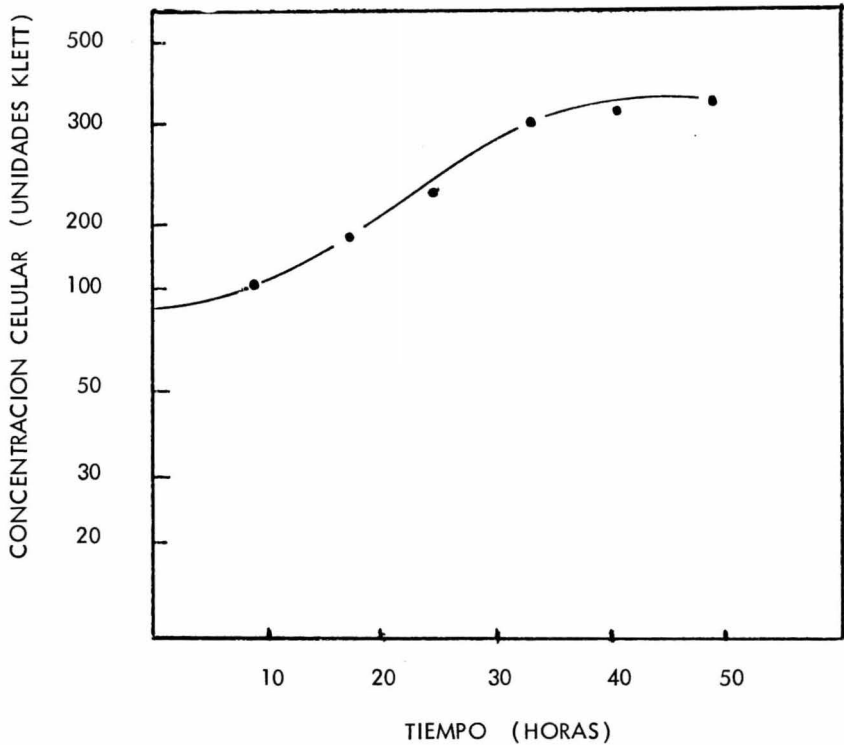
Fig. 41.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 1.0 vvm



Condiciones de Operación:

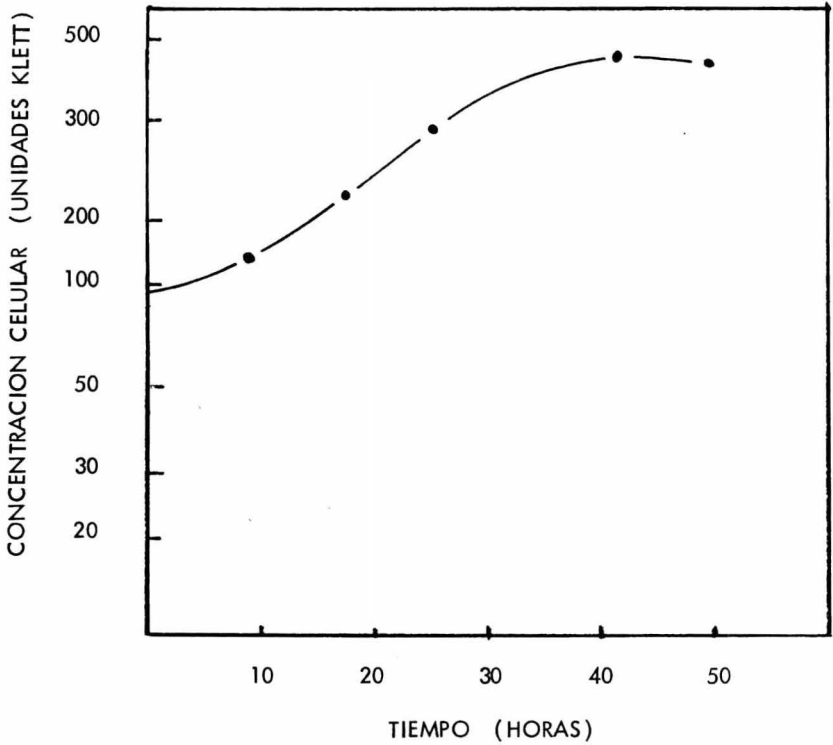
Volumen de Medio	-----	6 litros
Agua de Cocimiento de Maíz	----	24 g/l
Agitación	-----	750 rpm
Temperatura	-----	30°C
pH	-----	4.6

Fig. 42.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 1,0 vvm



Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 6 litros
 Agua de Cocimiento de Maíz ----- 28 g/l
 Agitación ----- 750 rpm
 Temperatura ----- 30°C
 pH ----- 4.6

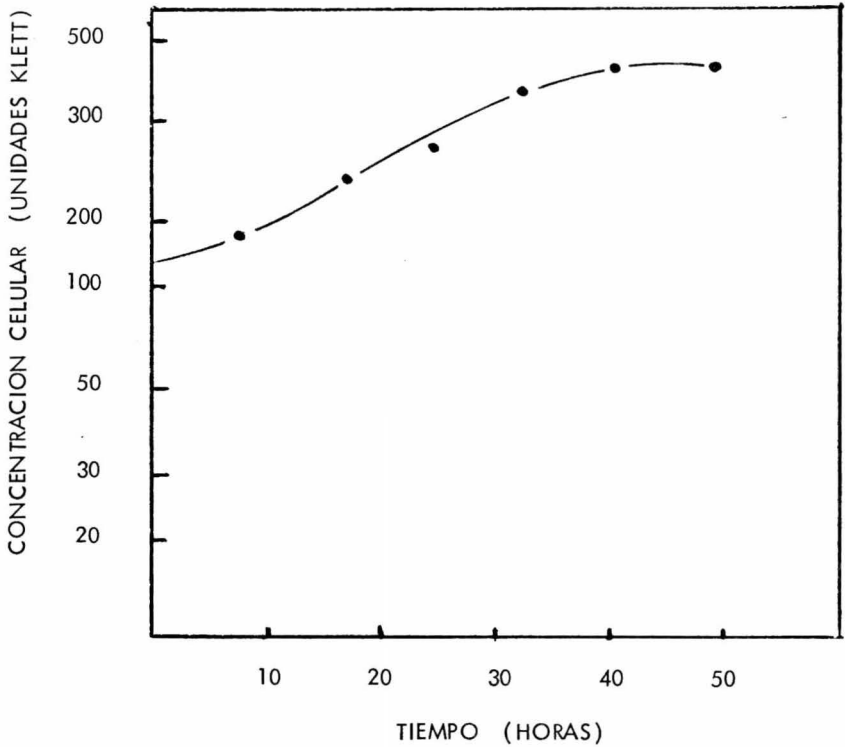
Fig. 43.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 1.0 vvm



Condiciones de Operación:

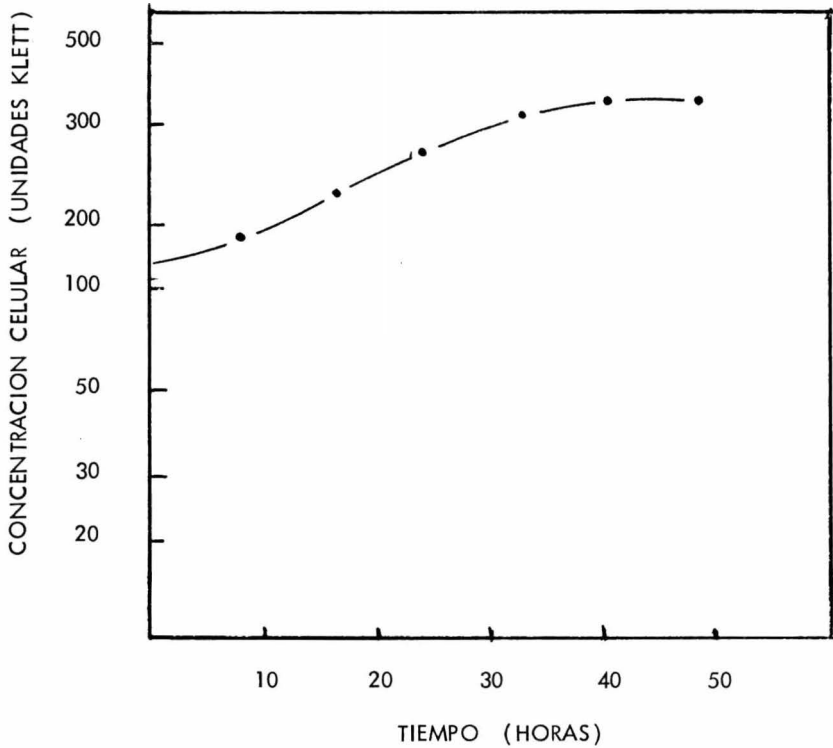
Volumen de Medio	-----	6 litros
Agua de Cocimiento de Maíz	----	32 g/l
Agitación	-----	750 rpm
Temperatura	-----	30°C
pH	-----	4.6

Fig. 44.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 1.0 vvm



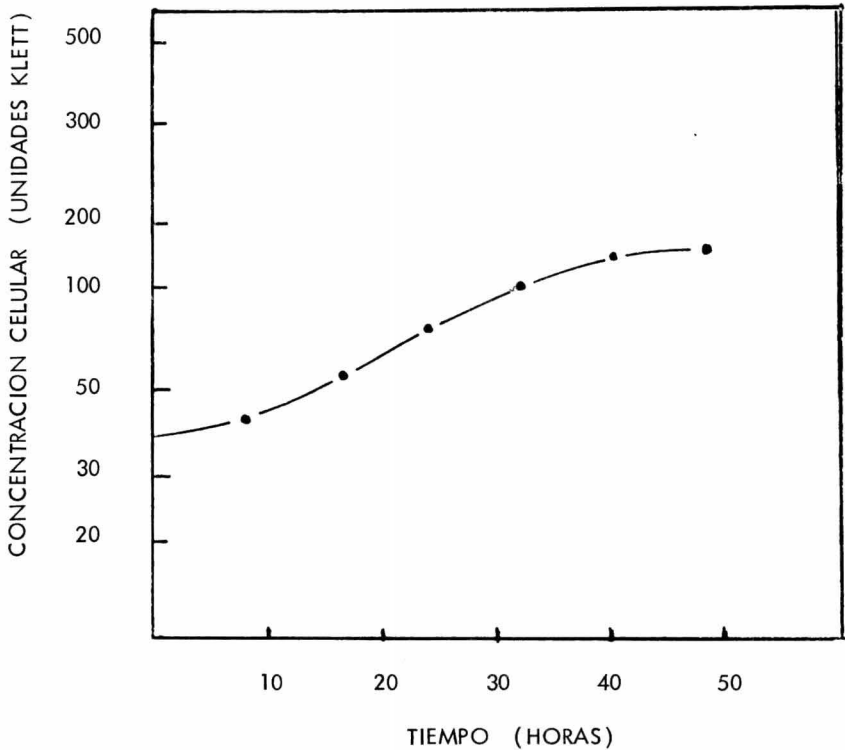
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 6 litros
 Agua de Cocimiento de Maíz ----- 36 g/l
 Agitación ----- 750 rpm
 Temperatura ----- 30°C
 pH ----- 4.6

Fig. 45.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 1.0 vvm



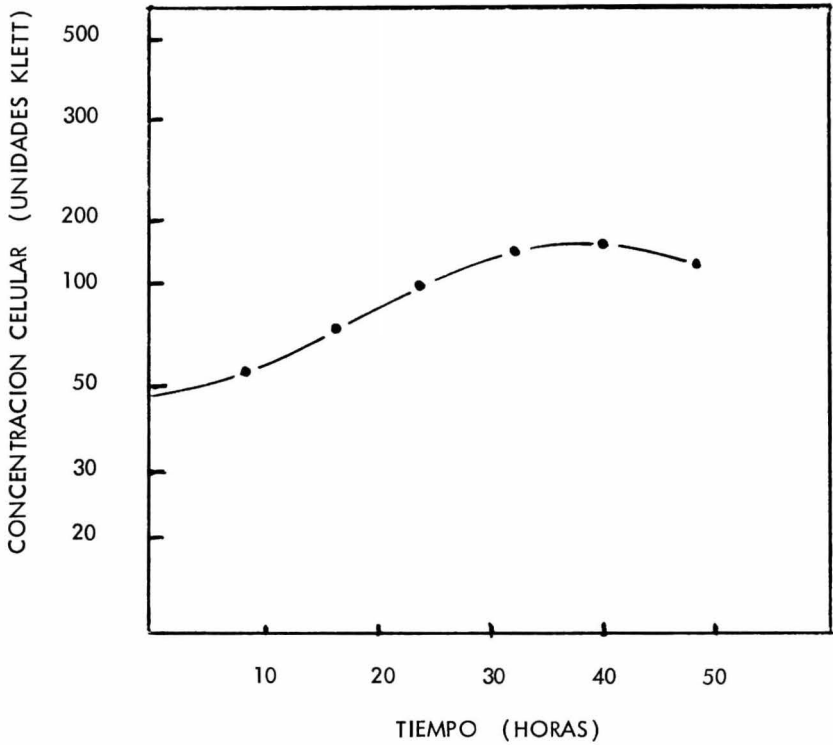
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 6 litros
 Agua de Cocimiento de Maíz ----- 40 g/l
 Agitación ----- 750 rpm
 Temperatura ----- 30°C
 pH ----- 4.6

Fig. 46.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 1.5 vvm



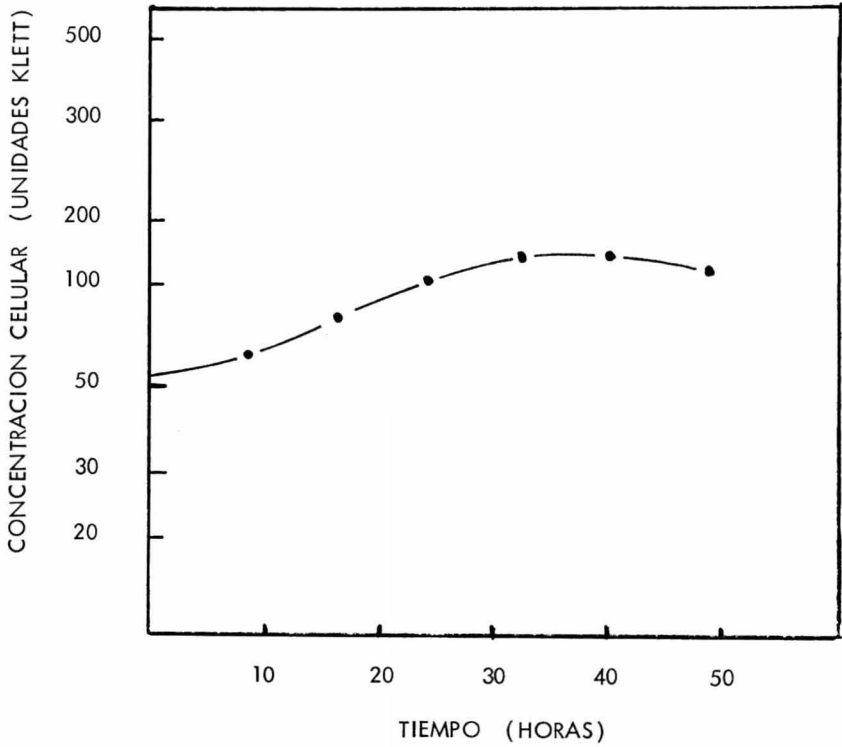
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 6 litros
 Agua de Cocimiento de Maíz ---- 4 g/l
 Agitación ----- 750 rpm
 Temperatura ----- 30°C
 pH ----- 4.6

Fig. 47.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 1.5 vvm



Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 6 litros
 Agua de Cocimiento de Maíz ---- 8 g/l
 Agitación ----- 750 rpm
 Temperatura ----- 30°C
 pH ----- 4.6

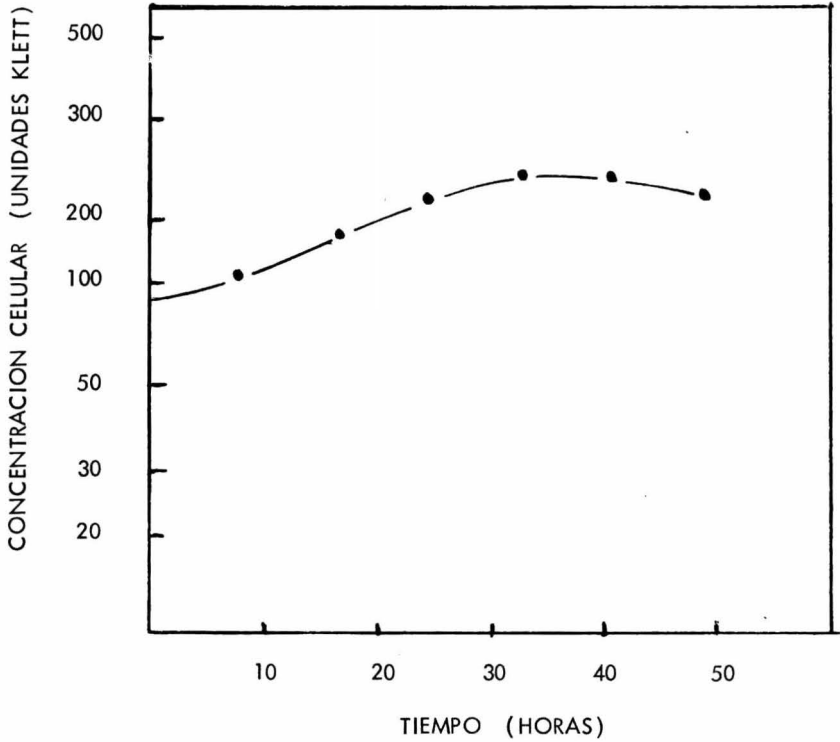
Fig. 48.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 1.5 vvm



Condiciones de Operación:

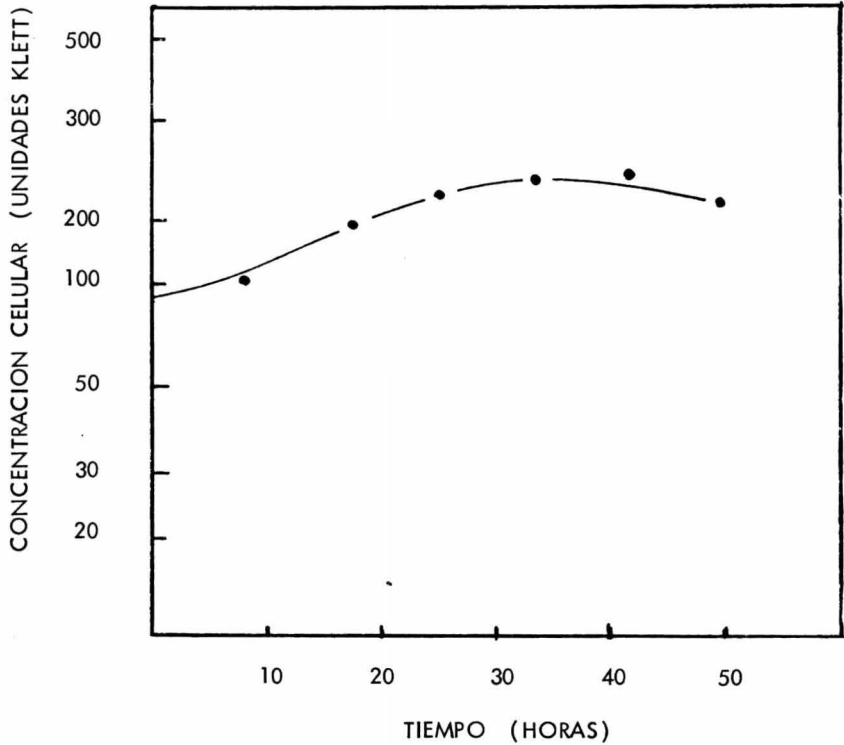
Volumen de Medio -----	6 litros
Agua de Cocimiento de Maíz ----	12 g/l
Agitación -----	750 rpm
Temperatura -----	30°C
pH -----	4.6

Fig. 49.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 1.5 vvm



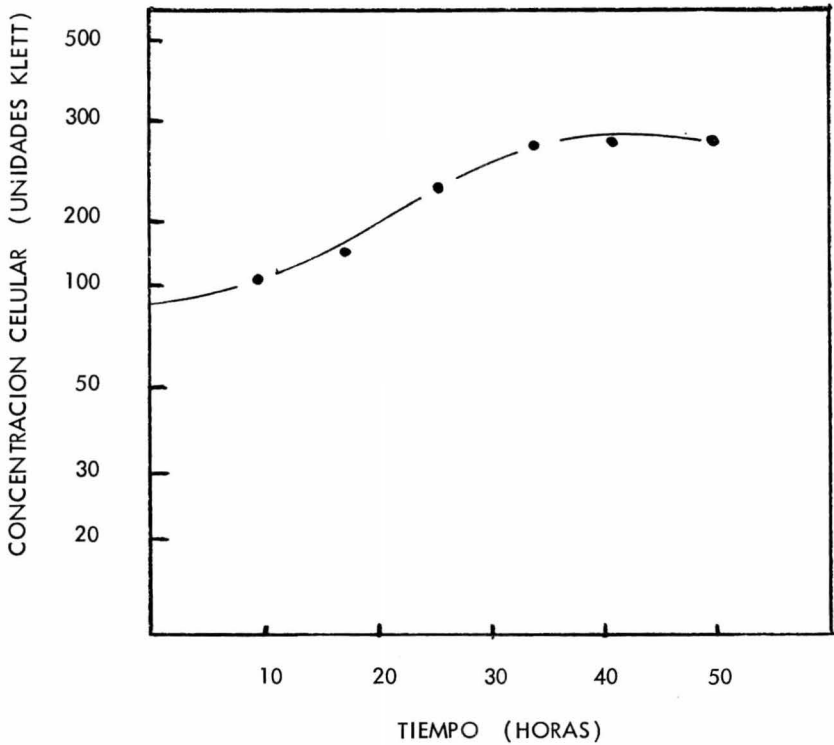
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 6 litros
 Agua de Cocimiento de Maíz ----- 16 g/l
 Agitación ----- 750 rpm
 Temperatura ----- 30°C
 pH ----- 4.6

Fig. 50.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 1.5 vvm



Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 6 litros
 Agua de Cocimiento de Maíz ---- 20 g/l
 Agitación ----- 750 rpm
 Temperatura ----- 30°C
 pH ----- 4.6

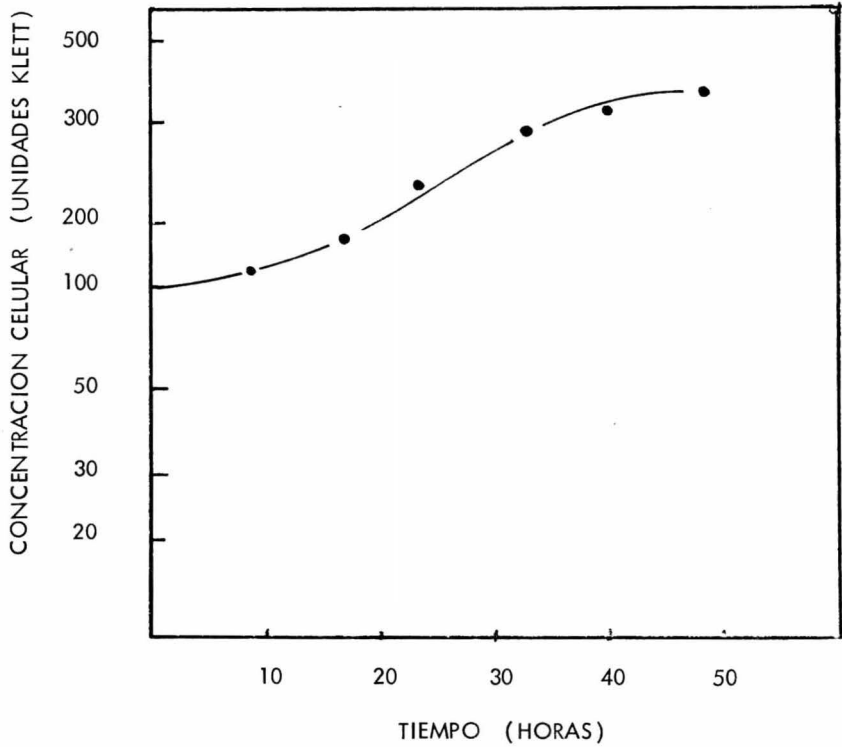
Fig. 51.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 1.5 vvm



Condiciones de Operación:

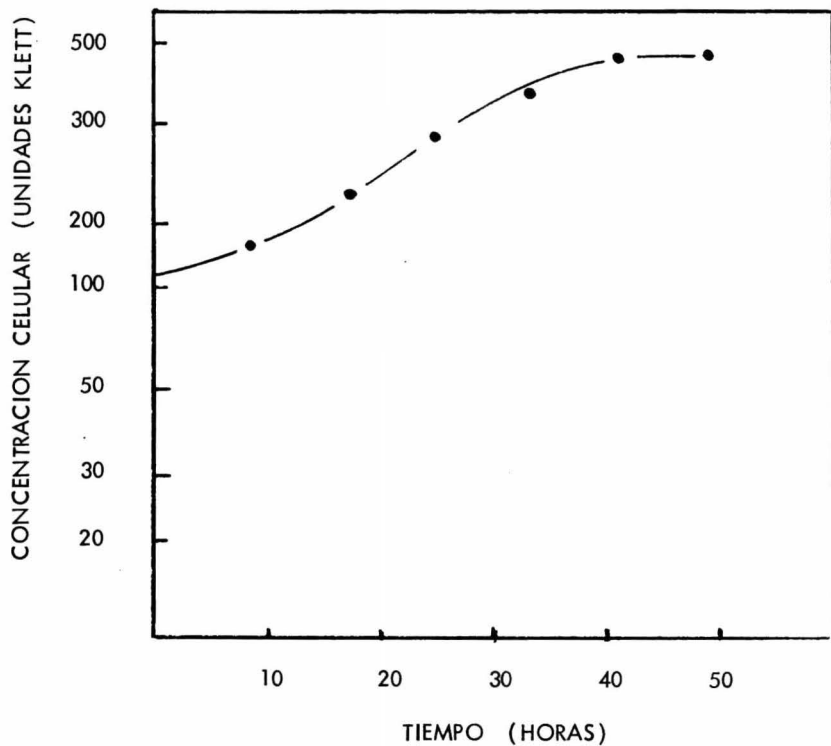
Volumen de Medio	-----	6 litros
Agua de Cocimiento de Maíz	----	24 g/l
Agitación	-----	750 rpm
Temperatura	-----	30°C
pH	-----	4.6

Fig. 52.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 1.5 vvm



Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 6 litros
 Agua de Cocimiento de Maíz ----- 28 g/l
 Agitación ----- 750 rpm
 Temperatura ----- 30°C
 pH ----- 4.6

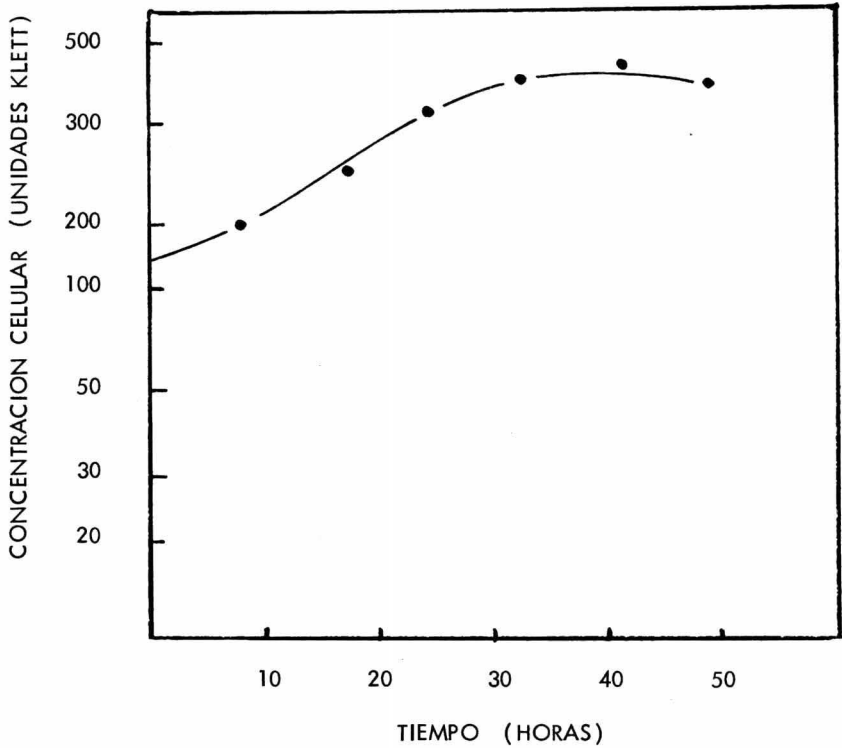
Fig. 53.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 1.5 vvm



Condiciones de Operación:

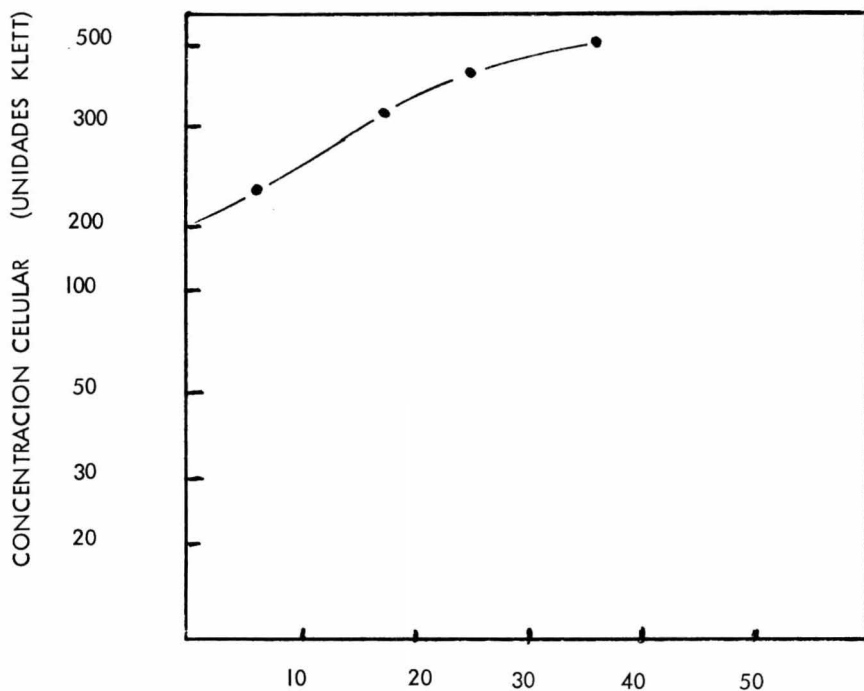
Volumen de Medio	-----	6 litros
Agua de Cocimiento de Maíz	----	32 g/l
Agitación	-----	750 rpm
Temperatura	-----	30°C
pH	-----	4.6

Fig. 54.- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 1.5 vvm



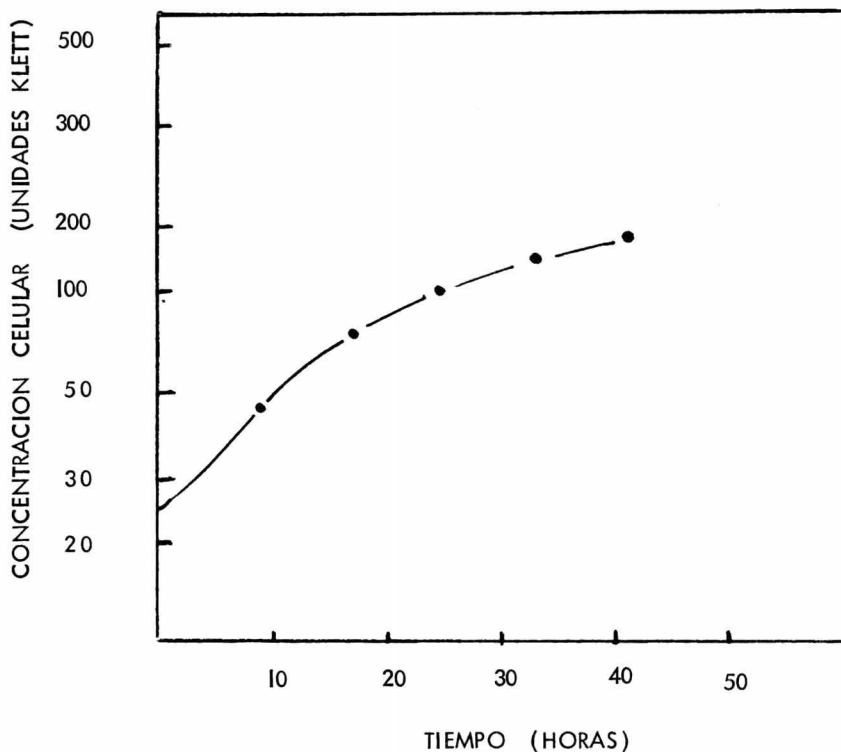
Condiciones de Operación: Volumen de Medio ----- 6 litros
 Agua de Cocimiento de Maíz ----- 36 g/l
 Agitación ----- 750 rpm
 Temperatura ----- 30°C
 pH ----- 4.6

Fig.55 .- Influencia del agua de cocimiento de maíz en la propagación de Candida BE-L-1 empleando 1.5 vvm



Condiciones de Operación : Volumen de Medio ----- 6 litros
 Agua de Cocimiento de Maíz ----- 40 g/l
 Agitación -----750 rpm
 Temperatura ----- 30° C
 pH ----- 4.6

Fig. 56.- Influencia de 100 mg/l de Tween 85, 24 g/l de agua de cocimiento de maíz empleando 0.5 vvm sobre la propagación de la levadura Candida BE-L-1.

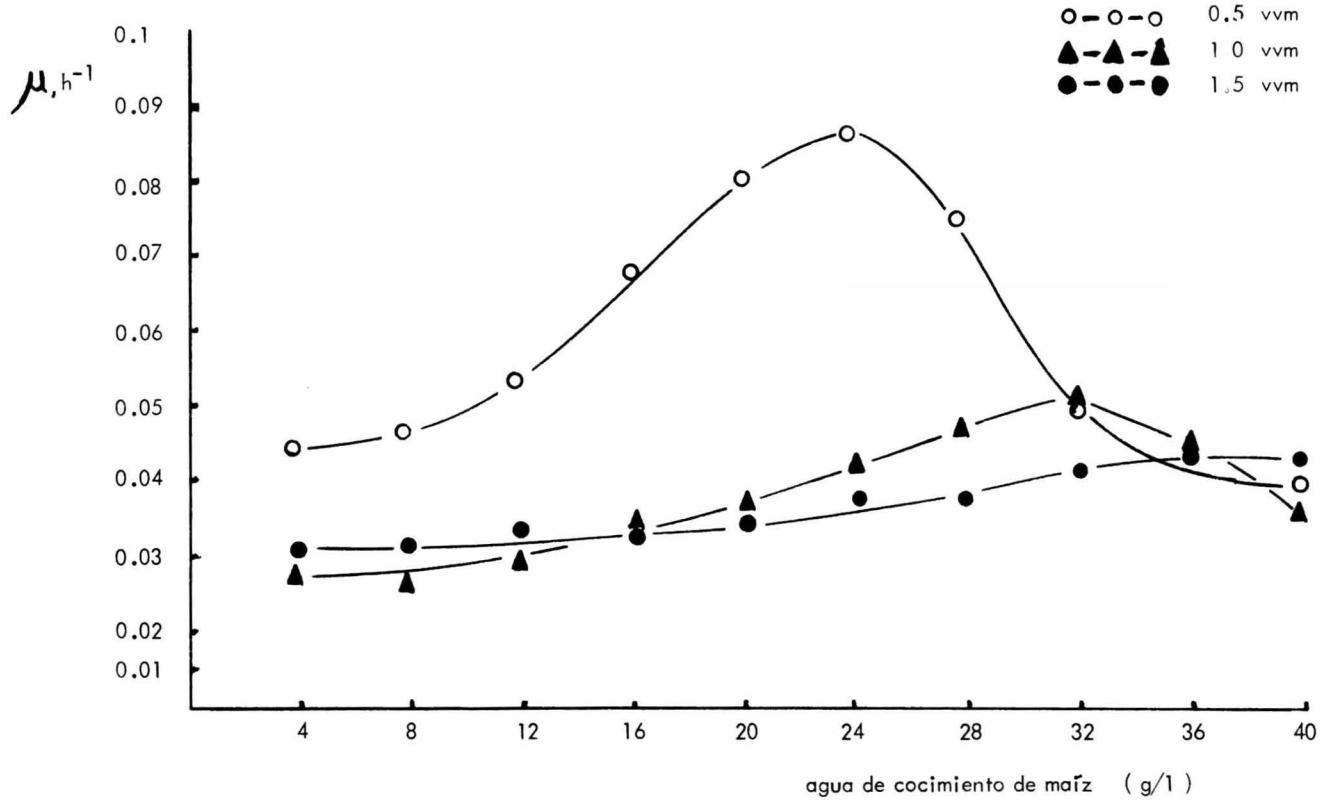


Condiciones de Operación:

Volumen de Medio	-----	6
Agua de Cocimiento de Maíz	-----	24 mg/l
Concentración de Tween 85	-----	100 mg/l
Agitación	-----	750 rpm
Aeración	-----	0.5 vvm
Temperatura	-----	30°C
pH	-----	4.6

FIGURA NUM. 57

EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AGUA DE COCIMIENTO DE MAIZ
 EMPLEANDO TRES DIFERENTES VOLUMENES DE AERACION EN LA PROPAGACION
 DE Candida BE-L-1



BIBLIOGRAFIA

- 1 Aiba S., V. Moritz, J. Someya and K.L. Haug. "Cultivation of -- Yeast Cells by Using n-Alkanes as the Sole Carbon Source. I. Batch -- Culture". J. Ferment. Technol, 47; 211 - 219 (1969).
- 2 Autret M. "Protein mal-Nutrition and the FAO Viewpoint, NAS-NRC, 843 - 845; (1961).
- 3 Aylward F. and B. J. Hudson. "Conversion of Agricultural Produce -- For Human Food". The Biological Efficiency of Protein Production. -- Edited by J. G. W. Jones University Press 285 - 301. (1973).
- 4 Barret L. S. and O. Eole. "Determination of Dry substance in Concentrated cor Steep Water". Cereal Chem. 26; 174 - 181. (1949).
- 5 Beerstecher E. Petroleum Microbiology" Elsevier Press. Inc. N. York, (1954).
- 6 Bennett I. C. and J. C. Honder. "How B.P. makes Protein from Hydrocarbons". Hydrocarbon Processing. 42: 104 - 108. (1969).
- 7 Blaxter K. L. "The Purpose of Protein Production". The Biological -- Efficiency of Protein Production. Edited by J. G. W. Jones. University Press. 3 - 11 (1973).
- 8 Borstrom G. A. "The Hungry Planet". The Mc Millan Co. N. York. (1965).

- 9 Brown L. R. "The World Food Population Problems Conf. on Alternatives for Balancing Future World production and Needs". Ames Iowa. Nov. 8. (1966).
- 10 Cardinal V. E. and L. Rhedrick. "Microbiological Assay of Corn Steep Liquor for Aminoacids Content." (1948).
- 11 Carter J. L. "World Food Supply, Problems and Prospects. Science, - 1955 : 56 - 58. (1967).
- 12 Casas-Campillo & F. Serrano. "Asimilación de Hidrocarburos por Bacterias Termófilas". Rev. VII Cong. Nac. Microbiol. Ag., Guadalajara, Jal. (1968).
- 13 Casas-Campillo, H. Medrano & S. Larrea. "Obtención de Proteína de Origen Unicelular Utilizando Hidrocarburos del Petróleo". I. Cultivo - Intermittente. Rev. Inst. Mex. Petróleo. (México). 3 : 58 - 71. - - (1971).
- 14 Casas-Campillo, J. Larrea & C. Morales. "Single'cell Protein from Filamentous Fungi Propagated on Hydrocarbon". Abst. III Internatl. - - Conf. on Global Impacts Appl. Microbiol. Bombay, India Dec. 6. - - (1969).
- 15 Casida, L. E. "Preparation of Lysine". U. S. Patente # 2,771 396. -- Nov. 20 (1956).
- 16 Coty V. F. "A Critical Review of the Utilization of Methane". Bio- tech. & Bioeng. Symposium. 1 ; 105 - 117. (1969).
- 17 Crosson P. R. "Institucional Obstacles to Expansion of World Food Production". Science 188; No. 4188 ; 519 - 524 (1975).
- 18 Champagnat A. "La Biosynthese des Proteines ä partir du Pétrole". Rev. Ita. Sostanze. XLX; 657 - 662. (1968).

- 19 Chepigo S. V., M. Rozhkova, L. Koslova and E. Zhdannikova. "Optimization of Yeast Cultivation on Hydrocarbon-Containing Media". *Bio-tech. & Bioeng. Symposium. No. 4*; 733 - 739 (1969).
- 20 Davis B. J. and D. M. Updegraff. "Microbiology in the Petroleum Industry". *Bact. Rev.* 18; 215 - 238. (1954).
- 21 Decerle C., S. Franckowiak and C. Gatellier. "How I. F. P. Makes - Food Yeast". *Hydrocarbon Processing March.* 109 - 112. (1960).
- 22 Erickson L. E., E. Humphrey and A. Prokop. "Growth Models of Cultures with two Liquid Phases. I. Substrate Dissolved in Dispersed Phase". *Biotech. & Bioeng.*, 11; 449 - 466. (1969).
- 23 Fencel Z. "Production of Microbial Protein From Carbon Sources". *Bio-tech. & Bioeng. Symposium No. 1*, 63 - 70 (1969).
- 24 Finnerty W. R. and R. Makula. "Microbial Assimilation of Hydrocarbons". *L. J. Bacterol.* 95; No. 6; 2102 - 2107. (1954).
- 25 Foster, J. W. "Hydrocarbons as Substrate for Microorganisms". *Ant. - V. Leeuwenhoeck J. Microbiol. Serol.* 28; 241 - 247. (1962).
- 26 Fuhs, G. W. "Der Mikrobielle Abbau Von Kohlenwasserstoffen". *Arch. Mikrobiol.* 39; 374 - 422. (1961).
- 27 Furukawa T, T. Nakahara and K. Yamada. "Influence of Several Factors on Fumaric Acid Production From n-Paraffines by *Candida Hydrocarbofumarica*". Part. 19. *Ag. Biol. Chem.* 34; No. 9; 1402 - 1406. - (1970).
- 28 Gapen, C. C. and R. W. Bond. "Antibiotics from Corn-Steep Liquor." *U.S. Patent # 2,678,903.* May. 1954.
- 29 Gavan A. J. and J. A. Dixon. "India : A Perspective on the Food Situation". *Science* 4188; 188; 541 - 549. (1975).

- 30 Hamer G. "Methane Fermentation for Food : Report on the Round Table-Meeting". Biotech. Bioeng. Symposium No. 1 p.p. 119 - 121. -- (1969).
- 31 Hamlet L. B. "Production of d-Tartaric acid by Fermentation". U. S. - Patent # 2,314 831. March 23. (1943).
- 32 Harrison D. E. F. "Production of Protein from Methane by the Use of -- Defined Mixed Bacterial Cultures". 6o. Congr. Latinoamericano y Ier. Venezolano de Microbiología. Dic. 1974.
- 33 Hattori K. and T. Suzuki. "Microbial Production of d-Arabitol by n-Alkane-grown Candida tropicalis". Agr. Biol. Chem. 38; No. 10; 1875 - 1881. (1974).
- 34 Hepple P. "Microbiology". Conf. on Petroleum Microbiology The Institute of Petroleum (London). **Elsevier** Pub. Ltd. Amst. (1968).
- 35 Hoshiai K. "Protein from Petroleum". Chem. Economy & Engineering Review. 4; No. 3 (47); 7 - 15. (1972).
- 36 Humphrey A. E. and F. E. Deindeerfer. "Fermentation". Ind. and Eng. Chem. 53; No. 11; 934 - 946. (1961).
- 37 Humphrey A. E. "Starvation : Chemical Engineering can Help Fight it". Chem. Eng. , 13; 684 - 686 (1966).
- 38 Karow E. O. and S. A. Waksman. "Production of Citric Acid". Ind. - Eng. Chem. 39; No. 821. U. S. Patente # 2,394,031. (1947).
- 39 Klug M. J. and A. J. Markovetz. "Utilization of Aliphatic Hydrocarbons by Micro-Organisms". Advances in Microbial Physiology. Academic Press. N. York; 5; 1-43 (1971).

- 40 Kuno M., M. Kikuchi and Y. Nakao. "Production of Coenzyme-A by n-Paraffins-assimilating Microorganisms". *Ag. Biol. Chem.* 37; No. 2-313 - 319. (1973).
- 41 Lukins H. B. "On the Utilization of Hydrocarbons, Methyl Ketones and Hydrogen by Mycobacteria". Thesis. U.C.L.A. (1972).
- 42 Manfredini R. and D. I. C. Wang. "Simple Method for Determining - Cell and Hydrocarbon Concentration during Fermentation". *Biotech. & Bioeng.* 14; 267 - 271. (1972).
- 43 Masuda Y. "Prospects of Petroproteins". *Chem. Econom & Eng. Review.* 4; No. 10 (54); 22 - 28 y 36 (1972).
- 44 Miller L. T. and M. J. Johnson. "Utilization of Gas Oil by a Yeast - Culture". *Biotech. & Bioeng.* 8; 567 - 588. (1966).
- 45 Miller L. T. and M. J. Johnson. "Utilization of Normal Alkanes by - Yeasts". *Biotech. & Bioeng.* 8; 549 - 565. (1966).
- 46 Miyoshi M. *Wiss. Bet. J.* 28; 296. Citado por Beerstecher (1954) y - por Walter (72). (1895).
- 47 Monod J. "The Growth of Bacterial Cultures". *Ann. Review of Microbiol. Ann. Rev. Inc.*; 3; 371-394. (1946).
- 48 Moyer A. J. and R. D. Coghill. "Production of Peniciline in Surface - Cultures". *J. Bact.*, 51; No. 1; 57 - 78. (1946).
- 49 Munk V. D. and O. Volfova. "Cultivation of Yeast on Gas Oil". *Biotech. & Bioeng.* 15; 382 - 391. (1969).
- 50 Murray S. and T. Walter 1956. "Media Condutrice to Formation of Fat from Sucrose by Penicillium soppi". *J. Sci. Food Agr.* No. 4; 237-240 - (1956).

- 51 Myers R. R. and M. L. Speck National Dairy Laboratories Inc. U. S. Patent # 2,448 680 Sept. 7, (1948)
- 52 Ochoa A. D. "Mechanisms of Hydrocarbon Uptake by Yeast During Fermentation". M.S. Dep. Nutrition of Food Sci. M. I. T., Cambridge, - Mass. Thesis. (1971).
- 53 Poleman T. T. "World Food : A Perspective". Science 188; No. 4188; 510 - 518 (1975).
- 54 Prescott C. S. and C. G. Dunn. Industrial Microbiology. - - Mc Graw-Hill. New York (1959).
- 55 Pridham T. G. "Biological Production of Riboflavina". U. S. Patent # - 2,578 738. Dec. 18. (1951).
- 56 Production of Wood Sugar in Germany & Its Conversion to Yeast Alcohol. Fiat Report No. 499. Joint Intelligence Objectives Agency. Washington, D. C. (1945).
- 57 Prokop A. and O. Volfova. "SCP. From Hydrocarbons". Prague Process Biochemistry. May. ; 31-32. (1972).
- 58 Ratledge C. "Production of Katty Acids and Lipid by a Candida sp. Growing on a Fraction on n-Alkanes predominating in Tridecane". Biotech. & Bioeng. 10; 511 - 533. (1968).
- 59 Rose A. H. and J. S. Harrison. "The Yeast". Academic Press. London 11 ; 211 - 270. (1971).
- 60 Sanderson F. H. "The Great Fumble". Science 188 ; No. 4188; 503 - 509. (1975).
- 61 Shacklady C. A. "Production and Utilization of BP Protein Concentrate. II. The Use of Hydrocarbons-grown Yeast in Commercial type Rations for Pigs and Poultry". Biotech. & Bioeng. Symposium. No. 1; 77 - 79. - (1969).

- 62 Sherrard & F. Kressman. "Review of Processes in the United States - - Prior to World War II". *Ind. Eng. Chem.* 37; No. 11. 5 - 54 (1945).
- 63 Shöngen N. L. *Proc. Royal Acad. Amsterdam*, 15; 1145 (1913).
- 64 Stubbs J. J., L. B. Lockwood, E. T. Roe and B. Tabenkin. "Bacterial Production of Ketogluconic Acids from Glucose". *Ind. Eng. Chem.* 32 : 1626 - 1631 (1940).
- 65 Sumino Y., S. Akiyama and H. Fukuda. "Performance of the Shaking - Flaks". *J. Ferment. Technol* 50 ; No. 3 ; 203 - 208. (1972).
- 66 Sykita B., A. Prokop and M. Novak. *1st International Symposium on Advances in Microbial Engineering. Part II*. *Biotech. & Bioeng. Symposium*. John Wiley & Sons. (1972).
- 67 Tausson W. A. *Microbiology. (U.R.R.S.)*, 8 ; 828. (1939).
- 68 Takata T. "From n-Paraffins to Proteins". *Hydrocarbon Processing*. - - March; 99 - 103. (1969).
- 69 Thijse G. J. L. & A. C. Van Der Linden (1958). "n-Alkane oxidation by Pseudomonas, Studies on the intermediate Metabolism". *Ant. - V. Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*; 24; 298 - 308. (1958).
- 70 Tokoro Y., K. Oshima and M. Okii. "Microbial Production of L-Phenylalanine from n-Alkanes". *Agr. Biol. Chem.*; 34 ; No. 10; 1516 - 1521. (1970).
- 71 Urmila S. M. and D. V. Tamhane. "Fermentative Production of Breminecine on Hydrocarbon Media by *Brevibacterium ammoniagenes*". *J. - Ferment. Technol.* ; 52 ; No. 8 ; 598 - 603. (1974).
- 72 Vilenchich R. and W. Akhtar. "Microbiological Synthesis of Proteins". *Process Biochemistry*. Feb. (1970).

- 73 Walters H. "Difficults Issues Underling Food Problems". Science 4188 ; 188 ; 524 - 530 . 1975) .
- 74 Walter T. "Protein Production by Unicelular Organisms from Hydrocar--
bon Substrates". The Biological Efficiency of Protein Production. Ed. by
J. G. W. Jones. University Press.; 323 - 337. (1973).
- 75 Wang D. I. C. and Ochoa. "Measurements on the Interfacial Areas of Hydrocarbon in Yeast Fermentation and Relationships to Growth Rates". -
Biotech. & Bioeng.; 14 ; 345 - 360. (1972).
- 76 Wang D. I. C. "Protein from Petroleum". Chem. Eng. Ag. 25; 99 -
108. (1968).
- 77 Whitworth D. A., M. Moo-Young and T. Viswanatha. "Hydrocarbon -
Fermentations : Oxidation Mechanisms and Nonionic Surfactant Effects -
in a Culture of Candida lipolytica". (1973).
- 78 Woodham A. A. (1973). "Future Demand for Protein Foods". The Bio--
logical Efficiency of Protein Production. Ed. by J. G. G. Jones. Uni
versity Press., ; 27 - 36 ; (1973).
- 79 Yamada K. and M. Yogo. "Studies on the Utilization of Hydrocarbon -
by Microorganisms. Part. 15. Yeast an Bacterial Cell Production from Paraffins Wax". Agr. Biol. Chem. 34 ; 296 - 301. (1970).
- 80 Zajic E. J. "Biochemical Reactions in Hydrocarbon Metabolism". De--
velopments in Industrial Microbiology. 6; 16 - 27 (1964).
- 81 Zobell C. E. "Advances in Enzymology". 10; 443. (1950).

FE DE ERRATAS

CITA BIBLIOGRAFICA NO.	DICE	DEBE DECIR
1	HAUNG	HUANG
4	COR	CORN
25	SUBSTANTE	SUBSTRATE
34	PETRILEUM	PETROLEUM
52	CRAMBIGDE	CAMBRIGDE
54	THE YEAST	THE YEASTS