

300627  
14  
24



**UNIVERSIDAD LA SALLE**

**ESCUELA DE QUIMICA**

Incorporada a la U. N. A. M.

**PRODUCCION DE PROTEINA UNICELULAR  
A PARTIR DE PAJA DE TRIGO**

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO - FARMACO - BIOLOGO

P R E S E N T A

**OLGA JACOME GUTH**

MEXICO, D. F.

1986



## **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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

# I N D I C E

## CAPITULO 1 INTRODUCCION Y OBJETIVOS

1.1	INTRODUCCION. . . . .	1-1
1.2	OBJETIVOS. . . . .	1-4

## CAPITULO 2 ANTECEDENTES

2.1	CONSIDERACIONES SOBRE MATERIALES CELULOSICOS. . . . .	2-1
2.2	CONSIDERACIONES SOBRE CULTIVOS MIXTOS. . . . .	2-4
2.3	CONSIDERACIONES SOBRE EL CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO. . . . .	2-5

## CAPITULO 3 MATERIAL Y METODOS

3.1	EQUIPO. . . . .	3-1
3.2	MICROORGANISMOS. . . . .	3-2
3.3	MEDIOS DE CULTIVO. . . . .	3-2
3.4	FUENTE DE CARBONO. . . . .	3-3
3.5	ESTERILIZACION. . . . .	3-4
3.6	PREPARACION DEL INOCULO. . . . .	3-4
3.7	OPERACIONES DE FERMENTACION. . . . .	3-6
3.8	MUESTREO . . . . .	3-6
3.9	RECUPERACION DE LA BIOMASA. . . . .	3-8
3.10	ANALISIS. . . . .	3-8
3.10.1	Pureza . . . . .	3-8
3.10.2	Crecimiento . . . . .	3-8
3.10.3	Carbohidratos Solubles . . . . .	3-10
3.10.4	Sustrato Residual . . . . .	3-10
3.10.5	Bromatológico . . . . .	3-10
3.10.6	Acidos Nucleicos . . . . .	3-11
3.10.7	Aminograma . . . . .	3-11

## CAPITULO 4 RESULTADOS

4.1	TIEMPO DE ESTERILIZACION. . . . .	4-1
4.2	EFFECTO DE LA CONTAMINACION. . . . .	4-2
4.3	CARBOHIDRATOS SOLUBLES. . . . .	4-5
4.4	SUSTRATO RESIDUAL. . . . .	4-5
4.5	CINETICA DE CRECIMIENTO. . . . .	4-5
4.6	FERMENTACION POR LOTE ALIMENTADO. . . . .	4-10
4.7	ANALISIS QUIMICO DE LA BIOMASA. . . . .	4-15

## CAPITULO 5 DISCUSION

5.1	ESTERILIDAD. . . . .	5-1
5.2	CARBOHIDRATOS SOLUBLES. . . . .	5-3
5.3	SUSTRATO. . . . .	5-3

5.4	CINETICA DE CRECIMIENTO DE LA FERMENTACION POR LOTE. . . . .	5-4
5.5	FERMENTACION POR LOTE ALIMENTADO. . . . .	5-6
5.6	ANALISIS QUIMICO DE LA BIOMASA. . . . .	5-8

**CAPITULO 6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

6.1	CONCLUSIONES. . . . .	6-1
6.2	RECOMENDACIONES. . . . .	6-2

**APENDICE A REFERENCIAS**

## RESUMEN

Se propagó el cultivo mixto bacteriano integrado por *Cellulomonas flavigena* y *Xanthomonas* sp., en paja de trigo tratada con NaOH, bajo condiciones de esterilidad.

Se encontró una gran resistencia a la esterilización en la paja de trigo que requirió un tiempo de 120 min a 18 lb/pulg<sup>2</sup> en las condiciones empleadas (fermentador de 14 l con un volumen de operación de 6 l y 2.5X de paja de trigo).

Los parámetros cinéticos de la fermentación por lote fueron:  $Y=0.2$  g-prot/g-sustrato consumido; se observaron 2 etapas de crecimiento exponencial con velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) de 0.111 y 0.029 l/hr. La productividad del sistema por lote fue: 50.99 mg-prot/l.hr.

La alimentación de sustrato (15 g/l cada 12 hr) a partir de las 24 y 30 hrs de cultivo, incrementó la  $\mu$  de la 2a. etapa de crecimiento exponencial a 0.046 l/hr y la productividad a 71.4 mg-prot/l.hr.

No se observó autoprotección a la contaminación al alimentar sustrato no estéril. Aunque el cultivo mixto (*C. flavigena* y *Xanthomonas* sp.) nunca fue desplazado por la contaminación, en algunos casos hubo inhibición del crecimiento.

No se consideró factible establecer un sistema por lote alimentado en condiciones de esterilidad, por los altos costos de operación que esto implica.

El contenido de proteína de la biomasa fue 53.37%. El perfil de aminoácidos de la proteína microbiana obtenida en paja de trigo, fue similar al de la obtenida en otros sustratos lignocelulósicos y al de la alfalfa, excepto en este caso, por menos lisina e isoleucina.

## CAPITULO 1

### INTRODUCCION Y OBJETIVOS

#### 1.1 INTRODUCCION.

La abundancia de residuos agrícolas, que constituyen una gran fuente de energía no aprovechada (el grano cosechado es menos del 50% de la energía capturada por la planta) (41), así como la necesidad de alimentos de buena calidad, han llevado a realizar investigaciones sobre la posibilidad de aprovechar el material celulésico renovable, como fuente de alimento, ya sea para consumo animal ó humano.

Han (12) menciona que el principal problema para el uso de estos materiales en la alimentación de ruminantes es su bajo contenido de proteína y su baja digestibilidad. Con el propósito de superar estas limitaciones algunos investigadores han utilizado tratamientos físico-químicos con suplementación de nutrientes (12), sin embargo, resultados más satisfactorios se han obtenido mediante fermentación con microorganismos celulolíticos.

Kristensen (20) en paja de cebada, De la Torre (8) en bagazo de caña y Han (12,13,14) en paja de arroz obtuvieron incrementos en el contenido de proteína desde 3% hasta 10%, desde 1.2% hasta 7.6% y desde 4.2% hasta 12.8% respectivamente, utilizando cultivos mixtos con Cellulomonas.

También Han (12,13,14) obtuvo un aumento en digestibilidad desde 30.7% hasta 51.7% en paja de arroz. Moo-Young (30) obtuvo un forraje con una digestibilidad de 73% utilizando Chaetomium cellulolyticum.

Cabe hacer énfasis que en el aprovechamiento de residuos agrícolas mediante fermentación con microorganismos unicelulares celulolíticos es posible obtener, dos productos de interés alimenticio: el sustrato residual enriquecido y la biomasa producida. Si el propósito es únicamente el enriquecimiento del material celulésico no hay necesidad de una separación. Moo-Young (30) trabajó con Chaetomium cellulolyticum en pajas de

## INTRODUCCION Y OBJETIVOS

cereales obteniendo un producto con un contenido de biomasa de 73% y de celulosa de 4%.

La recuperación de la biomasa, hace al proceso fermentativo más versátil, no limitado a producir únicamente alimento para rumiantes.

La biomasa obtenida contiene una elevada proporción de proteína de buena calidad, la cual, puede ser utilizada directamente en alimentos balanceados, en forma íntegra o puede ser procesada para obtener aislados proteínicos (38).

El contenido de aminoácidos de la proteína de varias especies de *Cellulomonas* (38) es similar al contenido de aminoácidos de la proteína de alfalfa (12).

Para *Chaetomium cellulolyticum*, Moo-Young (30) reportó un contenido de aminoácidos similar al de la pasta de soya.

Bellamy (4) reportó que la proteína de *Thermoactinomyces* sp. contiene una elevada concentración de lisina, triptófano y de aminoácidos sulfurados.

La factibilidad para producir proteína de origen microbiano de buena calidad a partir de residuos agrícolas ha llevado a desarrollar varios procesos de fermentación con ese propósito, datos generales de algunos de ellos se muestran en la Tabla 1.

En el departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV del I.P.N. se ha desarrollado una tecnología para la producción de proteína de origen microbiano a partir de residuos agrícolas. El proceso está basado en el empleo de un cultivo mixto bacteriano integrado por *Cellulomonas flavigena* y *Xanthomonas* sp. cuya selección se hizo en base a su cinética en bagazo de caña y a su inocuidad en animales de laboratorio (8).

Dentro del programa de investigación para llevar el proceso fermentativo a planta piloto y posteriormente a escala industrial, se incluye un estudio básico del comportamiento del cultivo y de la calidad de la biomasa obtenida bajo diferentes sustratos celulósicos tales como rastrojo de maíz, rastrojo de sorgo, paja de trigo etc.

INTRODUCCION Y OBJETIVOS

TABLA 1

PROCESOS DE FERMENTACION PARA LA OBTENCION DE PROTEINA UNICELULAR A PARTIR DE RESIDUOS LIGNOCELULOSICOS

MICROORGANISMOS	SUSTRATO	PRETRATAMIENTO	SISTEMA DE CULTIVO	REFERENCIAS
<i>Cellulomonas</i> sp y <i>Alcaligenes faecalis</i>	Bagazo de Cafe Paja de Arroz	Alcalino Acido	Lote y Continuo	(38,10) (12,13,14)
<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	Residuos de Madera y Pulpa de Celulosa	Alcalino	Lote	(29,30)
<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Excretas Animales	Alcalino	Lote	(4,8)
<i>Cellulomonas flavisensu</i> y <i>Xanthomonas</i> sp.	Bagazo de Cafe	Alcalino	Lote Lote Alimentado	(8)
<i>Cellulomonas</i> sp. y <i>Candida utilis</i>	Paja de Cebada	Alcalino	Continuo	(20)
<i>Trichoderma reesei</i>	Paja de Cebada	Alcalino	Lote	(33)
<i>T. reesei</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Paja de Cebada	Alcalino	Lote	(34)
<i>T. reesei</i> y <i>Candida utilis</i>	Paja de Cebada	Alcalino	Lote	(34)



## INTRODUCCION Y OBJETIVOS

### 1.2 OBJETIVOS.

En el presente trabajo se propagó el cultivo mixto en paja de trigo, bajo las condiciones de crecimiento y pretratamiento al sustrato establecidos para bagazo de caña (Tabla 2), con el propósito de evaluar la calidad de la biomasa, evaluar su comportamiento en cultivo por lote y establecer, en base a estudios previos que indican que se trata de un sistema limitado por fuente de carbono (8,23), un sistema de fermentación por lote alimentado.

TABLA 2

CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y PRETRATAMIENTO AL SUSTRATO EN LA FERMENTACION  
DE BAGAZO DE CAÑA CON EL CULTIVO MIXTO INTRODUCIDO POR  
*Cellulomonas flaviginea* y *Klebsiella* sp.

CONDICIONES	MEDIO MINERAL	SUSTRATO	PRETRATAMIENTO AL SUSTRATO
T = 27 grados C pH = 6.9 l	NaCl	5.50 g	1) Molienda
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6.25 g	2) Tratamiento Alcalino
	PO <sub>4</sub>	0.75 g	NaOH 2%
	CaCl <sub>2</sub>	0.25 g	Sustrato 10%
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25 g	Vapor directo
	Agua	1.00 l	3) Levado

## CAPITULO 2

### ANTECEDENTES

#### 2.1 CONSIDERACIONES SOBRE MATERIALES CELULOSICOS.

Los residuos agrícolas están formados principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina en una proporción aproximada 4:3:3 (45). El contenido depende de la fuente de que se trate y dentro de un mismo tipo de fuente depende de factores como son: el grado de maduración de la planta, de la fertilidad de la tierra y de las condiciones climáticas (2).

Dentro de la pared celular se encuentran la celulosa, hemicelulosa, y lignina agregadas en largos y delgados paquetes llamados microfibrillas, según la orientación de estas microfibrillas dentro de la pared celular se distinguen varias capas (6,7,10).

Las microfibrillas se comunican entre sí mediante pequeñas moléculas de celulosa que se cruzan de una microfibrilla a otra (6,7,10). Dentro de cada microfibrilla las moléculas lineales de celulosa están enlazadas lateralmente por puentes de hidrógeno, y están asociadas en varios grados de paralelismo. Las regiones que contienen alta orientación molecular son llamadas regiones cristalinas, mientras que aquellas con menor orden son llamadas regiones amorfas. Existen varias teorías sobre el arreglo que tienen las cadenas de celulosa nativa para formar las zonas cristalinas (10).

La lignina y la hemicelulosa actúan como cemento dentro de cada microfibrilla penetrando los espacios entre moléculas de celulosa en las regiones amorfas (26).

Esta estructura hace que los materiales lignocelulósicos presenten gran resistencia a la hidrólisis enzimática: la lignina restringe el acceso enzimático a la celulosa y la cristalinidad restringe la velocidad de hidrólisis (26).

## ANTECEDENTES

Se han realizado muchos trabajos con el propósito de incrementar la accesibilidad de la celulosa al ataque enzimático así como la velocidad de hidrólisis. Algunos de los métodos usados para este propósito se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3  
MÉTODOS PARA INCREMENTAR LA DIGESTIBILIDAD

MÉTODOS QUÍMICOS	MÉTODOS FÍSICOS
Tratamiento ácido (26,45,31)	Molienda (26)
Tratamiento alcalino (24,26)	Radiaciones (15)
Solvatación de la celulosa (26)	Temperatura (26)
Tratamiento con vapor (26)	Presión (26)
Deslignificación (5,26,28)	

El objetivo básico de estos tratamientos es alterar la estructura de la celulosa y por consiguiente romper el complejo lignina-carbohidrato (27).

En el proceso desarrollado por De la Torre (8), para la producción de proteína unicelular a partir de residuos agrícolas, el material lignocelulósico recibe un tratamiento alcalino, el cual incrementa el % de degradación del material desde un 28% hasta un 65%.

Este incremento es debido a la modificación de la estructura cristalina de la celulosa y a una deslignificación parcial: se solubiliza el 63% de la lignina presente en el material original (además de sales minerales y hemicelulosas).

Puesto que los cambios provocados por el tratamiento alcalino involucran reacciones químicas, los parámetros a considerar en su diseño y optimización son el tiempo y la temperatura, así como la relación álcali:residuo celulósico.

El efecto de cada una de estas variables sobre el % de degradación en la fermentación de bagazo de caña con el cultivo mixto (*C. flavigera* y *Xanthomonas* sp.) fue determinado por De la Torre (8).

La producción de residuos agrícolas en México es como se muestra en la Tabla 4.

## ANTECEDENTES

TABLA 4

PRODUCCION ANUAL DE LOS PRINCIPALES RESIDUOS AGRICOLAS (8)  
(PROMEDIO 1972-1976)

CULTIVO	RESIDUO (TONELADAS)	% PRODUCCION NAL.
Maiz (Rastrojo y Olate)	103,623,675	80.28
Sorgo (Rastrojo)	12,488,040	9.67
Caña de Azúcar (Rastrojo)	8,396,646	6.50
Trigo (Paja)	2,519,361	1.95
Frijol (Paja)	617,819	0.48
Arroz Palay (Cascarilla)	506,527	0.39

En base a estos datos de producción total de residuos agrícolas, se seleccionó la paja de trigo entre los sustratos de interés para la producción de proteína unicelular con el cultivo mixto: Cellulomonas flavisensu y Xanthomonas sp.

En la Tabla 5 se muestra la composición de la paja de trigo. El contenido de pentosas y hexosas que integran la hemicelulosa y celulosa se muestran en la Tabla 6.

TABLA 5

COMPOSICION DE PAJA DE TRIGO (2,41,42)

% BASE SECA	
Proteína	3.6
Extracto Etereo	1.7
Celulosa	40.0
Hemicelulosa	29.2
Lignina	13.6
Cenizas	8.1

## ANTECEDENTES

TABLA 6

CONTENIDO DE MONOSACARIDOS EN PAJA DE TRIGO (41,42)

	% BASE SECA
Arabinosa	6.2
Xilosa	21.0
Manosa	0.3
Galactosa	0.6
Glucosa	41.1
Carbohidratos totales	69.5

### 2.2 CONSIDERACIONES SOBRE CULTIVOS MIXTOS.

Los microorganismos empleados en procesos fermentativos de residuos agrícolas han sido de varios tipos (4). Algunos de ellos cultivos mixtos, integrados como tales, al tomar en consideración que en la degradación de materiales celulésicos en la naturaleza participan muchos microorganismos (1,34).

Con el empleo de cultivos mixtos, Kristensen (20) y Peitersen (34), utilizando paja de cebada como sustrato, obtuvieron mejoras en rendimiento, productividad, contenido de proteína y se pudo evitar la adición de factores de crecimiento al medio de cultivo, sin embargo se presentaron problemas de inestabilidad, después de tres días de cultivo, al cambiar el tipo de interacción de mutualismo a competición durante la fermentación.

Para aprovechar las ventajas que implica el uso de cultivos mixtos en procesos fermentativos, se ha tratado de explotar el fenómeno de interdependencia de las especies observada en la naturaleza (Tabla 7), aislando cultivos mixtos naturales en los cuales existe una asociación poblacional estable (16,17).

Un cultivo con estas características es el sistema mixto bacteriano integrado por *Cellulomonas flavigena* y *Xanthomonas* sp. En este cultivo De la Torre (8) demostró que existe una interacción benéfica para ambas poblaciones (mutualismo) en la cual ambos microorganismos intercambian factores de crecimiento y *Cellulomonas* proporciona carbohidratos solubles a *Xanthomonas*.

## ANTECEDENTES

Posteriormente, Ponce (36), en estudios en cultivo continuo concluye que más que un mutualismo puro, existe un mutualismo con competencia entre los integrantes del cultivo mixto.

En el mismo trabajo, Ponce demuestra que la relación de poblaciones permanece estable aún bajo ligeras variaciones en las condiciones ambientales. Esto es de suma importancia ya que uno de los requisitos para el empleo de cultivos mixtos en la producción de proteína unicelular es su estabilidad la cual va a permitir que se mantengan constantes las propiedades nutricionales y toxicológicas del producto (8).

TABLA 7  
INTERACCIONES DE LOS MICROORGANISMOS

TIPO DE RELACION	DEFINICION PARAFRASEADA
Neutralismo	Ausencia de interacción
Comensalismo	Uno se beneficia y el otro no es afectado
Mutualismo	Cada miembro se beneficia del otro
Competición	Hay competencia por nutrientes y espacio
Amensalismo	Uno cambia adversamente el medio para el otro
Parasitismo	Un organismo vive a expensas del otro afectándolo
Predación	Un organismo se come al otro

### 2.3 CONSIDERACIONES SOBRE EL CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO.

Cuando un sistema de cultivo por lote se alimenta con una cantidad determinada de medio fresco, sin eliminar medio agotado ni células, se llama cultivo por lote alimentado (35). El consecuente aumento de volumen en este tipo de cultivos lo distingue de un sistema continuo en el cual es esencial mantener un volumen constante.

Alcanzar el estado 'quasi estacionario' ( $ds/dt=0$ ), en el cual la velocidad de alimentación de sustrato se ajusta a la velocidad de consumo del mismo, es el factor crítico de los sistemas por lote alimentado (8).

El método para controlar la velocidad de alimentación dependerá: del microorganismo, del medio de cultivo, del fermentador y del equipo disponible (47). Se han desarrollado modelos matemáticos que permiten evaluar la velocidad de alimentación en función de algún parámetro tal como: presión de

## ANTECEDENTES

O<sub>2</sub> de CO<sub>2</sub> en los gases de salida, valores de pH, concentración de sustrato limitante en el medio, concentración de O<sub>2</sub> disuelto, presión de vapor del sustrato y cociente respiratorio (8). Es necesario determinar experimentalmente cual es la variable más adecuada para controlar la velocidad de alimentación en cada sistema de fermentación (8).

Se ha demostrado que el sistema por lote alimentado ha incrementado rendimientos y productividad de un gran número de procesos de fermentación, algunos de estos se muestran en la Tabla 8.

TABLA 8

PROCESOS DE FERMENTACION QUE HAN USADO CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO (47)

PRODUCTO	ADICIONES
Levaduras	Melassas, fuente de nitrógeno, fósforo y magnesio
Glicerol	Azúcares fermentables, carbonato de sodio
Riboflavina	Carbohidratos
Penicilina	Glucosa y amonio
Protéasa	Glucosa y caseína digerida
Novobiocina	Varias fuentes de carbono y nitrógeno
Acido glutámico	Amonio
Gibberelina	Glucosa
Vitamina B12	Glucosa
Tetraciclinas	Glucosa
Acido Cítrico	Carbohidratos, sulfato de amonio
Proteína unicelular	Metanol
Lisina	Etanol y urea, etanol y sulfato de amonio
Estreptomicina	Glucosa y amonio

La productividad del cultivo mixto *Cellulomonas flavigena* y *Xanthomonas* sp. sobre bagazo de café en cultivo por lote, resultó ser inferior a la obtenida en los procesos industriales de producción de levadura en hidrocarburos (8). Basados en la hipótesis de que la baja productividad se debía a una limitación en la fuente de carbono (22), se pensó que podría resolverse el problema incrementando la cantidad de fuente de carbono inicial ó bien añadiéndola durante la fermentación, la primera opción presentó problemas de transferencia de O al trabajar con concentraciones de sustrato de 3% (22), por lo cual se optó por la segunda diseñando un cultivo por lote cíclico (22) y posteriormente un cultivo por lote alimentado (8). Ver Tabla 9.

## ANTECEDENTES

TABLA 9

PRODUCTIVIDAD DE CELULAS Y PROTEINA A PARTIR DE BAGAZO DE CAMA  
CON EL CULTIVO MIXTO Cellulomonas flavigena-Xanthomonas sp. (8,22)

SISTEMA	g-cel/l.h	g-prot/l.h (considerando 60% de prot)
Por Lote 10 g/l	0.095	0.057
Por Lote 25 g/l	0.188	0.113
Lote Cíclico	0.302	0.181
Lote Alimentado	0.840	0.504

Como se observa en la Tabla 9 el cultivo por lote alimentado resultó ser muy adecuado ya que incrementó la productividad del proceso, aún cuando la velocidad de alimentación no fue la adecuada ya que hubo acumulación de sustrato (8).

En el cultivo por lote alimentado, el sustrato fue alimentado manualmente sin esterilizar, por lo cual de la Torre concluye que es factible operar este sistema de fermentación sin mantenimiento de condiciones asepticas. Esto constituye una gran ventaja para el proceso ya que puede evitarse el costo de esterilización que representa una parte considerable en la inversión del proceso (8,38).



**CAPITULO 3**  
**MATERIAL Y METODOS**

**3.1 EQUIPO.**

**Agitadora NBS G-25**

**Autoanalizador de aminoácidos Beckman 118 CL**

**Autoclaves CSR**

**Bombas peristálticas Randolp pump 250**

**Campana de flujo horizontal VECO**

**Centrifuga automática Sorvall 88-3**

**Centrifuga continua Westfalia BAI-04-175**

**Centrifuga de canasta M. de M. 305-SPQ**

**Controlador de pH Chemtrix 45 R/R B**

**Destilador micro-Kjeldahl Lab-Con-Co**

**Digestor micro-Kjeldahl Lab-Con-Co**

**Espectrofotómetro Perkin-Elmer 35**

**Estufa de incubación VECO**

**Extractor Soxhlet Lab-Line-Instruments**

**Fermentador de 14 l NBS Unidad CFS-314**

**Filtro de vacío Eymco**

## MATERIAL Y METODOS

Liofilizadora NBS B-66

Molino de martillos m y m

Secador de aspersión Niro Atomizer

### 3.2 MICROORGANISMOS.

Se trabajó con el cultivo mixto bacteriano integrado por *Cellulomonas flavigena* y *Xanthomonas* sp., el cual se conservó en tubos con medio mineral M1, agar al 2% y carboximetilcelulosa (CMC) al 1%. Después de sembrados los tubos se incubaron a 37 grados C por 48 hr, y se mantuvieron posteriormente en refrigeración a 4 grados C, la resiembra se hizo cada mes.

### 3.3 MEDIOS DE CULTIVO.

El medio mineral utilizado fue el optimizado por Lorences (22) y De la Torre (8), y tiene la siguiente composición:

#### Medio Mineral M1

NaCl	5.5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.5 g
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	3.5 g
CaCl <sub>2</sub>	0.1 g
HgSO <sub>4</sub>	0.1 g
Agua	1000.0 ml

Este medio M1 adicionado del 1% de fuente de carbono, se empleó para la conservación del cultivo y en las primeras etapas de la preparación del inóculo.

Para fermentador, donde se trabajó con 2.5% de fuente de carbono, la concentración de cada uno de los constituyentes del medio M1 se multiplicó por 2.5, excepto el NaCl, quedando el medio con la siguiente composición:

## MATERIAL Y METODOS

### Medio Mineral M2.5

NaCl	5.5 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6.25 g
$\text{PO}_4$	8.75 g
$\text{CaCl}_2$	0.25 g
$\text{MgSO}_4$	0.25 g
Agua	1000.0 ml

Todas las sales empleadas fueron grado industrial. Los  $\text{PO}_4^{3-}$  se suministraron después de neutralizar  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 75% con KOH.

### 3.4 FUENTE DE CARBONO.

En todas las fermentaciones se trabajó con paja de trigo. La paja se hizo pasar por un molino de martillos para reducir su tamaño, mismo que iba desde polvo impalpable hasta fibras de 5-6 mm de longitud.

Una vez molida se sometió al tratamiento alcalino descrito por De la Torre (8): se prepara una suspensión con 10% de paja en NaOH al 2%, esta se lleva a ebullición con vapor directo y se mantiene por 15 min, posteriormente se lava con agua de la llave hasta neutralidad.

Para secar el material se separó primero el exceso de agua en una centrifuga de canasta y posteriormente se llevó a un horno a 80 grados C por 24 hr d a temperatura ambiente por el tiempo necesario. Puesto que en un principio se trabajó con el material húmedo, fue necesario estandarizar la carga y tiempo de centrifugación: se alimentó a la centrifuga 300 g de material (pesados antes del tratamiento alcalino) suspendido en un volumen de 7 l de agua y se mantuvo a 3000 rpm durante 5 min; bajo estas condiciones se obtuvo el material con  $76 \pm 0.5\%$  de humedad y así se almacenó en refrigeración en bolsas de plástico.

Seco el material se molió nuevamente para desintegrar los grumos formados. Cuando se trabajó con el material húmedo, en un principio se dispersaron los grumos manualmente, posteriormente se usó una licuadora.

## MATERIAL Y METODOS

### 3.5 ESTERILIZACION.

Los matraces para inóculo se esterilizaron 45 min a 1B lb/pulg<sup>2</sup>.

El fermentador, equipado como se muestra en la Fig. 1, se esterilizó a la misma presión y se probaron diferentes tiempos de esterilización: 50 min, 60 min, 90 min y 120 min.

Previamente a la esterilización se hizo pasar vapor a todas las tuberías del fermentador, antes de cada corrida.

Los filtros de aire empacados con fibra de vidrio también se esterilizaron previamente en seco a 200 grados C por 2 hrs antes de cada corrida.

La hermeticidad del fermentador se comprobó (antes de cada corrida) sumergiendo el fermentador equipado, en agua e introduciendo aire al mismo para presurizar.

### 3.6 PREPARACION DEL INOCULO.

El inóculo se preparó sembrando en un matraz de 250 ml, que contenía 50 ml de medio M1 más 1% de paja de trigo tratada, la suspensión celular obtenida de un tubo de conservación del cultivo. El matraz se incubó a 37 grados C por 48 hrs en una agitadora recíproca a 100 golpes/min. Con 10 ml del crecimiento así obtenido se inoculó un matraz de 500 ml que contenía 100 ml del mismo medio (M1 más 1% de paja) y se incubó bajo las mismas condiciones por 24 hr. Con 20 ml del crecimiento obtenido de este matraz se inocularon cada uno de tres matraces de 1000 ml que contenían 200 ml de medio M2.5 más 2.5% de paja y se incubaron en la misma forma durante 24 a 30 hrs. Con estos matraces se inocularon 6 l de medio en el fermentador.

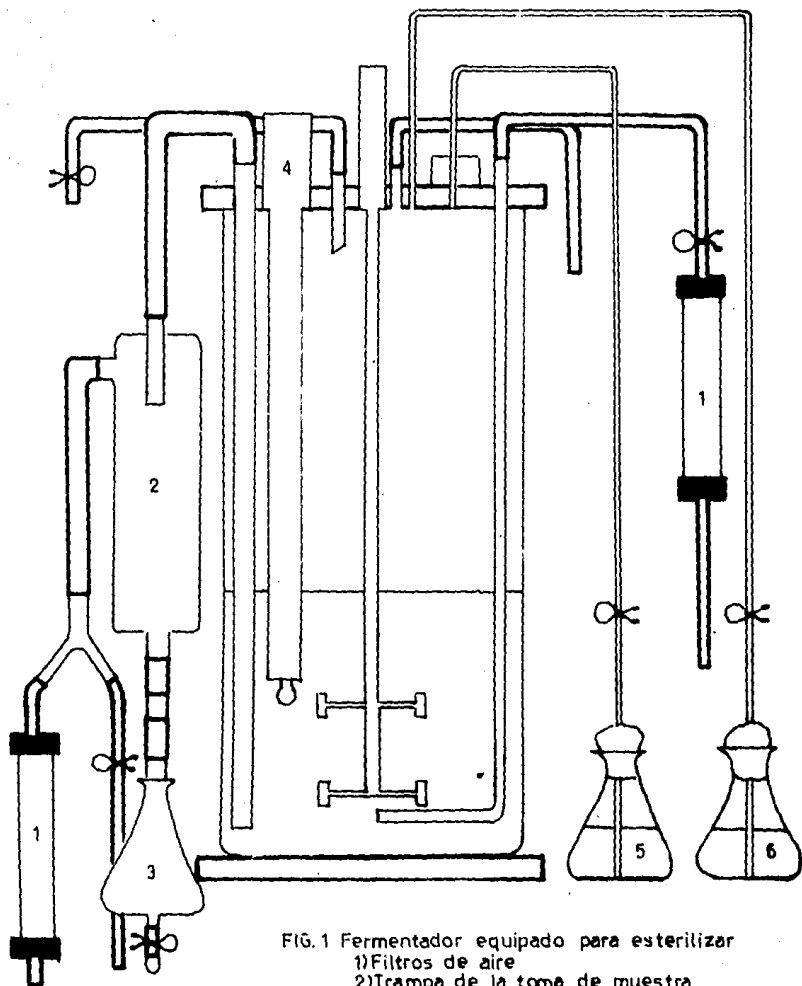


FIG.1 Fermentador equipado para esterilizar

- 1)Filtros de aire
- 2)Trampa de la toma de muestra
- 3)Receptor de muestra
- 4)Electrodo de pH
- 5)Alcali
- 6)Antiespumante

## MATERIAL Y METODOS

### 3.7 OPERACIONES DE FERMENTACION.

Se trabajó en un fermentador de 14 l con un volumen de operación de 6 l (medio M2.5 más 2.5% de paja tratada). La velocidad de agitación fue 400 a 600 rpm, el flujo de aire de 0.3 vvm (vol de aire/vol de medio/min) y la temperatura de 37 grados C. Se controló el valor de pH automáticamente a  $6.9 \pm 0.1$  mediante la adición de  $\text{NH}_4\text{OH}$  conc. y la espuma con adición de antiespumante (EG-10 Dowcorning).

Las condiciones de fermentación para el cultivo por lote alimentado fueron semejantes a las antes mencionadas. El inicio de la alimentación y la velocidad de esta fueron establecidas en base a los resultados de la fermentación por lote. Se alimentó sustrato estéril y no estéril. La alimentación se realizó manualmente por la puerta de inoculación.

### 3.8 MUESTREO

Para asegurar la asepsia del muestreo se hizo pasar vapor a través de la trampa de la toma de muestra (Fig. 2), y se adaptó un receptor de muestra intercambiable que hizo posible recibir la muestra directamente sin que ésta hubiera estado en contacto con el medio ambiente.

Inicialmente se tomaron muestras cada 2 hr, en las que se hicieron determinaciones de crecimiento, sustrato residual, carbohidratos solubles y pureza del cultivo. Posteriormente se tomaron muestras cada 6 hr haciendo las mismas determinaciones excepto carbohidratos solubles.

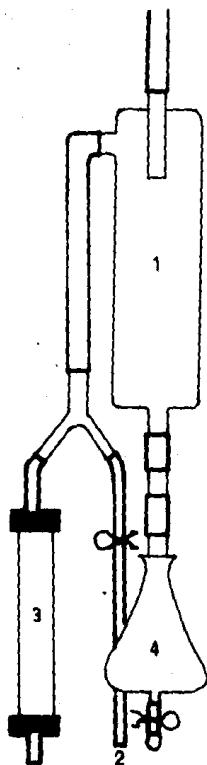


FIG. 2

- 1) Trampa de la toma de muestra
- 2) Tubería para la entrada de vapor
- 3) Filtro de aire
- 4) Receptor de muestra intercambiable

## MATERIAL Y METODOS

### 3.9 RECUPERACION DE LA BIOMASA.

Se separó el sustrato residual filtrando el caldo de fermentación en un filtro de vacío a través de diferentes mallas.

Posteriormente se concentró el material celular por medio de una centrifuga continua.

Quando fue necesario lavar las células, se hizo sedimentando el paquete celular en una centrifuga a 10,000 rpm por 20 min, una vez sedimentado se decantó y resuspendió en agua destilada; se repitió la operación, recuperando finalmente el paquete celular lavado, en la mínima cantidad de agua.

El concentrado celular se secd por dos métodos: mediante un secador por aspersion y por liofilización.

### 3.10 ANALISIS.

#### 3.10.1 Pureza

La pureza del cultivo mixto se comprobó sembrando por estria en cajas con infusión de cerebro corazón (BHI) más 2X de agar. En este medio Cellulomonas flavigena forma colonias circulares color crema y Xanthomonas sp. forma colonias circulares color amarillo.

#### 3.10.2 Crecimiento

Se cuantificó el crecimiento en base a la producción de proteína celular, para esto se elaboró una curva que correlaciona proteína celular y absorbancia a 660 nm, la curva se muestra en la Fig. 3. La proteína se determinó por el método modificado de Lowry para proteínas insolubles (23).

Se leyó la absorbancia después de filtrada la muestra (para separar el sustrato residual).



6-6

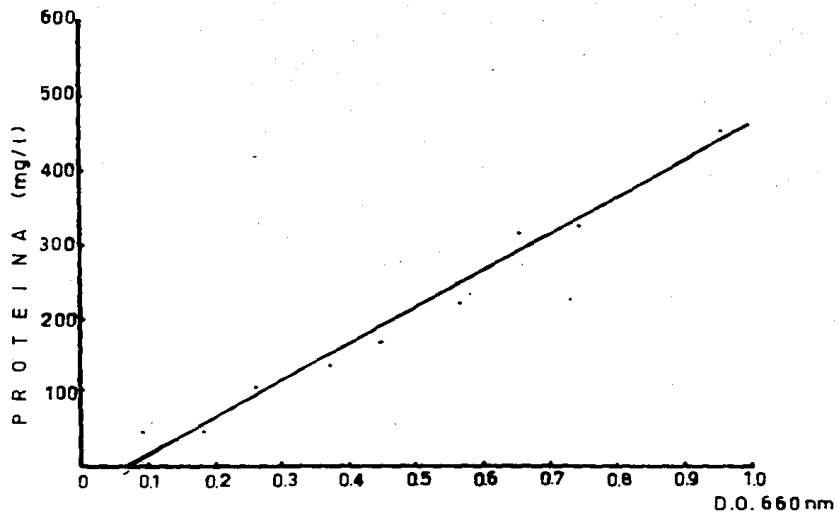


FIG. 3 Curva tipo para la determinación de proteína

6-3

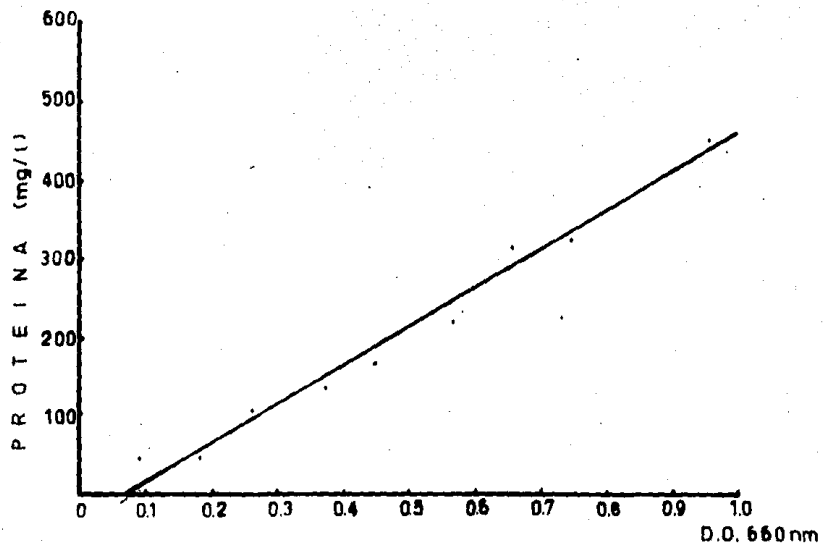


FIG. 3 Curva tipo para la determinación de proteína

## MATERIAL Y METODOS

### 3.10.3 Carbohidratos Solubles

Se determinaron carbohidratos solubles totales por el método de fenol-sulfúrico (9), y carbohidratos reductores por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (25).

Estas determinaciones se hicieron en las muestras después de filtradas y centrifugadas (para separar las células).

### 3.10.4 Sustrato Residual

La determinación de sustrato residual se realizó filtrando una muestra de volumen conocido en papel filtro (de filtración rápida) tarado, el residuo se lavó dos veces con volúmenes de agua iguales al volumen filtrado, posteriormente, se llevó a secar y en estas condiciones se pesó.

### 3.10.5 Bromatológico

La determinación de proteína cruda se realizó por el método del micro-Kjeldahl según el AOAC (3), multiplicando el nitrógeno total por 6.25.

La proteína verdadera se obtuvo por diferencia del nitrógeno total menos el nitrógeno no proteico.

El nitrógeno no proteico se determinó como sigue: se pesaron cantidades entre 0.5 y 1.0 g de muestra dentro de un matraz sforado de 50 ml, se adicionaron 25 ml de agua destilada y se agitó durante 10 min, se mantuvo la suspensión en reposo durante 30 min. A continuación se añadieron 25 ml de una solución de ácido tricloroacético al 20 % y se agitó nuevamente durante 10 min dejando la suspensión reposar durante 3 hr a 4 grados C, después se centrifugó a 10,000 rpm por 20 min. En el sobrenadante se determinó nitrógeno por micro-Kjeldahl considerándose este valor como nitrógeno no proteico.

Las determinaciones de extracto etereo, cenizas y humedad se realizaron según métodos del AOAC (3).

La determinación de fibra cruda se realizó según el método de Van De Kramer y Van Ginkel (46).

## MATERIAL Y METODOS

### 3.10.6 Acidos Nucleicos

Se cuantificó únicamente ácido ribonucleico. La determinación se hizo por el método de Mejsbaum: en ácido clorhídrico concentrado, las pentosas son convertidas a furfural, el cual en presencia de iones férricos reacciona con orcinol para dar un producto color verde (39).

### 3.10.7 Aminograma

La cuantificación de aminoácidos se realizó en un autoanalizador de aminoácidos siguiendo el método de hidrólisis ácida para el fraccionamiento de una proteína en sus aminoácidos componentes.

Antes de proceder a la hidrólisis, a la muestra seca y desengrasada se le extrajeron los ácidos nucleicos.

La hidrólisis se realizó pesando alrededor de 2 mg de muestra en tubos para hidrólisis y adicionando 1 ml de HCl 6N. Los tubos así preparados fueron sellados al vacío y mantenidos a 110 grados C durante 22 hr.

## CAPITULO 4

### RESULTADOS

#### 4.1 TIEMPO DE ESTERILIZACION.

La presencia de contaminación en varias fermentaciones realizadas, aún después de tomadas las precauciones mencionadas en la sección de esterilización y muestreo del capítulo de materiales y métodos, llevó a pensar que esta contaminación estuviera presente en el sustrato, por lo cual se decidió probar diferentes tiempos de esterilización trabajando con el sustrato seco y húmedo.

Para descartar la posibilidad de algún error de manipulación que provocara la contaminación durante la inoculación se procedió a incubar el fermentador sin inocular, después de esterilizado 70 y 90 min, bajo las condiciones normales de fermentación y añadiendo al medio 1 g/l de glucosa.

Con este procedimiento se pudo confirmar que la contaminación provenía del sustrato, ya que en ambos casos se detectó crecimiento.

Los resultados obtenidos con los diferentes tiempos de esterilización se muestran en la Tabla 10.

## RESULTADOS

TABLA 10

TIEMPO DE ESTERILIZACION DE PAJA DE TRIGO (AL 2.5X) EN FERMENTADOR DE 14 l CON VOLUMEN DE OPERACION DE 6 l

TIEMPO DE ESTERILIZACION A 18 lb/pulg <sup>2</sup> (min)	SUSTRATO	SE DETECTA CONTAMINACION EDAD DEL CULTIVO (hr)
50	Seco	12
50	Húmedo	12
60	Seco	Entre 18 y 30
60	Húmedo	Entre 18 y 30
75	Seco	50
90	Seco	50
120	Seco	No hasta 72
120	Húmedo	No hasta 72

El hecho de que al aumentar el tiempo de esterilización se detectara la contaminación en etapas posteriores de la fermentación es indicio de que la carga microbiana del sustrato disminuye al aumentar el tiempo de esterilización.

### 4.2 EFECTO DE LA CONTAMINACION.

Era importante determinar el efecto de microorganismos contaminantes sobre el crecimiento del cultivo mixto ya que en el sistema alimentado el sustrato se pretendía adicionar sin esterilizar, lo cual podía provocar un desplazamiento del cultivo mixto por algún microorganismo contaminante presente en el sustrato.

Para determinar si había desplazamiento del cultivo mixto por los contaminantes, se realizó cuenta viable (37) a lo largo de la fermentación, muestreando cada 6 hr. Esto se hizo en una corrida donde se esterilizó 45 min el fermentador.

De los resultados obtenidos se observó que se trataba de varios microorganismos contaminantes (tres ó cuatro), y que en ningún caso desplazaron al cultivo mixto, es decir siempre era mayor el número de colonias del cultivo mixto que de los contaminantes como se observa en las Figs. 4 y 5. Sin embargo su proporción varía y el efecto que tiene sobre el crecimiento del cultivo mixto no es definido, ya que en algunos casos se presentó inhibición del crecimiento (Fig. 5) y en otros no se presentó (Fig. 4).

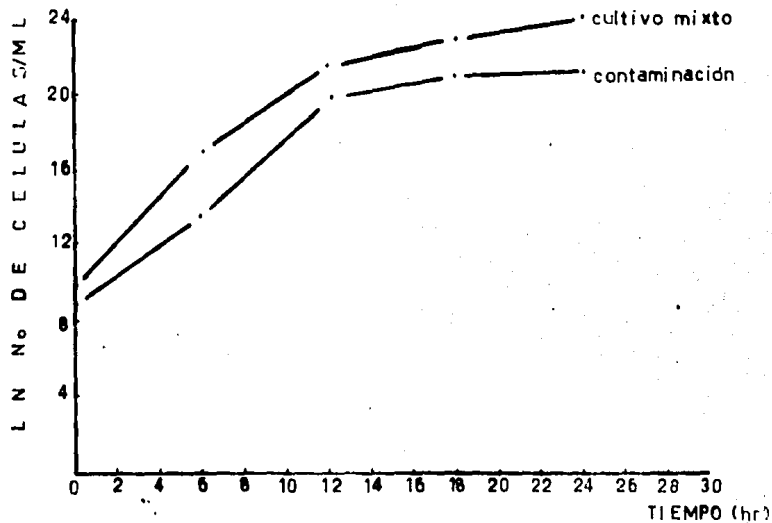


FIG. 4 Crecimiento del cultivo mixto Cellulomonas flavigena-Xanthomonas sp y un contaminante en paja de trigo esterilizada 45 min a 18 lb de presión.

Fermentador de 14 l  
Vol. de operación 6 l  
Aireación 0.3 v.v.m.  
Agitación 600 rpm

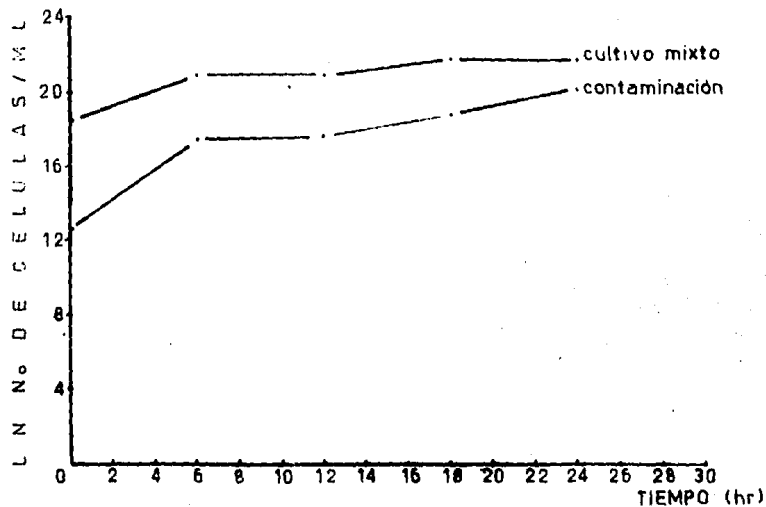


FIG. 5 Crecimiento del cultivo mixto Cellulomonas flavigena-Xanthomonas sp. y un contaminante en paja de trigo esterilizada 45 min. a 18 lb de presión.

Fermentador de 14 l  
 Vol. de operación 6 l  
 Aireación 0.3 vvm  
 Agitación 600 rpm



## RESULTADOS

### 4.3 CARBOHIDRATOS SOLUBLES.

Las curvas de carbohidratos solubles en la fermentación por lote con paja de trigo presentan el comportamiento mostrado en la Fig. 6.

Durante las primeras 6-8 hr de fermentación se alcanza la máxima concentración de azúcares: alrededor de 1200 mg/l de carbohidratos solubles totales y 300 mg/l de carbohidratos reductores. A partir de las 18 hr disminuye la concentración hasta 400 mg/l de carbohidratos solubles totales y 100 mg/l de carbohidratos reductores, manteniéndose en estos niveles desde las 12-14 hr hasta las 24-30 hr.

### 4.4 SUSTRATO RESIDUAL.

El consumo de paja de trigo, está asociado con el crecimiento como se puede observar en la Fig. 7. La pendiente de esta curva indica el rendimiento de proteína producida por paja consumida: 0.2 g-prot/g-paja.

El consumo de paja durante la fermentación por lote se muestra en la Fig. 8.

El 80.6% del sustrato es degradado en 48 hr de fermentación. En 72 hr se degrada el 88.8%.

### 4.5 CINETICA DE CRECIMIENTO.

En la cinética de crecimiento del cultivo mixto en paja de trigo, se observan dos fases de crecimiento exponencial, como se muestra en la Fig. 9.

La velocidad específica de crecimiento de la primera fase se encuentra entre 0.10 y 0.11 l/hr dependiendo de las condiciones del inóculo. Este crecimiento exponencial se presenta desde el inicio de la fermentación hasta que se alcanza una concentración de proteína entre 1200 y 1500 mg/l, esto es, entre las 24 y 30 hr de cultivo. A partir de este momento se puede observar una segunda velocidad específica de crecimiento de 0.03 l/hr que permanece hasta las 48 hr de cultivo.



FIG. 6 Cinética de carbohidratos solubles en la fermentación de paja de trigo con el cultivo mixto *Cellulomonas flavigena*-*Xanthomonas* sp.

ch. totales —•— ch. reductores -+-

Fermentador de 14 l  
 Vol. de operación 6 l  
 Aireación 0.3 vvm  
 Agitación 600 rpm

4-7

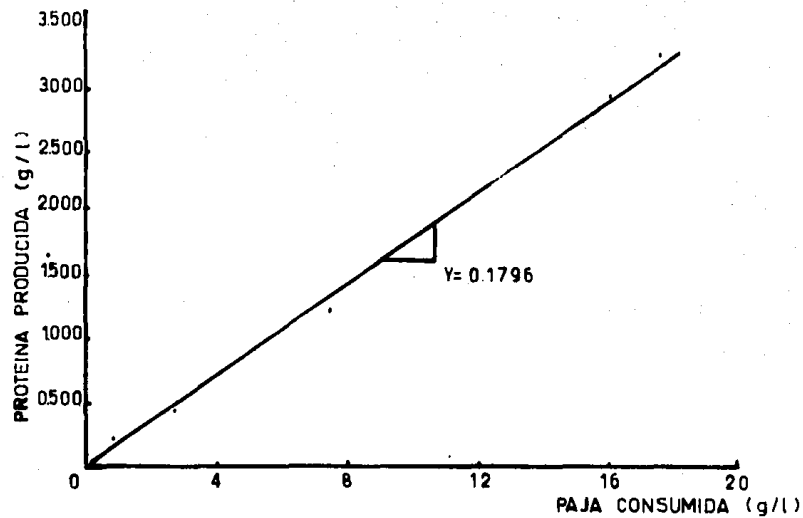


FIG.7 Rendimiento del cultivo mixto Cellulomonas flavigena-Xanthomonas sp. propagado en paja de trigo

Fermentador de 14 l  
Vol. de operación 6 l  
Aireación 03 vvm  
Agitación 600 rpm

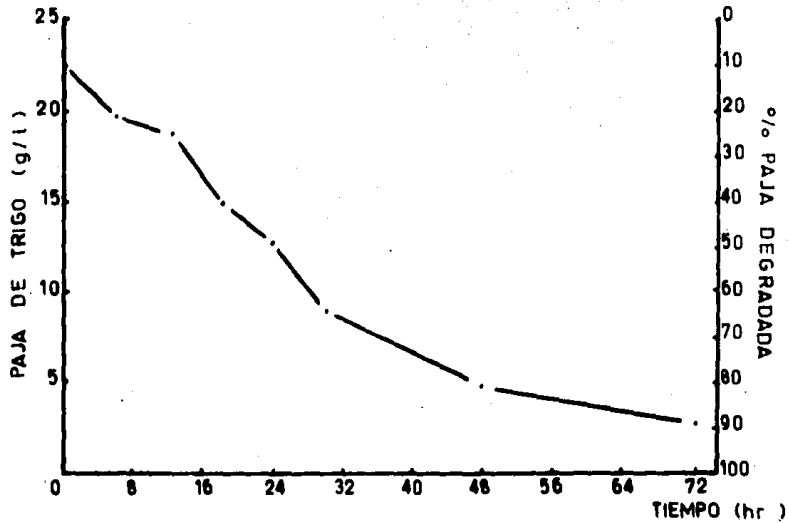


FIG. 8 Consumo de paja de trigo durante la fermentación con el cultivo mixto Cellulomonas flavigena-Xanthomonas sp.

Fermentador de 14 l  
 Vol. de operación 6 l  
 Aireación 0.3 vvm  
 Agitación 600 rpm

6-7

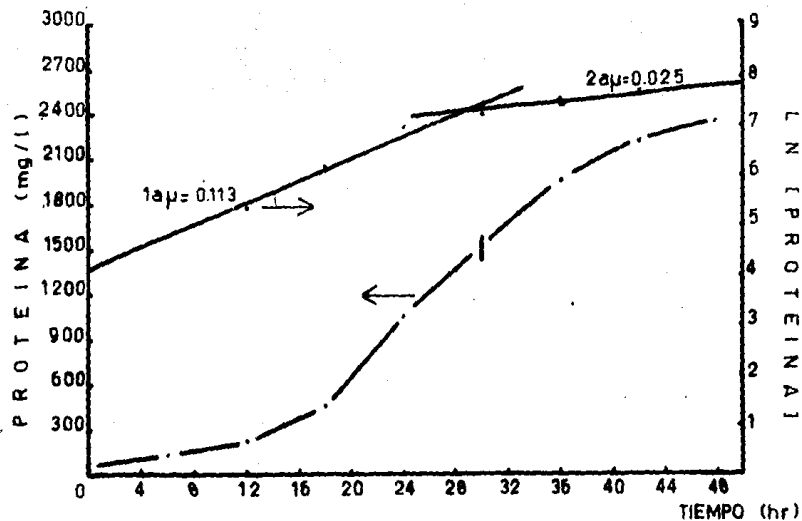


FIG. 9 Cinética de crecimiento del cultivo mixto *Cellulomonas flavigens* - *Xanthomonas* sp. propagado en paja de trigo

Fermentador de 14 l  
Vol. de operación 6 l  
Aireación 0.3 vvm  
Agitación 600 rpm

## RESULTADOS

Con el propósito de observar el efecto de la adición de sustrato sobre la velocidad específica de crecimiento de la segunda etapa de crecimiento exponencial, se decidió iniciar la alimentación una vez que terminara la primera fase, esto es, cuando se alcanzara una concentración de proteína entre 1200 y 1500 mg/l.

La productividad del cultivo por lote con paja de trigo es 50.99 mg-prot/1.hr.

### 4.6 FERMENTACION POR LOTE ALIMENTADO.

A pesar de los problemas por contaminación mencionados antes, se intentó la alimentación de sustrato sin esterilizar. Los resultados muestran la imposibilidad de trabajar en condiciones no asépticas: en un caso (Fig. 11) se presentó inhibición del crecimiento, y acumulación de sustrato en ambos casos (Figs. 10 y 11). Estos resultados corroboran lo antes observado: el efecto que tiene la contaminación sobre el crecimiento del cultivo mixto no es definido (por la variedad de microorganismos contaminantes), en vista de lo cual la efectividad del proceso dependería del tipo de contaminación presente.

La opción de realizar la alimentación del sustrato estéril se consideró apropiada únicamente para probar si el cultivo respondía como se esperaba al alimentar sustrato según los resultados observados en la fermentación por lote.

Con este propósito se esterilizó la paja húmeda en pequeñas cantidades (50-70 g) por 60 min en matraces Erlenmeyer de 1 l. A esta paja se le hizo prueba de esterilidad incubándola 48 hr con medio M1 más glucosa.

El inicio de la alimentación se realizó, como se menciona en la sección anterior. Se probaron dos velocidades de alimentación: una velocidad de 0.66 g-paja/1.hr alimentándose cada 15 hr 10 g/l, y una velocidad de 1.25 g-paja/1.hr alimentando cada 12 hr 15 g/l de paja.

Las cinéticas de crecimiento y consumo de paja de estos cultivos se muestran en las Figs. 12 y 13.

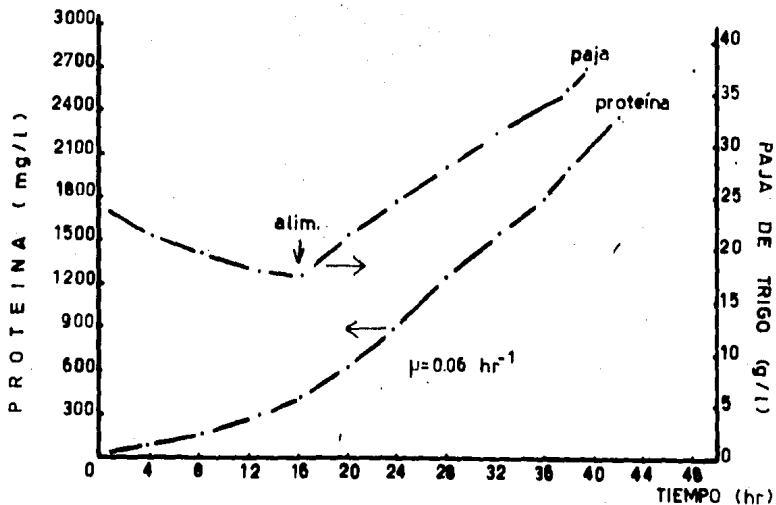


FIG. 10 Alimentación de sustrato no estéril durante la fermentación de paja de trigo con el cultivo mixto *Cellulomonas flavigena*-*Xanthomonas* sp.

Fermentador de 14 l  
 Vol. de operación 6 l  
 Aireación 0.3 vvm  
 Agitación 600 rpm

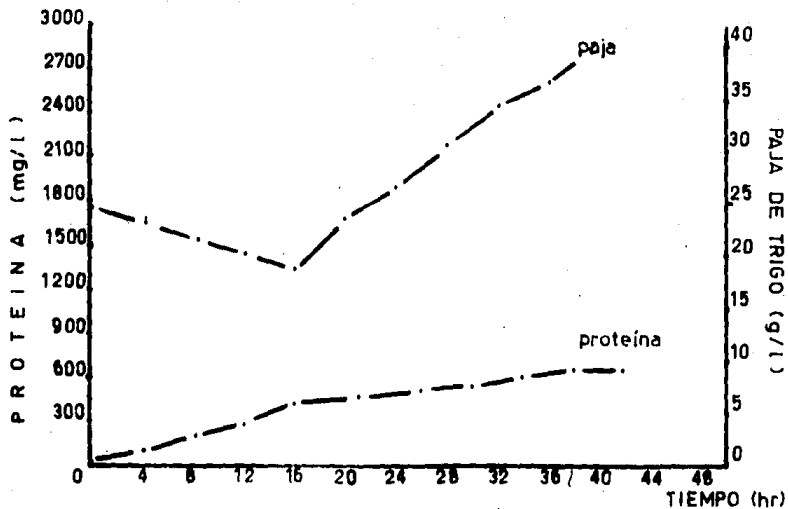


FIG. 11 Alimentación de sustrato no estéril durante la fermentación de paja de trigo con el cultivo mixto *Cellulomonas flavigens*-*Xanthomonas* sp.

Fermentador de 14 l  
Vol. de operación 6 l  
Aireación 0.3 vvm  
Agitación 600 rpm



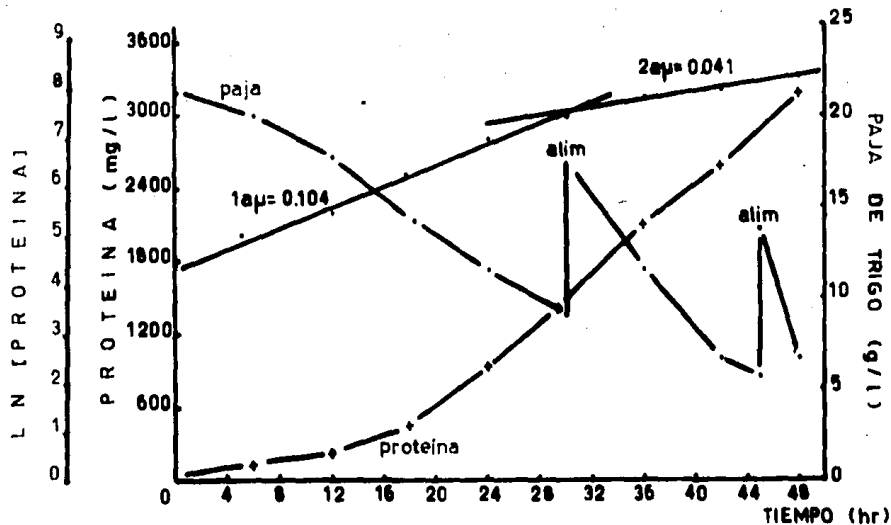


FIG. 12 Alimentación de sustrato estéril (10 g/l cada 15 hr) durante la fermentación de paja de trigo con el cultivo mixto *Cellulomonas flavigena*-*Xanthomonas* sp.

Fermentador de 14 l  
 Vol. de operación 6 l  
 Aireación 0.3 vvm  
 Agitación 600 rpm

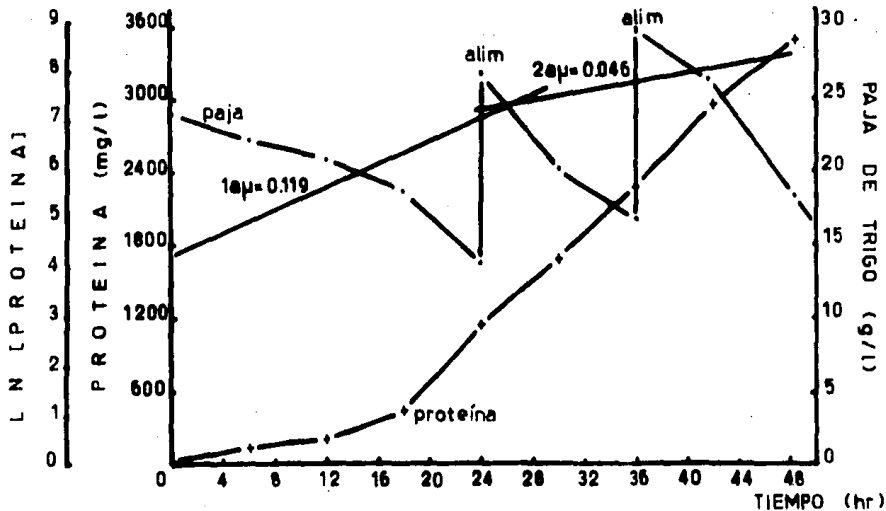


FIG. 13 Alimentación de sustrato estéril (15 g/l cada 12 hr) durante la fermentación de paja de trigo con el cultivo mixto *Cellulomonas flavigens*-*Xanthomonas* sp.

Fermentador de 14 l  
 Vol de operación 6 l  
 Aireación 0.3 vvm  
 Agitación 600 rpm

## RESULTADOS

La velocidad específica de crecimiento de la segunda fase de desarrollo exponencial y la productividad de los cultivos alimentados se muestran en la Tabla 11.

TABLA 11

VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCTIVIDAD DEL CULTIVO MIXTO  
(*C. flavisera* y *Xanthomonas* sp.) PROPAGADO EN PAJA DE TRIGO  
BAJO DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO

SISTEMA DE CULTIVO	u (1/hr)		PRODUCTIVIDAD mg-prot/1.hr	PROT. A LAS 48 hrs mg/l
	1a.	2a.		
Lote	0.111	0.029	50.99	2378
Alimentado 10 g/l c/15 hr	0.104	0.041	57.99	3140
Alimentado 15 g/l c/12 hr	0.119	0.046	71.35	3446

### 4.7 ANALISIS QUIMICO DE LA BIOMASA.

Los resultados del análisis químico de la biomasa del cultivo mixto propagado en paja de trigo se muestran en la Tabla 12.

TABLA 12

ANALISIS QUIMICO DE LA BIOMASA DEL CULTIVO MIXTO  
(*C. flavisera* y *Xanthomonas* sp.) PROPAGADA EN PAJA DE TRIGO

	X BASE SECA (BIOMASA LAVADA)	Y BASE SECA (BIOMASA SIN LAVAR)
Proteína Cruda (Nx6.25)	53.37	40.85
Proteína Verdadera	43.16	22.90
Extracto Etéreo	1.06	0.88
Fibra Cruda	7.73	6.40
Cenizas	15.51	32.71
Acidos Nucleicos (ARN)	21.69	12.83

## RESULTADOS

En la biomasa recuperada por centrifugación continua y sin lavar, se presenta un alto contenido de cenizas: alrededor de 30%. (Tabla 12).

El tiempo de recuperación y el método de secado empleado (liofilización ó aspersión) afectan el contenido de proteína y la composición de aminoácidos de la biomasa.

El contenido de proteína verdadera varió de 43.16% en la biomasa recuperada en dos días a 27.66% en la biomasa recuperada en doce días. (Tabla 13).

El contenido de lisina varió de 3.10 g/100 g-prot. en la biomasa secada por liofilización a 1.95 g/100 g-prot. en la biomasa secada por aspersión, cuando el tiempo de recuperación fue 12 días.

**TABLA 13**  
**EFFECTO DEL TIEMPO DE RECUPERACION (A) Y DEL METODO DE SECADO**  
**SOBRE LA COMPOSICION DE LA BIOMASA DEL CULTIVO MIXTO**  
***Cellulomonas flavispora-Kanthermonas 82.***

Tiempo de Recuperación (días)	Proteína Verdadera (%)
2	43.16
12	27.66
Tipo de Secado (12 días)	g-lisina/100 g-prot
Liofilización	3.10
Aspersión (mal control de T)	1.95

(A) El tiempo de recuperación es el tiempo transcurrido desde el final de la fermentación hasta la obtención de la biomasa seca.

## RESULTADOS

La capacidad para dispersarse en agua de la biomasa secada por aspersion fue mayor que la de la biomasa secada por liofilizacion.

La composicion de aminoacidos de la protefna del cultivo mixto se muestra en la Tabla 14.

TABLA 14

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA PROTEINA DEL CULTIVO MIXTO  
(*C. flavigena* y *Xanthomonas* sp.)  
PROPAGADO EN DIFERENTES SUBSTRATOS CELULOSICOS

AMINOACIDO g/100 g-prot	PAJA DE TRIGO	BAGAZO DE CAÑA (8)	BAGAZO DE PIÑA (8)
Lisina	3.10	3.19	3.72
Treonina	5.51	4.36	4.68
Valina	5.94	4.60	5.63
Metionina	0.45	0.79	1.52
Isoleucina	2.98	2.51	3.41
Leucina	7.50	7.38	7.20
Tirosina y Fenilalanina	5.36	6.26	7.46

## CAPITULO 5

### DISCUSION

#### 5.1 ESTERILIDAD.

La contaminación microbiana es un problema grave para la mayoría de los productores de proteína unicelular, que requiere condiciones de operación asépticas muy estrictas (38).

La importancia de obtener fermentaciones libres de contaminación en la producción de proteína unicelular es más que obvia: muchos microorganismos son patógenos ó parásitos y nadie quiere consumirlos ya sea vivos ó muertos. Adn si los microorganismos contaminantes no fueran tóxicos probablemente no serían aprobados para su consumo por las legislaciones alimentarias (38).

Por otro lado, si además el contaminante es capaz de afectar el crecimiento del cultivo original, la asepsia del proceso más que importante se vuelve indispensable.

El tiempo y la temperatura de esterilización en un sistema, dependen de varios factores, como son: la carga microbiana total inicial, la termoresistencia de los microorganismos y la velocidad de penetración de calor en dicho sistema (32).

La termoresistencia de un microorganismo se ve afectada por las condiciones del medio en que ha crecido y se han desarrollado las esporas, por la composición química del medio de cultivo (en medios ricos la termoresistencia de los microorganismos es mayor), el pH, etc (32).

La penetración de calor en un sistema, de tamaño y forma dados, depende de numerosos factores, de todos ellos uno de los más importantes es la naturaleza del medio, que condiciona por sí misma el mecanismo y la velocidad de propagación de calor en su seno. En los medios heterogeneos sólido-líquido, la penetración depende tanto de la proporción sólido-líquido como de la colocación de los sólidos en el líquido (la presencia de huecos permite la formación de corrientes de convección y facilita la

## DISCUSION

transmisión de calor). La consistencia del material sólido también tiene influencia en la penetración de calor. La agitación favorece los movimientos de convección y por lo tanto acelera la penetración de calor acortando el tiempo de esterilización (32).

En base a lo anterior se puede decir que la resistencia a la esterilización observada, se debe en gran parte a una carga de esporas muy alta en la paja de trigo. Esto queda confirmado por el hecho de que al inicio de la fermentación se observa una cuenta viable de células contaminantes/ml bastante alta (casi comparable a la cantidad de inóculo) Figs. 4 y 5. Considerando que en ambas fermentaciones se trabajó con paja húmeda que permaneció almacenada después de tratada, es explicable tal carga inicial.

Además es factible que la paja de trigo presente una estructura y composición que dificulten la transmisión de calor. Esto aunado a la falta de agitación incrementó considerablemente el tiempo de esterilización. Sin embargo, el tiempo que se empleó, 120 min, probablemente se podría reducir si se maneja la otra variable que es la temperatura.

La probabilidad de un microorganismo a sobrevivir en un proceso fermentativo, depende de si puede o no subsistir con la fuente de carbono del medio de cultivo y de su velocidad de crecimiento (38). La producción de proteína unicelular a partir de materiales celulósicos requiere que en el medio se encuentren disponibles los azúcares producto de la degradación del sustrato, esto significa que cualquier microorganismo que pueda crecer en esos carbohidratos puede crecer en el medio de celulosa. Esto incluye una gran diversidad de microorganismos, de ahí la variedad de contaminantes que pudieron desarrollarse junto con el cultivo mixto.

Los antecedentes de que el cultivo mixto era capaz de autoprotgerse a los contaminantes, después de un cierto tiempo de cultivo, basados en el hecho de que su rápido crecimiento impedía la competencia por sobrevivir no corresponde a lo observado en paja de trigo, ya que como lo demuestran los resultados de la Tabla 10, cargas iniciales no detectables son capaces de sobrevivir y desarrollarse en el medio de fermentación, aún cuando predomine el cultivo mixto: en el momento en que se detecta la contaminación a las 12 hr de cultivo, la concentración de células del cultivo mixto es 0.5 g/l, y es de 3.0. g/l cuando se detecta a las 30 hr.

## DISCUSION

### 5.2 CARBOHIDRATOS SOLUBLES.

El aumento en la concentración de azúcares en el medio de cultivo, durante las primeras 6 hr de fermentación (Fig. 6) se puede explicar considerando que en ese momento la actividad celololítica en el medio de cultivo era óptima. Puesto que el complejo enzimático de celulasas está regulado por inducción y sujeto a represión catabólica (11), es factible que las celulasas, que provocan el incremento en la concentración de azúcares, provengan del medio de inóculo y no sean producidas en el medio nuevo. De la Torre (8) reportó que la producción de celulasas (carboximetilcelulasa y celulasas adsorbidas) parecen estar asociada al crecimiento del cultivo.

La caída brusca en la concentración de azúcares se puede atribuir: a una inhibición en la actividad celololítica, provocada por la misma concentración de azúcares en el medio (la celobiosa es un inhibidor de la actividad de celulasas en el rango de concentración de 0.2 a 1.0 g/l), aunada al desarrollo del crecimiento exponencial, donde se manifiesta el consumo de azúcares.

La tendencia a mantenerse un nivel constante en la concentración de azúcares, a partir de las 12 hr de cultivo, se puede explicar considerando que se alcanza un equilibrio entre la producción y consumo de azúcares.

### 5.3 SUSTRATO.

El rendimiento de proteína por gramo de paja de trigo consumida es inferior al rendimiento reportado en bagazo de caña: 0.5 g-células/g-bagazo. Considerando un 50% de proteína, correspondería a un rendimiento de proteína de 0.25 g-prot/g-bagazo, comparado con 0.2 g-prot/g-paja de trigo. (Tabla 15).



## DISCUSION

TABLA 15

UTILIZACION DE BAGAZO DE CANA Y PAJA DE TRIGO POR EL CULTIVO MIXTO  
(*C. flavisana* y *Xanthomonas* sp.)

SUSTRATO	RENDIMIENTO g-prot/g-sustr	PERDIDA DE PESO. DURANTE EL TRATAMIENTO ALCALINO %	SUSTRATO DEGRADADO
Bagazo de caña(8)	0.25	26.3	65.0
Paja de trigo	0.20	43.9	80.6

Puesto que el medio mineral empleado es el mismo en ambas fermentaciones, la diferencia en rendimiento es atribuible a alguna limitación en la paja de trigo que no presenta el bagazo de caña.

Esto se hace evidente considerando que la pérdida de peso durante el tratamiento alcalino es mayor para aquellas sustratos, es mayor para la paja de trigo que para el bagazo de caña (Tabla 15).

De la Torre (8) menciona que la pérdida de materia seca durante el tratamiento alcalino es mayor para aquellos sustratos que tienen alto contenido de hemicelulosa y lignina, y concluye que es necesario establecer las condiciones de tratamiento químico y de molienda para cada sustrato, utilizando como parámetros el rendimiento de sólidos del tratamiento, el rendimiento en base a biomasa y los costos de operación.

En base a esto es necesario probar condiciones de tratamiento menos drásticas para la paja de trigo, que disminuyan la pérdida de material aprovechable y por lo tanto incrementen el rendimiento del proceso.

### 5.4 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LA FERMENTACION POR LOTE.

Las dos fases de crecimiento exponencial que se observan en la cinética en paja de trigo, corresponden a lo reportado en bagazo de caña. Los valores de las velocidades específicas de crecimiento en cada etapa se muestran en la Tabla 16.

## DISCUSION

TABLA 16

VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO DEL CULTIVO MIXTO  
(*C. flavigena* y *Xanthomonas* SP.)  
EN BAGAZO DE CANA Y PAJA DE TRIGO.

SUSTRATOS	[So] %	u (1/h)	
		1a.	2a.
Bagazo de caña (8)	1.0%	0.098	0.028
Paja de trigo	2.5%	0.111	0.029

La diferencia en las velocidades específicas de crecimiento también corresponden a lo reportado por De la Torre, en el sentido de que el sustrato tiene influencia sobre la velocidad de crecimiento del cultivo mixto (Tabla 17).

TABLA 17

VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO DEL CULTIVO MIXTO  
EN TANQUE AGITADO DE 14 l

SUSTRATOS	So %	u (1/h)
Bagazo de Paja	1.0	0.135
Bagazo de Caña	2.5	0.115
Bagacillo de Caña	2.5	0.147
Rastrojo de Maíz	2.5	0.130
Paja de Trigo	2.5	0.111
Rastrojo de Sorgo	2.5	0.160

En los procesos en los que el sustrato es algún residuo celulósico, la velocidad de crecimiento del cultivo es función de la actividad de celulasas y hemicelulasas (8). La actividad celulolítica está afectada en gran parte por las propiedades estructurales del material celulósico (43). En el cultivo mixto De la Torre (8) observó que la actividad de celulasas adsorbidas al bagazo de caña alcanzan su máximo valor durante las primeras 18 a 26 hr de cultivo y que éste decrece a partir de las 20-26 hr. Este decremento en la actividad se explicó considerando:

## DISCUSION

una mayor resistencia del material, parcialmente degradado, a la hidrólisis y una probable adsorción de las enzimas a la lignina, que al no poder actuar sobre este material permanecen como enzimas inactivas.

Si el principal factor que afecta la actividad celulolítica es la mayor resistencia del sustrato residual a la hidrólisis, puede ser factible con la adición de sustrato fresco, retrasar el decremento en la actividad celulolítica y por lo tanto mantener al cultivo creciendo más tiempo a su velocidad específica de crecimiento máxima.

El momento de iniciar la adición de sustrato, es de suma importancia y debe estar relacionado con una disminución en la velocidad específica de crecimiento del cultivo.

Puesto que la disminución en la velocidad específica de crecimiento se observa generalmente cuando se alcanza una concentración de proteína entre 1200 y 1500 mg/l, se decidió considerar dicha concentración como parámetro para regir la alimentación.

La productividad del proceso en paja de trigo es menor a la reportada en bagazo de caña: 0.188 g-cel/l.hr en bagazo de caña y 0.127 g-cel/l.hr en paja de trigo. Esto era de esperarse, ya que la velocidad específica de crecimiento es menor en paja de trigo (Tabla 18).

TABLA 18

PARAMETROS CINETICOS DEL CULTIVO MIXTO  
(*C. flavisera* y *Xanthosomas* sp.)  
EN BAGAZO DE CAÑA Y PAJA DE TRIGO

SUSTRATO	$S_0$ %	$X$ g-cel/l	$\mu$ (1/h)	PRODUCTIVIDAD g-cel/l.h
Bagazo de Caña	2.5	10.5	0.115	0.188
Paja de Trigo	2.5	5.5	0.111	0.127

### 5.5 FERMENTACION POR LOTE ALIMENTADO.

Los resultados muestran que con la alimentación de sustrato, una vez alcanzada una concentración de proteína entre 1200 y 1500 mg/l, se aumenta la velocidad específica de crecimiento de la

## DISCUSION

segunda etapa con desarrollo exponencial del cultivo (Tabla 11). Esto corrobora que se trata de un sistema limitado por la mayor resistencia a la hidrólisis, de la fuente de carbono parcialmente degradada.

La velocidad de alimentación del cultivo, puede realizarse según tres tipos definidos por Jones y Anthony (19): a) con una velocidad de alimentación que incrementa exponencialmente, b) con una velocidad de alimentación que incrementa linealmente y c) con una velocidad de alimentación constante. Cada tipo tiene sus propiedades distintas: el tipo a) permite una velocidad específica de crecimiento del microorganismo constante, mientras que el tipo c) lo que mantiene constante es la velocidad de producción celular.

En nuestro caso la velocidad de alimentación fue constante, de ahí que se observe en las Figs. 12 y 13 un crecimiento lineal ( $dx/dt = cte$ ) desde el inicio de la alimentación, hasta las 40-44 hr de cultivo. En cuanto a la velocidad específica de crecimiento su disminución se haría evidente si el tiempo de alimentación hubiera sido mayor.

Es evidente que la velocidad de alimentación que se empleó inicialmente no fue la óptima, ya que el sistema respondió favorablemente al aumentar la velocidad de alimentación del cultivo (Tabla 11), poniendo de manifiesto la dependencia entre la velocidad de alimentación y la velocidad de crecimiento.

El valor óptimo se debe determinar experimentalmente ya que depende de las limitaciones del sistema: transferencia de oxígeno, recuperación del cultivo, manipulación del proceso, etc. Estos factores son los que van a determinar la frecuencia y carga de alimentación.

La alimentación de sustrato en forma estéril presenta grandes inconvenientes ya que se trata de un sustrato sólido que por su estructura y carga microbiana requiere condiciones drásticas de esterilización, y por su dificultad para fluir requiere de equipo especial para su transportación, lo cual significa un incremento considerable en el costo del proceso (38). De ahí el interés de realizar la alimentación sin esterilizar el sustrato y la importancia de una autoprotección real del cultivo a la contaminación.

## DISCUSION

### 5.6 ANALISIS QUIMICO DE LA BIOMASA.

La composición comparativa de la biomasa del cultivo mixto en bagazo de caña y en paja de trigo se muestra en la Tabla 19.

TABLA 19

ANALISIS QUIMICO COMPARATIVO DE LA BIOMASA DEL CULTIVO MIXTO  
(*C. flavigena* y *Xanthomonas* sp.)  
PROPAGADA EN BAGAZO DE CAÑA Y PAJA DE TRIGO (% BASE SECA)

	BAGAZO DE CAÑA (B)	PAJA DE TRIGO
Proteína Cruda (Nx6.25)	50.50	53.37
Proteína Verdadera	45.20	43.16
Extracto Etereo	1.13	1.06
Fibra Cruda	7.39	7.73
Cenizas	17.29	15.51
Acidos Nucleicos (ARN)	10.10	21.69

En la determinación de la cantidad de proteína en microorganismos, una de las expresiones mas engañosas es el 'contenido de proteína cruda' que significa nitrógeno total por 6.25. Los microorganismos pueden tener un alto contenido de nitrógeno sin necesariamente ser ricos en proteína (una clasificación muy general del nitrógeno presente puede ser: nitrógeno no proteico y amino nitrógeno). La mayor fuente de nitrógeno no proteico son los ácidos nucleicos, y dentro del amino nitrógeno se pueden considerar: aminoácidos libres, péptidos, proteínas solubles y proteínas insolubles (44).

Lo mencionado anteriormente se pone de manifiesto en los resultados obtenidos (Tabla 19), ya que en la biomasa producida en paja de trigo se cuantificó un contenido de proteína cruda mayor que en la biomasa producida en bagazo de caña siendo que el contenido de proteína verdadera es inferior, pero el contenido de ácidos nucleicos mayor.

El contenido de ácidos nucleicos en las fuentes de proteína unicelular es elevado, comparado con el de las fuentes convencionales de alimento. El ácido nucleico que se encuentra en mayor proporción es el ARN (40), de ahí que solo se haya cuantificado este.

## DISCUSION

Es bien conocido que el contenido de ARN de las células es dependiente de la velocidad de crecimiento del cultivo y de las condiciones fisiológicas del cultivo. Cooney y Mateles (40) han demostrado que una limitación de fosfatos en cultivo continuo con *Aerobacter aerogenes* puede alterar la proporción de ARN a proteína hasta en un 24%.

Se puede decir en base a lo anterior que las diferencias en el contenido de proteína y ARN entre la biomasa producida en paja de trigo y en bagazo de caña, pueden ser consecuencia de la misma limitación que provoca un menor rendimiento en el proceso con paja de trigo.

De la Torre (8) menciona que el contenido de cenizas y fibra cruda dependen de la efectividad del proceso de separación: si la separación de sustrato residual es deficiente el contenido de fibra cruda de la biomasa se incrementa, y si las células no se separan adecuadamente del medio de cultivo su contenido de sales también se incrementa.

Es evidente que la separación del medio de cultivo por centrifugación continua no fue adecuada como único tratamiento, ya que la biomasa recuperada alcanzó un 30% de cenizas lo cual afecta drásticamente la proporción de los demás constituyentes. Esto indica que se debe incluir en el proceso de recuperación un lavado a las células.

En el proceso de secado, la temperatura de operación es determinante ya que el calor va a provocar cambios en la funcionalidad de la proteína (21). Es evidente, que durante el secado por aspersión de la biomasa, la temperatura de operación no se controló debidamente, ya que se alteró considerablemente el contenido de lisina de la proteína.

Se observa pequeña variación en el contenido de aminoácidos de la proteína del cultivo mixto propagado en diferentes sustratos celulósicos: en la biomasa propagada en paja de trigo, el contenido de treonina es ligeramente mayor, y el contenido de aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina) ligeramente menor que en las biomásas propagadas en bagazo de paja y caña (Tabla 14).

En la Tabla 20 se compara el perfil de aminoácidos de varias fuentes de proteína con el de la proteína del cultivo mixto propagado en paja de trigo.

DISCUSION

TABLA 20

COMPOSICION COMPARATIVA DE AMINOACIDOS DEL CULTIVO MIXTO  
(*C. flavigena* y *Xanthomonas* sp.)  
Y DE OTRAS FUENTES DE PROTEINA

AMINOACIDOS g/100 g-prot	<i>C. flavigena</i> y <i>Xanthomonas</i> sp.	ALFALFA (12)	PASTA DE SOYA (30)	HARINA DE TRIGO (38)
Lisina	3.10	6.70	6.4	1.9
Histidina	1.84	2.53	---	2.2
Arginina	4.93	5.54	---	4.2
Ac. Aspártico	8.68	12.54	---	---
Treonina	5.51	5.12	3.6	2.7
Serina	4.36	5.25	---	---
Ac. Glutámico	11.57	11.30	---	---
Prolina	4.91	5.10	---	---
Glicina	4.92	5.73	---	---
Alanina	7.37	6.33	---	---
Valina	5.94	6.70	4.4	4.1
Metionina	0.45	1.96	---	1.5
Cisteína	NR	1.40	2.2	---
Isoleucina	2.90	5.54	4.2	4.2
Leucina	7.50	8.43	7.7	7.0
Tirosina	2.35	3.72	2.7	---
Fenilalanina	3.01	5.75	4.7	5.5
Triptofano	A	A	1.7	A

A Durante la hidrólisis ácida hay destrucción de triptofano

Se observa que el contenido de aminoácidos de la proteína microbiana es similar al de la proteína de alfalfa, excepto por menos lisina e isoleucina.

Es evidente al comparar con el patrón de la FAO (Tabla 21) que la proteína del cultivo mixto es deficiente en lisina, aminoácidos amuñados e isoleucina.

## DISCUSION

### TABLA 21

COMPOSICION COMPARATIVA DE AMINOACIDOS DEL CULTIVO MIXTO  
(*C. flavigena* y *Xanthomonas* sp.)  
PROPAGADO EN PAJA DE TRIGO, CON EL PATRON DE LA FAO

AMINOACIDOS g/100 g-prot	<i>C. flavigena</i> y <i>Xanthomonas</i> sp.	FAO
Lisina	3.18	4.2
Treonina	5.51	2.6
Valina	5.94	4.2
Metionina	0.45	2.2
Cisteina	--	2.0
Isoleucina	2.98	4.2
Leucina	7.50	4.8
Tirosina	2.35	2.8
Fenilalanina	3.01	2.8
Triptofano	NA	1.7

NA: No Analizado

Las deficiencias de aminoácidos en las fuentes de proteína pueden ser suplidas preparando mezclas. De la Torre (8) reporta que en mezclas 1:1 (en base a proteína) de pasta de soya y biomasa del cultivo mixto propagada en bagazo de caña, el valor nutricional se incrementa considerablemente (Tabla 22).

### TABLA 22

RESULTADOS DE PRUEBAS BIOLÓGICAS EN RATAS ALIMENTADAS  
CON LA BIOMASA DEL CULTIVO MIXTO (*C. flavigena* y *Xanthomonas* sp.)  
PROPAGADA EN BAGAZO DE CAÑA (8)

MATERIAL PROTÉICO	PER (Índice de Eficiencia Protéica)	NRU (Utilización Neta de Proteína)
Biomasa	0.81	---
Pasta de Soya	1.41	26.8
Biomasa + Pasta de Soya	3.13	70.0
Caseins	2.50	54.0



## DISCUSION

Puesto que el perfil de aminoácidos de la biomasa propagada en paja de trigo y en bagazo de caña, presentan las mismas deficiencias, es de esperar que la mezcla soya:biomasa propagada en paja de trigo de resultados similares a los de la mezcla soya:biomasa propagada en bagazo de caña.

## CAPITULO 6

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 6.1 CONCLUSIONES.

En el proceso de producción de proteína unicelular a partir de paja de trigo con el cultivo mixto: *Cellulomonas flavigena* y *Xanthomonas* sp., se requiere establecer condiciones de pretratamiento al sustrato más suaves que las condiciones empleadas para bagazo de caña. Es de esperar que con esto, se incremente el rendimiento del proceso.

El bajo riesgo de contaminación que se había manifestado en la fermentación de bagazo de caña, no corresponde a lo observado en la fermentación de paja de trigo. Esto es una gran limitante para establecer un sistema de fermentación por lote alimentado puesto que, la alimentación de sustrato en forma estéril no se considera factible por los altos costos de operación que esto implica.

Puesto que la fermentación por lote alimentado, resulta ser la mejor opción para incrementar la productividad de este proceso, es necesario desarrollar un tratamiento selectivo de la carga microbiana del sustrato. Esto haría factible la estandarización del proceso.

La biomasa del cultivo mixto, como única fuente de proteína no es adecuada por sus deficiencias (aminoácidos azufrados, lisina e isoleucina). Sin embargo es necesario realizar pruebas nutricionales con animales, de alimentos balanceados en los cuales se sustituya parte de la fuente proteica por biomasa. Considerando además que la biomasa puede ser fuente de sales minerales y de vitaminas.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.2 RECOMENDACIONES.

1. Observar el efecto sobre el rendimiento de sólidos y de proteína, al reducir la temperatura y el tiempo de reacción durante el tratamiento alcalino de la paja de trigo.
2. Probar diversos tratamientos químicos (ácido fosfórico, hidróxido de amonio) al sustrato a alimentar, y observar el efecto de estos sobre el crecimiento del cultivo mixto y sobre el desarrollo de contaminación en la fermentación por lote alimentado.
3. Observar el efecto sobre la velocidad específica de crecimiento del cultivo al alimentar durante 48 hr 15 g-paja/l cada 12 hr. En base a los resultados obtenidos establecer un tipo de alimentación que incremente linealmente con el tiempo, posteriormente establecer una alimentación que incremente exponencialmente.

**APENDICE A**  
**REFERENCIAS**

- (1) ALEXANDER M. 1977.  
Introduction To Soil Microbiology.  
Chapter 10, 11, 12.  
2nd Ed. Wiley N.Y.
- (2) ANDERSON W. A. & ANDERSON J. F. 1979.  
On Finding A Use For Straw.  
In Utilization And Recycle Of Agriculture Wastes And  
Residues (Michael L. Shuler). p 237-268.  
CRC. Press. Boca Raton, Florida.
- (3) ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. 1975.  
Official Methods Of Analysis.  
12th Ed. Editorial Board.
- (4) BELLAMY W. D. 1974.  
Single Cell Proteins From Cellulosics Wastes.  
Biotech. Bioeng. 16: 869-880.
- (5) BLINDER A., PELLONI L. & FIECHTER A. 1980.  
Delignification Of Straw With Ozone To Enhance  
Biodegradability.  
Eur. J. Appl. Micr. Biotech. 11: 1-5.
- (6) COWLING ELLIS B. 1975.  
Physical And Chemical Contrains In The Hidrolysis Of  
Cellulose And Lignocellulosics Materials.  
Biotech. Bioeng. Symp 5: 163-181.
- (7) COWLING E. B. 1976.  
Properties Of Cellulose And Lignocellulosic Materials  
As Substrates For Enzymatic Conversion Processes.  
Biotech. Bioeng. Symp 6: 95-123.
- (8) DE LA TORRE MARTINEZ M. M. 1981.  
Produccion De Protefnas Alimenticias De Origen  
Unicelular En Residuos Lignocelulósicos.  
Tesis Doctoral.  
Escuela Nacional De Ciencias Biológicas IPN (México).
- (9) DUBOIS et al. 1956.  
Colorimetric Method For Determination Of Sugars And  
Related Substances.  
Anal. Chem. 28: 350-356.

## REFERENCIAS

- (10) DUNLAP C. P. & LIN-CHANG CHIANG. 1979.  
Cellulose Degradation - A Common Link.  
In Utilization And Recycle Of Agricultural Wastes And  
Residue (Michael L. Shuler). p 20-60.  
CRC. Press Boca Raton, Florida.
- (11) FLICKINGER M. C. 1980.  
Current Biological Research In Conversion Of Cellulosic  
Carbohydrates In To Liquids Fuels: How Far We Came?.  
Biotech. Bioeng. 22: Suppl 1 27-48.
- (12) HAN Y. W. 1975.  
Microbial Fermentation Of Rice Straw: Nutritive  
Composition And In Vitro Digestibility Of The  
Fermentation Products.  
Appl. Micr. 22 (4): 510-514.
- (13) HAN Y. W. & ANDERSON A. W. 1975.  
Semisolid Fermentation Of Ryegrass Straw.  
Appl. Micr. 30: 930.
- (14) HAN Y. W. et al. 1978.  
Alkali Treatment And Fermentation Of Straw For Animal  
Feed.  
Biotech. Bioeng. 20: 1015-1026.
- (15) HAN Y. W. et al. 1981.  
Gamma Radiations Induced Degradation Of Lignocellulosic  
Materials.  
Biotech. Bioeng. 22: 2525-2535.
- (16) HARRISON E. F. & S. J. WREN. 1976.  
Mixed Microbial Cultures As A Basis For Future  
Fermentation Processes.  
Proc. Biochem. 11 (8): 30-32.
- (17) HARRISON E. F. 1978.  
Mixed Cultures In Industrial Fermentation Processes.  
Adv. Appl. Micr. 24: 129-164.
- (18) HUMPHREY A. E. et al. 1977.  
Production Of Single Cell Protein From Cellulose  
Wastes.  
Biotech. Bioeng. Symp 7: 45-64.
- (19) JONES R. C. & R. M. ANTHONY. 1977.  
The Relationship Between Nutrient Fed Rate And Specific  
Growt Rate In Fed Batch Cultures.  
Eur. J. Appl. Micr. 4: 87-92.
- (20) KRISTENSEN T. P. 1978.  
Continuous Single Cell Protein From Cellulomonas sp And  
Candida utilis Grown On Barley Straw.  
Eur. J. Appl. Micr. Biotech. 5: 155-163.
- (21) LABUZA P. T. 1975.  
Cell Collection: Recovery And Drying For SCP  
Manufacture.  
In Single Cell Protein II (Tannenbaum & Wang).  
The MIT Press Cambridge, Massachusetts And London  
England.

## REFERENCIAS

- (22) LORENCES I. 1979.  
 Estudio Sobre La Degradación De Celulosa Por Un Cultivo Mixto De Bacterias.  
 Tesis Profesional.  
 Escuela Nacional De Ciencias Biológicas IPN (México).
- (23) LOWRY O. H. et al. 1951.  
 Protein Measurement With Folin-Phenol Reagent.  
 Biol. Chem. J. 193: 265.
- (24) MANDELS M. et al. 1974.  
 Enzymatic Hidrolysis Of Waste Cellulose.  
 Biotech. Bioeng. 16: 869-880.
- (25) MILLER G. L. 1959.  
 Use Of Dinitrosalicylic Acid Reagent For Determination Of Reducing Sugar.  
 Anal. Chem. 31 (3): 426.
- (26) MILLET M. A. et al 1975.  
 Pretreatment To Enhance Chemical And Microbiological Attack Of Cellulosic Materials.  
 Biotech. Bioeng. Symp 5: 193-219.
- (27) MILLET M. A. & BAKER A. J. 1976.  
 Physical And Chemical Pretreatment For Enhancing Cellulose Saccharification.  
 Biotech. Bioeng. Symp 6: 125-153.
- (28) HIRON J. & B. GHEDALIA D. 1981.  
 Effect Of Chemical Treatments On The Degradability Of Cotton Straw By Rumen Microorganism And By Fungal Cellulase.  
 Biotech. Bioeng. 23: 2863-2873.
- (29) MOO YOUNG et al. 1978.  
 Cell Protein From Various Chemically Pretreatment Wood Substrates Using *Chaetomium cellulolyticum*.  
 Biotech. Bioeng. 20: 107.
- (30) MOO YOUNG et al. 1979.  
 The Waterloo Process For SCP Production From Wastes Biomass.  
 Proc. Biochem. 14 (10): 38.
- (31) NESSE N. et al. 1977.  
 Pretreatment Of Cellulosic Wastes To Increase Enzymatic Reactivity.  
 Biotech. Bioeng. 19: 323-336.
- (32) OLLIN BALL C. & OLSON F. C. N. 1957.  
 Esterilization In Food Technology.  
 Mc Graw-Hill Company Inc. New York.
- (33) PEITERSEN N. 1975.  
 Production Of Cellulase And Protein From Barley Straw By *Trichoderma viride*.  
 Biotech. Bioeng. 17: 361-374.
- (34) PEITERSEN N. 1975.  
 Cellulase And Protein Production From Mixed Cultures Of *Trichoderma viride* And A Yeast.  
 Biotech. Bioeng. 17: 1291-1299.

## REFERENCIAS

- (35) PIRT JOHN S. 1974.  
The Theory Of A Fed Batch Culture With Reference To The Penicillin Fermentation.  
J. Appl. Chem. Biotech. 24: 415-424.
- (36) PONCE NOYOLA T. 1982.  
Estudio De La Dinámica De Un Cultivo Mixto  
(Cellulomonas flavigena y Xanthomonas sp)  
Propagado En Bagazo De Caña.  
Tesis Profesional.  
Escuela Nacional De Ciencias Biológicas IPN (México).
- (37) POSTGATE J. R. & J. E. CRUMPTON. 1961.  
The Measurement Of Bacterial Viabilities By Slide Culture.  
In Methods In Microbiology 1: 611.
- (38) ROCKWELL J. P. 1976.  
Single Cell Protein From Cellulose And Hydrocarbons.  
In Chemical Technology Review #74 And Food Technology Review #34.  
Noyes Data Corporation. Park Ridge New Jersey USA.
- (39) SCHNEIDER W. C. 1957.  
Determination Of Nucleic Acids In Tissues By Pentose Analysis.  
In Methods In Enzymology. 3: 680-684.  
Academic Press Inc. N.Y.
- (40) SINSKEY A. J. & TANNENBAUM S. R. 1975.  
Removal Of Nucleic Acids In SCP.  
In Single Cell Protein II (Tannenbaum & Wang).  
The MIT Press Cambridge, Massachusetts And London England.
- (41) SLONEKER H. J. 1976.  
Agricultural Residues, Including Feedlot Waste.  
Biotech. Bioeng. Symp 6: 235-250.
- (42) STEPHENS R. G. & GARY H. HEICHEL. 1975.  
Agricultural And Forest Products As Sources Of Cellulose.  
Biotech. Bioeng. Symp 5: 27-42.
- (43) SUN B. L. et al. 1982.  
Adsorption Of Cellulase On Cellulose: Effect Of Physicochemical Properties Of Cellulose On Adsorption And Rate Of Hidrolysis.  
Biotech. Bioeng. 24: 2137-2153.
- (44) TANNENBAUM & WANG. 1975.  
Single Cell Protein II.  
The MIT Press Cambridge, Massachusetts And London England.
- (45) ISAO T. G. 1978.  
Cellulosic Materials As A Renewable Resource.  
Proc. Biochem. 13 (1): 12.
- (46) VAN DE KRAMER S. H. & VAN GINKEL L. 1952.  
Rapid Determination Of Crude Fiber In Cereals.  
Cereal Chem. 29: 239-251.

## REFERENCIAS

- (47) WHITAKER A. 1980.  
Fed-Batch-Culture.  
Proc. Biochem. 15 (5): 10-15.