

41

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



OBTENCION EN CULTIVOS CONCENTRADOS, DE DOS LEVADURAS
(*Pichia barragani* y *Torulopsis hydromelitis*), AISLADAS
DEL AGUAMIEL, POR AGITACION Y AERACION. AIREACION

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

NOEMI DE LA CRUZ HERRERA

ALMA ANGELINA OCHOA LOZANO

1978



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO :

Presidente, Profra. CATALINA OROZCO VICTORIA
Vocal, Profr. ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN
Secretario, Profr. JORGE SOTO SORIA
1er. Suplente, Profra. LILIA VIERNA GARCIA
2do. Suplente, Profr. WENCESLAO FUENTES SOLIS

Sitio donde se desarrolló el tema:

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA EXPERIMENTAL

FACULTAD DE QUIMICA

Sustentante:

ALMA ANGELINA OCHOA LOZANO

Asesor:

Profr. JORGE SOTO SORIA

Supervisor técnico:

Profr. ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN

A MIS PADRES

CON CARÍO Y AGRADECIMIENTO

A MIS HERMANOS

A MI ASESOR

CON RESPETO Y AGRADECIMIENTO POR
SU INVALUABLE AYUDA EN LA REALI-
ZACION DE ESTE TRABAJO.

A MIS MAESTROS

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

A LA FACULTAD DE QUIMICA

I N D I C E

I.-	OBJETIVO	-----	1
II.-	GENERALIDADES	-----	3
III.-	MATERIAL Y METODOS	-----	12
IV.-	RESULTADOS	-----	23
V.-	DISCUSION	-----	44
VI.-	CONCLUSIONES	-----	50
VII.-	BIBLIOGRAFIA	-----	52

I.- O B J E T I V O

Siendo México un país con alta producción azucarrera y las melazas o mieles incristalizables un producto de desecho de esta industria, es válido pensar en utilizarlas como materia prima para la obtención de levadura alimenticia ya sea para el consumo humano o del ganado. Por otra parte la principal aplicación del aguamiel es la elaboración del pulque, bebida de alto consumo en nuestro país principalmente en la zona rural, donde desempeña cierto papel alimenticio y aún en muchos lugares suple la falta de agua; se ha hablado de la posibilidad de usar el agave que lo produce, en una forma integral como en la extracción de fibras y la obtención de diversos productos útiles a la industria como ácidos orgánicos, acetona, etc.

Los microorganismos presentes en el aguamiel pertenecen a dos grupos principales: BACTERIAS Y LEVADURAS. El aguamiel contiene pocas levaduras y muchas bacterias, en el pulque en cambio es mayor la cantidad de levaduras que de bacterias.

En los numerosos trabajos que se han hecho sobre este tema, se ha logrado aislar y caracterizar un buen número de levaduras y bacterias identificando ampliamente las más comunes e importantes, (9.18).

Los componentes químicos del aguamiel y del pulque han sido estudiados con bastante detalle, no así sus componentes biológicos que por su complejidad y diversidad ofrecen todavía un amplio campo para la investigación.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el comportamiento de dos especies diferentes de levaduras aisladas del aguamiel (Torulopsis hydromelitis y Fichia barragani) en la obtención

de crecimientos masivos en la melaza de caña de azúcar a nivel de laboratorio, además de valorar su contenido de proteína en las condiciones de producción que se desarrollaron en este trabajo.

Otro propósito fue conocer algunos factores que nos permitan sentar las bases para una futura obtención de proteína alimenticia en gran escala y contribuir al conocimiento de los diferentes microorganismos y su uso, los cuales en un momento dado pueden servir como fuente de proteína de alta calidad.

Para tener datos más precisos acerca de la calidad de proteína de estas dos levaduras desde el punto de vista alimenticio, se implementó un segundo trabajo de tesis, (9.9).

II.- GENERALIDADES

La importancia de las levaduras en la alimentación radica en que son fuente de muchas vitaminas del grupo B, además contienen todos los aminoácidos esenciales necesitados por el hombre y animales superiores. Los aminoácidos que contienen azufre como L-cisteína y L-metionina aparecen también en bajas concentraciones. Por esta razón - las proteínas microbianas son más efectivas que los suplementos dietéticos de proteína animal como única fuente de proteína.

Las levaduras pueden convertir rápidamente el nitrógeno inorgánico en aminoácidos y proteínas, este aprovechamiento tiene ventajas considerables sobre las proteínas de animales y de plantas superiores, (9.4).

Para la utilización de las proteínas microbianas - en algunos casos es necesario efectuar procesos especiales para hacerlas que sean más digeribles en humanos y animales. Se ha demostrado que la digestibilidad de la levadura puede ser grandemente incrementada por la desecación en temperaturas altas, bajo ciertas condiciones. Sin embargo el calor requerido en el tratamiento para incrementar la digestibilidad de las células puede también afectar a la proteína y componentes celulares, por lo que se prefieren métodos mecánicos, (9.6).

Desde hace muchos años se ha hablado de la necesidad de nuevas fuentes de alimento y de la importancia de la industria - de las fermentaciones para contribuir a este propósito. Se cree que para el año 2000 la población mundial será de 6 billones o más, por lo -- tanto se esperan muchos cambios en el suministro y hábito de alimentación, donde la fermentación jugará un papel de importancia relevante.

La expansión y afluencia cada día mayor de población, presiona el aumento de provisiones alimenticias y otros recursos,

así como también el gran incremento de fuentes de desecho impondrá condiciones especiales, ya que sustancias orgánicas normalmente desechadas en la actualidad y que contribuyen a aumentar la contaminación, en un futuro serán empleadas principalmente en la producción de S.C.P. — (proteína celular simple) y en menor grado en el mejoramiento de otros nutrimentos.

Los procesos de fermentación y sus productos serán adaptados a las demandas y condiciones del futuro, siendo las ventajas principales de estos procesos los siguientes:

1.- Actualmente se utilizan derivados del petróleo como sustrato para la producción de levadura pero por ser un recurso no renovable se buscan otros sustratos renovables y fáciles de adquirir.

2.- El proceso de fermentación puede emplear desechos y aminorar la contaminación.

3.- Siendo sustancias del metabolismo microbiano, los productos de la fermentación son por naturaleza degradados biológicamente y cuando pasen a ser desechos serán rápidamente estabilizados o eliminados.

4.- La fermentación favorece la actividad industrial y el desarrollo de esta área apoyará el rápido avance de las ciudades menos favorecidas, porque no dependen de reservas substanciales y combustibles fósiles.

5.- Los métodos de fermentación para la producción de tejidos microbianos, pueden servir para la elaboración de alimentos y ayudar a aminorar la escasez de los mismos, (9.13).

MATERIA PRIMA Y SU TRATAMIENTO

A) Melazas: llamadas también mieles residuales de la manufactura de la caña, remolacha y azúcar de maíz, se han utilizado por su bajo costo, alto contenido de sustancias minerales y la facilitación

dad de obtención de levadura. Las melazas en la industria de la caña de azúcar requieren de un grado de clarificación.

B) Cereales de grano: los carbohidratos de grano - pueden ser utilizados para la producción de levadura alimenticia, pero bajo condiciones normales no son aptos para ser empleados en la producción competitiva dados sus costos relativamente altos. Tratados previamente van a suministrar a la levadura vitaminas , minerales y substancias nitrogenadas. En épocas de sobreproducción y también escasez aguda de proteínas o demanda de levadura, estos productos principales de la agricultura serán tomados en consideración y podrán extender su uso a este campo.

C) Residuos de madera: como el aserrín, pueden ser hidrolizados por calentamiento en presencia de ácido fuerte obteniéndose como resultado azúcares fermentables.

D) Licores sulfíticos: son desechos de la industria de obtención de celulosa, se designa frecuentemente con los sinónimos S.S.L. licor sulfítico de desecho, es una fuente importante de carbohidratos con un gran potencial para la producción de levadura. Este licor debe recibir ciertos tratamientos que tienen como función principal remover las cantidades excesivas de dióxido de azufre. Para el crecimiento de microorganismos es necesario dicho tratamiento.

E) Desechos agrícolas: muchos estudios han sido desarrollados para utilizar vegetales, fruta y desechos como fuente de -- carbohidratos para la producción de levadura. Las papas especialmente -- escogidas tienen valor potencial como fuente de azúcar para crecimiento de levadura, aunque no son conocidos los métodos para su producción comercial. En general se puede concluir que los desperdicios agrícolas -- pueden ser excelentes sustratos para el crecimiento de levadura, pero -- esto es impedido en muchos casos por el costo de recolección y el pretratamiento a que hay que someterlas.

Las técnicas económicas y factibles para la producción de levadura a escala industrial dependerán grandemente de la selección y del mejoramiento de la cepa, por el uso de radiación, de sustancias químicas y radioisótopos y en la adaptación de ésta a la tecnología de la fermentación moderna.

Algunos de los factores más principales de los que dependen la mayoría de los procesos son los siguientes:

1.- Selección y mejoramiento de las cepas de mayor crecimiento, que sean capaces de utilizar mejor las materias primas.

Además de ser células de gran tamaño, estas levaduras pueden ser mejoradas por mutagénesis inducida a la hibridación.

2.- Conocimiento y control de mecanismos reguladores de vías biosintéticas en los productos utilizados como materias primas.

Las técnicas usadas en las investigaciones genéticas fundamentales han sido objeto de muchas publicaciones consideradas en general como eficaces. Desgraciadamente no pueden adaptarse siempre al mejoramiento de cepas industriales.

El papel de estas técnicas diversas se ha discutido y se insiste sobre las modificaciones que hay que hacer para que sean fácilmente adaptables al mejoramiento de dichas cepas, (9.7).

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y BIOQUIMICAS
DE LAS LEVADURAS ESTUDIADAS. (9.18)

Pichia barragani

Es una de las levaduras que se encuentra comunmente en mayor cantidad en el aguamiel o pulque, denominada por Guilliermond "Levadura del Pulque Número 1". Si en un tubo o matraz se coloca cierta cantidad de aguamiel o pulque, se notará al cabo de dos o tres días, que se forma un velo bastante desarrollado en la superficie del líquido y un anillo en las paredes del recipiente. Velo y anillo están formados de la levadura ya citada. Esta característica y su rápido desarrollo facilita la diferenciación de las demás especies de levaduras existentes en el aguamiel y en el pulque.

Caracteres Macroscópicos del Crecimiento en Medios Líquidos:

	Aguamiel Simple	Caldo lactosado	Raulin Simple
Temperatura:	16°- 18°C	16°- 18°C	16°- 18°C
Velo:	A los 4 días se obtiene un velo mucoso.	No se forma aún después de 5 meses de cultivo.	Igual que en caldo lactosado.
Anillo:	Se obtiene bien formado a los 7 días.	No se forma.	No se forma.
Sedimento:	Se forma a los 5 días, no es muy abundante.	Se comienza a formar a los 10 días.	Igual que en caldo lactosado, pero - escaso.
Enturbiamiento:	No hay.	No hay.	No hay.
Fermentación de azúcares :	No hay.	No hay.	No hay.

Caracteres Macroscópicos del Crecimiento de las Colonias
en Medios Sólidos :

	Mosto Gelosado	Sabouraud	Gorodkova
Temperatura:	16° - 18°C	16° - 18°C	16° - 18°C
Edad del cultivo:	10 días	10 días	10 días
Forma:	Circular	Circular	Circular
Superficie:	Rugosa	Rugosa	Rugosa
Elevación:	Convexa	Plana	Plana
Color:	Blanco grisáceo	Blanco grisáceo	Blanco grisáceo
Acción sobre el medio :	No hay	No hay	No hay

Caracteres Microscópicos de las Células :

En los medios de cultivo empleados, los caracteres microscópicos de las células son semejantes, sólo en alguno de ellos -- presentan ligeras diferencias.

Edad del cultivo : 48 horas.

Temperatura empleada: 17° - 18°C

Forma de las células: ovoide y elíptica.

Agrupamiento: muy pocas aisladas, la mayor parte formando cadenas.

Brotos: en casi todas las células uno o dos brotes, tanto en los polos como laterales.

Citoplasma: oscuro y sin granulaciones.

Vacuolas: desde una a cinco en cada célula.

Grasa: uno o dos glóbulos de grasa.

Gránulos metacromáticos: no se observan

Ascas y Ascosporas: no se forman

Caracteres Bioquímicos :

Fermentación de los principales azúcares:

Glucosa -	Arabinosa -
Manosa -	Sacarosa -
Lactosa -	Almidón -
Galactosa -	

Torulopsis hydromelitis

Caracteres Macroscópicos del Crecimiento en Medios Líquidos :

	Mosto de Cerveza	Aguamiel Simple
Temperatura:	24° - 25°C	24° - 25°C
Velo:	Se inicia a los 20 días formación de pequeños islotes de velo.	Hasta los 60 días se forman pocos islotes de velo.
Anillo:	La formación se inicia a las 48 hrs., completando su desarrollo a los 3 días.	Se inicia a las 48 hrs. y completa su desarrollo -- hasta los 30 días.
Sedimento:	A las 48 hrs. es abundante de color moreno claro.	Semejante a mosto de cerveza.
Fermentación:	Apenas notable a las 48 hrs. y continúa por 24 hrs.	Muy débil a las 48 hrs. y continúa por 3 días consecutivos.
Enturbiamiento:	Ligero en los primeros días del cultivo, después se acentúa.	Semejante a mosto de cerveza.

Caracteres Macroscópicos del Crecimiento
de las Colonias en Medios Sólidos :

	Aguamiel Gelosado	Mosto Gelatinado	Aguamiel Gelatinado
Temperatura:	24° - 25°C	18° - 19°C	18° - 19°C
Edad del cultivo :	15 días	15 días	15 días
Forma :	Circular	Circular	Circular
Superficie:	Lisa	Estrias radiales	Levemente granulosa
Elevación:	Plana	Levemente convexa	Convexa
Brillo:	Intenso	Muy poco	Intenso
Color:	Moreno amarillento	Moreno grisáceo	Blanco grisáceo
Bordes:	Enteros	Finamente ondulados	Finamente ondulados
Acción sobre el medio :	Ninguna	Ninguna	Ninguna

Caracteres Microscópicos de las Células :

	Aguamiel Gelosado	Mosto Gelatinado	Aguamiel Gelatinado
Temperatura:	24° - 25°C	18° - 19°C	18° - 19°C
Edad del cultivo :	3 días	5 días	5 días
Forma de las células :	Ovales y elípticas, pocas esféricas.	Igual que en Agua miel gelosado.	Ovales y elípticas.
Agrupamiento:	Aisladas	Aisladas	Aisladas
Brotos:	1, 2 o 3 brotes.	1, 2 brotes en los polos.	Un brote.
Citoplasma:	Claro, transparente sin granulaciones.	Igual que en Agua miel gelosado.	Igual que en Aguamiel gelosado.

	Aguamiel Gelosado	Mosto Gelatinado	Aguamiel Gelatinado
Vacuolas:	En pocas células una vacuola grande o pequeña.	Igual que en Aguamiel gelosado.	Igual que en Aguamiel gelosado.
Gránulos metacromáticos:	No se observan	No se observan	No se observan
Ascas y Ascosporas:	No se forman	No se forman	No se forman

III.- MATERIAL Y METODOS

Material utilizado:

- 3.1) Cristalería en general.
- 3.2) Fermentador con capacidad total de 15 l., de acero inoxidable con sistema de aeración, agitación y muestreo.
- 3.3) Mesa rotatoria.
- 3.4) Separador centrífuga Westphalia, modelo LWA. 205.
- 3.5) Centrífuga Andreas Hettich, modelo Se-DGE 2116 de 3500 rpm.
- 3.6) Centrífuga Wifug, modelo X 2.
- 3.7) Autoclave, modelo AL 252/LE para fermentador.
- 3.8) Balanza granataria OHAUS 1201.
- 3.9) Balanza analítica Mettler, modelo B 5.
- 3.10) Baño María de acero inoxidable, con agitación y termostato, marca Kinet.

Medios de Cultivo

A) PARA AISLAMIENTO

4.1) Melaza gelosada:

Melaza	-----	50.0 g.
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-----	0.5 g.
KH_2PO_4	-----	0.2 g.
Extracto de lev.	-----	1.0 g.
Agar	-----	2.0 g.
Agua destilada	-----	100.0 ml.

4.2) Medio de Sabouraud:

Glucosa	-----	2.0 g.
Peptona	-----	1.5 g.
Glicerina	-----	0.5 ml.
Extracto de lev.	-----	0.5 g.
Agar	-----	2.0 g.
Agua destilada	-----	100.0 ml.

4.3) Aguamiel gelosado:

Aguamiel	-----	100.0 ml.
Agar	-----	2.0 g.

B) PARA IDENTIFICACION

4.4) Melaza: líquida y gelosada:

Melaza	-----	10.0 g.
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-----	0.5 g.
KH_2PO_4	-----	0.1 g.
Extracto de lev.	-----	1.0 g.
Agua destilada	-----	100.0 ml.
pH	-----	5.0

NOTA: El medio sólido con agar al 2 %.

4.5) Aguamiel líquido.

4.6) Melaza gelatina:

Igual que (4.4) sólo que contiene gelatina al 10 % en lugar de agar.

4.7) Medio como única fuente de nitrógeno:

Glucosa	-----	2.0 g.
KNO ₃	-----	0.1 g.
KH ₂ PO ₄	-----	0.1 g.
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	-----	0.05 g.
Agar	-----	2.0 g.
Agua dest.	-----	100.0 ml.

4.8) Medio conteniendo alcohol como origen exclusivo de carbono:

Alcohol	-----	3.0 ml.
(NH ₄) ₂ SO ₄	-----	0.1 g.
KH ₂ PO ₄	-----	0.1 g.
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	-----	0.01 g.
Agua dest.	-----	100.0 ml.

4.9) Agar Gorodkowa:

Glucosa	-----	0.25 g.
Extracto de carne	-----	1.0 g.
NaCl	-----	0.5 g.
Agar	-----	2.0 g.
Agua dest.	-----	100.0 ml.

(suplementamente este agar es bajo en nutrientes para hacer ascosporas la levadura)

4.10) Medio para el método auxanográfico de Beijerinck:

4.10 a) Para azúcares:

(NH ₄) ₂ SO ₄	-----	0.5 g.
KH ₂ PO ₄	-----	0.1 g.
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	-----	0.05 g.
Agar	-----	2.0 g.
Agua dest.	-----	100.0 ml.

agui con la les. y se le ponen discos con azúcares (como antibiog) y se ve en cual de ellos hubo crecimiento.

NOTA: Los azúcares utilizados en el ensayo fueron: Manosa, Fructosa, Sacarosa, Arabinosa y Xilosa.

4.10 b) Para nitrógeno:

Glucosa	-----	2.0 g.
KH_2PO_4	-----	0.1 g.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	-----	0.05 g.
Agar	-----	2.0 g.
Agua dest.	-----	100.0 ml.

c) MEDIOS DE CONSERVACION

4.11) Para Torulopsis hydromelitis:

Melaza	-----	10.0 g.
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-----	0.5 g.
KH_2PO_4	-----	0.1 g.
Extracto de lev.	-----	1.0 g.
Agar	-----	2.0 g.
Agua destilada	-----	100.0 ml.

4.12) Para Pichia barragani:

Melaza	-----	10.0 g.
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-----	0.5 g.
KH_2PO_4	-----	0.2 g.
Extracto de lev.	-----	1.0 g.
Agar	-----	2.0 g.
Agua destilada	-----	100.0 ml.

D) MEDIOS DE PROPAGACION

4.13) Para Torulopsis hydromelitis:

El mismo que 4.11 excepto agar.

4.14) Para Pichia barragani:

El mismo que 4.12 excepto agar.

E) MEDIO DE FERMENTACION

4.15)

Melaza	-----	1000.0	g.
$(NH_4)_2SO_4$	-----	50.0	g.
KH_2PO_4	-----	10.0	g.
Agua de cocimiento de maiz	-----	50.0	g.
Agua destilada	-----	10000.0	ml.
pH	-----	5.0	

Este medio se usó para determinar crecimiento y consumo de azúcares tanto en los matraces bafleados como en los fermentadores de laboratorio (capacidad de 15 litros) - con inyección de aire y agitación con aspas.

Métodos utilizados:

5.1 AISLAMIENTO Y ADAPTACION DE LEVADURAS DEL AGUAMIEL, EN MIELES INCRISTALIZABLES DE CAÑA DE AZUCAR.

El método utilizado en el aislamiento de las cepas de levaduras, fue el de Lindner. Primeramente se tomó un ml. del agua--miel, el cual se había agitado previamente para hacerlo homogéneo y así tener una muestra representativa y se puso en un tubo con agua destilada estéril, de ahí se efectuaron diluciones para tener el menor número posible de células, facilitando de esta manera el aislamiento.

Las diluciones correspondieron a 10^{-1} hasta 10^{-5} , de esta última dilución se hicieron observaciones al microscopio, para lo cual se hizo uso de un cubreobjetos estéril en donde se colocó cinco gotas separadas de la dilución, después se invirtió en un portaobjetos excavado conteniendo una gota de agua destilada. Se eligieron las gotas que contenían una sola célula; posteriormente, cada gota fue recogida - por medio de tiras de papel filtro estériles y se pasaron al medio de - cultivo líquido (4.2), se incubaron a 28°C durante 24 horas.

De este cultivo se sembró por el método de la es--tría los medios (4.2) y (4.3) en cajas de Petri para observar las caract--erísticas morfológicas de las levaduras aisladas a las 24, 48 y 72 hrs. de incubación, se escogieron colonias de tres grupos con característi--cas diferentes . Las colonias se sembraron en el medio a base de melaza (4.1) utilizando también cajas de Petri, haciendo varios pases, esto se hizo con el fin de ir acostumbrando a la levadura a un medio de cultivo muy semejante al que después se utilizó en la fermentación.

Las cepas que se adaptaron a este medio fueron dos, las que se resembraron en tubos para su conservación y uso, se procedió posteriormente a su identificación, (6.1, 6.2).

5.2 IDENTIFICACION.

Los métodos de identificación de las levaduras se basaron principalmente en los datos de las observaciones de su morfología y bioquímicas en diferentes medios de cultivo (9.18).

Para realizar las pruebas bioquímicas se utilizaron los medios sólidos 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 y 4.9, que se sembraron por estría, se incubaron a 28°C exceptuando el medio 4.6 que se incubó a temperatura ambiente.

Se utilizó el método auxanográfico de Beijerinck, que se llevó a cabo de la siguiente manera:

En una caja de Petri se vertieron aproximadamente 2 ml. de una suspensión de levaduras incubadas durante 24 horas y suspendidas en 10 ml. de agua destilada estéril. Se añadieron 10 ml. del medio 4.10 (a) previamente fundido y enfriado a 40°C, se mezcló bien; cuando el agar se hubo solidificado completamente se pusieron en los diferentes puntos de la superficie, pequeñas cantidades de azúcares pulverizados. Las placas se incubaron a 28°C.

Para el medio 4.10 (b) se hizo una suspensión celular y se añadieron aproximadamente 10 ml. del medio fundido y enfriado a 40°C, se mezcló bien y se incubó la placa a 28°C, después que el medio hubo solidificado. Los medios líquidos 4.4, 4.5, 4.8 previamente esterilizados se inocularon con una asada de la cepa y se incubaron a 28°C.

Todos los ensayos fueron hechos por duplicado. Las observaciones microscópicas y macroscópicas de los cultivos se hicieron a las 24, 48 y 72 horas, para esto se hizo la observación directa, (6.2)

5.3 DETERMINACION DE LA FUENTE DE CARBONO OPTIMA.

Esta determinación se basó en obtener el mejor crecimiento de la levadura (por peso) en el medio de cultivo líquido 4.1,

variando la concentración de la fuente de carbono (azúcar) para conocer el nivel óptimo de ésta. Las demás sustancias se mantuvieron constantes y se efectuó utilizando matraces bafleados en los cuales se preparó el medio de cultivo líquido 4.1, variando las concentraciones de melaza en 20, 10, 5.0, 2.5 g./ 100 ml. de medio.

El pH se ajustó a 5.0, se colocaron los matraces - en la mesa rotatoria 3.3, se pusieron en agitación por 24 horas a una - temperatura de 30°C. Esta prueba se hizo por duplicado. El peso de la - levadura se determinó centrifugando el contenido del matraz a 3000 rpm. durante 15 minutos, después se decantó el líquido sobrenadante y se se-
có a 60°C durante 60 minutos. Por diferencia de peso con el tubo vacío y seco (tara) se conoció la cantidad de levadura producida y así se pu-
do observar a qué concentración de azúcar hay mayor crecimiento de leva
dura.

5.4 DETERMINACION DE LA FUENTE DE NITROGENO.

Se llevó a cabo utilizando el método anterior (5.3) sólo que varió la concentración de sulfato de amonio, siendo ésta de -- 1.0, 0.5, 0.25 g./ 100 ml., tanto la concentración de melaza como la de fósforo permanecieron constantes.

5.5 DETERMINACION DE LA FUENTE DE FOSFORO.

Se hizo igual que en los métodos 5.3 y 5.4 utili-
zando como fuente de fósforo, fosfato ácido de potasio, las concentra-
ciones fueron las siguientes: 0.4, 0.2, 0.1 g./ 100 ml. de medio de cul-
tivo. El nitrógeno y la fuente de carbono permanecieron constantes.

5.6 DETERMINACION DE LA CURVA DE CRECIMIENTO.

Este método se utilizó con el objeto de conocer el tiempo en que las levaduras en estudio, se desarrollaban y cómo consumían los azúcares puestos a su disposición; en qué tiempo alcanzaban su máximo

crecimiento (en peso) y qué rendimiento podía obtenerse a nivel de matraces en mesa rotatoria. Se usaron matraces bafleados según lo propuesto por Solomons, con una cubierta formada de una capa de algodón de 1 cm. de altura, puesta entre dos tapas de gasa. El objeto de esto fue evitar la contaminación del medio de cultivo y propiciar un mejor intercambio de gases-aire durante la agitación en mesa rotatoria, con esto se mejoró notablemente el crecimiento de las levaduras, (9.21).

Los métodos 5.3, 5.4 y 5.5 fueron un paso previo para la determinación de los medios de cultivo óptimos para la producción máxima de estas dos levaduras.

Obteniéndose para T. hydromelitis como mejor medio de cultivo el 4.13 y para la cepa de P. barragani el medio 4.14.

Se inocularon las cepas en estos medios y se colocaron en agitación a una temperatura de 30°C, retirándose un matraz cada tres horas, el contenido de cada matraz se centrifugó, se decantó el líquido sobrenadante y fue secado a 60°C durante 60 minutos. La cantidad de levadura producida se obtuvo por diferencia de peso, dicha cantidad correspondió a un determinado tiempo.

En el líquido sobrenadante se determinaron azúcares reductores totales, en esta forma pudimos conocer la manera en que las levaduras consumieron los azúcares.

5.7 PRODUCCION DE LEVADURA EN FERMENTADORES DE ACERO INOXIDABLE CON INYECCION Y PRESION DE AIRE ESTERIL Y AGITACION A BASE DE ASFAS.

Una vez conocida la manera en que estas levaduras crecían y consumían los azúcares al propagarlas en matraces bafleados en la mesa rotatoria, se inició la propagación en fermentadores con inyección de aire estéril y agitación a base de aspas rotatorias.

Para las dos levaduras la fermentación se llevó a cabo en fermentadores de acero (3.2), conteniendo 10 litros de medio de

cultivo efectivos; la temperatura de trabajo fue de 30°C; el volumen de aire estéril de 27 litros/ min. con una presión de 0.8 Kg./ cm.²

Para P. barragani y T. hydromelitis el medio utilizado fue el 4.15. El tiempo total para cada fermentación fue de 36 horas, el muestreo se hizo cada seis horas, para cubrir todo el período fue necesario hacer dos ensayos para cada levadura. En la primera parte inicia da a las 8 A.M. el muestreo se hizo a las 8, 14, 20 horas del primer día repitiéndose a la misma frecuencia el segundo día, (24, 30 y 36 horas).

El segundo ensayo abarcó un período intermedio de muestreo (18 horas). En resumen, el tiempo de muestreo fue: 0, 6, 12, 18, 24, 30 y 36 horas.

TOMA DE LA MUESTRA: Se hizo sifoneando el medio de cultivo que está dentro del fermentador al aplicar una presión de aire diferencial, el volumen fue de 10 ml. para cada muestra determinándose en cada una de las muestras los azúcares reductores totales y el peso en gramos de la levadura según se indica en el método 5.6.

SEPARACION Y SECADO DE LA LEVADURA: Al final de la fermentación se procedió a separar toda la levadura del medio de cultivo utilizando un separador centrifuga Westphalia de 12000 rpm (3.6) se lavó tres veces con agua destilada, centrifugándola cada vez con el separador el último lavado se hizo con agua acidulada (HCl al 1 %) para blanquearla posteriormente se eliminó el agua, lavando con alcohol etílico y éter -- etílico por separado. Se procedió a evaporar a temperatura ambiente para secarlas.

En el material seco, se procedió a determinar contenido proteínico por medio del método de Kjeldahl (9.3).

5.8 DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES.

Para esta determinación se usó el método de Underkoffler (9.22).

5.9 DETERMINACION DEL CONTENIDO PROTEINICO.

El contenido proteínico de las levaduras, se determinó valorando el contenido de nitrógeno total, por el método de Kjel--dahl (9.3) y multiplicando por 6.25 para obtener la cantidad de protefina en porcentaje, (9.10).

5.10 DETERMINACION DE LOS RENDIMIENTOS EN LA PRODUCCION DE LEVADURA, EN RELACION AL CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES.

Los rendimientos para cada levadura fueron obtenidos según la siguiente fórmula:

$$\text{RENDIMIENTO} = \frac{\text{g. de levadura seca}}{\text{g. de azúcar consumida}} \times 100$$

 IV.- RESULTADOS

 6.1 LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL METODO DE AISLAMIENTO Y ADAPTACION
 (5.1) DE LAS LEVADURAS DEL AGUAMIEL FUERON LOS SIGUIENTES :

CEPAS	P A S E S		
	1	2	3
1	+	++	+++
2	+	++	+++
3	+	+	+

Se observó que de las tres levaduras aisladas, sólo dos se adaptaron bien al medio de cultivo 4.1. La cepa denominada al principio cepa No. 1 (identificada como Torulopsis hydromelitis) creció abundantemente a las 48 horas, no así la denominada cepa No. 2 (Pichia - barragani) cuyo mayor crecimiento lo observamos a las 24 horas.

6.2 IDENTIFICACION

CARACTERISTICAS DE LOS CULTIVOS EN LOS MEDIOS LIQUIDOS Y SOLIDOS

(Método 5.2)

CEPA No. 1

6.2.1 CARACTERES MICROSCOPICOS DE LAS CELULAS: En el medio (4.5)

Cultivo de: 72 horas

Temperatura: 28°C

Forma de las células: Ovais

Agrupamiento: Aislado

Brotes: Un brote en alguna de las células

CARACTERES MACROSCOPICOS DE LOS CULTIVOS

6.2.2 Melaza líquida (4.4)

Cultivo de:	24 horas	48 horas
Temperatura:	28°- 30°C	28°- 30°C
Crecimiento:	Poco sedimento No enturbia el medio	Abundante sedimento No enturbia el medio

6.2.3 Melaza gelosada (4.4)

Cultivo de:	24 horas
Temperatura:	28°- 30°C
Crecimiento:	Escaso
Color:	Amarillento
Aspecto:	Opaco
Forma:	Circular
Superficie:	Lisa
Elevación:	Plana
Acción sobre, el medio	No hay

6.2.4 Aguamiel gelosado (4.5)

Cultivo de:	24 horas
Temperatura:	28°- 30°C
Crecimiento:	Escaso
Color:	Blanco
Aspecto:	Opaco
Forma:	Circular
Superficie:	Lisa
Elevación:	Plana
Brillo:	Escaso
Acción sobre, el medio	No hay

NOTA: A las 48 horas los cultivos de melaza gelosada y aguamiel gelosado presentaron las mismas características que a las 24 horas pero el crecimiento fue más abundante.

6.2.5 Aguamiel líquido (4.5)

Cultivo de:	24 horas	48 horas
Temperatura:	28°- 30°C	28°- 30°C
Crecimiento:	Poco sedimento	Poco sedimento
	No enturbia el medio	No enturbia el medio

6.2.6 Melaza gelatina (4.6)

Cultivo de:	24 horas
Temperatura:	Ambiente
Crecimiento:	Escaso
Color:	Ligeramente amarillo
Aspecto:	Opaco
Forma:	Circular
Superficie:	Lisa
Elevación:	Plana
Brillo:	Abundante
Acción sobre el medio :	No hay

6.2.7 Medio como fuente de nitrógeno (4.7)

Cultivo de:	24 horas
Temperatura:	28°- 30°C
Crecimiento:	Escaso
Color:	Blanco
Aspecto:	Opaco
Forma:	Circular
Superficie:	Lisa
Elevación:	Plana
Brillo:	Abundante
Acción sobre el medio :	No hay

NOTA: Se hicieron observaciones a las 48 horas, obteniéndose las mismas características, con crecimiento más abundante.

6.2.8 Medio conteniendo alcohol (4.8)

Cultivo de:	24 horas	48 horas
Temperatura:	28°- 30°C	28°- 30°C
Crecimiento:	Negativo	Negativo

6.2.9 Agar Gorodkova (4.9)

Cultivo de:	24 horas
Temperatura:	28°- 30°C
Crecimiento:	Escaso
Color:	Blanco
Aspecto:	Opaco
Forma:	Circular
Superficie:	Lisa
Elevación:	Plana
Brillo:	Escaso
Acción sobre el medio:	No hay

6.2.10 Método auxanográfico de Beijerinck (5.2)

Medio 4.10 a) Para azúcares :

Azúcar	24 horas	48 horas
Manosa	+++	+++
Arabinosa	+++	+++
Fructosa	+	+
Xilosa	+	+
Sacarosa	+	+

Medio 4.10 b) Para nitrógeno:

Cultivo de:	24 horas	48 horas
Crecimiento:	Negativo	Negativo

NOTA: Con los resultados anteriores la cepa No. 1 fue identificada como "Torulopsis hydromelitis".

CEFA No. 2

6.2.11 CARACTERES MICROSCOPICOS DE LAS CELULAS. En el medio (4.5)

Edad del cultivo: 72 Horas
 Temperatura: 28° C
 Forma de las células: Elípticas
 Agrupamiento: La mayoría forman cadenas
 CARACTERES MACROSCOPICOS DE LOS CULTIVOS

6.2.12 Melaza líquida (4.4)

Cultivo de: 24 horas
 Temperatura: 28° - 30°C
 Crecimiento: Poco sedimento, No enturbia el medio
 El velo es de aspecto seco, rugoso y amarillento.

6.2.13 Azúcar líquido (4.5)

Cultivo de: 24 horas
 Temperatura: 28° - 30°C
 Crecimiento: Formación de velo, no forma sedimento
 No enturbia el medio.

6.2.14 Melaza gelosada (4.4)

Cultivo de: 24 horas
 Temperatura: 28° - 30°C
 Crecimiento: Abundante
 Color: Amarillento
 Aspecto: Opaco
 Forma: Irregular
 Superficie: Rugosa
 Elevación: Escasa
 Brillo: No hay
 Acción sobre el medio: Ninguna

6.2.15 Aguamiel gelosado (4.5)

Cultivo de:	24 horas
Temperatura:	28°- 30°C
Crecimiento:	Escaso
Color:	Blanco
Aspecto:	Opaco
Forma:	Circular
Superficie:	Rugosa
Elevación:	Escasa
Brillo:	No hay
Acción sobre el medio:	Ninguna

6.2.16 Melaza gelatina (4.6)

Cultivo de:	24 horas
Temperatura:	28°- 30°C
Crecimiento:	Escaso
Color :	Amarillento
Aspecto:	Opaco
Forma:	Irregular
Superficie:	Rugosa
Elevación:	Escasa
Brillo:	No hay
Acción sobre el medio:	Ninguna

6.2.17 Medio como fuente de nitrógeno (4.7)

Cultivo de:	24 horas
Temperatura:	28 ⁿ - 30° C
Crecimiento:	Escaso
Color:	Blanco
Aspecto:	Opaco
Forma:	Irregular
Superficie:	Rugosa
Elevación:	Escasa
Brillo:	Escaso
Acción sobre el medio:	Ninguna

6.2.18 Medio conteniendo alcohol (4.8)

Cultivo de:	24 horas
Temperatura:	28° - 30°C
Crecimiento:	Abundante, con poca turbidez y sedimento.
Color:	Blanco
Aspecto:	Opaco
Forma:	Irregular
Superficie :	Rugosa
Elevación:	Plana
Brillo:	No hay
Acción sobre el medio	Ninguna

6.2.19 Agar Gorodkova (4.9)

Cultivo de:	24 horas
Temperatura:	28°- 30°C
Crecimiento:	Abundante
Color:	Blanco
Aspecto:	Opaco
Forma:	Irregular
Superficie:	Rugosa
Elevación:	plana
Brillo:	No hay
Acción sobre el medio:	Ninguna

NOTA: A las 48 horas presentan las mismas características pero el crecimiento es más abundante.

6.2.20 Método auxanográfico de Beijerinck (5.2)

Medio 4.10 a) Para azúcares:

Azúcar	24 horas	48 horas
Manosa	+	+
Arabinosa	-	-
Fructosa	+	+
Xilosa	-	-
Sacarosa	-	-

Medio 4.10 b) Para nitrógeno:

Cultivo de:	24 horas	48 horas
Crecimiento:	++	+++

NOTA: Con los datos anteriores la cepa No. 2 fue identificada como "Pichia barragani"

6.3 RESULTADOS DEL CRECIMIENTO DE LAS LEVADURAS, OBTENIDOS A DIFERENTES NIVELES DE NUTRIMENTOS.

El objeto de este estudio, fue determinar los niveles de azúcar, nitrógeno y fósforo en que cada especie de levadura estudiada creciera mejor, para poder diseñar un medio de cultivo líquido óptimo y obtener el máximo rendimiento (en peso) en las fermentaciones subsecuentes.

La eficiencia se determinó relacionando el crecimiento en peso de la levadura, a la cantidad (en gramos) del nutrimento estudiado.

DETERMINACION DE LA MEJOR CONCENTRACION DE LA FUENTE DE CARBONO (Método 5.3)

TABLA 6.3.1

(Medio de cultivo 4.11 - sin agar)

Conc. de melaza. g./100 ml.	Cepa 1		Promedio	Testigos (tara)	Total	Eficiencia
	g.lev./100 ml.				g.lev./100 ml.	g.lev./g.nutr.
20	1.1430	0.9937	1.0684	0.5759	0.4825	0.0241
10	0.6240	0.9233	0.7737	0.0604	0.7133	0.0713
5.0	0.5210	0.5281	0.5295	0.0358	0.4937	0.0987
2.5	0.3828	0.3781	0.3805	0.0126	0.3679	0.1471

TABLA 6.3.2

(Medio de cultivo 4.12 - sin agar)

Conc. de melaza. g./100 ml.	Cepa 2		Promedio	Testigos (tara)	Total	Eficiencia
	g.lev./100 ml.				g.lev./100 ml.	g.lev./g.nutr.
20	1.7673	1.3805	1.5324	0.5759	0.9565	0.0478
10	1.2846	1.2003	1.2424	0.0604	1.1820	0.1182
5.0	0.3325	0.3704	0.3514	0.0358	0.3156	0.0630
2.5	0.1806	0.3206	0.2506	0.0126	0.2480	0.0992

NOTA: Tanto el nitrógeno como el fósforo solubles, se mantuvieron constantes. (GRAFICA 1)

DETERMINACION DE LA MEJOR CONCENTRACION DE LA FUENTE DE NITROGENO
(Método 5.4)

TABLA 6.3.3

(Medio de cultivo 4.11 - sin agar)

Conc. de (NH ₄) ₂ SO ₄ g./100 ml.	Cepa 1		Promedio	Testigos (tara)	Total	Eficiencia
	g.lev./100 ml.					
1.0	0.8797	0.8472	0.8536	0.0604	0.7932	0.7932
0.5	0.9248	0.9448	0.9398	0.0604	0.8794	1.7588
0.25	0.6257	0.7709	0.6783	0.0604	0.6179	2.4716

TABLA 6.3.4

(Medio de cultivo 4.12 - sin agar)

Conc. de (NH ₄) ₂ SO ₄ g./100 ml.	Cepa 2		Promedio	Testigos (tara)	Total	Eficiencia
	g.lev./100 ml.					
1.0	1.4409	1.2559	1.3484	0.0604	1.2880	1.288
0.5	1.5454	1.6289	1.6871	0.0604	1.6267	3.553
0.25	1.3798	1.5205	1.4502	0.0604	1.3998	5.599

NOTA: La fuente de carbono y la de fósforo se mantuvieron constantes.

(GRAFICA 2)

DETERMINACION DE LA MEJOR CONCENTRACION DE LA FUENTE DE FOSFORO

(Método 5.5)

TABLA 6.3.5

(Medio de cultivo 4.11 - sin agar)

Conc. de KH_2PO_4 g./100 ml.	Cepa 1		Promedio	Testigos (tara)	Total g.lev./100 ml.	Eficiencia g.lev./g.nutr.
	g.lev./100 ml.	g.lev./100 ml.				
0.4	0.7007	0.8169	0.7488	0.0604	0.6884	1.721
0.2	0.8133	0.9022	0.8538	0.0604	0.7934	3.967
0.1	0.8820	1.1004	0.9913	0.0604	0.9309	9.309

TABLA 6.3.6

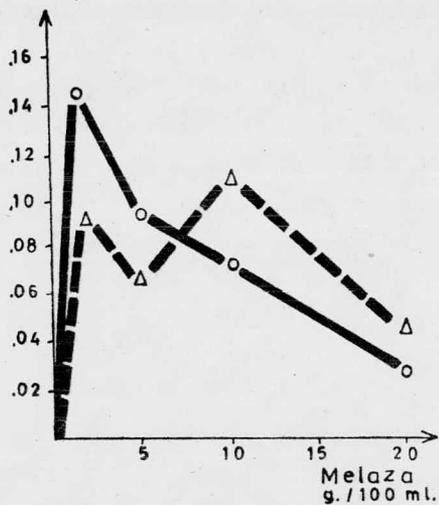
(Medio de cultivo 4.12 - sin agar)

Conc. de KH_2PO_4 g./100 ml.	Cepa 2		Promedio	Testigos (tara)	Total g.lev./100 ml.	Eficiencia g.lev./g.nutr.
	g.lev./100 ml.	g.lev./100 ml.				
0.4	1.5637	1.3959	1.4778	0.0604	1.4174	3.543
0.2	1.6570	1.9249	1.7909	0.0604	1.7305	8.652
0.1	1.4622	1.7441	1.6032	0.0604	1.5428	15.428

NOTA: Tanto la fuente de carbono como la de nitrógeno se mantuvieron constantes. (GRAFICA 3)

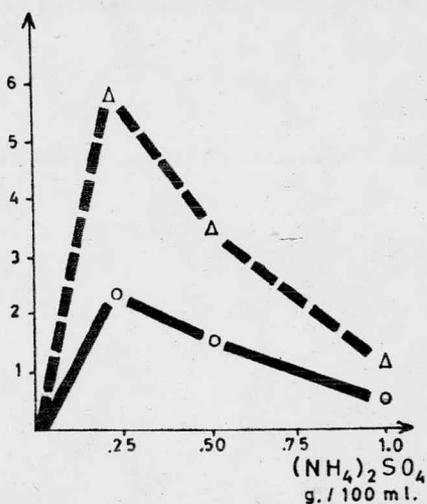
Gráfica 1
Fuente de Carbono

Eficiencia
g. lev. / g. nutriente



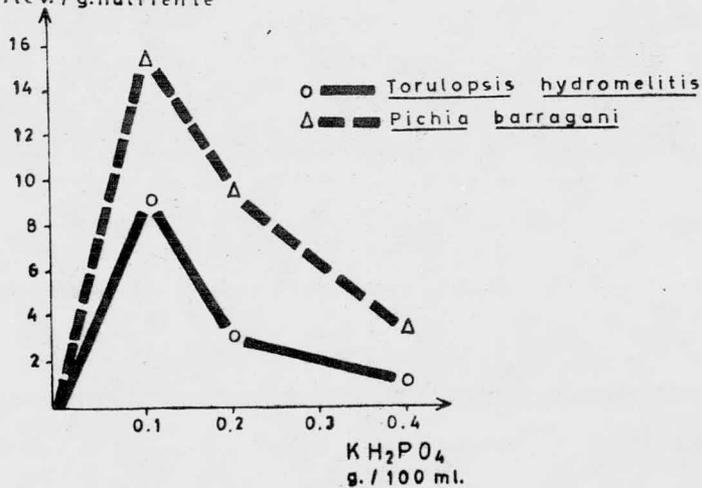
Gráfica 2
Fuente de Nitrógeno

Eficiencia
g. lev. / g. nutriente



Gráfica 3
Fuente de Fósforo

Eficiencia
g. lev. / g. nutriente



6.4 DETERMINACION DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO DE LAS LEVADURAS,
EN MATRACES BAFLEADOS Y AGITADOS.

(Método 5.6; medio de cultivo 4.15)

TABLA 6.4.1

CEPA No.1 Torulopsis hydromelitis

Tiempo horas	Peso total obtenido g. / 100 ml.	Peso real de levadura (⊗) g. / 100 ml.
3	0.0822	0.0218
6	0.2329	0.1725
9	0.2622	0.2018
12	0.2881	0.2277
15	0.4354	0.3750
18	0.7921	0.7317
21	1.1128	1.0524
24	0.8997	0.8393

TABLA 6.4.2

CEPA No.2 Pichia barragani

Tiempo Horas	Peso total obtenido g. / 100 ml.	Peso real de levadura (⊗) g. / 100 ml.
3	0.1258	0.0654
6	0.1477	0.0873
9	0.2163	0.1564
12	0.8015	0.7411
15	0.8760	0.8156
18	1.2390	1.1786
21	1.1757	1.1153
24	0.7880	0.7276

(⊗) Se obtuvo restando al peso total obtenido los sólidos del medio de cultivo, que corresponden a 0.0604 g.

6.5 DETERMINACION DEL CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES (COMO SACA ROSA), EN MATRACES BAFLEADOS Y AGITADOS.

(Método 5.8; medio de cultivo 4.15)

TABLA 6.5.1

CEPA No.1 Torulopsis hydromelitis

Tiempo horas	Gasto de tiosulfato de sodio 0.05 N. ml.	Equivalencia en sacarosa. g./100 ml.
3	3.8	8.0
6	6.5	4.0
9	6.9	3.8
12	9.0	0.5
15	9.3	0.2
18	9.3	0.2
21	9.5	0
24	9.5	0

TABLA 6.5.2

CEPA No.2 Pichia barragani

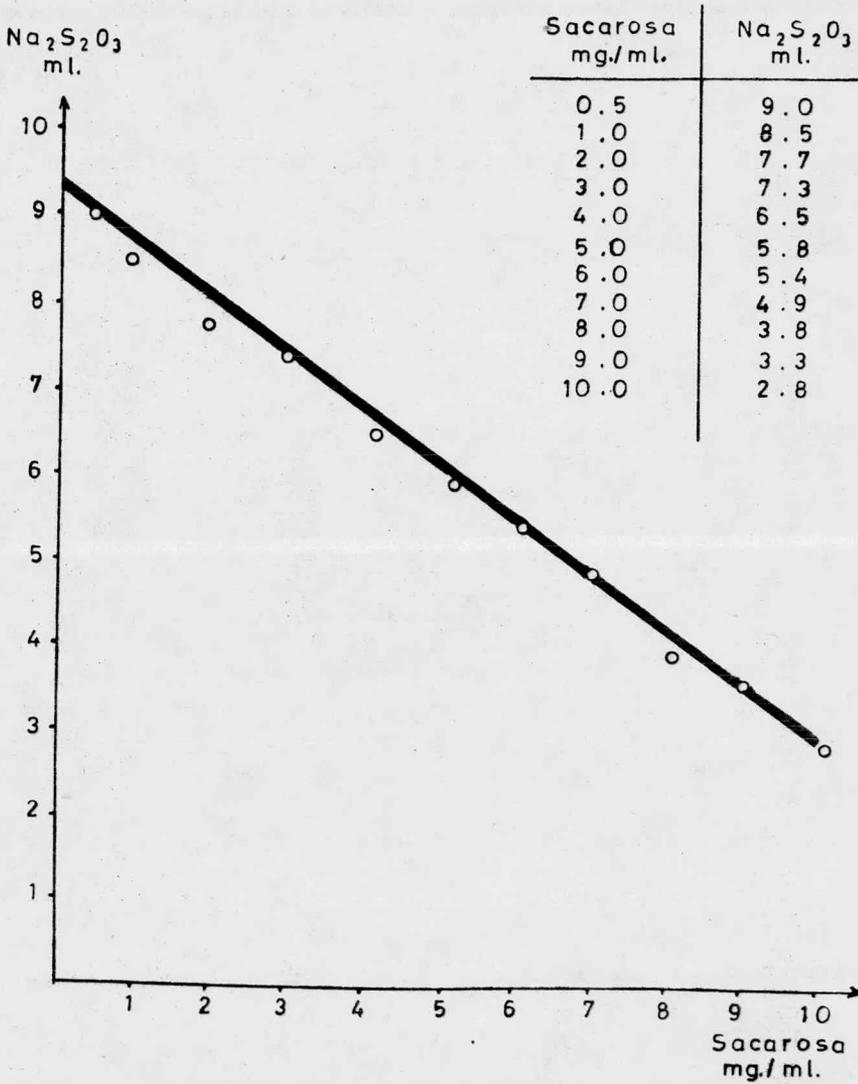
Tiempo horas	Gasto de tiosulfato de sodio 0.05 N. ml.	Equivalencia en sacarosa. g./100 ml.
3	5.5	5.9
6	6.1	4.8
9	7.3	3.0
12	8.6	0.9
15	8.6	0.9
18	8.9	0.6
21	9.0	0.5
24	9.5	0

Blanco

3.0

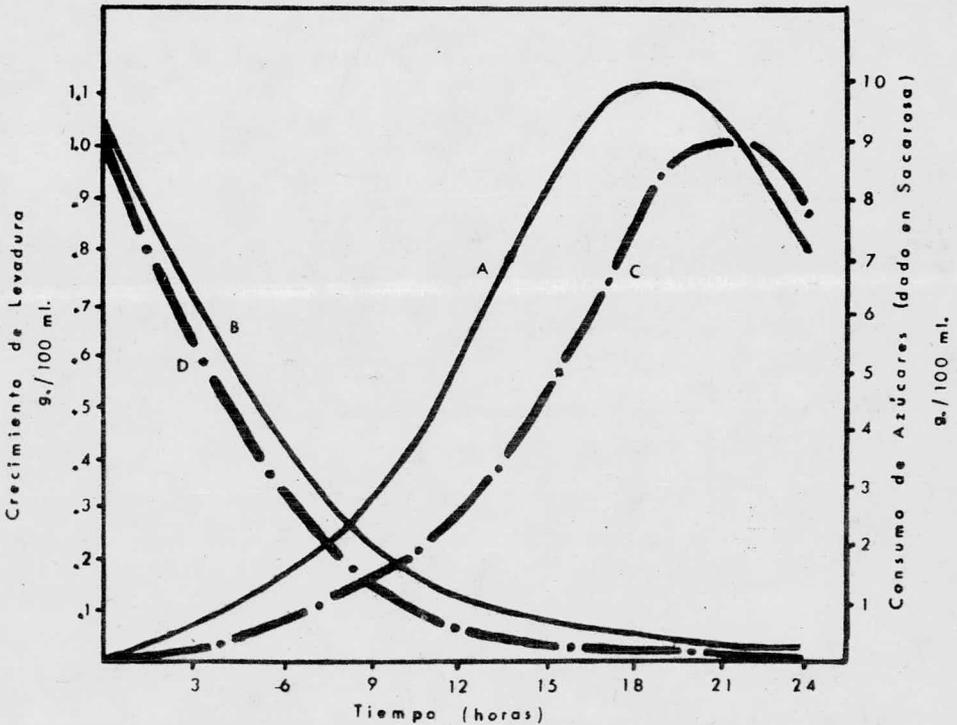
9.3

Gráfica 4
Curva estándar de Sacarosa
(Método 5.8)



Gráfica 5
 CURVAS DE CRECIMIENTO y
 Consumo de azúcares por las
 levaduras en cultivo agitado

(6.4 ; 6.5)



- A: CURVA DE CRECIMIENTO DE *Pichia barragani*
 B: " " CONSUMO DE AZUCARES DE *P. barragani*
 C: " " CRECIMIENTO DE *T. hydromelitis*
 D: " " CONSUMO DE AZUCARES DE *T. hydromelitis*

6.6 DETERMINACION DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO Y CONSUMO DE AZUCARES PARA LA LEVADURA Torulopsis hydromelitis EN FERMENTADOR DE LABORATORIO.

(Métodos 5.7 y 5.8; medio de cultivo 4.15 con 10 % de melaza)

TABLA 6.6.1

Tiempo horas	LEVADURAS	AZUCARES	
	g. lev. en 100 ml. Lectura corregida (\bar{x})	ml. Tiosulfato gastados. Promedio	Sacarosa equiva- lente consumida. g. por 100 ml.
0	0.0523	6.5	4.0
6	0.2803	6.7	3.8
12	0.5049	9.0	0.5
18	0.5447	9.2	0.3
21	0.6067	9.0	0.5
24	0.6897	9.3	0.2
30	0.7447	9.4	0.1
36	0.6941	9.4	0.1

TABLA 6.6.2

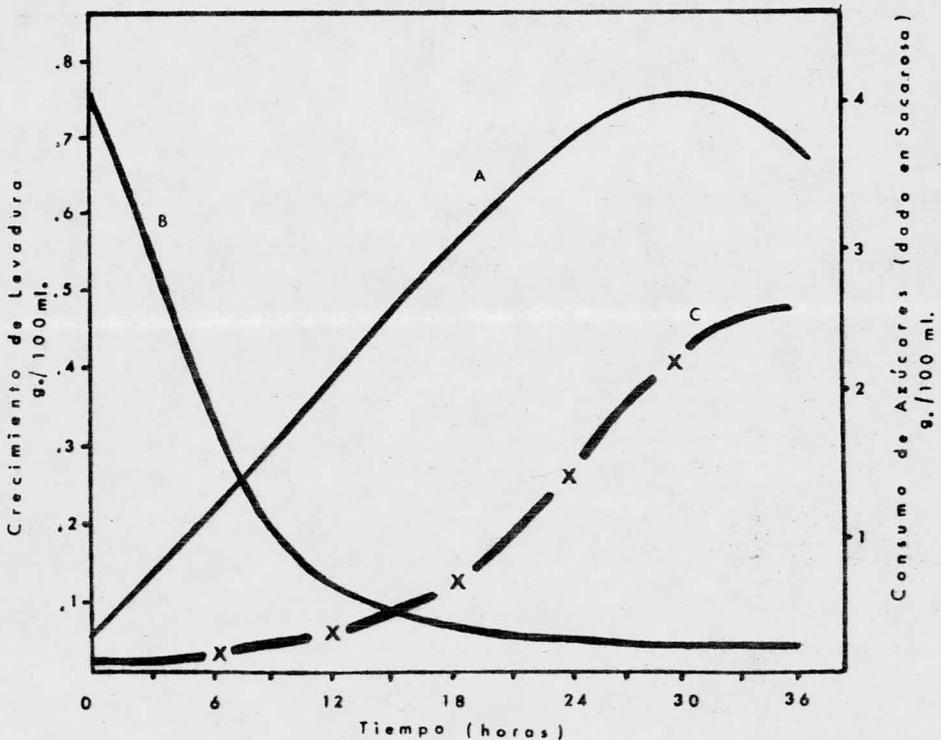
(Medio de cultivo 4.15 con 2.5 % de melaza)

Tiempo horas	LEVADURAS g. lev. en 100 ml. Lectura corregida (\bar{x})
0	0.0128
6	0.0178
12	0.0191
13	0.1161
21	0.1194
24	0.2401
30	0.3889
36	0.4325

(\bar{x}) La corrección se hizo restando a los gramos de levadura, 0.0604 g. que es el peso del sedimento del medio de cultivo testigo.

Gráfica 6
Curvas de Crecimiento
y
Consumo de Azúcares en
Fermentador de laboratorio
(6.6.1 y 6.6.2)

Torulopsis hydromelitis



Rendimiento = 19.09 %

A: Curva de Crecimiento con 10 % de melaza

B: Curva de Consumo de Azúcares

C: Curva de Crecimiento en medio de cultivo con 2.5 % de melaza

6.7 DETERMINACION DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO Y CONSUMO DE AZUCARES PARA LA LEVADURA Pichia barragani EN FERMENTADOR DE LABORATORIO.

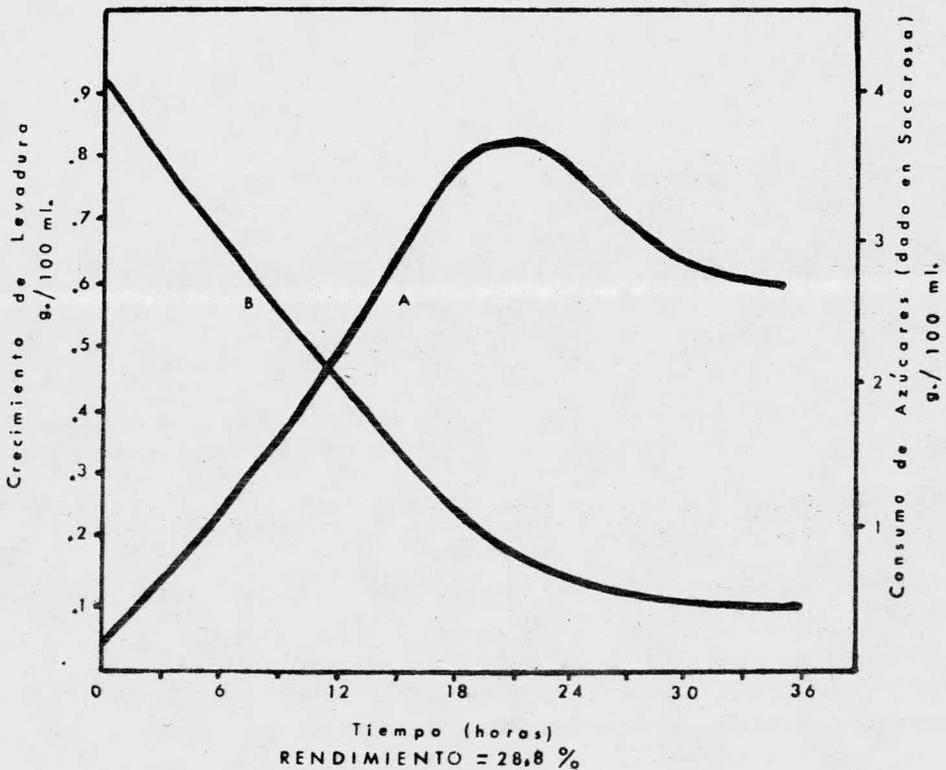
(Métodos 5.7 y 5.8; medio de cultivo 4.15 con 10 % de melaza)

TABLA 6.7.1

Tiempo horas	LEVADURAS	AZUCARES	
	g. lev. en 100 ml. Lectura corregida (⌘)	ml. Tiosulfato gastados Promedio	Sacarosa equivalente consumida. g. por 100 ml.
0	0.0441	6.5	4.0
6	0.2457	6.3	3.8
12	0.3392	7.5	2.7
18	0.6464	7.9	2.1
21	0.8665	8.4	1.2
24	0.5813	8.7	0.8
30	0.5870	9.0	0.5
36	0.5795	9.0	0.5

(⌘) La corrección se hizo restando a los gramos de levadura, 0.0604 g. que es el peso del sedimento del medio de cultivo testigo.

Gráfica 7
 Curvas de Crecimiento
 y
 Consumo de Azúcares en
 Fermentador de laboratorio
 (6.7.1)
Pichia barragani



A: CURVA DE CRECIMIENTO

B: CURVA DE CONSUMO DE AZUCARES

6.8 DETERMINACION DEL CONTENIDO PROTEINICO DE LAS LEVADURAS, (5.9).

$$\% N = \frac{V \times N \times 0.014 \times 100}{g. \text{ de muestra}}$$

$$\% \text{ Proteínas} = \% N \times 6.25$$

Torulopsis hydromelitis:

Gasto de HCl 0.1 N. obtenido = 28 ml.

$$\% N = \frac{28 \times 0.0192 \times 0.014 \times 100}{0.1} = 7.526$$

$$\% \text{ Proteínas} = 7.526 \times 6.25 = 47.04$$

Pichia barragani:

Gasto de HCl 0.1 N. obtenido = 27 ml.

$$\% N = \frac{27 \times 0.0192 \times 0.014 \times 100}{0.1} = 7.257$$

$$\% \text{ Proteínas} = 7.257 \times 6.25 = 45.36$$

6.9 RENDIMIENTOS DE LA PRODUCCION DE LAS LEVADURAS RELACIONADOS AL CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES, (5.10).

Torulopsis hydromelitis:

$$\text{Rendimiento} = \frac{0.7447}{3.9} \times 100 = 19.09 \%$$

Pichia barragani:

$$\text{Rendimiento} = \frac{0.8665}{3.0} \times 100 = 28.8 \%$$

V.- DISCUSION

7.1) Después de haber efectuado toda la serie de pruebas de crecimiento, forma de colonias y bioquímicas indicadas en el inciso 6.2 (6.2.1 hasta 6.2.20) de acuerdo al trabajo del Dr. Ruiz Oroz (9.18), en las dos cepas de levaduras que aislamos del aguamiel, se compararon los resultados obtenidos con los cuadros del capítulo II y se llegó a la conclusión de que se trataban de las especies:

Cepa N^o. 1 Torulopsis hydromelitis

Cepa No. 2 Pichia barragani

7.2) Como estas dos levaduras están acostumbradas a un medio ecológico natural (aguamiel - pulque), se pensó que era necesario un período de adaptación al medio melaza - sulfato de amonio, en que se pretendía cultivarlas; máxime que nuestra intención era lograr cultivos muy concentrados en un medio de cultivo líquido preparado con estos materiales.

Para la adaptación se ideó un medio sólido (el -- cual facilitaría la aeración al crecer el microorganismo en su superficie); utilizando agar, la fuente de carbono (melaza de caña), de nitrógeno (sulfato de amonio) y de fósforo (fosfato ácido de potasio) se pusieron en cantidades que se encuentran dentro de los límites indicados por diversos autores (9.15) este medio de adaptación fue el 4.1 y se -- usó para las dos levaduras, cada una de ellas fue sembrada por separado haciendo varios pases o resiembras (método 5.1) de esta manera fue observada la forma y velocidad de crecimiento de cada cepa.

En la cepa de P. barragani se notó que en el primer paso el crecimiento fue pobre pero al tercero fue abundante y rápido.

Con la cepa de T. hydromelitis sucedió exactamente lo mismo, aunque el crecimiento fue un poco más lento.

A partir de ese momento, las dos levaduras se conservaron en el medio sólido de melaza agar (4.11 y 4.12) para ulteriores experimentos y se desechó el medio de Sabouraud (4.2) que hasta ese momento se venía utilizando.

A continuación las dos levaduras se inocularon en matraces bafleados en el medio de adaptación líquido y después de sembrados, se procedió a agitarlos en mesa rotatoria, para observar la respuesta de crecimiento a estas nuevas condiciones (6.4).

El siguiente paso fue afinar los niveles de nutrientes para obtener una mejor relación entre el crecimiento celular y consumo de azúcares, o sea mayor rendimiento al aplicar los factores de agitación y aeración. Aunque es sabido que las levaduras utilizadas en la alimentación como C. utilis, C. tropicalis, S. cerevisiae etc. utilizan niveles de azúcares reductores bajos (1.0 a 1.5 %), (9.15); era necesario en este caso conocer el comportamiento de las levaduras en estudio, a diferentes niveles de nutrientes, pues su mejor rendimiento podría estar situado en otras concentraciones de nutrientes (6.3).

La cepa No.1 T. hydromelitis muestra abundante crecimiento a bajas concentraciones de melaza (6,3.1). En la cepa No. 2 - F. barragani sucede lo contrario, ya que el máximo rendimiento se obtiene a un nivel de melaza más alto; lo que indica una mayor asimilación de azúcares reductores totales utilizados, para formar su material celular, (6.3.2).

Para obtener un nivel óptimo de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, nos basamos en fundamentos teóricos (9.15) de los requerimientos necesarios para las levaduras, de los cuales se dedujo que la cantidad de esta fuente de nitrógeno debe ser suficiente, puesto que para la formación de aminoácidos y posteriormente la síntesis de proteínas se requiere principalmente de esta fuente nutritiva; dando como resultado una levadura con proteína de alta calidad.

De acuerdo a los resultados (6.3.3 y 6.3.4) P. barragani y T. hydromelitis son levaduras que requieren cantidades bajas de sulfato de amonio para un crecimiento favorable.

Los compuestos de fósforo juegan un importante papel en el metabolismo celular de la levadura, por lo que la adición de fósforo en forma de sales solubles incrementa considerablemente el contenido de carbohidratos y grasas en la célula.

Las cantidades bajas de fosfato ácido de potasio dan como resultado una eficiencia mayor en ambas levaduras (6.3.5 y 6.3.6).

La cifra más alta en las tablas de eficiencia, nos indicó el mejor aprovechamiento del nutrimento a prueba, o sea la más alta conversión a material celular por gramo del referido nutrimento.

Las gráficas 1, 2, 3 correspondientes a las fuentes nutritivas ensayadas para cada cepa de levadura en estudio, representan la eficiencia que se obtuvo en un medio determinado de acuerdo a la cantidad de substancia nutritiva requerida por la levadura (6.3).

En la gráfica 1, vemos que la cepa T. hydromelitis tiene mayor eficiencia en el nivel más bajo de melaza como fuente de carbono, esta eficiencia disminuye de una manera proporcional conforme aumenta la concentración de melaza. Para P. barragani la eficiencia tiene dos puntos óptimos, siendo ligeramente mayor a un nivel más alto aunque también se tiene buen rendimiento a un nivel más bajo. Comparando la eficiencia entre las levaduras se observa que se obtiene mayor producción de la levadura T. hydromelitis que de P. barragani, para el nivel que contiene menos fuente de carbono.

La gráfica 2 de la determinación de la fuente de nitrógeno muestra para T. hydromelitis que la eficiencia aumentó gradualmente a medida que la cantidad de nutrimento (sulfato de amonio) va disminuyendo en la cepa de P. barragani ocurre lo mismo, teniendo ambas levaduras la eficiencia óptima a un mismo nivel; así como la eficiencia

menor en el nivel de mayor concentración. La producción de P. barragani es mucho mayor que la de T. hydromelitis.

Los resultados de la gráfica 3 correspondiente a - la fuente de fósforo, indican para la cepa T. hydromelitis que la eficiencia va aumentando conforme va disminuyendo la cantidad de fosfato - ácido de potasio, obteniéndose así la eficiencia óptima en el nivel más bajo de la substancia nutritiva. P. barragani tiene su eficiencia óptima en un nivel de concentración baja del nutriente como ocurre con la - levadura anterior.

De acuerdo a estos resultados convendría afinar los niveles óptimos obtenidos para una mayor precisión en el diseño del medio de cultivo, de manera que la producción de levadura sea cada vez mejor.

7.3) Para la determinación de las curvas de crecimiento y consumo de azúcares previamente se hizo una curva estándar para correlacionar el gasto en mililitros de una solución de tiosulfato - de sodio 0.05 N., con los reductores totales en miligramos mediante el método de Underkoffler (5.8), obteniéndose la gráfica No. 4; como reductores totales se utilizó sacarosa R.A. la cual se invirtió con una solución de ácido clorhídrico.

En esta forma los datos de la curva estuvieron más en consonancia con los reductores totales de la melaza de caña utilizada en nuestro trabajo, los cuales en su mayoría consisten en sacarosa; habiéndose tratado cada muestra por el mismo método se analizó únicamente el remanente de reductores totales que la levadura al crecer no había consumido aún. Conforme a esto, todos los datos de consumo de azúcares en las tablas y gráficas se representan como sacarosa.

7.4) En las tablas 6.4.1 y 6.4.2 están indicados - los resultados del crecimiento de las dos levaduras en gramos. Tanto en este experimento en el que se utilizaron mesas rotatorias, como en el - siguiente en el que se usaron fermentadores con aire a presión, se deci

dió trabajar con el mismo medio de cultivo (4.15) para las dos cepas, con el objeto de observar el comportamiento de las dos levaduras en condiciones semejantes, para posteriormente en otros trabajos buscar los mejores rendimientos, pues aquí sólo se trató de encontrar algunos factores que permitieran hacer estudios enfocados a la producción de tipo industrial.

En relación al crecimiento de las dos levaduras efectuado en mesa rotatoria (6.4 y 6.5), observamos lo siguiente:

El crecimiento de las dos levaduras es muy semejante aunque la cepa de T. hydromelitis tarda más en llegar al máximo debido posiblemente a que se desarrolla mejor en medios de cultivo con menor concentración de azúcar. El máximo crecimiento para la levadura T. hydromelitis se alcanzó a las 21 horas y para la levadura P. barragani a las 18 horas. El consumo de azúcares fue bastante semejante en las dos cepas, habiendo consumido casi la totalidad de ellos en aproximadamente 12 horas. Sin embargo el crecimiento óptimo se alcanza unas 5 horas después; esto podría indicar que aunque ya no existan moléculas detectadas por el método de Underkoffler pueden existir otros compuestos de alta energía que siguen actuando como fuente de energía y de síntesis protoplásmica.

7.5) En las tablas 6.6.1, 6.6.2, 6.7.1; gráficas 6 y 7 se observa lo siguiente:

La levadura P. barragani crece un poco más rápido que T. hydromelitis corroborando lo que observamos en el crecimiento en mesa rotatoria; el consumo de azúcares está en el mismo caso, es más rápido en T. hydromelitis que en P. barragani.

P. barragani dio mejor rendimiento que la levadura T. hydromelitis pero no hay que olvidar que ésta fue producida en un medio con mayor contenido de azúcar que su óptimo.

Sin embargo al producirla en un medio con el óptimo de azúcar (2.5 %), se observó que su crecimiento fue más lento (gráfica 6) y la producción más baja. Esto podría indicar que hay necesi--dad de variar otros factores como aeración y temperatura, pH etc., en el fermentador para ver si en esta forma aumenta la velocidad de crecimiento. No se pudo hacer esto debido a no contar con el equipo adecuado, también hay que hacer notar que realmente no se profundizó en la -forma de obtener mejores rendimientos debido a lo antes mencionado y -sólo nos concretamos a obtener un conocimiento básico de estas dos le-vaduras asimismo clasificarlas.

Un mejor estudio en cuanto a producción para esca-la comercial deberá hacerse con un diseño más económico en el medio de cultivo, afinando los niveles de nutrimentos y con equipos de fermentación más adecuados.

VI.- CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados presentados en este trabajo podemos concluir que:

8.1) Las levaduras Torulopsis hydromelitis y Pichia barragani aisladas del aguamiel pueden ser utilizadas en los procesos fermentativos a gran escala con la finalidad de que sean aplicadas como fuente alimenticia, usando melazas como materia prima. Se eligieron estos desechos de la industria azucarera debido a que ofrecen un medio de cultivo adecuado para el rápido crecimiento de estas levaduras y aprovecharlos en lugar de tirarlos pues aunque una parte de ellos se utiliza en la producción de alcohol y como aditivo en alimentos para animales, el resto se desecha y causa problemas de contaminación en ríos y lagos; además no requiere de un tratamiento previo y es poca la cantidad de nutrientes inorgánicos agregados a la melaza al preparar el medio de cultivo.

8.2) Fueron estudiados los niveles de carbono, nitrógeno y fósforo apropiados; observándose que la utilización de ellos por cada levadura fue pequeña, lo que indica que el medio de cultivo a nivel industrial es económico. Sin embargo es necesario estudiar esto más a fondo para obtener mayor precisión en la determinación de estos niveles y mejorar el rendimiento.

8.3) Las condiciones óptimas de trabajo para la producción de levadura a escala industrial correspondientes a cada una de las levaduras deben ser establecidas de acuerdo a trabajos posteriores, a nivel de planta semipiloto y luego a planta piloto.

Ya que este trabajo fue enfocado a conocer algunos aspectos de la producción, a nivel de laboratorio como base para investigación posterior a nivel de planta semipiloto para efectuar estudios en relación a variaciones del pH, temperatura, aeración y agitación en cada una de las levaduras, lo que serviría para fijar condiciones de producción industrial.

8.4) En la determinación de azúcares reductores con el método utilizado (Underkoffler) se obtuvieron resultados favorables por su especificidad para el análisis en los medios de fermentación, además que no fue necesario la clarificación previa del medio de cultivo.

8.5) A pesar de que el crecimiento de estas dos levaduras fue rápido, los rendimientos obtenidos fueron un poco más bajos debido a que como se mencionó anteriormente, no se trabajó en las condiciones óptimas de equipo, ni se investigaron factores como pH, temperatura, aeración y agitación ya indicados.

8.6) Estas levaduras presentaron un contenido proteínico aceptable y es por lo que pueden considerarse de interés para su uso en la industria alimenticia animal y posteriormente con estudios más detallados, en la humana.

8.7) También es posible mediante nuevos estudios que estas levaduras pueden ser utilizadas tanto en la industria farmacéutica como tales, o para la obtención de vitaminas del complejo B, así como para la obtención de aminoácidos e hidrolizados de proteína.

VII.- B I B L I O G R A F I A

- 9.1) Albanese A. (1959). " Protein and Aminoacid Nutrition ".
Academic Press, New York. (E.U.A.)
- 9.2) Alexopoulos C. (1962). " Introductory Micology ". Segunda edición
John Wiley and Sons, Inc. New York. (E.U.A.)
- 9.3) Black C. (1965). " Methods of Soil Analysis ". Part 2, pag. 1162-
1167.
- 9.4) Cook A. (1958). " The Chemistry and Biology of Yeasts ".
Academic Press, Inc. Publishers, New York. (E.U.A.)
- 9.5) Hahen H. (1956). " Bioquímica de las Fermentaciones ".
Editorial Aguilar, Madrid. (ESPAÑA).
- 9.6) Hedenskong H. and Mogren H. (1973). " Some methods for processing
of single - cell protein ". Biotechnology and Bioengineering, Vol.
XV, pag. 129 - 142.
- 9.7) International Atomic Energy, (1971). " Radiation and Radioisoto--
pes for Industrial Microorganisms ".
Agency, Viena. (AUSTRIA)
- 9.8) Jørgensen A. (1948). " Microorganisms and Fermentation ".
Charles Griffin and Co. L.T.D. (ENGLAND)
- 9.9) Lemoine M.B. y Rodríguez U.I. (1976). " Evaluación química y bio-
lógica de levaduras aisladas del pulque como recurso proteico en
alimentación ". TESIS. Facultad de Química U.N.A.M. (MEX.)
- 9.10) Loyola M.E. (1956). " La Industria del Fulque ". Departamento de
Investigaciones Industriales . Banco de México S.A. (MEX.)
- 9.11) Málek. (1968). " Continuous Cultivation of Microorganisms ".
Academic Press, New York. (E.U.A.)

- 9.12) MTP. (1975). "International Review of Science Synthesis of Amino-acids and Proteins Biochemistry". Vol. 7, Series One.
University Park Press, (E.U.A.)
- 9.13) Perlman (1969). "Fermentation Advances".
Academic Press, New York. (E.U.A.)
- 9.14) Phaff H. (1966). "The life of yeasts".
Harvard University Press. (E.U.A.)
- 9.15) Prescott S. (1952). "Microbiología Industrial".
Editorial Aguilar S.A. Madrid. (ESPAÑA)
- 9.16) Rhodes A. (1969). "Principios de Microbiología Industrial".
Editorial Acribia, Zaragoza. (ESPAÑA)
- 9.17) Rose H. (1970). "The Yeasts".
Academic Press, New York. (E.U.A.)
- 9.18) Ruiz Oronoz M. (1942). "Contribución al conocimiento de las levaduras del aguamiel y del pulque".
Anales del Instituto de Biología. U.N.A.M. (MEX.)
- 9.19) Skinner (1947). "Henrici's Molds Yeasts and Actinomycetes".
John Wiley and Sons. (E.U.A.)
- 9.20) Smith G. (1963). "Introducción a la Micología Industrial".
Editorial Acribia, Zaragoza. (ESPAÑA)
- 9.21) Solomons G.L. (1969). "Materials and Methods in Fermentation".
Academic Press, New York. (E.U.A.)
- 9.22) Underkoffler L.A. and Guymon J.P. (1943). "Semimicromethod for the Determination of Reducing Sugars in Fermentation Media".
J. Sci. 17 , 251-256. Iowa State Coll. (E.U.A.)
- 9.23) Underkoffler L.A. (1954). "Industrial Fermentation".
Vol. I y II. Chemical Publishing Co., New York (E.U.A.)
- 9.24) Webb F. (1964). "Biochemical Engineering".
Van Nostrand, Co. Inc. (E.U.A.)