

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIO COMPARATIVO DE SACCHAROMYCES
CARBAJALI CON CANDIDA UTILIS PARA LA
OBTENCION DE BIOMASA**

TESIS PROFESIONAL

que para optar por el título de:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
ORIENTACION EN TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

p r e s e n t a :

ROBERTO JAVIER CRUZ PARRA

México, D. F.

1 9 7 7



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Tesis 1977
M-~~100~~ 119
ECHA _____
REC _____



QUIMICA

Jurado Asignado Originalmente Según el Tema

PRESIDENTE:	Quim.	NATALIA SALCEDO O.
VOCAL:	Quim.	NINFA GUERRERO DE C.
SECRETARIO:	Q.B.P.	JORGE SOTO SORIA.
1o. SUPLENTE:	Q.B.P.	ALFREDO ECHEGARAY A.
2o. SUPLENTE:	M. en C.	ROSA MARIA RAMIREZ.

Sitio donde se desarrolló el tema:

FACULTAD DE QUIMICA, U.N.A.M.

Nombre completo y firma del sustentante:

ROBERTO JAVIER CRUZ PARRA

Nombre completo y firma del asesor del tema:

Q.B.P. JORGE SOTO SORIA

A MI ESPOSA E HIJO
SILVIA Y ROBERTO

A MIS PADRES
ROBERTO Y ESTHER

A MIS HERMANAS
A MI ABUELITA

AL PROFESOR JORGE SOTO SORIA
POR SU INVALUABLE ORIENTACION

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS

AL DEPARTAMENTO DE MICRO-
BIOLOGIA DE LA FACULTAD
DE QUIMICA

I N D I C E

OBJETIVOS	2
INTRODUCCION	4
GENERALIDADES	9
MEDIOS, METODOS Y MATERIALES	35
RESULTADOS	62
DISCUSION	81
CONCLUSIONES	86
BIBLIOGRAFIA	88



OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo fueron tres:

1.- El comparar la levadura aislada con *Candida utilis*, ya que ésta última es una de las levaduras mejor estudiadas y es utilizada actualmente en la obtención de proteínas. Los investigadores alemanes lograron aislar y habitar *Candida utilis*, para hacerla crecer en grandes cantidades, utilizando como medio de cultivo los desperdicios de la remolacha y posteriormente se logró adaptarla a un medio a base de mieles incristalizables. Por lo tanto es una levadura que -- esta ampliamente estudiada y experimentada en este campo, por lo cual es posible establecer comparaciones y observar si la levadura que se estudia puede responder de una manera análoga a ella.

2.- El utilizar alguna de las especies de levaduras aisladas del aguamiel (producto que abunda en algunas regiones del país), las cuales en caso de poder reproducirse en la melaza de igual manera que lo hacen *Candida utilis* y *Saccharomyces cereviceae* - puedan ser aprovechadas para la producción de levaduras a un nivel industrial, con fines alimenticios, ya que son una buena fuente de proteínas y vitaminas.

3.- El utilizar una materia prima rica en azúcares y que además sea de bajo costo como lo son las mieles incristalizables -- que en gran parte desperdician los ingenios azucareros.

Resumiendo estos tres puntos, el objetivo de esta investigación es el hacer un estudio comparativo de una levadura aislada - del pulque o del aguamiel, como lo es *Saccharomyces carbajali* con - *Candida utilis* que es una levadura ampliamente industrializada, --- desarrolladas estas en un medio hecho a base de mieles incristalizables, para saber si es posible que la primera se pueda aprovechar - como una fuente de proteínas y así posteriormente poder tener un -- alimento que ya sea solo o combinado pueda ser utilizado como fuen- te de proteínas, aminoácidos y vitaminas en la alimentación del ga- nado y de ser posible sea utilizado en la alimentación humana.

-INTRODUCCION ○

Importancia

Se podría decir que el problema nutricional de México tiene su origen en las características de la dieta que consume la po-
blación. Dicha dieta es el resultado de muy diversos factores que
han operado a lo largo de la Historia, entre los que destaca, de ma
nera muy especial, la disponibilidad de cierto tipo de alimentos ca
racterísticos de nuestra geografía. La evolución cultural del mexi-
cano ha desembocado en la consolidación de patrones dietéticos que
son bastante uniformes a lo largo del país, ya que las variaciones
observadas son, más que nada, técnicas de preparación. Esto deter-
mina que las diferencias en los tipos de dietas que se consumen en
México - diferencias especialmente relevantes para el estado de nu-
trición de los individuos - sean el resultado de factores de tipo -
socioeconomico.

México debe luchar en forma continua y creciente por lo -
grar un considerable aumento en la producción de los alimentos nece
sarios para que sus habitantes alcancen el nivel de nutrición indis-
pensable para el pleno goce de la salud.

Hablando con franqueza debemos confesar que en México la demanda comercial de alimentos es extraordinariamente baja. Estamos lejos de alcanzar una situación en la que nuestra demanda comercial pudiera equipararse a nuestra demanda fisiológica.

Resulta ser bien difícil el poder llegar a establecer sobre certeras bases estadísticas, la cifra que nos indique la demanda comercial actual de alimentos y la demanda fisiológica. No basta conocer la cifra que representa la producción anual de alimentos en el territorio nacional, puesto que no todos ellos van destinados únicamente al pueblo, dado que una parte su utiliza para el consumo animal. El maíz que es el grano de mayor empleo, se distribuye entre los animales, las industrias y el hombre, y lo mismo sucede con el trigo.

En la actualidad todas las estadísticas son aterradoras, la FAO en su última encuesta mundial indica que de cada 100 habitantes del planeta, 72 están hambrientos o mal alimentados. Pero esto no es el aspecto grave del problema. ¿Que nos revela la encuesta sobre el plano calidad?. Que a duras penas un 17.2% de la población mundial sobrepasa el nivel normal de los 30 g. de proteínas de buena calidad (6).

En México al observar el consumo de proteínas tanto animales como vegetales, que se hacen en diversas regiones del país, en áreas rurales y urbanas; tanto a nivel de familia, como a nivel infantil, la situación es más favorable en el área urbana, pese a tratarse de un nivel socioeconómico bajo. De esta última, es en -

la zona Central, Sur y Sureste donde el problema reviste graves proporciones. Tenemos como ejemplo al niño preescolar, es decir de uno a cuatro años, este niño, en la zona Sureste del país sólo alcanza a consumir 20 g. diarios de proteína total en promedio, de las cuales solo la cuarta parte es de origen animal, proteína que por su cantidad y calidad no satisface sus necesidades mínimas (9).

Ha sido notable el incremento observado en la producción de alimentos en los últimos 25 años, especialmente en lo que se refiere a leguminosas y cereales; este fenómeno se ha acentuado a partir de 1955 y seguramente es consecuencia del desarrollo general del país, pero también de programas y medidas específicas y ha tenido como rasgo sobresaliente el haber superado el propio crecimiento de la población. Sin embargo, la disponibilidad real, que es el resultado del balance entre la producción por un lado y el crecimiento demográfico, mermas, exportaciones e importaciones por el otro, revela un panorama menos halagüeño. Estas disponibilidades son de 2625 calorías y 76 g. de proteínas por persona por día, que corresponden muy bien con las cifras de 2600 calorías y 75 g. de proteína por persona, que los organismos internacionales FAO/OMS consideran como mínimas para un país en desarrollo (21).

Sería un error suponer que estas cifras representan una disponibilidad real de alimentos. De hecho, el consumo real es con frecuencia inferior a ellas.

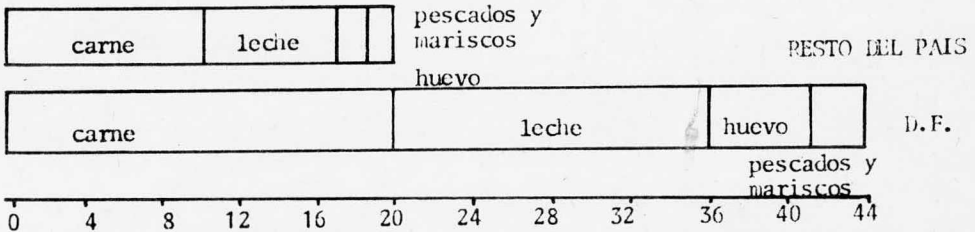
No es fácil evaluar el estado de nutrición de un pueblo,

puesto que no se trata solamente de alimentarlo bien, ni de evitarle enfermedades sino también de colocar al individuo en un estado tal de salud que logre vivir plenamente su vida. ¿Cuántos de los rasgos físicos y mentales que caracterizan al indígena mexicano, que se han creído que son raciales, son en realidad signos de mala alimentación?. Esta es quizá la principal causa de la insuficiencia de capacidad de trabajo de muchos mexicanos y de la actitud mental que se les ha creado.

Es necesario pensar en México, que el alimento del pueblo, más que un objeto de comercio, debe ser ante todo el principal sostén de la vida y la salud de los habitantes.

CONCLUSION.- El país debe de producir un alimento complementario que debe proporcionarsele al pueblo al menor precio posible. Este debe de ser un alimento que venga a cubrir las deficiencias de nuestros alimentos, o sea: a).- Proporcionarle proteínas en abundancia, sobre todo aquellas que más se asemejan a las del tipo animal; b).- Asegurarle la aportación cuando menos de 2 de los aminoácidos que el organismo no puede sintetizar: triptofano y lisina; c).- Así como los factores vitamínicos de que carece. Todo esto en un alimento conveniente y barato, que en su ración alimenticia proporcione también al organismo las calorías necesarias para reponer las calorías gastadas en su diaria actividad.

DISPONIBILIDAD DE PROTEINAS DE ORIGEN ANIMAL EN EL D.F. Y EL RESTO DEL PAIS
(promedio de 1960 a 1970) (6).



Alimento	DISPONIBILIDAD DE ALIMENTOS EN MEXICO (6)					
	kilogramos por año y por habitante					
	1945	1950	1955	1960	1965	1970
Cereales	129.8	133.1	149.4	164.7	162.1	168.9
Leguminosas	12.6	14.4	18.8	22.0	24.4	25.4
Raíces	5.9	6.3	6.8	8.7	7.4	8.1
Verduras	10.7	13.3	13.8	14.0	16.8	21.2
Frutas	50.9	56.5	54.1	63.2	72.5	67.9
Carnes	21.8	17.2	18.4	26.9	26.9	25.9
Leche	81.4	76.2	77.8	98.4	93.7	89.8
Huevo	3.4	3.9	4.5	4.9	5.7	6.1
Calorias	1991	2166	2277	2523	2662	2626
Proteínas totales	55.1	55.3	58.8	62.6	72.0	78.1
Proteínas animales	17.1	16.2	16.1	22.6	23.3	23.1

Cuadro Núm. 1

Generalidades

GENERALIDADES

Historia

HISTORIA:

El pan de levadura, el mosto fermentado y el arte cervecero son acaso tan viejos como el género humano, y puesto que en todos --- ellos tiene parte primordial la levadura, se puede decir que Saccharomyces, fué el primer microbio que aprovechó el hombre. En 1860 Antonio Van Leeuwenhoek inventor del microscopio, vió por primera vez --- Saccharomyces y registró con claridad sus caracteres morfológicos. Los orígenes de la industria de las levaduras tal como se conocen ahora datan de 1859 cuando el gran químico francés Luis Pasteur fué el --- primero que en sus memorables experimentos acerca del "vino enfermo", observó el papel que desempeña la levadura en la fermentación "hor --- mal". Pasteur fué uno de los primeros en estudiar también los efectos del metabolismo microbiano.

Basado en ello Marquardt, ideó un proceso de aeración en la producción de levaduras, logrando un notable aumento en su rendimiento en un tiempo menor que el empleado por los métodos en que no --- se aeraba el medio de cultivo.

Al avanzar los conocimientos de mecánica y electricidad y progresar los inventos de Dehne, quien en 1867 constituye la primera prensa filtro; los de Simons quien diseñó la primera máquina -- cortadora en 1878; al usarse la centrífuga para separar levaduras -- en 1905; al conocerse el cambio del proceso vienés o de baja aeración, por métodos de aeración abundante en 1910 y por los estudios que en las postrimerías del siglo XIX hizo Hansen quien inventó la técnica del cultivo puro (que se ha aplicado a la producción en -- gran escala de ciertas levaduras especiales para la elaboración de pan); a que en el periodo de 1914 - 1915 se concedieron patentes a los inventores alemanes Federico Haydruk y Alfredo Wohle, quienes dieron a conocer la manera en que se podía cultivar la levadura en una mezcla de melaza y sales inorgánicas; y debido a los estudios de nutrición hechos por Maercker, Mayer, Delbruck y Hayduck etc., -- pudo conseguirse que los rendimientos de las levaduras, aumentaran enormemente y permitieran montar grandes instalaciones industriales que con el método de "proceso continuo" rinden diariamente --- grandes cantidades de levaduras.

Al mismo tiempo que los perfeccionamientos técnicos, se -- desarrollaron los estudios sobre la alimentación adecuada de la le vadura, que como es natural, constituye el fundamento de la multiplicación. Las sales alimenticias comerciales más acreditadas son las amóniacas y los fosfatos de potasio y calcio. Sobre todo hay que indicar en especial que el nitrógeno inorgánico se asimila --

bien y se transforma en proteínas, lo que constituye un descubrimiento de extraordinaria importancia en la práctica. También se ha comprobado que en las melazas, producto final de la fabricación del azúcar de caña, además de las sustancias orgánicas nitrogenadas asimilables en caso necesario y las sales nutritivas, existen sustancias estimulantes, con lo que la melaza se ha convertido hoy día en la mejor materia prima. Se trata en este caso de los factores de crecimiento y en especial de las vitaminas del grupo B. Para que la levadura no sufra perjuicios durante el cultivo, se procura amortiguar los ácidos producidos y conservar un grado de acidéz moderado. Este tampoco debe ser demasiado pequeño, para impedir que aparezcan bacterias infectantes perjudiciales. Según M. Hayduck, el contenido alcohólico de la solución nutritiva no debe sobrepasar el 5%, en interés de la reproducción de la levadura.

M. Delbruck sospechaba que en la levadura de cerveza existen una gran cantidad de proteínas desaprovechadas. En la comprobación de esta cuestión se demostró, con los ensayos de alimentación, que se trata de un producto valioso, que puede servir también para la alimentación humana. Pero puesto que la levadura en cuestión contiene las sustancias amargas de lúpulo, deben separarse éstas mediante lavados con álcalis diluidos (carbonato sódico). Para obtener luego un producto de consumo de buena conservación era necesario transformar la levadura húmeda en seca mediante un secador de rodillo calentado con vapor de agua, con lo que se obtiene la siguiente

composición: agua 7-12%; proteína bruta 45-55%; grasa bruta 2-3%, extracto exento de nitrógeno 20-30%, y componentes minerales 7-9%.

El conocido fisiólogo de la alimentación von Noorden, - señaló el valor de esta levadura. Está demostrado que las proteínas existen en forma muy adsorbible, puesto que se digiere el 80-88% de la proteína bruta. Del extracto no nitrogenado se aprovecha el 100%, y de las sustancias orgánicas en general, del 70-94%. Entre los componentes minerales salta a la vista especialmente la gran concentración de ácidos fosfórico, el cual está combinado, en parte formando la lecitina. Igualmente están presentes en cantidad abundante, los ácidos nucleicos, de los cuales el importante componente ácido adenílico actúa como hipotensor. También existe un alto contenido en glutatión. Muy notables son además, las altas dosis de la vitamina B. En vista del gran valor alimenticio de la levadura, es comprensible que durante la primera guerra mundial aumentara considerablemente la demanda de levadura seca. Puesto que la cervecera no podía cubrir la demanda, a propuesta de Q. Henneberg se cultivo en las fábricas de levadura con melaza y sales minerales nutritivas una levadura silvestre *Torula utilis*, a la que se llamó levadura mineral.

METODO DE MELAZAS

La melaza constituye hoy en día la mejor materia prima para la fabricación de levadura. La melaza contiene, aproximadamente, el 50% de azúcar, pero es relativamente pobre en nitrógeno

en vez de esto
la pag

FIN de historia

no asimilable (0.4-0.5%) y en fósforo asimilable (0.025% P_2O_5).

Por esta causa es necesario añadir sulfato amónico o solución amoniacal. También se puede usar el amoníaco comprimido en botellas de acero. El fósforo que falta se aporta con fosfato diamónico o superfosfato. Este se añade a la solución de melaza cuando se clarifica por medio de superfosfato y de ácido sulfúrico, lo que constituye una preparación necesaria antes del cultivo. Gracias a esto se aclara notablemente la solución nutritiva por separación de pigmentos oscuros y en consecuencia, se obtiene una levadura clara.

③ Las melazas contienen azúcares fermentecibles, minerales esenciales (potasio, magnesio, fósforo, zinc, fierro, cobre), vitaminas (biotina, ácido pantoténico, piridoxina, tiamina) y nitrógeno amigénico (principalmente asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico). La melaza de caña es sustancialmente rica en magnesio, calcio, biotina, piridoxina, ácido pantoténico y tiamina - (25).

El conocimiento de que un contenido alcohólico elevado de la solución nutritiva perjudica a la reproducción de la levadura, ha conducido al método de alimentación diferencial. Se empieza el cultivo con una solución nutritiva de 1-2°Balling y se va añadiendo el resto del mosto al mismo ritmo que se consumen las sustancias nutritivas. Las pequeñas cantidades de alcohol que se producen se asimilan por la levadura gracias a la airea-

ción constante y se transforma en substancia celular. Para reducir el enorme consumo de aire que se requiere se ha pasado de la aereación gruesa a la aereación fina. El aire sube en forma de niebla al salir de los finisimos orificios del sistema de tubos metálicos colocados en la proximidad del fondo de la cuba de fermentación.

Si el método diferencial se quiere llevar favorablemente hasta el fin, es necesaria una buena vigilancia de la operación.

② Como es natural, es sulfato amónico añadido produce ácido libre al consumirse el amoníaco, y para evitar su acción perjudicial se debe amortiguar por medio de fosfatos o de substancias orgánicas básicas. Una vez consumidas las sustancias amortiguadoras de la melaza hay que emplear amoníaco o sosa. El pH debe establecerse en 4.0-5.0. La regulación del nitrógeno se debe realizar por valoración con formol, que no comprende solamente los aminoácidos, si no también los polipeptidos inferiores y el amoníaco, después de lo cual se calcula la cantidad de nitrógeno a añadir.

① Después de diluir la melaza y de clarificarla con super fosfato y ácido sulfúrico, se añade a la cuba de fermentación 1/8 de la melaza total y se diluye a 1.5°B_x. Luego se añade 1/8 del nitrógeno en forma de sulfato y 1/8 a 1/10 de sulfato diamónico.

La cantidad de levadura de siembra, cultivada según reglas determinadas, se calcula en el 15-20% de la cantidad total de melaza empleada. Si se ha ajustado con ácido sulfúrico se obtiene un pH 4.7-4.8. Entonces se puede empezar con la aereación fina en cuanto

to la temperatura de la cuba alcanza los 24°C. Durante la primera hora se emplea una pequeña aportación de aire. El sistema de aireación, que puede ser de distinta clase (tubos metálicos con agujeros finos, bujías cerámicas, haces apretados de tubitos de acero), inyecta 80-100 m³ por metro cúbico de mosto y por hora. Esta medida provoca una multiplicación de las enzimas respiratorias, y pues to que por medio de ellas se consigue obtener una cantidad mucho mayor de energía que en la fermentación, debido al desdoblamiento total de la molécula de azúcar en CO₂ y H₂O, dispone la célula de mucha energía para la síntesis de su propia substancia. De este modo se produce una gemación muy activa. La multiplicación de la levadura es tan activa que de hora en hora hay que vigilar por medio de análisis el consumo de azúcar y la formación de ácido. También el pH tiene gran importancia para informar sobre el estado del medio. Si el consumo de nitrógeno es normal, se empieza después de la segunda hora con la adición de la solución de melaza restante, que debe durar unas 10-12 horas. Empezando con una cantidad relativamente pequeña (6%), se eleva de hora en hora la cantidad de solución de melaza hasta el 11% del volumen total. Si hay defecto de nitrógeno valorable al formol (0.15-0.2%) se compensa por adición de sulfato amónico. Al hacer esto hay que procurar que el pH no descienda por debajo de 4.4. En los mostos demasiado ácidos esto se corrige con solución de amoníaco o con NH₃ gaseoso. Por el contrario, si el pH sube a 4.6 se reduce con ácido sul

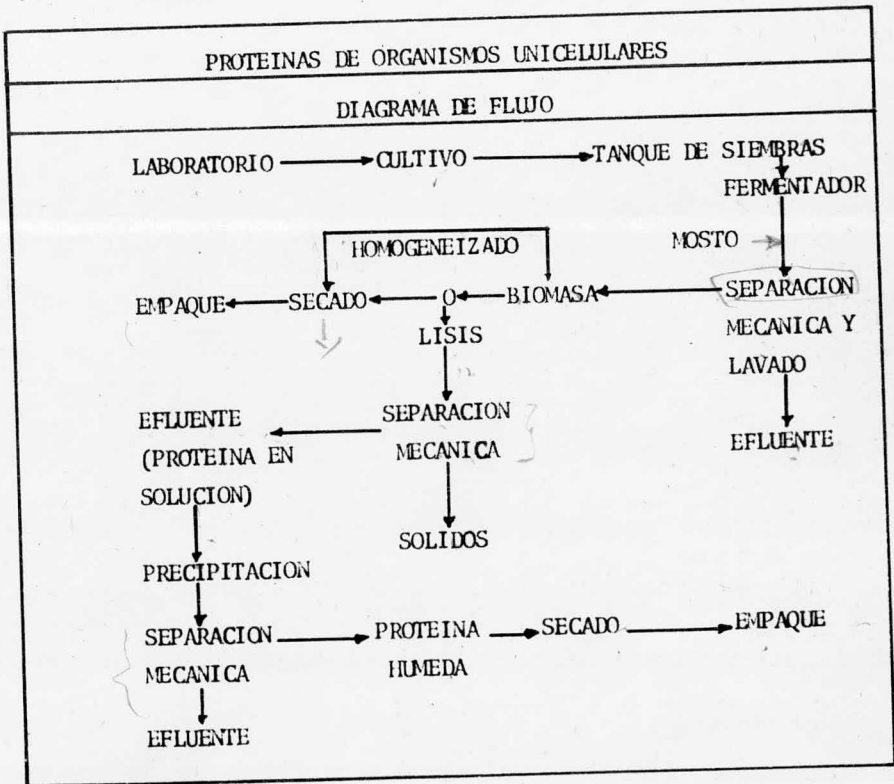
fúrico. También se deja caer la solución de fosfato diamónico de un modo regular desde la segunda hora de fermentación. En la última hora, que es el período de maduración de la levadura, sólo se añade el 5% de la melaza total y se reduce también la cantidad de aire a 1/3 de la cantidad normal. Así se asimilan los últimos restos del nitrógeno, de modo que la valoración con formol da resultado negativo o - indica solamente trazas. Normalmente el pH permanece en el valor de 4.4, y la temperatura en las dos últimas horas asciende a 30°C. La levadura está madura cuando ya no presenta células en gemación.

* Durante la aireación intensiva de la levadura se produce, la mayoría de las veces, una cantidad de espuma considerable, que se combate por medio de aceite. La separación de la levadura de la solución nutritiva se efectúa con separadores (centrifugas) hasta de 20 mil litros por hora de capacidad. Puesto que el lavado de la levadura aumenta mucho su conservación, se realiza éste muchas veces a un pH de 4.4. Para separar el agua unida mecánicamente se lleva la levadura a una prensa, que la deja en condiciones de entregarse al comercio. Las células vivas contienen ahora un 75% de agua unida a la sustancia celular.

Rendimiento: 80% referido a la melaza, con 47-49% de azúcar (sin producción de alcohol). ya que

La producción de alcohol es muy pequeña en este método, de modo que el mosto residual no puede utilizarse como subproducto. Si tiene interés la obtención de una cantidad de alcohol determina-

da, hay que conducir de otro modo la fermentación. Cuanto mayor es la producción de alcohol, menor es el rendimiento en levadura. El cultivo de la levadura, que se airea poco o nada, produce cantidades considerables de alcohol. Para acostumbrar el cultivo puro a los métodos de la gran industria, se necesitan 3-5 pasos sucesivos, que establecen gradualmente las condiciones del método de fermentación recién descrita.



Cuadro Num. 2 (28)

Etapas en el proceso de fabricación de levadura seca utilizando un medio de melazas (25).

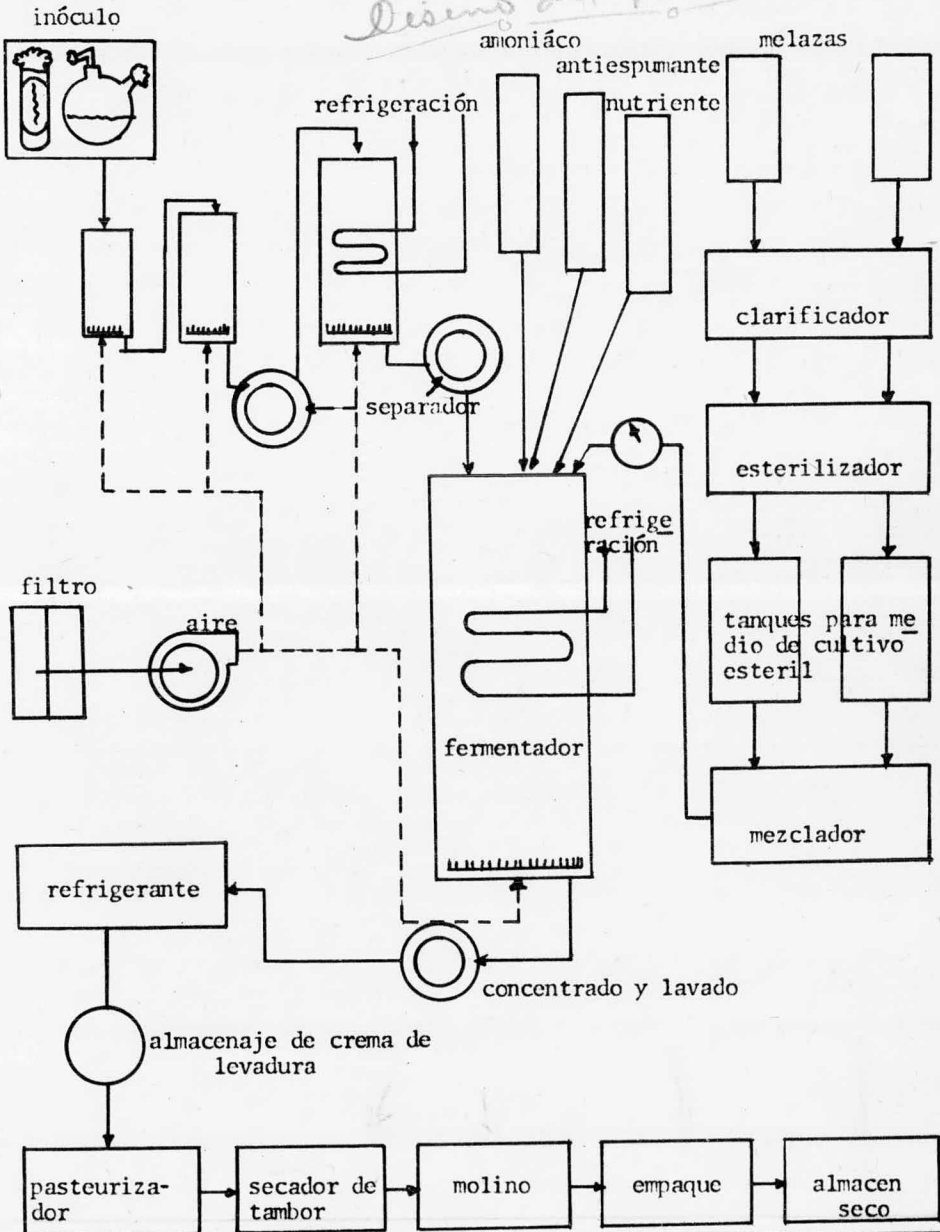


Figura núm. 1

impolancia

VALOR NUTRITIVO DE LAS LEVADURAS

El valor nutricional de las levaduras empezó a ser estudiado en la última parte del siglo pasado, y su estudio a partir de entonces va en aumento. El valor nutricional de la levadura ya tiene un lugar aceptado dentro de los alimentos actuales. La composición química, contenido vitamínico, cantidad y tipo de aminoácidos en la proteína de la levadura y la existencia de uno o más factores de crecimiento que todavía no han sido identificados, han sido bien establecidos.

Los productos secos de levadura en el mercado se pueden agrupar como sigue:

- 1.- Levadura seca primaria S. cerevisiae
- 2.- Levadura seca primaria "torula" C. utilis
- 3.- Levadura secundaria; levadura seca de S. cerevisiae
cerveza S. carlsbergensis

LEVADURAS PRIMARIAS

La composición de la levadura seca primaria disponible comercialmente es especificada en la onceava edición de "The National Formulary" (páginas 395-396) de la siguiente manera(15):

proteínas (N x 6.25)	mínimo	45%
tiamina (vitamina B ₁)	mínimo	120 mcg/g
riboflavina (vitamina B ₂)	mínimo	40 mcg/g
ácido nicotínico	mínimo	300 mcg/g
poder fermentativo	inactivo	

cuenta total de bacterias	máximo	7 500 /g
cuenta de hongos	máximo	50 /g
humedad	máximo	7%
cenizas	máximo	8%

Todos los productos de levadura seca primaria que cumplen con las especificaciones del NF, con la excepción de los contenidos de tiamina y riboflavina son usados principalmente como saborizantes. El contenido de tiamina de levadura seca primaria está entre 12-15 mcg/g y el contenido de riboflavina entre 35-45 mcg/g.

Un cierto número de productos de levadura seca primaria son vendidos con un alto contenido de vitaminas, provenientes de sus tratos enriquecidos con vitaminas. Son vendidos con nombres en clave y sus contenidos de vitaminas y la proporción de éstas varía grandemente; sus precios varían dependiendo del contenido de vitaminas.

Un análisis típico de levadura seca primaria comercial para fines alimenticios es la que sigue (14):

humedad	5.0%	calcio	0.3%
proteína	50.0%	fósforo	2.4%
grasa (ext. etereo)	1.2%	potasio	2.6%
lípidos totales	5.5%	magnesio	0.5%
carbohidratos	31,5%	sodio	0.4%
cenizas	8.0%		

El valor energético de la levadura seca es de aproximadamente 3.25 cal/g o 93 cal/oz.

El contenido aproximado de aminoácidos expresados en por ciento del contenido de proteína seca es como sigue(14):

alanina	9.0%	lisina	8.2%
arginina	5.0%	metionina	2.5%
ácido aspartico	4.0%	fenilalanina	4.5%
cistina	1.6%	prolina	2.5%
ácido glutámico	13.5%	treonina y serina	5.5%
glicina	0.6%	triptofano	1.2%
histidina	4.0%	tirosina	5.0%
hidroxiprolina	4.5%	valina	5.5%
isoleucina	5.5%	otros	9.4%
leucina	8.0%		

En terminos generales, la levadura seca contiene no menos de 40% de proteínas y cada gramo representa no menos de 0.12 mg de clorhidrato de tiamina, 0.04 mg de riboflavina y 0.25 mg de ácido nicotínico.

Cerca de la mitad del peso de la levadura es proteína cruda (N x 6.25) constituida por 80% de aminoácidos, 12% de ácidos nucleicos y 8% de amoníaco. Alrededor del 7% de nitrógeno total se encuentra como aminoácidos libres. La presencia de grandes cantidades de purina y pirimidina, baja la proteína real de levadura a 40% del peso seco.

El valor nutritivo de la levadura depende de la calidad de sus proteínas y vitaminas. La abundancia de lisina y triptofano en la proteína de la levadura, ayuda para complementar dietas de ce

reales. Cuando la protefina de levadura es suplementada con metioni-
na, su eficiencia es casi igual que la casefina.

Las levaduras contienen también más de 10 vitaminas hidro-
solubles del complejo vitamínico B, solo tres de ellas tiamina, ribo-
flavina y niacina, están especificadas en la levadura seca comercial,
pero sin embargo también proporcionan diversas cantidades de biotina,
ácido pantoténico, piridoxina, colina, estreptogenina, y quizás áci-
do fólico y ácido p-aminobenzóico.

PRODUCTOS E INTERMEDIARIOS QUE CONTIENEN O ESTAN CONSTITUIDOS POR LEVADURAS.

En la tabla siguiente, se enlistan 16 productos comerciales
o intermediarios en procesos, sus usos, sus aplicaciones y las espe-
cies de levaduras empleadas. Estas sustancias son vendidas como pro-
ductos primarios manufacturados o como productos secundarios (sub-pro-
ductos) obtenidos en la producción de algún producto primario, o son
intermediarios en un proceso de manufactura en la cual se ve envuelto
la levadura. Por conveniencia, las sustancias están agrupadas en es-
tas categorías que no tienen sus fronteras bien marcadas.

18-23-24
 109 35-36-37-38.

LEVADURAS Y DERIVADOS DE ESTAS, SUS USOS Y LA ESPECIE UTILIZADA (29)

Serie num.	Sustancia comercial	Utilización	Especie de levadura utilizada
1	lev. de panificación, lev. comprimida.	panificación cocina casera.	Saccharomyces cereviseae.
2	lev. de panificación activa seca.	panificación, cocina casera.	Saccharomyces cereviseae.
3	lev. alimenticia.	nutrición humana.	S. cereviseae C. utilis, S.carlsbergensis Oospora lactis C.lipolytica.
4	alimento de lev.	nutrición animal.	vease el num. 3
5	lev. usada como suplemento vitaminico	pan, alimentos balanceados.	S. cereviseae S. carlsbergensis
6	derivados de lev. usados como <u>ingredien</u> tes en alimentos	alimentos procesados, pan, cereales.	vease el num. 5
7	tabletas de lev. dieteticas	suplemento en las dietas	S. cereviseae
8	extracto de lev. como nutriente microbiológico.	laboratorios industriales y clínicos.	vease el num. 5
9	derivados de lev. para farmaceuticos	medicina	vease el num. 5
10	alimentos secos y solubles de las destilerias	nutrición animal.	vease el num. 5

LEVADURAS Y DERIVADOS DE ESTAS, SUS USOS Y LA ESPECIE UTILIZADA
(continuación)

11	inoculos de lev.	a.-destilería b.-vinatería c.-cervecería d.-producción de lev. <u>prima</u> ria.	a.-S. cereviseae b.-S. cereviseae var. ellipsoideus S. byanus, Kloeckera apiculata S. beticus, especies de Pichia Rhodotorula, etc. c.-S. cereviseae S. carlsbergensis d.-cualquier fil - trade deseado.
12	líquidos fermen- tadores	a.-destilería b.-vinatería c.-cervecería d.-producción de lev. <u>prima</u> ria.	vease el num. 11
13	sedimentos de cerveza.	cervecerías	S. cereviseae S. carlsbergensis ocasionalmente - otras.
14	cultivos puros de lev.	laboratorios industriales y científicos	cualquier cultivo de lev. conteniendo células de un solo tipo.
15	cultivos de lev. usados en análisis	laboratorios científicos	cualquier cultivo puro de lev.
16	preparaciones de enzimas de lev.	industrias especiales	S. cereviseae S. carlsbergensis

CANDIDA UTILIS:

Candida utilis se agrupa en la familia de las Endomycetaceae que carecen de clorofila. Corresponde a la subfamilia de los Sacaromycoideae dado que es un verdadero hongo gemante esporógeno.

El uso poco afortunado del termino "levadura torula" ha causado algunas confusiones, pero está tan ampliamente utilizado de una manera comercial que es improbable que se deje utilizar. No obstante que la primera edición de The Yeast no enlistaba el género Torula, como un género aceptado, ediciones posteriores tienen Torula utilis, Torulopsis utilis y Candida utilis como sinónimos.

El género Candida comprende una colección heterogenea de especies de levaduras esporógenas, las cuales no califican para la clasificación en ningún otro género homogéneo de levaduras imperfectas. El género Torulopsis es el otro género de levaduras imperfectas con una similar heterogeneidad. Los hallazgos taxonómicos han hecho posible el reclasificar un cierto número de sus especies dentro del otro género, pero en el presente no hay información disponible con la cual se pueda basar una clasificación natural del grupo Candida-Torulopsis. Ya que este grupo no se puede resolver en el presente dentro de una taxonomía natural puesto que esta división entre los géneros Candida y Torulopsis es arbitraria y artificial, parece lógico el clasificar el grupo como un enorme grupo único, el cual, la taxonomía en un futuro, pueda dividir cuando se tenga disponible la suficiente información para hacerlo. Esta medida, aun-

que es realizable, no se ha realizado ya que se pensó que sería necesario el renombrar provisoriamente a un gran número de especies, lo cual llevaría inevitablemente a confusiones en las personas que laboran con las levaduras de este grupo. Por lo tanto los géneros *Candida* y *Torulopsis* se mantienen separados/

▮ *Candida utilis* se reproduce en forma más o menos redonda con ascas formadas por partenogénesis en células que han intentado conjugarse, con una o dos ascosporas redondas y lisas. Estas células son hongos que vegetan en forma de sedimento y que no producen película o anillo, o bien lo forman lentamente.

▮ *Candida utilis* tiene la propiedad de fermentar los azúcares aclimatándose perfectamente al uso de las hexosas, pudiendo también fermentar las pentosas y desarrollarse en medios con un pH más bien ácido. Fermenta la glucosa, levulosa, sacarosa, manosa, muy debilmente: la maltosa y la rafinosa, no fermenta la lactosa ni la galactosa. El desarrollo máximo se logra cuando teniendo un medio azucarado, con una composición conveniente y un pH adecuado alrededor de 4.5 a 5.3, se mantiene en constante agitación con ---aire a presión; y tanto mayor es el volumen de aire distribuido en el caldo de cultivo, tanto mayor será la producción total de células de *Candida utilis*.▮ Puede aclimatarse bien a un medio de cultivo formado por melazas de caña o por melazas provenientes de la --hidrólisis de la celulosa de la madera.▮

▮ *Candida utilis* una vez bien aclimatada al medio de - -

cultivo, preparado con melazas, llega a consumir hasta el 91 o 92% de los azúcares presentes. II Con una fuerte aereación se puede obtener entre 30 y 40 % de levadura seca calculada sobre el total de -- los azúcares reductores presentes.

II Desde un punto de vista organoléptico presenta las siguientes cualidades: su olor es agradable y su color ligeramente - café es absolutamente uniforme. Su sabor no es amargo, como el de las levaduras de cerveza, sino más bien ligeramente dulce. II

CRECIMIENTO DE LAS LEVADURAS:

II En todos los sistemas biológicos el crecimiento o aumento en la masa total, tiene una gran importancia, pero se presentan algunas dificultades prácticas cuando se le intenta valorar en los microorganismos. Probablemente se obtiene la mejor determinación -- *e mit de det. elemento luz.* del crecimiento si se valora el nitrógeno celular total, pero resulta incómodo y corrientemente se concidera adecuado determinar - el aumento en peso seco de las células, aunque con frecuencia este valor puede resultar demasiado alto debido a la acumulación en las células de materiales de reserva. [?] Otras medidas de crecimiento - que son muy útiles son; la turbiedad de los cultivos de microorga - nismos unicelulares (la densidad óptica es función del producto - del tamaño celular por el número de células y se puede relacionar con el peso seco por medio de una curva de calibrado) y la centri

fugación que permite establecer el volumen de células empaquetadas o de micelio. Hay métodos indirectos basados en la determinación de la actividad celular (cantidad de células, producción de anhídrido carbónico o ácido) que a veces resultan útiles, pero que pueden inducir a error si se emplean sin discriminación.

El logaritmo del peso seco de un organismo unicelular que crece en un cultivo sumergido, representado frente al tiempo de cultivo, proporciona una curva que tiene una forma característica cuyos detalles particulares dependen del tipo de microorganismo y de las condiciones ambientales. Se trata de la curva de crecimiento y típicamente consta de cinco partes: la fase latente, la fase de aceleración, la fase exponencial, la fase de retraso y la fase estacionaria.

FASE LATENTE.- Para un microorganismo dado, la fase latente está constituida por el tiempo que transcurre desde que se inocula el medio hasta que se pueden percibir las primeras señales de crecimiento. Está constituida por el periodo de adaptación a las nuevas condiciones del medio. Su duración depende de la naturaleza del microorganismo, del tamaño y estado fisiológico del inóculo, de la cantidad de medio transferido junto con el inóculo, el cambio en las concentraciones de los metabolitos esenciales en el nuevo medio la temperatura y a veces, la intensidad de la luz. Por lo general, la fase latente se puede acortar si se aumenta la temperatura hasta llegar a un óptimo y realizando la transferencia a un medio que sea más completo bajo el punto de vista de la nutrición. Se puede disminuir mucho y aún suprimir el retraso si se inocula un cultivo que

ojs *Gráfica curva*

ya se halle en la fase de crecimiento exponencial.

FASE LOGARITMICA O EXPONENCIAL.- La fase latente da paso a un corto periodo en que se acelera el ritmo de crecimiento, antes de que comience la fase logarítmica o exponencial. En esta fase la velocidad de crecimiento alcanza su valor máximo, constante para un microorganismo en particular y para la obtención de condiciones bioquímicas que determinen donde se encuentren los equilibrios de las múltiples reacciones de cuyo progreso depende el crecimiento. Esta velocidad constante de crecimiento presupone, para un microorganismo dado, que cada una de las células se divida a intervalos de tiempo regulares y que el crecimiento en masa celular por unidad de tiempo tenga que estar fijado por la velocidad de crecimiento y por la cantidad de células presentes en cada momento. Por lo tanto, el crecimiento acumulativo de materia celular se ajustará a la expresión matemática: $P = P_0 e^{rt}$ en donde P es el material celular acumulado al termino del tiempo t; P_0 es la masa celular presente al comenzar el periodo de crecimiento logarítmico; r es el porcentaje de ritmo de crecimiento o de aumento de masa celular por unidad de intervalo de tiempo y e es la base de los logaritmos naturales. Por lo tanto; $P/P_0 = e^{rt}$ y tomando logaritmos de los miembros de la ecuación: $\log_e P/P_0 = rt$ resulta: $\log_e P - \log_e P_0 = rt$ y por lo tanto;

$$r = \frac{\log_e P - \log_e P_0}{t} \quad (1)$$

La ecuación (1) indica que el ritmo de crecimiento (r) viene dado por la pendiente de la gráfica en que se representa --

$\log_e P$ frente al tiempo (t) de manera que en términos generales;

$$r = \frac{\log_e P_2 - \log_e P_1}{t_2 - t_1}$$

Suele resultar más cómodo representar la curva de crecimiento empleando los logaritmos comunes con base 10. De esta manera la pendiente viene dada por la expresión:

$$r = \frac{\log_{10} P_2 - \log_{10} P_1}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

A menudo suele ser conveniente y más especialmente con microorganismos unicelulares representar la **curva** de crecimiento con logaritmos base 2, porque de esta manera una división en las ordenadas corresponde a la duplicación de la población o a un incremento de una generación. La pendiente de esta gráfica (r_u) es igual al recíproco del tiempo de una generación (g) que es el tiempo requerido para cada división celular, así que:

$$r_u = \frac{1}{g} = \frac{\log_2 P_2 - \log_2 P_1}{t_2 - t_1}$$

Puesto que los logaritmos en base 10 se pueden convertir en logaritmos en base 2 si se les multiplica por 3.322, se puede substituir en la ecuación (2) el valor de r por $3,322 r_u$ para calcular el tiempo de generación (g) con logaritmos vulgares:

$$3,322 r_u = \frac{3,322}{g} = \frac{\log_{10} P_2 - \log_{10} P_1}{t_2 - t_1}$$

y por lo tanto

$$g = \frac{3,322 (t_2 - t_1)}{\log_{10} P_2 - \log_{10} P_1}$$

El tiempo medio de una generación (g) o el tiempo que la población necesita para duplicar su masa, puede variar entre unos - 15 minutos para algunas bacterias y varios días para ciertos hongos.

Es importante señalar que con organismos unicelulares el ritmo al que ocurre la división celular es lo que determina la velocidad con que se duplica la materia celular. Con organismos filamentosos se puede conseguir el mismo efecto, mediante la producción de nuevos puntos de crecimiento en forma de ramificaciones.

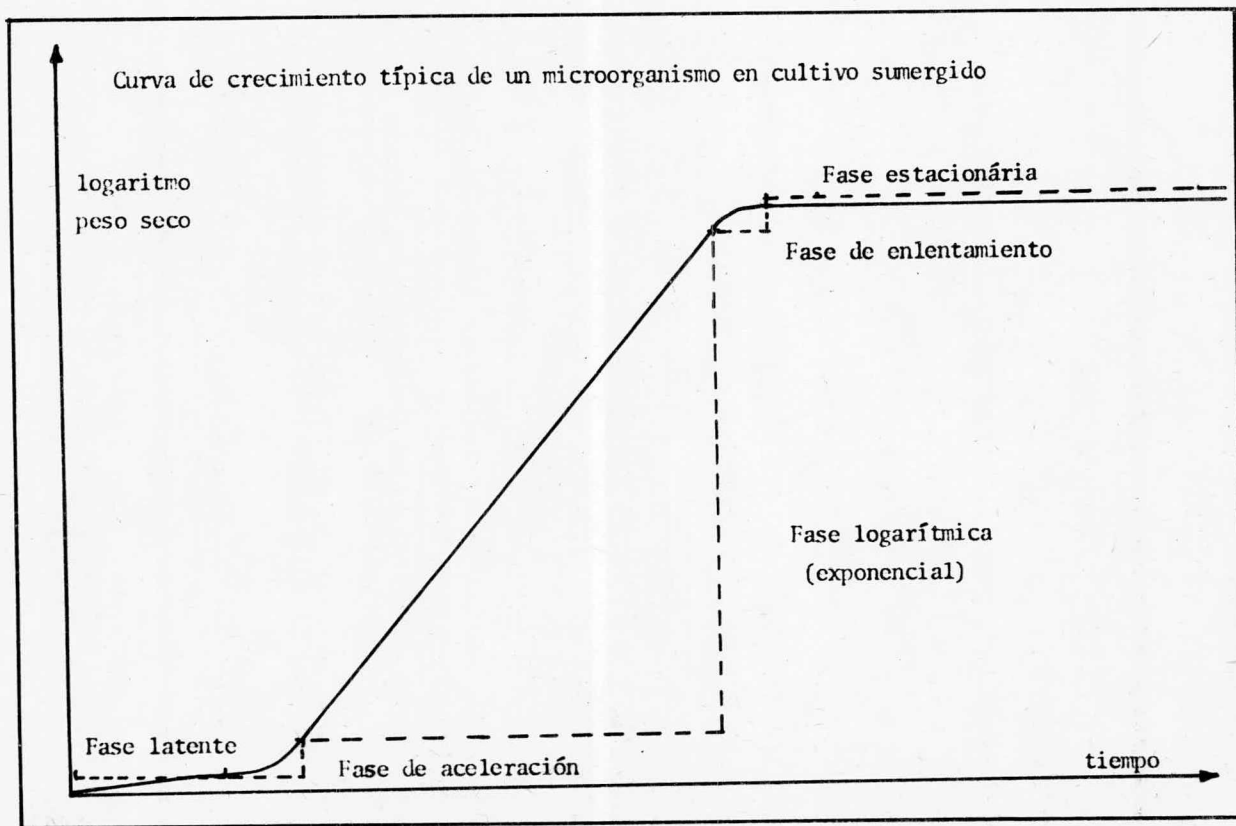
Se determina experimentalmente el crecimiento total conseguido. El periodo de retraso se puede determinar gráficamente -- por extrapolación de la porción exponencial de la curva de crecimiento hasta que corte el eje de los tiempos. También se puede determinar de otra manera, calculando el periodo de retraso a partir de la diferencia que existe entre el tiempo que se necesita para - la acumulación de una masa protoplasmática determinada (o su equivalente) y el tiempo que se ha calculado que sería preciso para - conseguir el mismo crecimiento, suponiendo que desde el principio - el crecimiento haya sido exponencial. *→ hasta aquí*

FASE ESTACIONARIA.- El crecimiento exponencial de la masa celular *†* llega finalmente a estar limitado por el agotamiento de los nutrientes del medio o la acumulación en el mismo de los productos de deshecho. Las condiciones menos favorables del medio determinan una - disminución progresiva en la velocidad de crecimiento, hasta que - se alcanza la fase estacionaria, en la cual la cantidad de masa celular se mantiene constante.

En los organismos unicelulares puede ocurrir que el paso a la fase estacionaria se produzca de una forma muy rápida, pero en los hongos filamentosos, en cambio, se produce un periodo prolongado en el que el crecimiento es más limitado y el peso seco puede seguir aumentando considerablemente, pero en una proporción aproximadamente lineal. Esto puede ser debido a una disminución gradual de la velocidad de producción de nuevos filamentos ramificados a la vez que continúa el crecimiento apical de las hifas ya existentes. También se puede deber a la deposición de reservas alimenticias o a la producción de antibióticos u otros metabolitos, por medio de vías metabólicas secundarias. Este periodo intermedio entre la fase logarítmica y la estacionaria se suele denominar fase de retraso.

Resumiendo, se puede concluir que la curva de crecimiento para un microorganismo dado representada en una escala logarítmica conveniente se puede describir por medio del periodo latente, la velocidad de crecimiento y el crecimiento total alcanzado.

semei poco
c/ fase



Gráfica núm. 1

PERSPECTIVAS FUTURAS:

En áreas con poblaciones desnutridas, la levadura alimenticia tendrá un papel mucho más importante que la levadura de panificación. La levadura alimenticia, si se obtiene a bajo costo, puede suplir parte de las proteínas y gran parte de las vitaminas necesarias para el mantenimiento de la salud. La restauración y el mantenimiento de la salud no puede depender de 1.0 a 1.5 Kg. de levadura que se consumen anualmente en el pan. Un factor substancial en la solución de los problemas nutricionales de los países subdesarrollados será, el consumo per capita de 4.5 a 14 Kg. de levadura alimenticia seca anualmente, con 50% de proteínas y un alto contenido de vitaminas del complejo B. Usando sus propias mieles como fuente de carbono, agregando amoníaco y fosfato como nutrientes, y utilizando una pequeña planta, estos países podrían producir suplementos alimenticios de alto valor nutritivo para cubrir sus necesidades, - si tales planes, en la actualidad promovidos por varias organizaciones internacionales se volvieran realidad, un aumento sin precedentes se puede esperar en la producción mundial de levadura de grado alimenticio. Usando fermentadores y procesos en los que se trabaje con altas concentraciones de medio de cultivo y de levadura, distribuidores efectivos de aire que requieran baja energía, y un equipo de control de operaciones, una planta compacta fácilmente puede suplementar la alimentación de 10 millones de personas. La conversión de las materias primas a proteína terminada de alto grado puede llevarse a cabo en 24 horas.

CAPITULO 3

MEDIOS METODOS Y MATERIALES

3.1.- MEDIOS

3.1.1.- MEDIO DE MELAZA

Para preparar el medio de melaza, con un 10% de azúcares reductores, ésta fué tratada de la siguiente manera: se sabía por análisis que la melaza tenía un 33% de reductores, por lo cual se tomaron 60 ml. de melaza y se disolvieron en 100 ml. de agua, se agregaron 0.5 ml. de ácido clorhídrico concentrado y se puso en autoclave a una temperatura de 120°C que se mantuvo por 15 min. Después de enfriarse, se filtró en filtro buchner al vacío. De ésta solución se tomaron 50 ml. para preparar el medio de cultivo.

Este medio contiene además las siguientes sustancias:

extracto de levadura	1.0 g.
agua de cocimiento de maíz	1.0 ml.
sulfato de amonio	0.5 g.
fosfato dipotásico	0.2 g.
agua destilada	100 ml.

El medio se esterilizó a 1 atm. de presión durante 30 min.

El pH del medio se ajustó ya sea con HCl o con amoníaco, según fuese el caso.

3.1.2.- MEDIO DE AGAR MELAZA

Para este medio se utilizó el mismo medio anterior (3.1.1) pero adicionado de 2 g. de agar para hacer el medio sólido.

3.1.3.- MEDIOS DE MELAZA A DIFERENTE CONCENTRACION DE AZUCARES

Para la preparación de estos medios, se empleó el medio de melaza (3.1.1) pero variando la cantidad de melaza tratada, la cual se ajustó en los diferentes medios a 1.0%, 2.5%, 5.0% y 10.0% de azúcares. La cantidad de azúcar se determinó con un hidrómetro de --- Brix, de escala 0°- 10°Brix y a una temperatura de 20°C.

3.1.4.- MEDIOS PARA FERMENTACION DE DIFERENTES AZUCARES

Para la preparación de estos medios se utilizaron los siguientes azúcares: glucosa, xilosa, galactosa, maltosa, sacarosa, - lactosa y rafinosa. Los medios fueron preparados haciendo una solución con los siguientes ingredientes:

áucar	2.0 g.
sulfato de amonio	0.5 g.
fosfato dipotásico	0.2 g.
agua destilada	100 ml.

3.1.5.- MEDIO DE SABOURAUD

Se utilizó el medio normal de Sabouraud, preparado con - las siguientes sustancias:

neopeptona	1.0 g.
agar	2.0 g.
glucosa	4.0 g.
agua destilada	100 ml.

3.2.- METODOS PARA EL CRECIMIENTO EN MELAZAS

3.2.1. AISLAMIENTO DE SACCHAROMYCES CARBAJALI DEL AGUAMIEL

Para aislar las levaduras se realizaron varias siembras en un medio de cultivo sólido, siendo este medio el de Sabouraud - - - (3.1.5). Estas siembras fueron hechas a diferentes diluciones - - - (1/1 000, 1/10 000, 1/100 000) para lograr obtener así las colonias bien separadas unas de otras y poder tener cultivos posteriores que procedieran de una sola célula. En el desarrollo práctico se observó que en las diluciones de 1/1 000 y 1/10 000, las colonias eran numerosas y su diferenciación resultaba difícil, ya que se mezclaban entre sí, pero con las diluciones de 1/100 000 se obtuvieron las colonias bien diferenciadas unas de otras y así pudieron hacerse resiembras que procedían de una sola célula. Los resultados obtenidos en el Sabouraud, se encuentran indicados en el punto 4.1.1.

3.2.2.- ADAPTACION DE LAS LEVADURAS AL MEDIO DE MELAZA

En este punto se trató de adaptar las levaduras al medio que sería empleado posteriormente para su reproducción. Para esto se procedió a sembrar las cepas en medio de agar melazas (3.1.2) - en tubos de cultivo. La temperatura de incubación a la cual se desarrolló esta prueba fué de 28° a 30°C, el pH del medio fué de 4.5. Después de sembrada la levadura, se hicieron observaciones cada 24 y 48 horas alcanzándose este tiempo se resebraron los cultivos a un nuevo medio y así sucesivamente, realizándose la observación en cada uno de los pasos a los mismos intervalos de tiempo que en la primera siembra.

Esta prueba se realizó con las levaduras *Candida utilis* y *Saccharomyces carbagali*, haciéndose por triplicado para evitar algún posible error obteniéndose los resultados indicados en el punto 4.1.6.

3.2.3.- DETERMINACION DEL pH OPTIMO PARA EL CRECIMIENTO DE LAS LEVADURAS

Para esta determinación se utilizó un medio de melaza a una concentración de 1°Brix al cual se le hicieron variaciones de pH desde 3.0 hasta 7.0 haciéndose estas con intervalos de 0.5 en la escala potenciométrica para cada una de las levaduras. El pH del medio se determinó por medio de un potenciómetro. La prueba se realizó a una temperatura entre los 28° - 30°C. Se mantuvo en agitación el medio para una buena aireación del mismo. Esta determinación se hizo con las dos levaduras estudiadas, fué hecha por -

triplicado para cada variación de pH. Los resultados obtenidos se encuentran indicados en el punto 4.1.7.

3.2.4.- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION ADECUADA DE AZUCARES PARA EL CRECIMIENTO OPTIMO DE LAS LEVADURAS

Se hicieron crecer las levaduras en el medio líquido de melazas, pero a diferentes concentraciones de azúcar (3.1.4). La medición de la concentración de azúcares se realizó con un hidrómetro de Brix. Las concentraciones con que se trabajó, fueron de --- 1°B, 2.5°B, 5.0°B y 10°B, las cuales al relacionarse con el porcentaje de azúcares se obtuvieron los siguientes valores: 1.006%, --- 2.5018%, 5.009% y 10.010% que fueron obtenidos en tablas (15).

El medio que se utilizó fué hecho con melaza tratada enriquecida con caldo de cocimiento de maíz, sulfato de amonio y fosfato dipotásico. La temperatura de incubación fué de 28° a 30°C, el pH del medio fué de 4.5. Este medio se colocó en matraces bafleados, los cuales fueron mantenidos en agitación para lograr una buena aireación del medio.

La inoculación del medio se realizó de la siguiente manera: la levadura que se utilizó, tenía 24 horas de haber sido sembrada en medio de agar melaza y por lo tanto se encontraba en la fase logarítmica de crecimiento. A este medio con la levadura se le agregaron 10 ml de agua destilada esteril, con una asa se agitó hasta lograr la suspensión total de la levadura. De aquí se tomaron 5 ml para sembrar en cada uno de los matraces bafleados para la fermentación.

3.2.5.- DETERMINACION DE LA TEMPERATURA OPTIMA DE CRECIMIENTO DE LAS LEVADURAS

Se prepararon varios medios de agar melaza, con un pH de 4.5 y con un 10% de azúcares. Estos medios se inocularon y se incubaron durante 48 horas a diferentes temperaturas (5°, 20°, 25°, 30°, 37° y 40°C) para encontrar en cual de ellas el crecimiento era mayor. Los resultados de esta determinación se encuentran indicados en el punto 4.1.8.

3.2.6.- METODO GENERAL DE LAVADO Y SECADO DE LAS LEVADURAS

El procedimiento que se empleó para secar las levaduras, separar las sustancias extrañas y dar un resultado cuantitativo en peso de la levadura seca, fué el método de Kurth (30), el cual se describe a continuación:

Se agregaron 10 ml. de la suspensión de levadura en un tubo de centrifuga tarado de 15 ml. de capacidad, se centrifugó, decantó y lavó con agua destilada procurando que la cantidad de esta fuera igual al volumen original pipeteado, se volvió a centrifugar y decantar, se lavó con 20 ml. de HCl al 0.35% dispersando uniformemente las levaduras, se volvió a centrifugar, a decantar y se lavó inmediatamente con una solución de carbonato de sodio al 1%, se centrifugó y se volvió a decantar. Enseguida se secó la levadura en el mismo tubo en una estufa a una temperatura de 105°C durante 2 horas, se enfrió en el desecador y se pesó en una balanza analítica.

3.2.7.- METODO ESPECIFICO DE LAVADO Y SECADO DE LAS LEVADURAS

Después de haberse desarrollado en los fermentadores, la levadura se centrifugó y lavó con agua hasta que ésta quedó completamente clara. Hecho esto se lavó con alcohol otras dos veces y se puso a secar a 105°C para evaporar perfectamente el alcohol.

3.2.8.- METODO DE MUESTREO EN LOS FERMENTADORES

Para seguir paso a paso las fermentaciones, y poder hacer las determinaciones a la levadura y al medio, se siguió el método descrito a continuación para el muestreo en los fermentadores.

Se prepararon dos fermentadores para poder correr las fermentaciones con doce horas de intervalo y tener así la oportunidad de muestrear de una manera continua, y que las fermentaciones pudieran realizarse en igualdad de condiciones. El primer fermentador se inoculó y 12 horas después el otro fermentador. El muestreo de estos fermentadores, se llevó a cabo durante dos días, tomandose las muestras cada cuatro horas. Al término de las fermentaciones, se tomaron porciones de las dos levaduras y se sometieron a análisis de proteínas, humedad, cenizas, fibra cruda, riboflavina, tiamina y niacinamida.

A las muestras tomadas durante la fermentación, se les determinó la cantidad en peso de la levadura y al medio, el contenido de azúcares. Estas muestras se trataron de analizar inmediatamente pero en los casos en que esto no fué posible, la muestra se almacenó a una temperatura entre 4° y 6°C para detener lo más posible la fermentación.

3.3.- METODOS ANALITICOS

3.3.1.- DETERMINACION DE PROTEINAS

Método de Kjeldall (1, 4, 15, 29, 31).

Se pesaron alrededor de 1 g. de levadura en papel glacine, se introduce en el matraz de Kjeldall, se agregaron 0.3 g. de CuSO_4 pentahidratado, 10 g. de K_2SO_4 , 25 ml. de H_2SO_4 y unos pedazos de porcelana porosa. Se colocó el matraz dentro de una campana de vacío en una posición inclinada en un soporte y se calentó con mechero lentamente hasta que cesaron los humos blancos, se colocó un embudo de cola corta en la boca del matraz y se siguió calentando más fuerte para destruir la materia orgánica, hasta que la solución quedó completamente clara. Se enfrió y diluyó con 200 ml. de agua destilada, se enfrió con hielo y resbalando por las paredes del matraz se agregó una solución concentrada de sosa (la cual también se había enfriado previamente), y se conectó inmediatamente el matraz a una trampa de Kjeldall la que estaba unida a un refrigerante el cual llevaba una alargadera terminal que iba introducida en una solución de ácido valorado (50 ml. de ácido clorhídrico 0.1 N). Se destilaron aproximadamente unos 150 ml. Se tituló el exceso de ácido valorado con una solución de sosa (0.1 N) utilizando rojo de metilo como indicador. Se hizo un blanco utilizando 1 g. de sacarosa en lugar de levadura.

$$\%N_2 = \frac{(\text{ml blanco} - \text{ml problema}) (\text{N de NaOH}) (0.014) (100)}{\text{peso de la muestra}}$$

$$N_2 \times 6.25 = \% \text{ de protefna}$$

3.3.2.- DETERMINACION DE GRASA CRUDA

Método de Soxhlet. (15,31)

Para la determinación de grasa cruda, se utilizó el extractor de Soxhlet. Para pesar la muestra se pesó primero el cartucho especial para estos extractores, después se puso la muestra y se volvió a pesar. Se colocó el cartucho en el Soxhlet teniendo la precaución de colocar lana de vidrio sobre la muestra, por otro lado se pesó un matraz redondo de 300 ml. con unas piedras porosas el cual se conectó al Soxhlet y éste a su vez a un refrigerante de bolas. Se agregó el éter por el refrigerante poniéndole dos cargas y una tercera durante la noche para que cubriera la muestra, después se empezó a calentar utilizando un baño maría para evaporar el éter, la extracción se mantuvo durante 12 horas. Finalmente se llevó el matraz a la estufa a 100°C hasta peso constante.

Se calculó el por ciento de grasa cruda dividiendo el peso de la muestra seca sin grasa entre el peso de la muestra original multiplicado por cien.

$$\% \text{ grasa cruda} = \frac{\text{peso de la muestra (100}^\circ\text{C)}}{\text{peso de la muestra original}} (100)$$

3.3.3.- DETERMINACION DE FIBRA CRUDA (1,4,15,29,31)

La fibra cruda se determinó en forma empírica. Para esta determinación se partió de 2 a 4 g. de muestra, se utilizó la muestra que quedó al hacer la determinación de grasa cruda. Se -

pasó a un matraz de 500 ml. en donde se adicionaron 0.5 g. de asbesto digerido y después 200 ml. de solución al 1.25% de ácido sulfúrico, esta solución estaba hirviendo al agregarse, se calentó de immediato utilizando un refrigerante de reflujo, empezó a hervir antes de 1 min. Se dejó hervir 30 min. y se filtró a través de una tela de algodón y se lavó con agua destilada hasta que no dió reacción ácida al rojo de metilo. El residuo se agregó al matraz y se repitio el procedimiento con sosa de la misma concentración, pasados -- los 30 min., se filtró en un gooch que había sido preparado con asbesto digerido, se lavó hasta que no dio reacción alcalina, después se lavó con alcohol se seco a 100°C y se pesó, luego se calcinó a 900°C y se volvió a pesar. La diferencia de estos dos pesos nos -- dió el contenido de fibra cruda y el resultado se reaciona a %.

Para la preparación del asbesto se digirió a ebullición - durante 8 horas con NaOH al 5%. Se lavó con agua caliente; se puso a digerir nuevamente pero con HCl 1:3 durante el mismo tiempo, se - lavó de nuevo con agua, se filtró, se secó y se calcinó al rojo brillante.

3.3.4.- DETERMINACION DE HUMEDAD (1,4,15,29,31)

Se pesaron 3 g. de la muestra en un pesafiltro puesto a peso constante, se secó en la estufa por 5 horas a 100°- 110°C hasta que ya no variaron las pesadas. Se dejó enfriar en un deseca-- dor.

Se calculó % de humedad por diferencia de peso.

3.3.5.- DETERMINACION DE CENIZAS (4,15,31)

Se pesó entre 2 y 4 g. de las levaduras, secadas al aire y se colocaron en un crisol tarado, se incineraron a bajas temperaturas teniendo el cuidado de no pasar de un rojo muy tenue, hasta -- que ya no hubo carbón y se determinó el peso de las cenizas. Cuando las cenizas no pudieron quedar libres de carbón por este método, se le agregaron a estas unos cuantos mililitros de agua caliente, para poder filtrar el residuo insoluble en un papel filtro sin cenizas, - se incineró el filtro y el residuo hasta que las cenizas quedaron - blancas o casi blancas, después se agregó el filtrado y se evaporó a sequedad y se calentó todo hasta tener un rojo tenue. En algunos ca sos las cenizas no quedaron libres de carbón, por lo que se tuvo que enfriar el crisol, agregar 15 ml. de alcohol, se rompieron las cenizas. Se calculó el porcentaje de cenizas por diferencia de pesos.

3.3.6.- DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS

Se sumaron los datos anteriormente obtenidos de proteínas, fibra cruda, grasa cruda, humedad y cenizas se restaron de 100, la - diferencia se reportó como carbohidratos asimilables.

3.3.7.- DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES

Método de Underkofler (32)

Reactivos:

- 1.- Una solución conteniendo 12.5% KI g. 25% ^{oxalato} $K_2C_2O_4 \cdot H_2O$
- 2.- Una solución 7.5 N de H_2SO_4 . Esta solución debe estar libre de material oxidable.
- 3.- Solución 0.050 N- $Na_2S_2O_3$
- 4.- Solución indicadora de almidón conteniendo 1% de almidón soluble en un solución saturada de NaCl.
- 5.- Reactivo "G"

Componentes	Peso en g. por litro
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	37.5
$NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$	125.0
Na_2CO_3 (anhidro)	53.0
KI	1.0
Na_2SO_3 (anhidro)	50.0
KIO_3	3.5665 (exactos)
NaOH	aproximadamente saturada para ajustar $pH = 2.48$

El reactivo "G2" se prepara como sigue:

El carbonato de sodio y la sal de Rochelle se disuelven en 300 ml. de agua destilada, después de lo cual es sulfato de cobre se disuelve en cerca de 500 ml. de agua destilada, se agrega con agitación - continua de tal forma que no se desprenda CO_2 libre. El uso de un

embudo con la salida debajo de la superficie de la solución carbonato-tartrato es útil. El KI y el sulfato de sodio se agregan agitando hasta que se disuelvan. La solución es llevada a un volumen de cerca de 950 ml. con agua destilada. La fuerte solución de NaOH es después lentamente agregada con agitación hasta que el pH ha alcanzado el valor de 9.48. El pH es determinado con un electrodo de vidrio a 25°C, el error de la sal es despreciado. Las muestras usadas para probar el pH son siempre regresadas a la solución principal. La solución resultante se calienta a ebullición fuertemente durante 10 min. en un recipiente cubierto. Después se enfria a 20°C. El KIO_3 exactamente pesado, se agrega, disolviéndose completamente y el volumen es llevado a un litro en un matraz volumétrico.

El reactivo cuando esta recién preparado siempre contiene algunas materias suspendidas por lo que la solución se debe dejar reposar por lo menos una semana en un recipiente Pyrex. Después de que las materias suspendidas se depositan, la solución clara es filtrada a través de asbesto y almacena en una botella Pyrex. Siguiendo el procedimiento anterior la autoreducción se reduce a un mínimo.

Procedimiento:

Exactamente 5 ml. de reactivo "G" se colocan en un tubo de 25 x 100 mm Pyrex, se agregan 5 ml. de la muestra y se mezclan perfectamente por agitación. El tubo debe estar acondicionado con un tapón de hule que tenga un pequeño pedazo de tubo capilar. El tubo se sumerge por lo menos 2/3 partes de su largo en un baño maría y

es calentado durante medio hora, que es el tiempo de calentamiento apropiado para que el azúcar se determine. El contenido del tubo se enfria a 30°C por inmersión en agua fría. Se agregan 2 ml. de la solución KI-oxalato (reactivo 1) y se mezclan por agitación. A esta mezcla se agregan cuidadosamente 1 ml. de H_2SO_4 7.5 N por las paredes del tubo inclinado, de tal manera que se evite un desprendimiento demasiado rápido de CO_2 . El mejor procedimiento es inclinar el tubo de tal manera que quede una gran superficie del líquido, después se deja resbalar el ácido por las paredes del tubo y se mezcla lentamente revolviendo el tubo en la posición inclinada hasta que el primer desprendimiento violento de CO_2 ha terminado, la solución es entonces mezclada por agitación. Después de la adición del ácido sulfúrico se debe dejar el suficiente tiempo para que todo el óxido cuproso se disuelva y que la solución se vuelva completamente clara.

El exceso de yodo es finalmente titulado con la solución de tiosulfato 0.05 N usando el indicador de almidón cerca del punto final. Un blanco se corre de la misma manera utilizando 5 ml. de agua como muestra. La diferencia correspondiente al volumen de tiosulfato consumido por el óxido de cobre es convertido a miligramos de azúcar por 5 ml. de solución por la lectura sobre una curva estandar.

Curva estándar:

Para realizar el análisis de azúcares por el método de Underkofler, fué necesario realizar una curva estándar de sacarosa.

Para realizar la curva estándar de sacarosa se pesaron 1 g. del azúcar y se diluyó en 50 ml. de agua en un matraz aforado de 500 ml. , a esto se le agregaron 100 ml. de HCl 1N. Se calentó en baño maría a 70°C durante 30 min. Después de esto se llevó a un pH de 7.0 con NaOH 1N y se aforó a 500 ml. De esta solución se tomaron -- alicuotas de un mililitro en un mililitro de 1 a 10, en tubos de ensaye y se llevaron a un volumen de 10 ml. con agua. A estas soluciones se les determinaron los azúcares por el método anterior.

3.3.8.- DETERMINACION DE FOSFORO (1,29,30)

Para la determinación de fósforo en las levaduras, el método colorimétrico de azul de molibdeno usando ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico como agente reductor es el recomendado por la AACC

Reactivos:

La mezcla digestora se prepara de la siguiente manera: A 60 g. de molibdato de sodio disueltos en 300 ml de agua, se agregan 300 ml de ácido sulfúrico concentrado. La solución se enfría en un baño de hielo; cuando la temperatura llega a los 10°C, se agregan 400 ml. de ácido perclórico al 70%.

El agente reductor se conoce con el nombre de reactivo de Fiske-Subbarow y se prepara de la siguiente manera: Se mezclan 0.5 g. de sodio 1-amino-2-naftol-4-sulfato, 195 ml. de solución de bi--

sulfito de sodio al 15% y 5 ml. de una solución al 20% de sulfito de sodio. Se calienta hasta lograr la disolución total de los sólidos. Se debe de tapar el matraz para prevenir la pérdida de -- dióxido de azufre. El reactivo es estable por varias semanas.

Determinación:

Poner una muestra exactamente pesada correspondiente a 0,02 g. de sólidos en un matraz de digestión de Kjeldhal de 100 - ml. y se mezcla completamente. De una manera similar se prepara un blanco conteniendo las cantidades equivalentes de los reactivos. Se deja que se desarrolle el color durante 30 min. después se lee a 660 nm contra el blanco.

Calibración:

Se prepara una curva patrón analizando muestras de -- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ correspondientes a 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg. de P_2O_5 , de la misma manera descrita con anterioridad; 3.777 mg. - de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ corresponden a 1.0 mg. de P_2O_5 .

3.3.9.- DETERMINACION DE TIAMINA (15)

Soluciones especiales y solventes.

Solución de cloruro de potasio.- Se disolvieron 250 g. de cloruro de potasio en 1 000 ml. de agua.

Solución ácida de cloruro de potasio.- Se ponen 8.5 ml. de HCl en 1 000 ml. de solución de cloruro de potasio.

Solución al 2% de ferricianuro de potasio.- Se disuelve 2 g. de ferricianuro en 100 ml. Se prepara el día en que se va a usar.

Reactivo oxidante.- Se mezclan 10 ml. de solución de ferricianuro con suficiente NaCl 3.5N para hacer 100 ml. Usar esta solución antes de 4 horas.

Solución patrón de tiamina HCl.- Se llevan 25 mg. de un patrón -- USP de referencia, previamente secado a 105°C por dos horas, pesados con exactitud a un matraz volumétrico de 1 000 ml. teniendo -- cuidado con la absorción de humedad durante el pesado del patrón. Se disuelve este en 300 ml. de una solución diluída de alcohol - - (1 en 5) y se ajusta el pH a 4.0 con HCl diluído, y aforar con alcohol diluído. Esta solución se almacena sólo durante un mes en - un recipiente resistente a la luz y en el refrigerador.

Preparación del patrón.- Se pipetea un volumen de la solución es-tandar stock de tiamina equivalente a 100 mcg de tiamina HCl pa -- trón de referencia, en un matraz volumétrico de 100 ml y se diluye con una solución ácida de cloruro de potasio hasta el aforo. Se - diluye 10 ml. de ésta solución a 50 ml. con solución ácida de clo-ruro de potasio. Cada ml. de la solución resultante contiene 0.2 mcg de tiamina HCl patrón de referencia.

Preparación de la muestra:

Se pesan con precisión cerca de 1 g. de levadura seca en un vaso, se agregan 20 ml. de H_2SO_4 0.1 N y se mezclan. Se lavan las paredes del recipiente con una pequeña cantidad de ácido sulfúrico 0.1 N y se calienta la mezcla bajo presión a 121°C durante 30 min. Se enfría y se dispersan los grumos que se hayan formado. Se

transfiere a un matraz volumétrico de 100 ml. y se afora con agua. Se transfiere una alícuota de esta solución equivalente a aproximadamente 20 mcg de tiamina HCl a un tubo de centrifuga de 100 ml. Se ajusta el pH a 4.0-4.5 con acetato de sodio 2 M, usando bromocresol verde como indicador. Se agregan 5 ml de una solución o dispersión al 10% de enzimas diastásicas, y se calienta a 45-50°C durante 3 horas. Se enfría y se centrifuga la mezcla. Cuantitativamente se transfiere el líquido sobrenadante a un matraz volumétrico de 100 ml. Se lava el residuo con 10 ml. y con 5 ml. de ácido sulfúrico 0.1 N, centrifugando cada vez y agregando los lavados al extracto principal. Se afora con agua y se mezcla.

Procedimiento:

A tres tubos o vasos de precipitado de aproximadamente 40 ml. de capacidad, se pipetea 5 ml. de la solución patrón. A cada uno de dos de estos tubos se agregan rápidamente (en 1 o 2 seg.) y agitando, 3 ml. del reactivo oxidante y después de 30 seg. se agregan 20 ml. de alcohol isobutílico, después mezclar vigorosamente durante 90 seg.

Preparar un blanco con el tubo restante para el patrón, substituyendo en lugar del reactivo oxidante, un volumen igual de NaOH 3.5 N y procediendo de la misma manera.

A tres tubos similares se pipetea 5 ml. de la muestra preparada y se trata de la misma manera que la descrita para los que contienen la solución patrón.

A cada uno de los tubos de la muestra y del patrón, agregar 2 ml. de alcohol deshidratado, agitar y dejar que se separen las dos fases, decantar o pipetear 10 ml. del sobrenadante. Medir la fluorescencia.

Calculos:

La cantidad de mcg de $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$ en cada 5 ml. de la muestra preparada está dado por la fórmula $(A-b)/(S-d)$, en donde A es el promedio de las lecturas de la muestra, b es la lectura del blanco de la muestra, S es el promedio del patrón y d es la lectura de el blanco del patrón. Calcular la cantidad mcg de tiamina HCl en la muestra basándose en la alícuota que se tomó.

3.3.10.- DETERMINACION DE RIBOFLAVINA (15,31)

Soluciones especiales:

Solución estándar concentrada de riboflavina.- A 50 mg. de riboflavina patrón USP de referencia, previamente secado a $105^{\circ}C$ durante dos horas en un desecador sobre pentóxido de fósforo y protegido de la luz, agregar 300 ml. de ácido acético 0.02 N y calentar la mezcla en un baño de vapor, agitando frecuentemente, hasta que la riboflavina se haya disuelto. Enfriar y agregar suficiente ácido acético 0.02 N para hacer 500 ml. Almacenar bajo tolueno o con nitrógeno en el refrigerador. Diluir una porción de esta solución usando ácido acético 0.02 N hasta tener una concentración de 10 mcg de riboflavina por ml., para tener así la solución estándar concentrada de riboflavina. Almacenar bajo tolueno en el refrigerador.

Preparación del patrón.- Diluir 10 ml de la solución estandar concentrada de riboflavina con agua para hacer 100 ml. Cada ml. contiene 10 mcg de riboflavina. Preparar esta solución fresca para cada ensayo.

Preparación de la muestra:

Poner 5.0 g. exactamente pesados de levadura seca en un matraz con 50 ml. de HCl 0.1 N, dispersar bien la muestra en el líquido. Calentar la mezcla en un autoclave a 121°C durante 30 min. y enfriar. Si se forman grumos, agitar la mezcla hasta que estos queden completamente dispersados. Ajustar el pH de la mezcla agitando vigorosamente a pH 6-6.5 con NaOH 0.1 N, después agregar HCl 0.1 N inmediatamente hasta que ya no se forme precipitado (usualmente a pH aproximadamente de 4.5 el punto isoeléctrico de muchas de las proteínas presentes). Diluir la mezcla con agua hasta un volumen de 250 ml. Filtrar y a una alícuota del filtrado de 25 ml. agregar con agitación vigorosa, una solución de NaOH 0.1 N para tener un pH entre 6.6 y 6.8 diluir esta solución con agua a un volumen de 200 ml. esta solución contendrá aproximadamente 0.1 mcg de riboflavina por ml. Si se produce una turbiedad en la solución, se debe filtrar nuevamente.

Procedimiento:

A cuatro tubos o vasos de precipitado, agregar 10 ml. de la muestra preparada. A dos de estos tubos agregar 1 ml de la solución estándar y mezclar, a los dos tubos restantes agregar 1 ml. de agua y mezclar. A cada uno de los tubos agregar 1 ml de ácido

acético glacial, mezclar, después agregar con agitación 0.5 ml de la solución de permanganato de potasio (1 en 25) y dejarla reposar por dos minutos. A cada tubo agregar agitando 0.5 ml de H_2O_2 . El color del permanganato se destruye en 10 seg. Agitar los tubos vigorosamente hasta que el exceso de oxígeno se haya liberado. Medir la fluorescencia de todos los tubos designando la lectura promedio de los tubos que contienen solo la muestra tratada como I_u , y el promedio de los tubos que contienen la muestra y el patrón como I_s . Después a cada uno de los tubos de los dos tipos agregar 20 ml de hidrosulfito sódico y después de 5 seg medir nuevamente la fluorescencia designando el promedio de las lecturas como I_b .

Calculos:

Calcular la cantidad de mg en base seca de $C_{17}H_{20}N_4O_6$ por cada ml de la muestra preparada por medio de la fórmula:

$$0.0001(I_u - I_b) / (I_s - I_u).$$

3.3.11.- DETERMINACION DE NIACINAMIDA (15,31)

Soluciones especiales:

Solución estandar concentrada de niacinamida.- Se disuelven 50 mg de estandar NF de referencia de niacinamida, previamente secada y almacenada protegida de la luz en un desecador con pentóxido de fósforo, en suficiente solución de alcohol (1 en 4), para hacer 500 ml. Almacénese en el refrigerador. Cada ml de esta solución contiene 100 mcg de niacinamida.

Preparación del estandar.- Transferir 5 ml de la solución estan-

dar concentrada de niacinamida a un matraz volumétrico de 100 ml, diluir a volumen y mezclar. Cada ml de esta solución contienen 5 mcg de niacinamida NF estandar de referencia.

Preparación de la muestra:

Se pesan con exactitud alrededor de 1.5 g de levadura seca y se colocan en un vaso de precipitado. Se agregan 20 ml de ácido sulfúrico 1 N y se mezclan. Se lavan las paredes del recipiente con una pequeña cantidad de ácido sulfúrico 1N y se calienta la mezcla - bajo presión a 121°C por 30 min. Se enfria y se dispersan los grupos que se hayan formado. Se ajusta el pH a 6.8 con solución de sosa, y se transfiere a un matraz volumétrico de 100 ml y se afrora con agua. Si después de reposar el líquido sobrenadante no es claro, hay que filtrar.

Procedimiento:

Transferir a una serie de tres tubos los volúmenes de solución que se indica a continuación: a dos de los tubos transferir 1 ml de la muestra preparada y 0.5 ml de solución de hidróxido de amonio (1 en 5). Tratando cada uno de los tubos individualmente, agregar 5 ml de solución de bromuro de cianógeno (1 en 10). Después de treinta segundos se agregan 2 ml de solución de ácido sulfanílico (el cual se prepara disolviendo 2.5 g de ácido sulfanílico en 15 ml de agua y 3 ml de amoníaco T.S., mezclando y agregando con agitación más amoníaco TS si es necesario, hasta que el ácido se disuelva, se ajusta el pH de la solución a 4.5 con HCl diluido y usando - verde de bromocresol TS como indicador y diluyendo a 25 ml). se ta-

pa el tubo y se agita bien. Dos minutos después de la adición de la solución de ácido sulfanílico colocar el tubo en un colorímetro y de terminar la absorbancia a una longitud de onda de 450 milimicras, con tra un cero marcado por el blanco. Los blancos se preparan como la muestra, excepto que se substituye la solución de bromuro de cianógeno por 5 ml de agua. Se repite el procedimiento utilizando 1 ml del es tandar preparado en lugar de la muestra preparada.

Calculos:

Se calcula la cantidad de mg de niacinamida en cada gramo de la muestra tomada por la formula: $0.5(A_u/A_s) / W$ en donde A_u y A_s son los promedios de las absorbancias de las soluciones de la muestra preparada y del estandar respectivamente y W es el peso en gramos de la muestra tomada.

3.4.- MATERIALES

3.4.1.- FERMENTADOR

Para llevar a cabo las fermentaciones utilizando un medio de cultivo mayor al empleado para las fermentaciones en matraces bañados, se recurrió a unos fermentadores de acero inoxidable que son propiedad del departamento de Microbiología de la Facultad de Química. Estos fermentadores consisten en un cilindro de acero inoxidable cuyas dimensiones son: altura 50 cm. diámetro 30 cm. En la tapa superior del cilindro se encuentran unos tubos también hechos de acero y que sirven para la entrada y salida del aire y otro para el muestreo. Además posee una flecha metálica colocada en el centro de la tapa en un dispositivo con baleros sellados que sirve para agitar el medio de cultivo.

Para hacer una descripción mas detallada del fermentador hay que tocar los puntos importantes para su uso que son: la agitación, la aireación y el muestreo.

-Agitación.- Para llevar a cabo la agitación del medio de cultivo, se utilizó un motor de medio caballo de fuerza el cual sirve para hacer girar la flecha trasmisora y ésta a su vez a la flecha colocada en el centro de la tapa del fermentador. Esta tiene dos paletas colocadas en ángulo recto a la mitad de la flecha y otras dos colocadas en la misma posición pero en la parte inferior. Estas paletas al girar son las que mueven el medio de cultivo. Para ayudar a la agitación, el tanque posee además cuatro bafles de 2.5 cm. de ancho y 20 cm. de largo, colocados transversalmente a las paredes -

del fermentador y que sirven para formar turbulencias en el medio de cultivo.

-Aireación.- Para llevar a cabo la aireación del medio de cultivo, se utilizó un compresor eléctrico para bombear el aire. Este pasa después a una válvula con la cual se regula la cantidad de aire inyectado al medio. Después de esto sigue un filtro el cual esteriliza el aire, éste filtro está hecho con un tubo de acero de 3 pulgadas de diámetro y de 20 cm. de largo, el cual tiene en sus extremos unas tapas fabricadas del mismo material que se unen al tubo por medio de roscas, éstas tapas tienen en su centro un pequeño tubo metálico que sirve para hacer las conexiones con la tubería del aire. El aire se filtra a través de capas de algodón colocadas en todo el interior del filtro. Estas capas de algodón fueron cambiadas cada vez que se llevó a cabo una nueva fermentación, y se esterilizó junto con el fermentador.

Después del filtro, el aire entra por un tubo metálico colocado en la tapa del fermentador, que tiene una forma de "L", para que su extremo quede colocado exactamente debajo de las paletas agitadoras con el objeto de que éstas, además de agitar el medio, sirvan para ayudar a la incorporación del aire en el medio de cultivo. La última parte del sistema de aireación lo forma un pequeño tubo colocado en la tapa del fermentador que sirve para la salida del aire, éste tubo cuyo extremo no llega a tocar el medio tiene en su otro extremo un filtro hecho con algodón a fin de evitar la entrada de microorganismos contaminantes al medio al variar la presión den-

tro del fermentador.

-Muestreo.- Para llevar a cabo el muestreo del medio durante la fermentación se utilizó un tubo colocado en la tapa del fermentador cuyo extremo más largo penetra dentro del medio de cultivo dentro del fermentador. El otro extremo del tubo se conectó a una mangera de hule lo suficientemente larga como para que se puede sifonear, la cual termina en un tubo de vidrio de unos 10 cm. de longitud. En esta mangera de hule se colocó una pinza de Mohr con el objeto de cerrarla y abrirla cuando fuese necesario. El extremo libre del tubo de vidrio se colocó sumergido dentro de un tubo de ensayo con alcohol al 75% , detenido por medio de un tapón de hule, en esta forma se trataron de evitar las contaminaciones al muestrear.

3.4.2.- CEPAS

Las cepas utilizadas en el presente trabajo fueron las siguientes:

- *Candida utilis*, (*Torula utilis*).- Esta levadura fué proporcionada por el departamento de Microbiología de la Facultad de Química de la U.N.A.M.

- *Saccharomyces carbajali*.- Esta levadura no fué posible conseguirla, por lo cual tuvo que ser aislada del aguamiel. Para esto se utilizo un aguamiel obtenido en Tulancingo en el Estado de Hidalgo.

3.4.3.- MELAZAS

Las melazas que se emplearon para llevar a cabo la investigación, fueron proporcionadas por el departamento de Microbiología de la Facultad de Química de la U.N.A.M.

3.4.4.- EQUIPO DE LABORATORIO

Los principales aparatos de laboratorio que se emplearon para llevar a cabo los análisis y experiencias del presente trabajo, son los que se enumeran a continuación.

- 1.- Espectrofotómetro.- Beckman, modelo DB-G, fabricado en Fullerton, Calif. USA.
- 2.- Potenciómetro.- Beckman, modelo Zeromatic II Beckman, Calif. USA.
- 3.- Balanza Analítica.- Mettler, De la casa Mettler de -- Zurich, Suiza.
- 4.- Fluorómetro.- Modelo num. 110, de la casa G K Turner Associates, Palo Alto Calif, USA.
- 5.- Estufa.- Thelco, modelo 19, de la casa Precision -- Scientific Company. Chicago Illinois, USA.
- 6.- Microscopio.- Modelo Bactil - 60, de la casa Watson Barnet, England.

3.4.5.- CRISTALERIA

El material de vidrio que se utilizó, fué el material normal de cualquier laboratorio, (tubos de ensayo, pipetas, matraces, matraces volumétricos, etc.) .

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1.1.- AISLAMIENTO DE SACCHAROMYCES CARBAJALI DEL AGUA-MIEL

Para llevar a cabo el aislamiento de la levadura, se recurrió a los estudios hechos por Rufz Oronoz (26), se procedió de la siguiente manera:

Se realizaron varias siembras en un medio de Sabouraud. Estas siembras fueron hechas a diferentes diluciones 1/1 000, 1/10 000, 1/100 000, para lograr obtener así las colonias bien separadas unas de otras y poder tener cultivos posteriores que procedan de una célula. En el desarrollo práctico se observó que con las diluciones de 1/1 000 y 1/10 000, las colonias eran numerosas y su diferenciación resultaba difícil, ya que se mezclaban entre sí, pero con la dilución de 1/100 000 se obtuvieron las colonias bien diferenciadas unas de otras y así se pudieron hacer resiembras que procedían de una sola colonia.

Los resultados obtenidos en el Sabouraud, después de hacer tres resiembras, fueron que había cuatro tipos de levadura diferentes por sus caracteres macroscópicos. De éstas se escogió una para su identificación y fue elegida por ser la que más se había desarrollado.

Las colonias se incubaron a una temperatura entre 28° y 30°C y se observaron a las 48 horas, resultando que la levadura seleccionada, se desarrolló en forma de colonias circulares, de color blanco grisáceo, con bordes enteros, de superficie convexa y algunas casi planas, húmedas y brillantes, lisas menos en el centro donde son un poco rugosas y levantadas, la parte central toma con el tiempo un color moreno mientras que en la periferia continúa de color blanco grisáceo, así mismo se conservan húmedas y con bastante brillo.

4.1.2.- CARACTERES MACROSCOPICOS EN MEDIO LIQUIDO

En el cultivo de la levadura utilizándose aguamiel simple como medio de cultivo líquido, se obtuvieron los siguientes resultados: La levadura a las 24 horas de haber sido sembrada, e incubada a una temperatura de 28° a 30°C, se encontraba en el fondo de los tubos, en forma de un abundante depósito de color blanco grisáceo, teniéndose también un enturbiamiento del medio, al mismo tiempo que un desprendimiento de gas debido a una fermentación muy activa. A los cuatro días, la fermentación se detuvo, a los diez días el medio se había clarificado y se había formado un depósito de color blanco amarillento. No se observó ni la formación de anillo ni de velo en el medio.

4.1.3.- CARACTERES MICROSCOPICOS DE LAS CELULAS DE LA LEVADURA

Las levaduras del aguamiel, fueron observadas a las 48 horas de haber sido sembradas en el medio, teniéndose que eran células de diferentes formas y estructuras, que las había de for

ma alargada y redonda con vacuolas, que formaban ciertas cadenas que tenían brotes laterales y algunas con granulaciones oscuras en el protoplasma. Se notaban pocas vacuolas en las células, la mayoría no las tenían. A los tres días, aparecieron glóbulos de grasa que llegaron a hacerse muy numerosos. Después de varios días, aparecieron las primeras ascas, con tres y cuatro ascosporas, aumentando después en gran cantidad.

Al observarse las levaduras del medio de Sabouraud, se tuvo que la gran mayoría de las células tenían forma elíptica alargada, formándose falsos micelios con gran cantidad de brotes laterales, al principio el protoplasma se notaba granuloso, después adquirió vacuolas y grasa. A los 45 días aparecieron las primeras ascas, también con tres y cuatro ascosporas.

4.1.4.- CARACTERES BIQUÍMICOS

Se hicieron pruebas de fermentación utilizando para ello tubos con 10 m. de medio 31.4 hechos con los siguientes azúcares: xilosa, galactosa, maltosa, lactosa, sacarosa, rafinosa y glucosa. - - Las experiencias se realizaron por triplicado para evitar algún posible error, teniéndose los resultados que se presentan:

xilosa	galactosa	maltosa	lactosa	sacarosa	rafinosa	glucosa
+	-	+	-	+	+	+
+	-	+	-	+	+	+
+	-	+	-	+	+	+

Cuadro num. 4

4.1.5.- CUADRO GENERAL DE LA LEVADURA

Basándome en los resultados obtenidos en los puntos 4.1.1. a 4.1.4., se pudo concluir que la levadura pertenece al género *Saccharomyces*, por los caracteres siguientes: originar una fermentación alcohólica e intensa; poseer células esféricas, ovals, elípticas y - - alargadas; formar rudimentos micelianos, ascas obtenidas por conjugación o partenogénesis, con esporas redondas de paredes lisas; vegetación en los líquidos formando depósito y en ningún caso anillo o velo.

A continuación se presenta el cuadro completo de clasificación de esta levadura

Reino	Vegetal
Phyllum	Talophyta
Subphyllum	Fungi
Clase	Ascomycetes
Orden	Endomycetales
Familia	Endomycetaceae
Subfamilia	Saccharomycoidae
Tribu	Saccharomycetaceae
Género	<i>Saccharomyces</i>
Especie	carbajali

Cuadro num. 5

	1o. paso	2o. paso	3o. paso	4o. paso	5o. paso	6o. paso	7o. paso	8o. paso
horas	24 48	24 48	24 48	24 48	24 48	24 48	24 48	24 48
Torula utilis	+ +	+ +	++ ++	++ +++	++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++
	+ +	+ ++	++ ++	++ +++	++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++
	+ +	+ +	++ ++	++ +++	++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++
Sacch. carbajali	+ +	+ ++	++ +++	++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++
	+ +	+ ++	++ +++	++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++
	+ +	+ ++	++ +++	++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++

medio utilizado: agar melaza

temperatura de incubación: 28°-30°C

pH del medio: 4.5

+ crecimiento pobre

++ crecimiento regular

+++ crecimiento bueno

++++ crecimiento abundante

4.1.6.- Adaptación al medio de melazas

Método 3.2.2.

4.1.7.- DETERMINACION DEL pH OPTIMO PARA EL CRECIMIENTO DE LAS LEVADURAS

pH	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0
C. utilis	++	+++	++++	++++	+++	++	++	+	+
	++	+++	++++	++++	+++	++	++	+	+
	++	+++	++++	++++	+++	++	++	+	+
S. car bajali	++	+++	+++	++++	++++	++++	+++	++	+
	++	+++	+++	++++	++++	++++	+++	++	+
	++	+++	+++	++++	++++	++++	+++	++	+

Cuadro num. 6

- + crecimiento pobre temperatura 25°- 30°C
 ++ crecimiento regular medio de melaza
 +++ crecimiento bueno concentración de azúcar
 ++++ crecimiento abundante 10%

Método 3.2.3.

4.1.8.- TEMPERATURA OPTIMA DE CRECIMIENTO DE LAS LEVADURAS

Método 3.2.5.

levadura	5°C	20°C	25°C	30°C	37°C	40°C
Saccharomyces carbajali	+	++	+++	++++	+++	+
Candida utilis	+	++	+++	++++	++	+

Cuadro num. 7

pH del medio 4.5

medio de melaza agar

tiempo de incubación 48 hr.

4.1.9.- CRECIMIENTO DE LAS LEVADURAS EN AGITACION EN MATRACES
BAFLEADOS

Cuando se hizo la determinación de la concentración adecuada de azúcares para el crecimiento óptimo de las levaduras (método - 3.2.4.), se obtuvo el crecimiento de éstas expresado en peso. Para saber cual era la concentración óptima de azúcares se calculó el rendimiento de cada una de las levaduras a las diferentes concentraciones de azúcares, teniéndose los siguientes resultados:

Saccharomyces carbajali							
1% de azúcares				2.5% de azúcares			
hr.	mg lev./100 ml		promedio	hr.	mg lev./100 ml		promedio
0	100	100	100	0	100	100	100
6	135	126	130	6	135	141	138
12	162	149	155	12	193	212	202
24	200	290	245	24	424	510	467
48	210	237	263	48	560	495	527
72	216	289	252	72	540	503	521
5% de azúcares				10% de azúcares			
hr.	mg lev./100 ml		promedio	hr.	mg lev./100 ml		promedio
0	100	100	100	0	100	100	100
6	165	142	155	6	135	123	129
12	230	291	260	12	320	295	307
24	974	1010	992	24	2735	2833	2634
48	1025	993	1009	48	2816	2714	2765
72	1013	1090	1055	72	2825	2730	2778

Candida utilis							
1% de azúcares				2.5% de azúcares			
hr.	mg lev./100 ml	promedio		hr.	mg lev./100 ml	promedio	
0	100	100	100	0	100	100	100
6	108	115	112	6	145	150	148
12	122	119	120	12	190	187	188
24	198	179	188	24	465	493	479
48	195	195	195	48	495	500	498
72	200	190	195	72	504	555	529
5% de azúcares				10% de azúcares			
hr.	mg lev./100 ml	promedio		hr.	mg lev./100 ml	promedio	
0	100	100	100	0	100	100	100
6	150	152	151	6	150	168	159
12	198	261	229	12	380	410	395
24	970	900	936	24	2740	2798	2769
48	1025	1040	1032	48	2810	2890	2850
72	1095	1100	1097	72	2875	2870	2873

Saccharomyces carbajali		Candida utilis	
% azúcares	rendimiento %	% azúcares	rendimiento %
1.0	25.2	1.0	19.5
2.5	20.84	2.5	21.16
5.0	21.02	5.0	21.94
10.0	27.78	10.0	28.73

Cuadro num. 8

4.1.10.- CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES

La determinación de la cantidad de azúcares reductores totales presentes en el medio de cultivo, se llevó a cabo siguiendo la técnica de Underkofler(3.3.7.).

Fué necesario hacer diluciones de las muestras que se habían tomado del fermentador, para poder llegar a una concentración que estuviera entre 1 y 10 mg. de azúcar por cada 5 ml. de solución, ya que es en este rango de concentraciones donde se puede determinar la cantidad de azúcares utilizando este método de análisis. Las diluciones que se realizaron fueron las siguientes: Para las primeras determinaciones en las etapas más tempranas de la fermentación a la muestra tomada del fermentador, después de haber separado la levadura del medio, se tomaron 10 ml. de éste y se llevaron a 500 ml. para realizar el análisis. Para las últimas determinaciones en las fases finales de la fermentación se hizo la siguiente dilución; del medio ya separado de la levadura, se tomó una alicuota de 4 ml. los cuales se aforaron a 50 ml con agua destilada. De ésta última dilución, se tomaron 5 ml. para el análisis.

Para saber la concentración del azúcar fué necesario realizar una curva patrón. Los resultados de esta curva, al graficar, -- dan una línea casi recta sobre la cual se calcularon las concentraciones de las muestras diluídas.

Consumo de azúcares reductores (método 3.3.7)

Saccharomyces carbajali					Candida utilis			
hora	ml tio- sulfato gastado	muestra diluida mg/5ml	conc. real en g/100ml	azúcar residual %	ml tio- sulfato gastado	muestra diluida mg/5ml	conc. real en g/100ml	azúcar residual %
0	2.4	11.6	11.6	100	2.8	11.0	11.0	100
4	2.8	11.0	11.0	97.06	3.1	10.6	10.6	96.5
8	3.2	10.7	10.7	86.7	3.25	10.25	10.25	93.3
12	3.4	10.0	10.0	86.2	3.8	9.4	9.4	85.1
16	4.0	9.0	9.0	77.58	4.75	7.75	7.75	70.8
20	4.2	8.6	2.15	18.53	4.6	7.9	1.98	18.1
24	5.3	7.3	1.83	15.77	5.2	7.1	1.79	16.3
28	5.8	6.0	1.5	12.93	6.25	5.58	1.31	12.0
32	5.5	6.6	1.65	14.22	6.6	4.8	1.2	11.0
36	6.1	5.7	1.43	12.32	6.8	4.6	1.16	10.58
40	5.8	6.0	1.50	12.93	6.55	4.9	1.24	11.32

	Curva patrón										
mg sacarosa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	blanco
ml tiosulfato gastado	9.0	8.5	7.7	7.3	6.5	5.8	5.4	4.9	3.9	3.4	9.7

Cuadro núm. 9

4.1.11.- CRECIMIENTO DE LAS LEVADURAS EN LOS FERMENTADORES

Cuando se llevaron a cabo las fermentaciones para observar el consumo de azúcares reductores totales, se observó de una manera simultanea el crecimiento de las levaduras, ya que a todas las muestras tomadas del fermentador cada cuatro horas se le determinó la cantidad en peso de la levadura. Para saber el peso exacto de las levaduras, fué necesario determinar el porcentaje de humedad que tenían éstas después de haber sido separadas del medio de cultivo por centrifugación. Se encontró que la humedad promedio de las levaduras así tratadas fué de 46.6% en el caso de *Sacharomyces carhajali* y de 38.8% en el caso de *Candida utilis*. El método por el cual se hizo la determinación de humedad es el expuesto en el punto 3.3.4.

Cuando se tuvo la humedad promedio de las levaduras, fué posible calcular el peso de éstas en base seca y con este dato, al obtener su logaritmo, trazar una gráfica en donde resulta claro observar el crecimiento de las levaduras (gráfica num. 2).

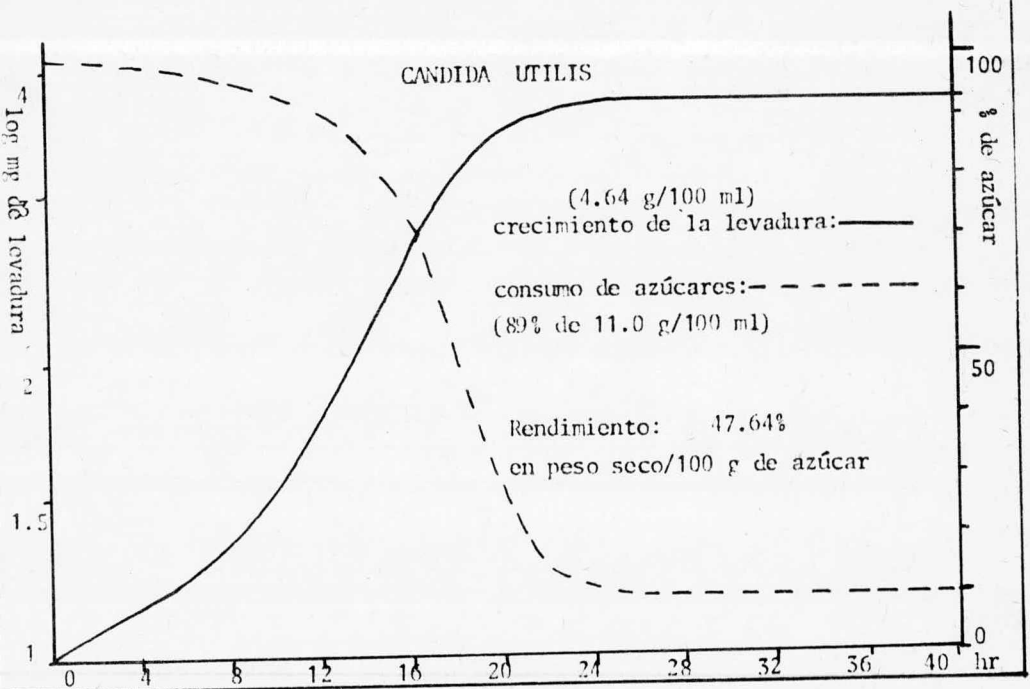
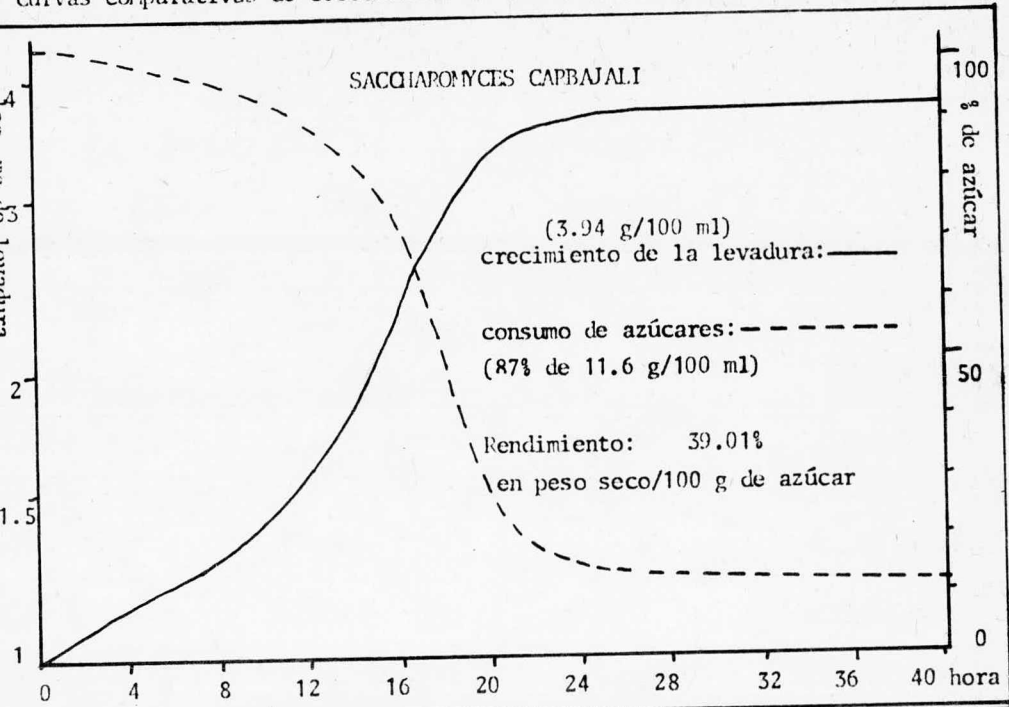
Los resultados del crecimiento de las levaduras en los fermentadores se encuentran en el cuadro num. 10, en donde se dan los siguientes datos: el peso de la levadura húmeda, el peso calculado de la levadura seca y el logaritmo de éste último dato. Además se encuentra indicada la humedad encontrada para cada una de las levaduras.

Crecimiento de las levaduras en los fermentadores

Saccharomyces caribajali			
hora	mg de lev. húmeda/100 ml	mg de lev. seca/100 ml	log.
0	18.7	10	1.0000
4	39.3	21	1.3322
8	50.6	27	1.4313
12	61.8	33	1.5185
16	1846.4	986	2.9938
20	6850.0	3658	3.5632
24	7300.0	3898	3.5908
28	7410.0	3957	3.5973
32	7576.0	40.45	3.6069
36	7528.0	3913	3.5925
40	7235	3863	3.5869
Humedad promedio de la levadura: 46.6%			

Candida utilis			
hora	mg de lev. húmeda/100 ml	mg de lev. seca/100ml	log.
0	20.0	12.2	1.0863
4	33.1	20.2	1.3053
8	55.3	33.7	1.5276
12	181.0	110.8	1.5276
16	1997.1	1222.2	3.0871
20	6960.0	4259.5	3.6293
24	7575.0	4624.9	3.6651
28	7600.0	4651.2	3.6676
32	7603.0	4653.0	3.6677
36	7580.0	4638.9	3.6664
40	7590.0	4645.0	3.6669
Humedad promedio de la levadura: 38.8			

Curvas comparativas de crecimiento de las levaduras y consumo de azúcar.



Gráfica núm. 2

4.1.12.- RENDIMIENTOS

Con los datos obtenidos de las levaduras en los fermentadores (4.1.11) y los del consumo de azúcares reductores (4.1.10), fué posible calcular el rendimiento de cada una de las levaduras. Para esto se tomó como crecimiento máximo de la levadura, un promedio de los pesos de estas de los datos que se obtuvieron entre las 24 y las 40 horas de fermentación. Este resultado fué relacionado con el promedio de azúcar consumido por las levaduras en ese mismo lapso de tiempo expresado en forma de porcentaje. Los rendimientos que se obtuvieron se encuentran indicados a continuación:

Saccharomyces carbajali		Candida utilis	
g lev./100 ml base seca	% azúcar consumida	g lev./100 ml base seca	% azúcar consumida
3.9352	87.07	4.6426	88.77
Rendimiento: 45.19% en peso		Rendimiento: 52.3% en peso	

Cuadro núm. 11

4.1.13.- PROTEINAS

La determinación de proteínas en las levaduras, se realizó después de haberlas tratado por el método (3.2.6). El ensayo se llevó a cabo empleando el método de Kjeldhal (3.3.1).

Se realizaron dos series de análisis para cada una de las levaduras para determinar la cantidad de proteínas: una a la levadura desarrollada en los matraces bafleados y otra a la de los fermentadores. El análisis se realizó por triplicado para la leva

dura desarrollada en matraces bafleados y por quintuplicado para la obtenida en los fermentadores.

levadura	valor promedio % en peso seco de levadura	
	matraces bafleados	fermentadores
S. carbajali	49.43	49.63
Candida utilis	50.15	50.75

Cuadro núm. 12

4.1.14.- GRASA

La determinación de grasa en las levaduras obtenidas en los fermentadores, se llevó a cabo siguiendo la técnica indicada en el punto (3.3.2). Esta determinación se realizó por duplicado para cada una de las levaduras obtenidas en los fermentadores, obteniéndose los siguientes resultados:

levadura	valor promedio expresado en % en peso seco
Saccharomyces carbajali	1.61
Candida utilis	1.99

Cuadro núm. 13

4.1.15.- FIBRA CRUDA

La determinación de fibra cruda se realizó en las levaduras desarrolladas en los fermentadores, de acuerdo con la técnica indicada en el punto (3.3.3.). El análisis se llevó a cabo por duplicado para cada una de las levaduras.

levadura	valor promedio expresado en % peso seco
Saccharomyces carbajali	1.55
Candida utilis	1.99

Cuadro núm. 14

4.1.16.- HUMEDAD

Para hacer la determinación de humedad en la levadura, ésta tuvo que ser tratada primeramente siguiendo la técnica indicada en el punto (3.2.6.) para ser lavada y secada. El análisis se llevó a cabo de acuerdo con la metodología expuesta en el punto (3.3.4.). La determinación se realizó en las levaduras tanto de los matraces bafleados como en la de los fermentadores.

levadura	valor promedio % en peso seco de levadura	
	matraces bafleados	fermentadores
S. carbajali	7.82	7.90
Candida utilis	7.96	8.04

Cuadro núm. 15

4.1.17.- CENIZAS

La determinación de cenizas se llevó a cabo siguiendo el método indicado en el punto (3.3.5.) aplicandose tanto a las levaduras obtenidas en los matraces bafleados como en los fermentadores.

levadura	valor promedio % en peso seco de levadura	
	matraces bafleados	fermentadores
S. carbajali	7.82	7.90
Candida utilis	8.12	8.21

Cuadro núm. 16

4.1.18.- CARBOHIDRATOS

Esta determinación se llevó a cabo de acuerdo con el método (3.3.6.), obteniendose los resultados utilizando los valores promedio de las determinaciones anteriores

levadura	valor promedio expresado en % en peso seco
Saccharomyces carbajali	30.43
Candida utilis	30.41

Cuadro núm. 17

4.1.19.- FOSFORO

La determinación de fósforo se realizó siguiendo el método indicado en el punto (3.3.8.). El fósforo se determinó en forma de P_2O_5 .

levadura	valor promedio expresado en % en peso seco
Saccharomyces carbajali	1.61
Candida utilis	1.88

Cuadro núm. 18

4.1.20.- TIAMINA

A las levaduras obtenidas en los fermentadores, se les determinó la cantidad de tiamina que contenían, de acuerdo con la técnica especificada en el punto (3.3.9.). Para hacer esta determinación se pesó aproximadamente un gramo de muestra, el cual se diluyó hasta tener una concentración de aproximadamente 0.2 mcg/ml. Al calcular el factor de dilución, se encontró que tenía el valor de - - 133.3333 .

Para conocer la cantidad de mcg de tiamina en cada 5 ml de la muestra preparada, se aplicó la siguiente fórmula: $(A-b)/(S-d)$, - en donde (A) es el promedio de las lecturas de la muestra, (b) el la lectura del blanco de la muestra, (S) es el promedio de las lecturas del patrón y (d) es la lectura del blanco del patrón.

Para conocer la concentración real de la muestra, la cantidad de mcg de tiamina en cada 5 ml de la muestra fué multiplicado - por el factor de dilución y dividido entre el peso de la muestra tomada.

Los resultados obtenidos son los que se indican a continuación:

levadura	lecturas fluorómetro			muestra tratada mcg/5ml	peso muestra g.	mcg/g resultado
	blanco	muestra	promedio			
patrón	0	80 80.5	80.25			
S. carba- jali	2	83 83.5	83.25	1.013	1.000	134.99
C. utilis	2	86 87.0	86.50	1.053	1.000	140.40

Cuadro núm. 19

4.1.21.- RIBOFLAVINA

A las levaduras desarrolladas en los fermentadores, se les determinó la cantidad de riboflavina que poseían, utilizando la técnica especificada en el punto 3.3.10. Para llevar a cabo esta determinación, fué necesario hacer diluciones a los 5 g. de muestra que se tomaron, para poder llégar a una concentración de riboflavina de 0.1 mcg/ml. Al calcular el factor de dilución, se encontró que tenía el valor de 2 000.

Para conocer la cantidad de riboflavina que había en 10 ml de la muestra preparada, se utilizó la fórmula: $0.0001(Iu-Ib)/(Is-Iu)$ en donde (Iu) es la lectura promedio de los tubos que contienen solo la muestra preparada, (Is) es el promedio de las lecturas de los tubos que contienen la muestra y el patrón y (Ib) es la lectura promedio de los tubos después de haberles agregado el hidrosulfito de sodio.



Los resultados que se obtuvieron son los que se indican a continuación:

levaduras	lecturas promedio			muestra tratada	peso muestra	resultado
	Iu	Ib	Is	mcg/10ml	g.	en mg/g
S. carbajali	56	31	80	0.1041	4.9989	0.04169
C. utilis	52	21	80	0.1107	5.0000	0.04428

Cuadro núm. 20

4.1.22.- NIACINAMIDA

La cantidad de niacinamida que poseía cada una de las levaduras se determinó siguiendo la técnica indicada en el punto 3.3.11. Para calcular esta cantidad se utilizó la siguiente fórmula:

$0.5 \times (Au/As)/W$ en donde Au y As, son los promedios de las absorbancias de las soluciones de la muestra preparada y del patrón respectivamente y W es el peso en g. de la muestra tomada.

Los resultados que se obtuvieron son los siguientes:

levadura	absorbancia		promedio	muestra g.	resultado mcg/g
S. carbajali	0.475	0.460	0.4675	1.500	296.0
C. utilis	0.480	0.485	0.4825	1.500	306.4

Cuadro núm. 21

CAPITULO 5

DISCUSION

El primer problema que se tuvo que afrontar al llevar a cabo este estudio, fué el de conseguir la cepa adecuada de levadura, - ya que las que se pudieron conseguir, presentaban diferencias al ser comparadas con los datos encontrados en la bibliograffa (26-30); por lo cual se decidió no utilizarlas. Debido a esto, fué necesario aislar la levadura directamente del aguamiel.

Al sembrar el aguamiel en un medio de Sabouraud, se desarrollaron principalmente tres tipos de levaduras. De entre éstas, - se escogió de una manera arbitraria a la que más se había desarrollado. La levadura aislada en el Sabouraud, para ser identificada, tuvo que ser estudiada en sus caracteres macroscópicos en medio sólido, caracteres microscópicos de las células de la levadura y en sus caracteres bioquímicos, encontrándose que los resultados obtenidos indican que la levadura pertenece al género *Saccharomyces* y que es la levadura que el Dr. Rufz Oronóz clasificó como *Saccharomyces carbajali*.

Posteriormente, se desarrolló un medio de agar melaza, el

cual fué utilizado en la adaptación y crecimiento de las levaduras. Se llevaron a cabo determinaciones del crecimiento de las levaduras a diferentes concentraciones de azúcar, pH, temperatura, con el objeto de encontrar cuáles eran las condiciones óptimas para el desarrollo de cada especie de levadura.

En la clarificación de las melazas utilizadas para el medio de cultivo, se presentó el problema de no lograr una completa eliminación de las sustancias indeseables al precipitarlas al esterilizar el medio en el autoclave. Al principio se obtuvieron las levaduras en un medio con melaza sin tratar, observandose que las colonias presentaban colores oscuros y que en los medios líquidos, al ser centrifugados, se formaba una mezcla de levaduras y sustancias extrañas. Para resolver este problema, se encontró que al clarificar el medio, durante el cambio de pH de básico a ácido, el precipitado se formaba en gran cantidad, por lo cual se decidió tratar la melaza de esta forma.

Para enriquecer el medio de cultivo, se utilizó una cierta cantidad de agua de cocimiento de maíz, para facilitar factores de crecimiento para el mejor crecimiento de la levadura. Respecto al nitrógeno y al fósforo utilizados en forma de sales inorgánicas en los medios de cultivo, no se realizó un estudio de la cantidad óptima de cada uno de ellos para cada una de las levaduras, ya que las cantidades utilizadas dieron buenos resultados para ambas, estando de acuerdo a las tesis expuestas en la bibliografía (7-30).

La concentración de azúcares del medio se tomó en grados

Brix, variándose esta concentración entre uno y diez grados Brix en las diferentes fermentaciones realizadas, con el objeto de determinar la concentración óptima de azúcares para el mejor crecimiento de las levaduras.

Sabíamos que las levaduras al llevar a cabo la fermentación producen una cantidad considerable de alcohol y se sabía también que a mayores concentraciones de alcohol, el desarrollo de la levadura se veía inhibido, por lo cual para evitar esto, se utilizaron medios de cultivo con un máximo de 10°Brix y se le proporcionó una aireación adecuada con el mismo motivo.

Con los resultados del crecimiento de las levaduras en los matraces bafleados, se encontró que la levadura tenía un rendimiento en relación con la concentración de azúcar más elevado cuando ésta era de un 10% .

Posteriormente se decidió observar el comportamiento de *Saccharomyces carbajali* en un medio de cultivo de mayor volumen con las condiciones que se habían encontrado como óptimas. Durante las fermentaciones se determinaron el consumo de azúcares y la cantidad en peso de levadura que se desarrollaba, para posteriormente calcular el rendimiento de cada levadura. Se encontró al graficar estos resultados que las levaduras tenían el crecimiento muy similar al típico de los microorganismos desarrollados en medio de cultivo líquido, en estas gráficas es posible observar las diferentes fases que la componen, encontrándose que las fases son muy similares para las dos levaduras.

De la serie de datos obtenidos del crecimiento de las levaduras, consumo de azúcares y rendimientos, se puede decir que *Saccharomyces carbajali* da unos resultados similares a los de *Candida utilis*, aunque un poco más bajos. Esto se puede deber a que la levadura no este todavía bien adaptada al medio de cultivo, pero en sí, -- los resultados si son comparables.

Respecto a los análisis químicos a los que fueron sometidas las levaduras, éstos fueron los que recomiendan el AOAC, el AACC la NF y la USP, para las determinaciones de proteínas, grasa, fibra cruda, cenizas y humedad.

Para la determinación de azúcares reductores, se escogió el método de Underkofler, por las siguientes razones: la cantidad de muestra que se tenía que analizar de una misma fermentación debía -- ser pequeña, y éste siendo un método semi-microquímico, nos permitió aprovechar una pequeña cantidad de medio para que se hiciera la determinación de azúcares, aprovechando el resto de la muestra para -- los demás análisis. Los azúcares reductores del medio se reportarán siempre como totales. No se tomaron en cuenta los reductores directos porque por el método de clarificación de la melaza, los azúcares no reductores se hidrolizaban, lo cual se comprobó determinando los reductores totales en el medio antes y después de clarificar.

El método empleado para la determinación del fósforo en la levadura, fué seleccionado ya que presenta la ventaja de que en el medio excesivamente ácido evita la formación de ácido silicomolibdico el cual interfiere en la reacción de coloración alterando los re-

sultados (30). El bisulfito de sodio se emplea para evitar la posi
ble interferencia de nitritos.

En cuanto a los análisis de las vitaminas se siguieron -
las técnicas usuales proporcionadas por la NF y la USP. Se determi
naron solo la tiamina, riboflavina y niacinamida, por ser éstas las
vitaminas que normalmente se analizan para cubrir los requerimien -
tos de la USP y del NF.

Los resultados de los análisis de estas tres vitaminas -
nos dicen que la cantidad de éstas en *Saccharomyces carbajali* es un
poco menor que la cantidad presente en *Candida utilis*, sin embargo,
resultan superiores a las especificadas como mínimas en la biblio -
grafia anterior.

CONCLUSIONES

Toda la serie de resultados tanto del crecimiento de las levaduras, como los del análisis químico de éstas, nos dicen que *Saccharomyces carbajali* es una levadura similar a *Candida utilis*.

La levadura *Saccharomyces carbajali*, obtenida del aguamiel o del pulque, puede ser una levadura que esté a la altura de competir cuantitativamente con *Candida utilis* para la obtención en gran escala de biomasa.

Es de hacerse notar, que para dar una última palabra en cuanto al uso de *Saccharomyces carbajali* como una levadura adecuada para la obtención de proteínas o de vitaminas, aptas para el consumo humano o animal, es necesario realizar un estudio cualitativo de esta levadura no sólo de sus proteínas, sino también de sus vitaminas y de todos los demás factores que pueden influir en su toxicidad, en su valor biológico, en su valor energético, en su digestibilidad, etc. Mientras tanto, con los datos obtenidos en el presente estudio, podemos concluir que *Saccharomyces carbajali* es una levadura que merece ser estudiada de una manera más profunda ya que es apta para su producción en gran escala, además de poseer los requisitos cuantitativos necesarios para ser una levadura que se emplee para la producción de proteínas.)

Hay que recordar que *Candida utilis* ha llegado a su estado actual de productividad y de calidad, después de más de 60 años de -

estudio, habiendose realizado en ella varias mejoras para optimizar sus cualidades. Al observar esto, nos atrevemos a pensar que Saccharomyces carbajali es susceptible de realizar en ella adaptaciones similares tendientes a hacerla más productiva y a mejorar su calidad nutritiva, con lo cual puedan alcanzar un nivel tan elevado en estos aspectos como el que actualmente tiene Candida utilis.]

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

- 1.- Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, W. C. Shaefer.- American association of Cereal Chemists, Inc., - St. Paul Minnesota, 1969, 40-56.
- 2.- Adame José fernando.- Fermentaciones alcoholicas de melazas mediante un proceso continuo.- Tesis Fac. Química UNAM, México 1947
- 3.- Aiza Torres Agripina.- Contribución al estudio de la flora microbiana del aguamiel.- Tesis Fac. Química UNAM, México 1945.
- 4.- AOAC.- Official Methods of Analisis, of the Association of Official Agricultural Chemists.- 10a. ed. Washington, D.C. USA 1965.
- 5.- Arroyo P. Pedro.- La Situación Nutricional de México. Tecnología de Alimentos, Vol. V. Núm. 4, 1970
- 6.- Bourges Hector.- La participacion de la tecnología de alimentos en la solución de los problemas nutricionales.- Tecnología de Alimentos, año 7, Núm. 4, 1972
- 7.- Colin Balde Ernesto.- Condiciones Óptimas para el desarrollo de las levaduras que se encuentran en el pulque.- Tesis Fac. Químicas UNAM, 1951.
- 8.- E.F. Cook y Martin.- Farmacia Práctica de Remington. Ed. Uthea, 2a. Edic. México 1953 p. 1074-1075.
- 9.- Encuestas Nutricionales en México.- Edición de la división de nutrición INN, México 1963.

- 10.- W.C. Frazier.- Microbiología de los Alimentos.- 2a. ed. Editorial Acribia, Zaragoza España, 1972.
- 11.- Hugo Haen.- Bioquímica de las Fermentaciones.- 1a. ed. Editorial Aguilar, Madrid España, 1956.
- 12.- Jay, M.J.- Microbiología Moderna de los Alimentos. 1a. ed.- Zaragoza, España, Editorial Acribia, 1972.
- 13.- Jorgensen.- Microbiología de las Fermentaciones Industriales.- Editorial Acribia, Zaragoza, España, 1959.
- 14.- Kirk.-Othmer.- Encyclopaedia of Chemical Technology. 2a. ed. - Vol. 22 Edit. Board, USA 1970.
- 15.- National Formulary.- N.F. XIII.- American Pharmaceutical Association, Washington D.C., USA 1970.
- 16.- Organización Mundial de la Salud.- Necesidades de Energía y de Proteínas.- Informes Técnicos Núm. 522, Ginebra Suiza, 1973.
- 17.- Ornelas Carrillo Manuel.- Proyecto de una fabrica de levadura alimenticia.- Tesis, Fac. Química, México 1947..
- 18.- Ortega Silva José María.- Balance de nitrógeno en la elaboración del pulque.- Tesis, Fac. Química, UNAM, México 1947.
- 19.- Pelczar y Reid.- Microbiology.- Mc. Graw-Hill, Kogakusha printing Co., Tokio, Japan. 1958
- 20.- Prescott Samuel y C. Gordon Dunn.- Industrial Microbiology.- - Mc. Graw-Hill Book Co. 1a. ed. 1940 USA.

- 21.- Ramirez Hernández y Chavez A.- Balance de Alimentos en México durante el año 1976.- Rev. Mex. Social, México, 1969 p. 31-73.
- 22.- A Rhodes.- Principios de Microbiología Industrial.- Ed. Acribia, Zaragoza España, 1969.
- 23.- Rodríguez Beauregard Rosa Luisa.- Estudio Químico comparativo entre compuestos del aguamiel y el pulque común.- Tesis Fac. Química UNAM, México, 1950.
- 24.- Romo A. Jesús.- Analisis Químico de los productos de fermentación del maguey.- Tesis Fac. Química, UNAM. México, 1945.
- 25.- Rose Harrison.- The Yeast.- Academic Press, London-New York, 1969.
- 26.- Ruíz Oronóz Manuel.- Contribución al conocimiento de las levaduras del aguamiel y del pulque.- Anales del Instituto de Biología, Fac. Ciencias Biológicas, UNAM México 1938.
- 27.- Segura Guillen Ramón.- Desamargado de la levadura residual en la fabricación de cerveza y estudio bromatológico con miras a aprovecharlas en la alimentación.-Tesis Fac. Química UNAM México 1956.
- 28.- Servin Massieu B.- Proteínas de Organismos Unicelulares.- Tecnología de Alimentos, año 6 Núm. 5, Sep-Oct, 1971.
- 29.- Snell-Ettre.- Encyclopaedia of Industrial Chemical Analysis Vol. 19, Interscience Publishers, USA, 1973, p. 514-543.
- 30.- Soto Soria Jorge.- Cultivo Intensivo de Levaduras del pulque. Tesis, C. Biológicas, IPN, México 1952.

- 31.- USP. United States Pharmacopea, XIX Ed., Unites States Pharmaceutical Convention Inc. USA. 1975.
- 32.- L.A. Underkofler & J.F. Guxmon.- Semi-micro method for the -
determination of reducing sugars in fermentation media.- Iowa }
State Coll., J. Sci. 17, p. 251-256. USA. 1943.
- 33.- Valor nutritivo de los Alimentos Mexicanos.- Tablas de uso -
Práctico.- Publicaciones de la División de Nutrición, 6a. ed.
Instituto Nacional de la Nutrición, Méx. 1974.
- 34.- Zardain G. Catalina.- Propiedades alimenticias de Torula uti-
lis obtenida por fermentación de las melazas de madera.- Tesis
Fac. Química, UNAM. México 1952.
- 35.- Zottola Georges.- El hambre la sed y los hombres.- Editorial -
Bruguera, Barcelona España, 1972.