



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE QUIMICA**

**“DESARROLLO DE UNA PLANTA PILOTO  
PARA EL PROCESADO DE SUBPRODUC-  
TOS DEL ARROZ PARA ELABORAR UN  
CONCENTRADO PROTEICO PARA EL GA-  
NADO.”**

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

**MA. ISABEL DEL CARMEN GUERRERO LEGARRETA**

**MEXICO, D. F.**

**1973**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

JURADO: PRESIDENTE: ING. ENRIQUE GARCIA GALEANO  
VOCAL: ING. JORGE SPAMER GARCIA CONDE  
SECRETARIO: Q.B.P. JORGE SOTO SORIA  
1er. SUPLENTE: DR. ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN  
2o. SUPLENTE: ING. RUBEN BERRA GARCIA COSS

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA  
FACULTAD DE QUIMICA U.N.A.M.

DESARROLLADO POR:

MARIA ISABEL DEL CARMEN GUERRERO LEGARRETA

*Maria Isabel Guerrero Legarreta*

ASESOR DEL TEMA:

Q.B.P. JORGE SOTO SORIA

*Jorge Soto Soria*

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

AL SR. ING. DON JOSE ANTONIO LEGARRETA J.

**CAPITULOS:**

- I. INTRODUCCION ✓
- II. MATERIALES Y METODOS
- III. RESULTADOS ✓
- IV. DISCUSION
- V. CONCLUSIONES
- VI. BIBLIOGRAFIA

## CAPITULO I. INTRODUCCION.

- a) Propósito de la Investigación.
- b) La Planta de Arroz.
  - i. Generalidades
  - ii. Cultivo
  - iii. Irrigación
  - iv. Suelos
  - v. Herbicidas
  - vi. Fertilizantes
  - vii. Enfermedades y Plagas
  - viii. Molienda
  - ix. Composición química
- c) Generalidades sobre Bromatología.
- d) Procesos semejantes.
  - i. Proceso Amilo
  - ii. Uso de amilasa fungal
  - iii. Proceso Balls-Tucker
  - iv. Hidrólisis fungal
- e) Proceso Bioquímico.
  - i. Hidrólisis
  - ii. Consumo de azúcares
  - iii. Factores del crecimiento
- f) Cepas usadas.
  - i. *Aspergillus oryzae*
  - ii. *Saccharomyces carbajali*
  - iii. *Streptomyces rimosus*.

a) Propósito de la investigación.

Un problema que actualmente afronta México es la incorrecta utilización de subproductos de determinadas industrias. Entre éstos tenemos los de beneficios de granos con alto contenido de almidón, y dentro de éstos, el que es objeto del presente trabajo es el arroz.

Como posteriormente se indica, el grano de arroz, al entrar en los molinos, primeramente se descascarilla y posteriormente se despoja de la cutícula envolvente, de color café grisáceo, a la cual nos referiremos como pulido. En las operaciones que involucra éste proceso parte del arroz se quiebra, representando la fracción quebrada en un alto porcentaje en relación con el total de arroz procesado. Tanto el arroz quebrado como el pulido son utilizados actualmente como forraje, de escaso valor alimenticio.

El propósito de ésta investigación es usando como materia prima arroz quebrado y pulido o salvadillo, obtener un forraje rico en proteínas y vitaminas a través de métodos microbiológicos, primero hidrolizando el almidón por acción de las enzimas de un hongo, en segundo lugar transformando los azúcares resultantes a proteínas, por acción de una levadura y finalmente inoculando un *Streptomyces*, que dará productos de fermentación que contiene factores desconocidos del crecimiento. Completando el proceso se adiciona el pulido, rico en vitaminas del complejo B.

Como antecedente a éste trabajo se encuentra el realizado por L. Murcia Flores y E. Zetuna Curioica (43), en el cual se -

investigaron los microorganismos apropiados usando como medio de cultivo básicamente arroz y pulido. Esta investigación fué hecha a nivel de laboratorio.

En el presente trabajo se transfieren los resultados obtenidos en el antecedente a un proyecto de escala semi-piloto, visualizando el proceso de forma que se engloben todas las operaciones necesarias para tener el producto terminado.

b) La planta de arroz.

1) Generalidades sobre la planta de arroz. Producción mundial y nacional.

El arroz es un cultivo de primera importancia en muchos países, crece en todos los continentes. Es considerado a menudo como cultivo tropical, aunque crece en zonas tanto templadas como tropicales de Asia, Africa, América, Oceanía y la región sur de Europa. Los rendimientos varían ampliamente según los países productores, por lo general son mayores en zonas templadas que tropicales, no solo por las variaciones del clima, sino también por las prácticas de cultivo y las variedades usadas.

Tabla 1. Producción anual de arroz, datos promedio 1965-70 (38)

	Producción (millones de Ton.)	Rendimiento (Ton/Ha)
<u>Asia</u>		
India	45.2	1.34
Japón	14.98	4.45

Africa

Congo	0.177	1.07
R.A.U.	1.28	5.1

Europa

Italia	0.65	4.76
España	0.378	5.76

Oceania

Australia	0.13	5.66
-----------	------	------

Sudamérica

Brasil	4.34	1.57
Perú	0.257	1.77

Norteamérica

E.U.A.	2.24	3.55
México	0.265	1.98

Las variedades de arroz cultivado pertenecen al género *Oryza*, tribu *Oryzae*, familia *Graminae*. La mayor parte de las variedades cultivadas son de la especie *Oryza sativa*, pero en Africa la mayor parte son de la especie *Oryza glaberrima*. *O. sativa* es anual, pero teniendo humedad y temperatura adecuada así como ausencia de enfermedades, la planta puede sobrevivir y producir grano hasta por veinte años.

Existen tres tipos principales de *O. sativa*: tipo japonico, tipo indico y tipo bulí. Esta clasificación es en base a determinadas características, la principal de ellas es la este

rilidad del híbrido. Kato (38) observó que cruza de ciertas variedades de zonas templadas, producen híbridos con alto porcentaje de flores estériles. Los híbridos entre variedades del mismo grupo eran fértiles y de alta polinización. Propuso que a las variedades de zonas templadas se les denominara japonico o insular y a las variedades de zonas tropicales, indico o continental. Posteriormente se encontró un tercer grupo con características intermedias entre los dos anteriores, procedente -- principalmente de las islas del sudeste de Asia, a éste grupo se le denominó como bulú. El tipo japonico se ha subdividido -- posteriormente en tropical insular y templado insular.

Tabla 2. Especies y distribuciones de *Oryzae* (38)

<i>O. alta</i>	Centro y Sudamérica
<i>O. australiensis</i>	Australia
<i>O. abrahmyatha</i>	Africa Tropical Oeste y Central
<i>O. brevelingulata</i>	Africa Oeste Tropical
<i>O. coarctata</i>	India y Birmania
<i>O. eicingeri</i>	Africa Este
<i>O. glaberrima</i>	Africa Tropical Oeste y América Central
<i>O. glandiglumis</i>	Sudamérica
<i>O. latifolia</i>	Centro y Sudamérica, India Occidental
<i>O. meyeriana</i>	Java, Borneo, Filipinas y Tailandia
<i>O. minuta</i>	Península Malaya, Filipinas y Borneo
<i>O. officinalis</i>	India y Birmania
<i>O. perrieri</i>	Madagascar
<i>O. punctata</i>	Africa Tropical Noreste

O. ridleyi	Cenínsula Malaya, Tailandia y Borneo
O. sativa	India e Indochina
O. selechteri	Nueva Guinea
O. tisseranti	Africa Central

La clasificación anterior es la más general y la más ampliamente reconocida, aunque existen otras. Se ha propuesto por varios investigadores que la parte Este de la India, Indochina y parte de China es el área en donde se originó el actual arroz cultivado. Algunos investigadores han concluido -- que los ancestros del actual arroz cultivado dejaron de existir para dar formas salvajes del actual arroz, a través de etapas sucesivas.

Todas las variedades que crecen en Norteamérica son clasificadas en base a:

- 1) Duración de la época de crecimiento
- 2) Tamaño del grano
- 3) Características químicas del endospermo

En base a la duración de la época de crecimiento, las variedades se pueden dividir en:

1. Muy tempranas (100-150 días)
2. Tempranas (116-130 días)
3. Medianas (131-155 días)
4. Tardías (156 días o más)

Las variaciones en éste tiempo son debidas principalmente a temperatura ambiente y latitud.

Con respecto al tamaño del grano hay tres tipos: corto, me

diano y largo, aunque existe un tipo extralargo considerarlo aparte. Ejemplos de éstos tipos son: corto, variedad Caloro, -- cultivado en California; mediano, variedad Nato, cultivado en todo el centro de E.U. y zona norte central de México; largo, variedad Rexoro cultivado en todo el centro de E.U. y que procede de Filipinas.

En base a las características químicas del endospermo se dividen: grasos ( contiene sólo amilopectina en el endospermo) y común (el endospermo contiene amilosa y amilopectina). El -- porcentaje de amilosa en el endospermo varía ampliamente.

En México se han logrado magníficas variedades de arroz. Mediante una serie de investigaciones efectuadas en el estado de Sinaloa durante el año de 1967, fué posible la obtención de variedades de alto rendimiento. Entre dichas variedades se encuentran las denominadas Ríos A-67, del valle de Culiacán y Sinaloa A-68, con rendimientos experimentales en ésta zona de - 12.5 promedio, para la primera. y 10.4 promedio, para la segunda, toneladas por hectárea.

Esta última tiene 53.2% de grano entero ya molido y es de buena calidad culinaria. Otras variedades como la Venus, Galaxia Mocerito 1 o la línea IR6-10131, prometen un amplio mejoramiento de cultivo en la misma entidad, mientras que la llamada Apura, que rinde aproximadamente 14 toneladas/Ha., continúa en estudio. (31).

La variedad Milagro Filipino ha sido una de las variedades de más alto rendimiento que se han probado en México. Su -

adaptación ha sido muy amplia en el país, porque prospera en casi todos los estados arroceros. Los estudios realizados demuestran que ésta variedad puede usarse tanto para consumo doméstico como para usos industriales, en éste último caso, especialmente para la industria cervecera. Este arroz tiene una -- buena calidad culinaria como la variedad Jojutla Mejorado, que actualmente se siembra en el estado de Morelos. La calidad molinera o industrial, estimada en el porcentaje de grano entero varía de regular a buena, se han encontrado variaciones de grano entero de 35 a 62%, éste último sumamente bueno. Es bastante resistente a las plagas y aunque en Tabasco y Morelos se -- presentan ligeros ataques por hongos, no son de considerar, dado que el rendimiento disminuye en forma apenas perceptible.

Tabla 3. Variedades de arroz en la República Mexicana y localización (44).

Blue Bonnet	Sinaloa
Uruapan	Michoacán
Jojutla	Veracruz
Zapata	Morelos
Jojutla	
Mejorado	Morelos
Faney	Sinaloa

#### ii) Cultivo del arroz

Por regla general el arroz se cultiva en regadío aunque está muy generalizada la opinión que su cultivo requiere un a-

bundante suministro de agua, también se puede cultivar con las mismas cantidades de agua que requieren otros cereales, La característica que lo distingue es que a diferencia de otros cereales, la planta se desarrolla sin dificultad en terrenos enlodados o encharcados. De entre todos los cereales, el arroz es el que proporciona má calorías por unidad de superficie cultivada, y ésto, unido a la capacidad de soportar las inundaciones del terreno y adaptabilidad a las condiciones climáticas y agrícolas, es lo que hace que sea un cultivo de tan gran importancia.

En comparación con otros cultivos, la producción de arroz suele ser más sencilla, conociéndose una gran variedad de -- prácticas de cultivo. En las zonas de cultivo intensivo, donde las parcelas son de poca extensión y donde se cuenta con suministro seguro de agua, las plantas se trasladan después a zonas inundadas. Existen, por otra parte, algunas zonas productoras de arroz como ciertas regiones de Europa, Estados Unidos y Australia, en que la mano de obra es tan cara y tan escasa, -- que la producción de arroz ha tenido que mecanizarse en alto grado.

El arroz necesita en todas las fases de su crecimiento - un abundante suministro de Nitrógeno asimilable. Este nutriente procede generalmente de las materias orgánicas en descomposición. El amoniaco es una forma conveniente de Nitrógeno para el arroz, pero para que se produzca amoniaco la descomposición debe efectuarse en condiciones anaerobias. En condiciones aerobias la descomposición se lleva a cabo demasiado rápido, y

con el Oxígeno del aire, se forman nitratos que pueden dañar a las plantas jóvenes, o nitrógeno libre que se pierde al pasar a la atmósfera a través de la capa de agua. Las condiciones especiales y únicas que existen en un suelo inundado hace que el nitrógeno sea especialmente susceptible de perderse.

El más generalizado sistema de producción de arroz puede resumirse de la siguiente manera. La semilla se humedece durante una semana o diez días, para que, una vez germinada, sembrarla en el semillero. La cantidad de agua que cubre el semillero hay que regularla con precisión. Su nivel debe ser lo más bajo posible, una vez que ha comenzado a brotar; en las regiones frías se hace que bajo el nivel del agua durante el día haciendo que el suelo se caliente, y subiendo el nivel en la noche para evitar que éste se enfríe.

Llegado el momento de hacer el trasplante, las plantas se arrancan del semillero. Con el objeto de no dañar las raíces las plantas se arrancan oblicuamente, en lugar de hacerlo en sentido vertical. Después se transportan al campo. Las plantas se trasplantan el mismo día que fueron arrancadas, y se enloda el campo, a intervalos de diez días se escarda el campo, siempre que sea posible, se drena antes de cada escardada, cuando las plantas tienen 20 a 30 días se pueden utilizar herbicidas.

La recolección se verifica cuando las hojas, tallos y las dos terceras partes de la espiga están aún verdes, El contenido de humedad del grano en el momento de recolectar, viene a ser, por regla general, de 20 a 25%. La práctica más comunmen-

te empleada es secar la mies para reducir su contenido de humedad hasta 15%. Las gavillas se trillan aplicándolas a un tambor giratorio provisto de unos ganchos de alambre que arrancan al grano de la panícula. Este tipo de trilladoras, sin embargo, ha dejado de utilizarse al popularizarse las cosechadoras.

Desde luego, las prácticas de cultivo varían de acuerdo con la región o país. Así tenemos que en Pakistán, India y -- China, todas las prácticas se hacen manuales, la tierra se ara varias veces y el control de agua no es exacto. En Estados Unidos se tiene un alto grado de mecanización y condiciones óptimas de cultivo. El porcentaje de humedad de arroz al cosecharlo varía según las variedades, pero generalmente se tiene de 16 a 27%.

### iii) Irrigación

Los suelos se sumergen de 10 a 12 centímetros de agua la mayor parte del tiempo de su crecimiento. El agua requerida es comparativamente mayor que la requerida en otros cultivos. La diferencia de crecimiento de arroz en suelos inundados o no inundados es una diferencia en metabolismo. Las plantas que crecen en condiciones de inundación tienen baja actividad de catalasas y alta actividad de peroxidazas, que favorecen la degradación de sustancias nutrientes. El alto nivel de manganeso de las plantas que crecen en condiciones de inundación, afecta el mecanismo de oxidación del ácido indolacético y como resultado se tiene crecimiento retardado y bajo rendimiento del grano, -- El arroz en inundación crece con nitrógeno de amonio y peque--

ñas cantidades de manganeso. El agua se añade periódicamente - para compensar las pérdidas por evaporación, filtración y transpiración de la planta.

Para buenos rendimientos es necesario que el agua empleada sea de calidad adecuada. Debe tener baja concentración de sales dafinas a la planta. Las características que determinan si una agua es buena para la irrigación son: Concentración total de sales solubles, proporción de sodio y otros cationes, concentración de boro y otros elementos tóxicos. Otros factores importantes a considerar son la salinidad del suelo y el drenaje interno de los suelos inundados. Una buena de agua de irrigación sería aquella con conductibilidad eléctrica de menos de  $750 \times 10^6$  milimhos; partes por millón de boro, menos de 1. Cuando hay mucho sodio en el agua usada, la tierra se compacta y su impermeabilidad aumenta, lo que la hace dura de cultivar, y de rendimientos bajos. Un punto de gran importancia es la naturaleza de la solución del suelo en la región circundante a la raíz. Si su conductividad excede de 8 milimhos el rendimiento puede disminuir hasta un 50%. Cuando los suelos son fuertemente salinos, las plantas al crecer son muy afectadas, no ocurriendo lo mismo durante la germinación. Las sales impiden que las aguas de inundación se resuman en los suelos lo que las hace estar más expuestas a evaporación y consecuentemente la solución se concentra y las plantas son aún más afectadas por las sales.

La temperatura en el agua de irrigación tiene gran efec-

to en las plantas. Es bombeada a 20°C o menos. Cuando el agua fría va directamente a los campos de arroz, las plantas cercanas al surtidor de agua retardan su crecimiento de 7 a 10 días con respecto al resto del campo. La temperatura de irrigación no debe ser menor de 23°C ni mayor de 30°C para tener los mejores resultados. Hay una relación establecida entre temperatura y oxígeno disuelto en el agua. In vitro se ha encontrado que rangos de temperatura de 25 a 30°C en el agua, son los más favorables para el desarrollo de cultivos de arroz. Exposiciones de 12 horas a agua de 40°C es letal para la mayoría de las variedades de arroz. Se concluye que la deficiencia en oxígeno disuelto es un factor limitante, generalmente se tienen de 5 a 6 partes por millón de oxígeno disuelto a 25°C.

Los métodos para transportar y controlar el agua de irrigación varía de una zona arrocerera a otra, pero todos tienden a un patrón general. En la mayoría de los casos se lleva por bombas, corrientes o canales, los cuales se dividen en arterias - ya dentro del campo. Pasa sucesivamente por compuertas y represas, con controles de nivel. El agua en exceso se drena y recircula para volver a las represas.

#### iv) Suelos.

El arroz es una planta semiacuática y debe ser mantenida bajo condiciones de extrema humedad durante parte o la totalidad de su desarrollo, para minimizar el crecimiento de las malas hierbas y alcanzar altos rendimientos. Dados los requerimientos de agua, los suelos ideales para cultivar arroz son aquellos que retienen humedad. Los suelos arroceros deben de te

ner además, facilidad para el drenaje, por los cambios de la película superior de agua que deben efectuarse. Los suelos de arcilla y aluvi6n son los m1s indicados por su retenci6n de agua y su fertilidad, aunque el cultivo de arroz no requiere -- tierras f6rtils aumenta el rendimiento.

El arroz no requiere un pH critico aunque los 6ptimos son entre 5.5 y 6.5 en 6ste rango de pH hay suficientes nutrientes y las materias t6xicas como aluminio, fierro, sulfatos y sodio generalmente no se encuentran. El pH del suelo en la zona de - la raiz aumenta de 0.5 a 1.5 unidades cuando est1 bajo condiciones de inundaci6n y disminuye cuando se elimina el exceso de - agua. Este aumento de pH influye en la mejor absorci6n de nu-- trientes por la planta. El uso de ciertos fertilizantes sobre-- todo de aquellos que contienen amoniaco aumenta la acidez del suelo. Los problemas de salinidad se presentan en zonas donde las sales solubles se han acumulado, o cuando es pobre la calidad del agua de irrigaci6n. Las variedades difieren en tolerancia de la cantidad de sales , pero todas son afectadas por concentraciones de sales de la regi6n de la raiz.

Química de los suelos inundados.- En la producci6n del arroz - se reconoce el beneficio de inundar los suelos para el creci-- miento de la planta. Este crecimiento en condiciones de inundaci6n puede atribuirse en cierta forma a sus caracteristicas a- cuáticas, pero las caracteristicas químicas de los suelos inundados son las que tienen mayor importancia en el desarrollo - de la planta, las condiciones de inundaci6n provocan cambios - químicos, físicos y biol6gicos profundos en el suelo, el efec-

to inmediato del agua de inundación es la considerable disminución de intercambio gaseoso entre la atmósfera y el suelo. El agua llena los poros del suelo reduciendo la entrada de oxígeno y a menudo permitiendo la acumulación de gases producto de la descomposición orgánica anaeróbica. Las concentraciones de bióxido de carbono, metano, hidrógeno, nitrógeno y varios óxidos, aumenta en los suelos inundados.

La entrada de oxígeno no está totalmente restringida, pero se reduce grandemente a una delgada capa del suelo y a la interfase agua-suelo. El agua de inundación contiene algo de oxígeno disuelto manteniendo una delgada capa del suelo en condiciones de oxidación con propiedades fisicoquímicas y biológicas diferentes a las de tierras más profundas. Los potenciales de óxido-reducción de ésta capa son de 320 milivolta, a un pH de 5.0 y conteniendo radicales oxidados, tales como nitratos, sulfatos, iones férricos y mangánicos. La capa inmediatamente abajo de ésta capa oxidada se caracteriza por la ausencia de oxígeno, así como por la presencia de radicales reducidos tales como amonio, iones ferrosos y manganosos; nitrógeno y sus óxidos, varios sulfitos, incluyendo  $H_2S$ . Los potenciales de oxidación son generalmente menores de 350 milivolts y un pH de 5.0. Estas condiciones se pueden desarrollar después de 3 días de inundación.

Cuando los suelos son inundados el oxígeno desaparece en pocas horas y se tiene ausencia total del mismo a una profundidad de media pulgada. El estado de óxido-reducción de los suelos inundados está gobernado por algunos factores, incluyendo

la velocidad de intercambio de oxígeno, actividad microbiana, contenido de materia orgánica en descomposición y saturación del mismo suelo. La inundación como se ha señalado aumenta el pH del suelo, este aumento depende parcialmente del pH inicial y de la materia orgánica contenida en el suelo, así como del período de tiempo que se tenga sumergido. El pH aumenta de 0.5 a 1.5 unidades dependiendo del pH inicial. Generalmente los suelos con alto contenido de materia orgánica y bajo pH son los que más cambios sufren en el pH al ser inundados. La causa del aumento del pH no ha sido estudiada pero lo más probable es que se deba al aumento en la concentración de amonio, así como que las sales solubles ferrosas e hidróxidos manganesos neutralizan los iones hidrógeno intercambiables en el suelo.

Algunas propiedades mecánicas del suelo tales como permeabilidad, plasticidad, cohesión y consistencia, cambian al inundarse. La permeabilidad de un suelo es influida por la cantidad de aire atrapada, decrece después de inundarse, pero después de liberado el aire, aumenta nuevamente. Después de un tiempo vuelve a decrecer si los productos de microorganismos bloquean los poros y restringen el movimiento del agua,

El inundar un terreno tiene gran importancia en la temperatura del suelo y consecuentemente afecta el crecimiento del arroz, directa e indirectamente. El alto valor específico y al to calor de vaporización del agua hace que se temperatura aumente y disminuya tan rápido o tan lento como la temperatura -

del aire. Las capas superiores del suelo, con buena aereación, generalmente tienen diversas poblaciones de microflora y microfauna. Estos organismos descomponen materia orgánica de la cual derivan energía y liberan  $\text{CO}_2$ . Ellos necesitan de ciertos nutrientes, especialmente hidrógeno. Bajo condiciones de inundación la microflora normal del suelo (actinomicetes, hongos, bacterias, algas y protozoarios) se modifican para producir microflora consistente principalmente en bacterias anaerobias, algunas facultativas y una población menor de algas. Las formas anaerobias tienen requerimientos de energía mucho menor que las aerobias.

La modificación de microflora y microfauna es temporal y las condiciones normales se vuelven a establecer al drenar y aerear el terreno.

La descomposición de la materia orgánica procede más lentamente en suelos inundados que en suelos sin inundar y los productos finales son distintos. Bajo condiciones de inundación se lleva a cabo a la mitad de la velocidad usual. En suelos con buen drenaje los productos finales de descomposición son principalmente  $\text{CO}_2$  sulfatos y nitratos. Bajo condiciones de inundación, son metano, hidrógeno, varios ácidos orgánicos, ion amonio, nitrógeno y varios de sus óxidos, aminas, mercaptanos y  $\text{H}_2\text{S}$ .

La velocidad de descomposición depende de la clase de constituyentes orgánicos y de contenido de nitrógeno; si la relación carbono-nitrógeno es adecuada a las funciones microbia

nas, el nitrógeno es mineralizado y si los materiales carbónicos están en exceso, el nitrógeno es inmovilizado. En suelos inundados la mineralización produce iones amonio. La existencia de dos capas distintas, una oxidada en la interfase suelo-agua y una reducida inmediatamente abajo tiene una gran influencia en los factores agronómicos asociados con la producción de arroz. Estas capas deben ser tomadas en cuenta en todo el ciclo de cultivo, fertilización e irrigación.

Los suelos inundados, por sus características, aumentan el aprovechamiento de fósforo nativo y es aplicado como fertilizante, factores que parecen estar asociados con el aumento del aprovechamiento del fósforo, incluyendo modificaciones de pH, reducción de fosfatos férricos insolubles a la forma ferrosa soluble, hidratación y subsecuente hidrólisis de fosfatos férricos y de aluminio y desplazamiento de fósforo soluble por formación de un ion complejo.

El azufre en forma orgánica o como ion sulfato es reducido a sulfito en suelos inundados. La reducción de sulfato es llevado a cabo por bacterias anaerobias, que son activas en un amplio rango de pH y operan bajo potenciales pequeños de óxido-reducción.

El fierro, un constituyente principal de los suelos, está presente como mineral, óxidos hidratados y varios complejos orgánicos. Cuando el suelo se inunda el hierro cambio de solubilidad. Este cambio es también una función del contenido de materia orgánica, el potencial de óxido-reducción y la reacción

con el suelo. El ion férrico que predomina en suelos con buen drenaje, se reduce a la forma ferrosa especialmente como hidróxido y carbonato.

La química del manganeso del suelo no está muy bien estudiada. Forma un equilibrio dinámico, dependiendo de factores como pH, óxido-reducción actividad microbiana y presencia de materia orgánica. El manganeso existe en tres estados de oxidación, con algunos compuestos conteniendo manganeso en dos de sus formas. En ciertos aspectos, el comportamiento del manganeso en el suelo es similar al del fierro. En suelos inundados, los óxidos de manganeso se reducen a iones solubles e intercambiables. La reducción biológica ocurre independientemente del pH del suelo y existen potenciales de oxidación-reducción bajos. La materia orgánica en descomposición reduce al manganeso, especialmente a pH bajos. No es común que el manganeso del suelo en condiciones de inundación afecte adversamente al arroz.

#### v) Fertilizantes.

El uso apropiado de fertilizantes hace que el rendimiento suba de 30 a 50%. El nitrógeno es el elemento clave en la producción de arroz. En muy pocos casos los rendimientos de arroz no responden ante las aplicaciones de Nitrógeno, esto puede deberse a varias razones entre las cuales tenemos: 1) la variedad carece de potencial fisiológico para responder, 2) la existencia de fósforo y/o potasio pudo haber sido inadecuada, 3) ya existía Nitrógeno en el terreno de cultivo

La respuesta al fósforo es menor que a la de Nitrógeno. -

Con la aplicación de Nitrógeno en proporciones mayores y ante la demanda de nutrientes por las variedades de alto rendimiento los suelos que normalmente contienen cantidades adecuadas de fósforo, no pueden admitir más, pues es probable que tengan efectos contraproducentes.

La respuesta del arroz a las aplicaciones de potasio es menor, para su efecto en el rendimiento es muy significativo. Las formas amoniacales de Nitrógeno son generalmente preferidas a las formas de nitratos; sin embargo, compuestos conteniendo ambas fuentes, tales como nitrato de amonio o mezclas de nitrato de amonio y urea, en forma líquida, se consideran como fuentes óptimas de Nitrógeno. El amoniaco anhidro es una magnífica fuente de Nitrógeno para el arroz, pero su costo es muy elevado. El fósforo es comunmente aplicado en forma de superfosfato, fosfato de amonio o fosfato diamónico. El cloruro de potasio es la fuente más común de potasio. Se usa en muy pequeñas cantidades de sulfato de potasio, aunque se consideran resultados similares a los del KCl. En aéreas en donde se ha cultivado arroz que se ha fertilizado con fósforo y potasio, quedan cantidades residuales que sirven para fertilizar el siguiente cultivo, sin necesidad de añadir más. No hay necesidad de añadir limo para los suelos con pH ligeramente ácido (5.0 a 6.5).

Los fertilizantes comerciales no fueron muy usados hasta después de la 2a. guerra mundial, de hecho, en las pruebas hechas con fertilizantes en la década de los '30, dieron rendimientos bajos. El auge de los fertilizantes comerciales vino cuando se

mejoraron las técnicas de irrigación y drenaje en los campos arroceros, mecanización en las operaciones de cosecha y mejoramiento de las variedades. Se hacen varias pruebas químicas rápidas para determinar cual será el fertilizante apropiado; estas son: reacción del suelo (pH), porcentaje de materia orgánica, fósforo, potasio y calcio aprovechables, así como nivel de salinidad. El nivel del Nitrógeno se determina por la cantidad de materia orgánica presente. Los resultados obtenidos de estas pruebas dan información bastante exacta de los cambios químicos que ocurren en los terrenos inundados. Toda esta información es de valor para determinar los requerimientos de fertilizantes en áreas arroceras.

#### vi) Herbicidas.

Las condiciones favorables para el crecimiento del arroz - también son favorables para el crecimiento de malas hierbas. Estas producen semillas abundantes, que una vez que infectan el campo, es difícil de quitarlas. Los herbicidas son usados conjuntamente con buenas prácticas de cultivo. Uno de los principales herbicidas es el Propanil (3,4-dicloropropionanilida). El Propanil es muy selectivo y el arroz no es dañado al aplicarlo. El Propanil controla las siguientes especies: *Echinochloa crus-galli*, *E. colonum*, *E. crus-galli* y otras; el Propanil tiene acción de contacto, se usa cuando las malas hierbas y el arroz están en las primeras etapas de crecimiento.

La irrigación estimula el crecimiento de las malas hierbas y las hace más susceptibles al Propanil, pero no debe haber inundación cuando éste se aplica, dada su acción de contacto.

Los herbicidas fenoxi controlan hierbas acuáticas. Estos

herbicidas incluyen los siguientes: 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), MCPA (ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético), 2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético). Estos herbicidas son aplicados como sales aminadas o esterés de baja volatilidad. El arroz muy joven es seriamente afectado por el 2,4-D, MCPA, y 2,4,5-T. Los herbicidas son generalmente menos efectivos en caso de inundación. Así como el Propanil, los herbicidas fenoxi afectan a otros cultivos, por lo que hay que tener cuidado al aplicarlos.

#### vii) Enfermedades del arroz.

El hongo *Piricularia oryzae* ocasiona que las plantas se sequen, los síntomas son la aparición de manchas alargadas de color café en las hojas. Las condiciones de humedad ambiental favorecen su desarrollo.

La llamada "Mancha café" es provocada por el hongo *Helminthosporium oryzae*. Estas manchas en las hojas son ovales y de color café grisáceo.

La "Raíz podrida" es en general una enfermedad en la que las raíces crecen pobremente y mueren. Es causada por varios hongos del suelo. Las plantas que crecen en terrenos salinos y alcalinos son severamente afectadas.

El "Tallo seco" es producido por el hongo *Sclerotium oryzae* que se encuentra en los suelos. El arroz es atacado por éste hongo en etapas avanzadas de su crecimiento. Los fertilizantes de potasio reducen el daño.

La "Punta blanca" es causada por el nematodo *Aphelenchoides besseyi*, afecta a las hojas dandoles un aspecto blancuzco en la

punta. El tratamiento con agua caliente da relativamente buenos resultados.

La "Hoja blanca" es una enfermedad viral, presentándose estrías blancas en las hojas. La planta no alcanza su tamaño normal y las flores son estériles.

El "Grano manchado" es causado por el hongo *Neovossia barclayana*. El endospermo es invadido por una mancha negra. Hay mayor incidencia en la época de lluvias.

La "Hoja manchada" es causada por el hongo *Entyloma oryzae*. Se reconoce por numerosas manchas muy pequeñas en las hojas. La enfermedad se hace más intensa a medida que la planta llega a su madurez.

Se presentan también zonas decoloradas en los granos, se han aislado varios hongos que las producen, entre ellos: *Curvularia lunata*, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Trichocoris caudata* y *Helminthosporium oryzae*.

## Insectos

Gorgojo de agua.- (*Lissorhoptrus oryzophilus*) Existe en muchas áreas arroceras de Norteamérica. El adulto es de color café grisáceo de 5 mm. de largo. Crece durante el Invierno en aguas de inmediaciones, en la Primavera emigra y las larvas se alimentan de la raíz, causando serios daños. Es fácilmente controlada con insecticidas.

Chinche del arroz.- (*Oebalus pugnax*) El adulto mide aproximadamente 12 mm. Pasa el Invierno en los pastos cercanos, emigrando a los arrozales antes que las plantas comiencen a cre

cer; los huevos, dentro de bolsas cilíndricas son depositados en tallos, hojas y hierba que crecen en el arrozal, se alimentan de plantas jóvenes causando esterilidad.

Gusano de Lespedeza.- (*Maecolapsis flavida*) Pasa el Invierno en estado de larva. En la Primavera se translada a los suelos en los cuales las semillas empiezan a germinar. La larva aparece ahora en la superficie de la tierra, desarrollándose y alimentándose de las plantas jóvenes.

Barrenador del arroz.- (*Hydrellia griseolla*) Ataca a las hojas, las que se tornan café y caen.

Los saltamontes causan también serios daños en los campos de arroz. Las orugas aparecen a intervalos regulares en los campos no inundados, alimentándose de hojas y tallos.

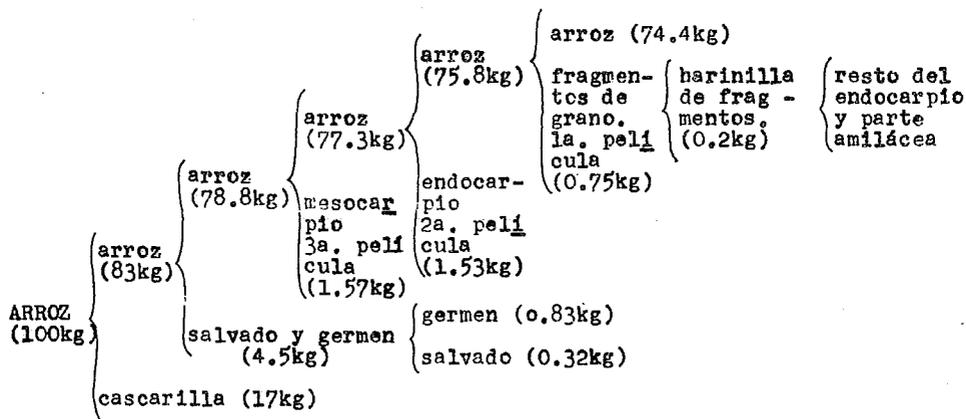
Hay otras plagas que afectan al arroz, todas o la mayor parte son controlables con insecticidas, aunque con estos deben de tenerse precauciones extremas, ya que es común que también afecten al hombre. Para ciertos insecticidas es necesario utilizar máscaras adecuadas y aún así deben de ser aplicados por personas con experiencia en el manejo de estos compuestos. Es necesario lavar perfectamente cara y manos después de aplicarlos.

#### viii) Molienda del arroz.

En relación con su aspecto externo y su importancia alimenticia y mercantil, se distinguen: arroz bruto o palay, es el grano que aún está cubierto por la cascarilla y no es apto para consumo por el alto contenido de celulosa en ésta última; el arroz descascarillado en el cual el grano está desprovisto de la cascarilla, no es todavía blanco por estar cubierto por

el pericarpio, película delgada que encierra la masa de células amiláceas; el arroz blanco, pulido o perlado, listo para su consumo después de haber sido sometido a los procedimientos mecánicos del pulido del grano. Durante las operaciones a que se somete el arroz, una porción se parte. En la preparación industrial de arroz para consumo humano, se efectúan dos operaciones fundamentales: a) descascarillado y b) blanqueado o pulido, ambas dan residuos de muy diferente naturaleza y sobre todo, de muy distinto valor alimenticio. En el descascarillado, primera operación a que se someten los granos, se les desprovee de la cascarilla. Esta carece prácticamente de valor alimenticio por su alto contenido de fibra bruta y sales minerales. Se utiliza como combustible. El blanqueo o pulido comprende una serie de operaciones que son señaladas esquemáticamente a continuación. El arroz, ya sin cáscara pierde una fina película exterior, o sea el endospermo. Este residuo se conoce como salvadillo, al mismo tiempo se quita el germen del grano.

Tabla 4. Subproductos de la molienda del arroz.

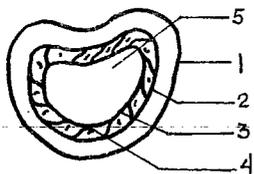


Los datos entre paréntesis son valores promedio, los valores reales fluctúan según la calidad del arroz, así como los procedimientos de descascarillado y pulido empleados.

En México, el promedio que da una tonelada de arroz palay da alrededor de 630 kg. de arroz sin pulir y 370 kg. de cascarilla. Para fines comerciales el arroz se divide en: arroz superextra con 5% de arroz quebrado en el producto final; arroz extra con 25% de arroz quebrado y arroz comercial con 35% de arroz quebrado. Los precios varían según el porcentaje de arroz quebrado.

El grano descascarillado queda cubierto por una especie de película café grisáceo, el mesocarpio o parte media (3a. película). La operación siguiente elimina de la superficie del endospermo al endocarpio, la siguiente película envolvente (2a. película). La última pasada elimina los restos de endocarpio que quedan y arrastra una gran parte de harina o parte amilácea hasta quedar lisa la superficie del grano, el residuo se denomina harinilla o la. película.

Fig. 1.- Diagrama esquemático del grano de arroz.



1. cascarilla
2. Pericarpio
3. Mesocarpio (3a. película)
4. Endocarpio (1a. y 2a. Películas)
5. Endospermo

Los granos son desprovistos también del gérmen, con el fin de que las harinas puedan ser mejor conservadas, ya que las grasas que contienen en el gérmen provocan con toda facilidad procesos de enranciamiento y fermentativos, si se encuentran incorporadas a las harinas correspondientes.

En general, el rendimiento oscila entre 10 y 17% para México, refiriéndose a la cascarilla, pudiéndose establecer la siguiente relación de los subproductos obtenidos en el tratamiento del grano de arroz:

cascarilla	17-21% del total procesado
quebrado	8-14% " " "
pulido	2-4 % " " "

La disponibilidad nacional de pulido de arroz estimada para 1975 es de aproximadamente 58 000 toneladas. Los estados de Veracruz, Sinaloa, Morelos tienen 36, 18 y 13% respectivamente de la producción nacional de pulido. La zona del centro para 1975 tendrá una producción de pulido de 17 000 toneladas. El precio actual del pulido es de alrededor de \$750.00 por tonelada (33).

Tabla 5. Producción de arroz en México (anual). Promedio 1965-70 en toneladas (38).

	Total	D.F.	Mich.	Mor.	Ver.	Jal.	Son. y Pue.
<u>palay</u>	21 291	1 573	13 859	1 440	2 311	350	1 755
<u>entero</u> (hasta 12% quebrado)	10 898	773	6 848	746	1 180	172	1 177

Tabla 5. (continúa)

	Total	D.F.	Mich.	Mor.	Ver.	Jal.	Son. y Pue.
<u>moreno</u>	35	1	22	0.6	6	1	2
<u>quebrado(hasta 25%)</u>	1 220	80	759	68	121	16	174
<u>cabeznuela</u>	280	25	197	20	25	5	9
<u>granillo</u>	2 170	166	1 470	152	214	37	128
<u>harina de arroz</u>	969	60	530	55	105	13	204

Una vez procesado el arroz y antes de almacenarlo se seca, para el secado adecuado la temperatura no debe ser alta, así - como llevarse a cabo lentamente, de otra forma la calidad se afecta seriamente. Para evitar que el grano se rompa, el secado se lleva a cabo en tres etapas, aumentando la temperatura gradualmente de una a otra, enfriando el grano entre etapas. Hay varios tipos de secador, pero todos siguen el mismo patrón de hacer circular el aire a contracorriente.

En el arroz almacenado pueden ocurrir contaminaciones o - invasiones de insectos.

#### ix) Composición química del arroz.

Las composiciones de arroz palay y blanqueado son las siguientes:

Tabla 6. Composición del arroz

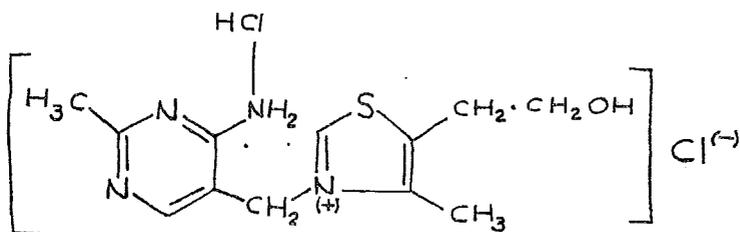
	Palay		blanqueado	
	bruto (%) digestible		bruto (%) digestible (%)	
Sustancia seca	90		90	
proteínas	8.5	6.8	8	6.4
grasas	1.7	1.3	1	0.7
extractivas				
(sin nitrógeno)	68.1	61.3	79	71.1
fibra	7.5	2.4	1	0.3
cenizas	4.3	-	1	-

Con relación a las diferentes películas del endospermo, la composición química es la siguiente:

Tabla 7.

	Incluyendo las		
	tres películas	1a. película	2a. y 3a. películas
sustancia seca	87	91.44	89.31
Materias nitrogenadas	12.5	10.6	10.6
" grasas	15.4	11.25	10.65
" extractivas	41.5	41.74	38.75
" celulósicas	10.2	16.25	18.65
" minerales	7.4	11.6	11.20

Las cubiertas propias del endospermo son muy ricas en fitina, compuesto orgánico de fósforo y en vitaminas del complejo B, principalmente en vitamina B<sub>1</sub>.



Vitamina B<sub>1</sub>

cloruro de 3-(amino-2-metilpirimidil-5-metil)-4-metil-5(β-hidroxi-etil)-tiazolio. (Tiamina o vitamina B<sub>1</sub>).

Del germen o embrión de los granos se obtienen los productos: harina del germen y aceite del germen. La harina del germen en granos presenta un color amarillo claro y un olor semejante al de las nueces, es rica en prótidos, especialmente en fitina, carbohidratos y grasas y posee en elevado contenido de vitamina E.

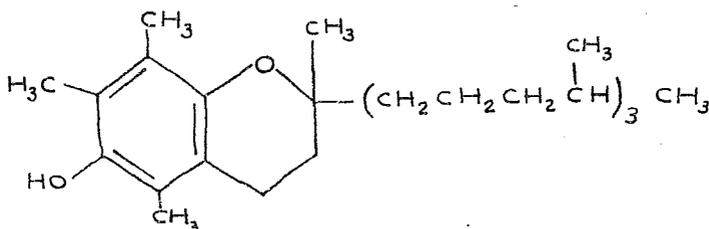
Si se extrae el aceite, la harina resultante es algo más clara, pierde algo de su olor y gran parte de las materias grasas. El aceite de germen es un líquido denso de color marrón y olor agradable; es rico en lipoides (fitosterina, lecitina, etc.) y en vitamina E, representando la fracción vitamínica el 0.5% de su peso total.

La composición química de la harina del germen sin desgrasar en comparación con las de germen de maíz y trigo es la siguiente:

Tabla 8. Comparación en la composición del germen de arroz, --

maíz y trigo.

	gérmen de trigo (%)	gérmen de arroz (%)	gérmen de maíz (%)
sustancia seca	89.7	90	93
materias protéicas	25.3	19	19.8
" grasas	8.7	13	7.8
fibra	2.7	4	8.9
cenizas	3.8	6.5	3.3



Vitamina E ( $\alpha$  - tocoferol)

Resumiendo, las diferentes partes de que consta el grano de arroz tienen las siguientes composiciones:

Tabla 9. Composición de las diferentes partes del arroz.

	salvado sin germen (%)	3a. película sin germen (%)	2a. película	1a. película con fragmentos de grano (%)	harinilla sin fragmentos de grano (%)
sustancia seca	88.42	88.63	88.87	87.8	87.61
proteína bruta	12.18	12.9	10.44	9.69	9.57
" pura	10.93	10.8	9.56	8.87	9.06
" digerida	8.44	9.6	8.74	8.0	8.37
proteína no digestible	2.4	1.2	0.82	0.85	0.69
extracto etéreo	15.87	11.95	7.6	4.75	1.57
fibra bruta	16.25	8.44	2.94	1.88	1.4
almidón	23.35	30.25	39.95	60.15	58.65
azúcares no reductores (expresados en glucosa)	1.31	-	-	-	0.8

pentosanas	3.7	3.7	1.95	1.1	0.8
sustancias mi- nerales	8.28	8.26	4.15	3.57	2.64
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> total	1.72	1.49	1.45	0.98	0.91
MgO total	1.42	1.11	0.77	-	0.005
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> en com- binación or- gánica	1.32	1.21	1.26	0.71	0.788
Fitina	2.22	2.0	1.15	1.15	1.3

Comercialmente podemos diferenciar el arroz en normal, café y precocido. El Rice Council de Estados Unidos diferencia - entre prehervido (parboiled) y precocido (precooked). Ambos son tratados con vapor; su composición química es la siguiente:

Tabla 10. Composición química de diferentes arroces para alimen-  
tación.

Para 100 g. de arroz:

	café		blanco (no enriq.)		prehervido (parboiled)	
	crudo	cocid.	crudo	cocid.	crudo	cocid.
agua (%)	12.0	70.3	12.0	72.6	10.3	73.5
proteína (g)	7.5	2.5	6.7	2.0	7.4	2.1
grasa (g)	1.9	0.6	0.4	0.1	0.3	0.1
carbohidratos (g)	77.4	25.5	80.4	24.4	81.3	23.3
fibra (g)	0.9	0.4	0.3	0.1	0.2	0.1
cenizas (g)	1.2	1.1	0.5	1.1	0.7	1.1
calcio (mg)	32.0	12.0	24.0	10.0	60.0	19.0
fósforo (mg)	221.0	73.0	94.0	28.0	200.0	57.0
hierro (mg)	1.6	0.5	0.8	0.2	2.9	0.8
sodio (mg)	9.0	**	5.0	**	9.0	**
potasio (mg)	214.0	70.0	92.0	28.0	150.0	42.0
tiamina (mg)	0.34	0.09	0.07	0.02	44.0	0.11
riboflavina (mg)	0.05	0.02	0.03	0.01	-	-
niacina (mg)	4.7	1.4	1.6	0.4	3.5	1.2

\*\* Varía con el contenido de ion sodio en el agua y la adición de sal durante el cocimiento.

Algunas de las pruebas físicas y químicas a que se somete el arroz son: determinación de contenido de amilosa, cantidad de almidón y temperatura de gelatinización. Algunas de estas

propiedades en granos cortos y medios son: temperatura baja de gelatinización, reacción pronunciada alcalina y viscosidad relativamente baja al cocerse. En variedades largas se tiene alto contenido de amilosa y máxima viscosidad en la pasta.

### c) Generalidades sobre Bromatología.

Para la correcta dosificación de sustancias alimenticias es necesario conocer el papel de cada uno de los constituyentes de estas en el organismo. Este necesita para la normalidad de sus funciones y para su propia subsistencia un mínimo de proteínas, grasas, carbohidratos, sales minerales y vitaminas, a esto se le conoce como Ley de los Mínimos.

Planteando el proceso de nutrición en estos términos, rápidamente se relaciona con el metabolismo de las sustancias máximas, obligando a considerar el aspecto cualitativo de los alimentos y la importancia biológica de los elementos o sustancias mínimas (aminoácidos, minerales, vitaminas).

Proteínas.- El organismo animal necesita un mínimo de aminoácidos unidos en proporciones definidas, que son material básico con el cual sustituyen nitrógeno perdido en determinadas funciones como crecimiento, gestación, etc.

Como solo los vegetales son capaces de realizar la síntesis de prótidos a partir de sustancias más sencillas, los animales al no poseer ésta capacidad deben tener una fuente exógena. El valor biológico de una proteína está relacionado con el número, naturaleza, proporcionalidad, etc. de los aminoácidos que lo componen. Al liberarse en procesos digestivos los aminoácidos que constituyen una proteína, son asimilados y representan la materia prima que servirá al organismo para la síntesis de las proteínas específicas orgánicas y de las que han de figurar en sus producciones; será mayor el valor biológico de una proteína

entre más se aproxime su composición a las especificaciones orgánicas, por esto, las proteínas de origen animal presentan un coeficiente de utilización más elevado que las de origen vegetal, debido a la semejanza entre las proteínas alimentarias y las sintetizadas por el organismo a partir de las primeras, fragmentadas durante la digestión. Según Thomas, valor biológico de una proteína es la capacidad que ésta tiene para sustituir a la que ha sido destruida en el organismo, en su funcionamiento o para formar la de una determinada producción. Si una proteína tuviera la misma composición que la de la proteína destruida, se establecería el equilibrio nitrogenado, administrándola en cantidad igual a la destruida, se tendría entonces un valor biológico de 100. Si para sustituir la proteína destruida se requiere dos veces de la proteína alimentaria, se tiene un valor biológico de 50. Thomas propone la siguiente fórmula en la que se indica la cantidad de nitrógeno recobrado por el organismo.

$$\text{Valor biológico} = 100 \frac{\text{N recobrado}}{\text{N alimentario absorbido}}$$

Tabla 11

Valor biológico encontrado para algunas fuentes de proteínas:

Leche	93
Huevo de gallina	93
Harina de arroz	86
Salvado de arroz	67
Alfalfa	56
Harina de trigo	52

En determinadas condiciones (crecimiento, lactancia, gestación) se modifican los requerimientos tanto cualitativos como cuantitativos de las proteínas. De aquí que se consideren proteínas completas las que son capaces de asegurar el crecimiento de los animales, ya que es en éste período en el que se requiere suficiente cantidad de proteínas. Las parcialmente completas son capaces de mantener el equilibrio nitrogenado y la vida normal en los adultos, pero no asegura el equilibrio ni el crecimiento en los jóvenes; las proteínas incompletas no son capaces de mantener la vida de los animales, cuando se suministra como única fuente de nitrógeno.

Desde el punto de vista fisiológico, es tan importante como una cantidad adecuada de proteína la proporción de los componentes de estas: los aminoácidos. Hay algunos de ellos que aunque el organismo animal los necesita, no puede sintetizarlos. Rose denominó aminoácidos esenciales a aquellos que por ser necesarios para mantener el crecimiento y funciones normales y que no se sintetizan, es forzoso que figuren en la dieta. Estos son: lisina, valina, leucina, isoleucina, histidina, triptofano, metionina, arginina, treonina y fenilalanina. En las primeras etapas del crecimiento son todos ellos indispensables; los demás aminoácidos no son indispensables en la dieta, pues pueden ser sintetizados.

Tabla 12

Composición en aminoácidos de la proteína de arroz en comparación con la de Hígado y alfalfa (Comparativamente).

	Hígado	Arroz blanco	Alfalfa
Arginina	6.6	7.2	4.4

Tabla 12 (continuación)

	Hígado	Arroz blanco	Alfalfa
Histidina	2.7	1.5	2.1
Lisina	5.5	3.2	4.9
Tirosina	4.8	5.6	5.7
Triptofano	1.7	1.3	1.6
Fenilalanina	5.5	6.7	4.5
Cistina	1.5	1.4	1.6
Metionina	2.7	3.4	2.3
Treonina	4.6	4.1	3.3
Leucina	8.0	9.0	6.6
Isoleucina	5.6	5.3	3.6
Valina	6.2	6.3	4.3

## Nitrógeno no protéico.

Se pueden hacer dos grupos con las sustancias que contienen nitrógeno no protéico y que son utilizados por el organismo para la síntesis de las proteínas; a) amidas, b) urea y sales amoniacales.

Las principales amidas son la asparagina y la glutamina. Son utilizados directamente, metabolizados, o a través de la síntesis de proteínas, por los microorganismos existentes en el intestino de los animales. La urea requiere la presencia de microorganismos en el aparato digestivo de los nutrientes (en los carnívoros no hay resultados positivos), para su paso a proteínas y posterior asimilación, lo mismo ocurre con las sales amoniacales.

Carbohidratos.- Los carbohidratos estriban su valor biológico en que son las sustancias que más fácilmente se combustión y los únicos que pueden ser utilizados directamente por los tejidos, es decir, sin experimentar cambio previo, como en el caso de las proteínas. En ausencia de ellos o cuando se tiene una aportación escasa el organismo puede fabricar azúcares a partir de algunas proteínas y grasas; pero la ausencia prolongada provoca la acumulación de cuerpos ácidos.

Los carbohidratos favorecen el crecimiento de determinados gérmenes que intervienen en la síntesis de algunas vitaminas del complejo B y en el aprovechamiento del nitrógeno no protéico. El exceso de carbohidratos ocasiona efectos perjudiciales

por su facilidad en la producción de fermentaciones nocivas en el aparato digestivo. De un modo más general se puede decir que los carbohidratos no deben constituir más del 60% del valor calórico de la dieta.

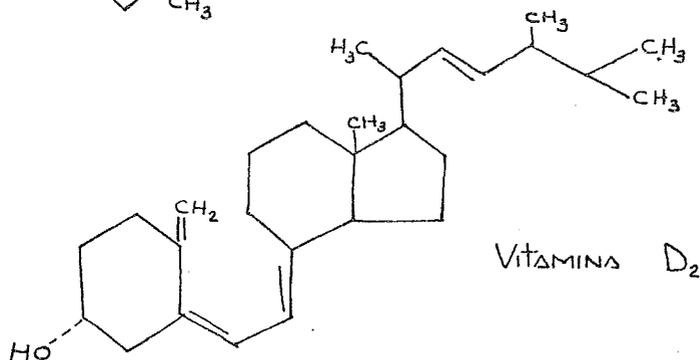
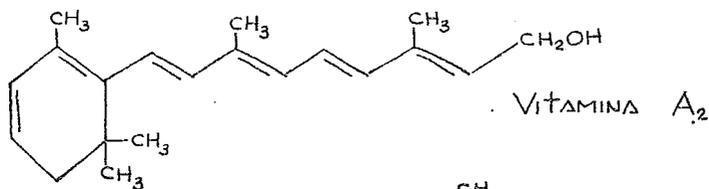
Grasas.- Al principio, el valor biológico de las grasas fué considerado por su poder energético, es decir, por las calorías producidas en su combustión; más tarde se ha valorado más ampliamente su función al conocer su influencia sobre la absorción de las proteínas, así como por servir de vehículo a algunas vitaminas y por ser necesarias para la absorción y utilización de vitaminas A, D, E y K. El consumo excesivo de grasas provoca trastornos digestivos con acción laxante y disminución del aprovechamiento de los restantes elementos constituyentes de la ración.

Burr demostró la necesidad de ácidos grasos en la dieta al observar que un nivel de 0.2% de ácido linoléico en la dieta de ratas curaban los síntomas de pérdidas de peso y dermatitis. Debe señalarse que todos los animales deben tener en sus dietas colina y fosfato, con el fin de sintetizar fosfolípidos.

Vitaminas.- Se descubrieron por primera vez en la naturaleza debido a que son nutrientes esenciales para los animales. Se requieren sólo en cantidades muy pequeñas para el mantenimiento de la salud del animal. Las principales vitaminas son: Vitamina A.- Es esencial para mantener saludables los tejidos epiteliales es precursor de los bastoncillos de la retina. La

deficiencia ocasiona la queratinización de las membranas mucosas, principalmente el ojo. Se encuentra en aceites y grasas de peces y animales, especialmente los de hígado; actualmente se sintetiza.

Vitamina D.- Es esencial en el desarrollo de la estructura ósea su deficiencia ocasiona el raquitismo. No está ampliamente en la naturaleza, se produce por la irradiación de ciertos esteroides, así, como ejemplo la irradiación del ergosterol produce vitamina D<sub>2</sub> (calciferol)

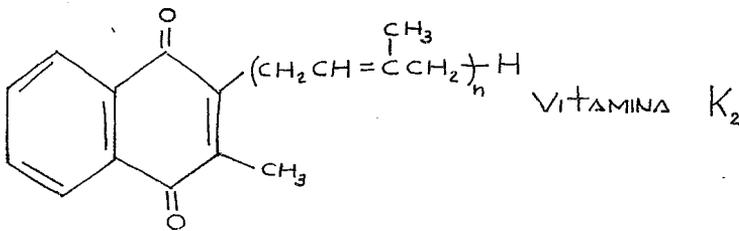


Vitamina E.- Hay cuatro formas diferentes, todos son compuestos fenólicos denominados tocoferoles. Se denominan:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$  tocoferol. Es una vitamina antiesterilidad, su falta oca-

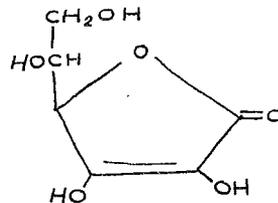
siona en el macho degeneración irreversible del tejido germinal de las gónadas. En la hembra la esterilidad es temporal, ya que pueden llegar a una reproducción normal si se les administran cantidades ad cuadas. La deficiencia ocasiona también - - distrofia muscular. Una de las fuentes más ricas es el aceite de gérmen de semillas.

Vitamina K.- Se ha denominado antihemorrágica, por su papel en la coagulación sanguínea, la parte activa de la molécula es el núcleo de 1,4-naftoquinona. Fué aislada por primera vez de la alfalfa y de la harina de pescado putrefacto. Es sintetizada por las plantas verdes y por algunos microorganismos.

Vitamina C.- O ácido ascórbico, puede considerarse como derivado de la L-glucosa, es por tanto un 3-ceto-L-gluco-furanolactona, su deficiencia ocasiona falta de sustancias cimentadoras en el tejido intercelular (escorbuto). Se encuentra especialmente en frutas cítricas y algunos tubérculos. También se ha llegado a sintetizar por métodos industriales.



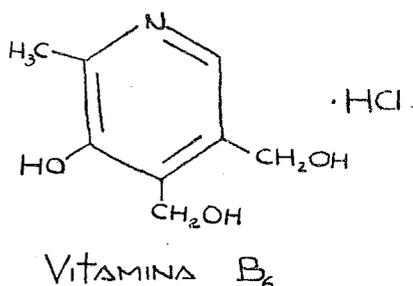
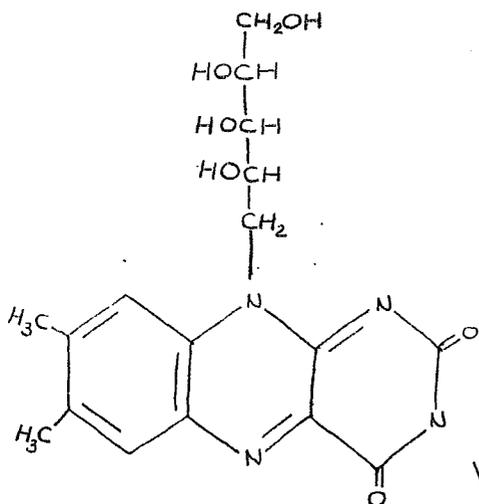
VITAMINA C



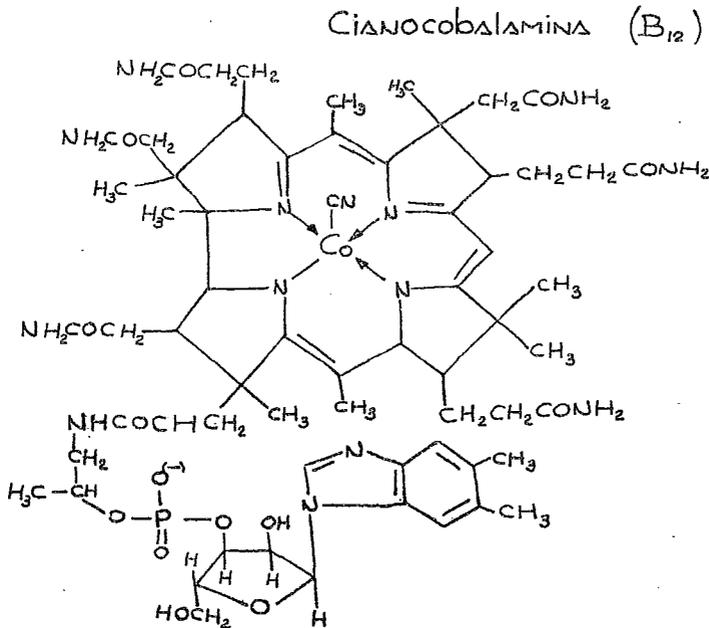
Tiamina.- ( $B_1$ ) Funciona como coenzima para el metabolismo de los carbohidratos, cuando hay defecto, el ácido pirúvico se acumula en la sangre alcanzado niveles tóxicos. En el hombre se produce el beri-beri, en las aves de corral, polineuritis. Fué descubierto en el pulido de arroz, se encuentra también como producto metabólico de levaduras.

Riboflavina.- ( $B_2$ ) Actúa como coenzima en el metabolismo. Su deficiencia produce trastornos oculares y pelagra. Está ampliamente distribuida en tejidos animales, vegetales y microorganismos.

Piridoxina.- ( $B_6$ ) Es un derivado de la piridina, es una coenzima para descarboxilasas, transaminasas y en la síntesis de aminoácidos. Su deficiencia causa dermatitis en las ratas. Se encuentra en los granos de cereal entero, carne, leche y verduras.



Cobalamina.- (B<sub>12</sub>) Muchos microorganismos la sintetizan, (Streptomyces sp.) Es una coenzima en el metabolismo de los aminoácidos. Su estructura es la más compleja de todas las vitaminas. La vitamina aislada del hígado contiene un átomo de cobalto de la siguiente forma:



Digestibilidad.

Conocidas las composiciones de los alimentos y las modificaciones que durante el proceso digestivo sufren, por la acción de temperatura, medio, agentes químicos, flora microbiana y fermentos se tiene una idea de la transformación que experimentan para que el organismo las pueda asimilar, la parte no digerida

se elimina por las heces, y la diferencia entre ésta parte y el total de alimentos nutritivos contenidos en el alimento, - constituyen los principales nutrientes digestivos. La digesti**o**n de un alimento se establece a través de los coeficientes de digestibilidad. Si se tiene p como el peso de la sustancia ingerida con el alimento y p el de la sustancia eliminada en las heces, la parte digerida será P-p y el coeficiente será:

$$\frac{\text{Sustancia ingerida}}{\text{Sustancia absorbida}} = \frac{100}{X}$$

$$C = \frac{(P-p) \times 100}{P}$$

Las cifras de digestibilidad obtenidas no son totalmente exactas, parte de las sustancias que figuran como digeridas no han sido en realidad incorporadas al organismo, sino que se han perdido de diferentes modos. En sentido contrario, se enmascara la digestibilidad de las proteínas, ya que en las heces se encuentra nitrógeno que no procede de proteínas, además en todos los animales, principalmente en los rumiantes hay procesos de fermentación que forman sustancias de escaso o nulo valor nutritivo.

El aumento de carbohidratos digeribles rebaja el coeficiente de digestibilidad de los demás elementos, se debe en parte al número considerable de bacterias que se desarrollan cuando se administran alimentos con exceso de almidones, se eleva el contenido de ácido láctico, pues en la digestión

microbiana de las sustancias no nitrogenadas se forman importantes cantidades de éste ácido y otros ácidos grasos inferiores, los que por su marcada acción acidificante puede ocasionar la muerte de las bacteria o impedir su desarrollo, con lo que la digestibilidad disminuye.

El aumento de proteínas inhibe la acción perniciosa de cantidades demasiado desproporcionadas de sustancias no nitrogenadas. Probablemente, de los principios que integran los alimentos, el que más influencia tenga en la digestibilidad es el porcentaje de fibra bruta. En general, los coeficientes de digestibilidad de los diversos principios alimenticios, son inversamente proporcionales al contenido de fibra bruta del alimento en que se trate.

- - - - -

Con relación al arroz, el salvado tiene un valor nutritivo equivalente a una paja de buena calidad pero muchas veces es inferior por llevar una cantidad excesiva de cascari-lla. No debe darse más que a los rumiantes, en sustitución a una parte de la paja.

Los tres tipos de películas envolventes, dadas las necesidades de cada 100 kg. de arroz descascarillado se obtiene una media de 7 kg. de película. Tiene el aspecto de una harina amarillo grisácea grueso al tacto, de olor agradable cuando fresco y desagradable después de una larga conservación. La composición de éste salvado se indicó anteriormente. La película total es más digestible ya que contiene menos fibra cruda; la me

dia de digestibilidad se reporta en la literatura en 90 para las sustancias extractivas no grasas, 87 para las grasas y 70 para las proteínas. La riqueza en grasas procede del gérmen y la de las proteínas del gluten.

El empleo de subproductos del arroz como alimento para los animales queda restringido casi a regiones, en que éste grano se produce por dos razones: 1) limitada conservación; por su elevado contenido graso y su naturaleza harinosa que hace que se altere con facilidad, enranciándose y sufriendo todas las alteraciones propias de las harinas, enmohecimiento, parasitismo, etc., 2) por alteraciones que hacen los comerciantes para obtener mayores ganancias mezclándole con cascarilla.

La harina del gérmen es un excelente alimento, altamente digestivo, muy rico en proteínas y éstas de un gran valor biológico, es alimento óptimo para animales jóvenes, como hembras en gestación, para complementar en proteínas las raciones pobres, y en las vacas lecheras origina un apreciable aumento de la producción y ligero incremento en el contenido graso.

En las aves es de resultados dietéticos nutritivos y fisiológicos seguros. Suministrando un 15% de harina de gérmen sin desgrasar a un 10% de harina desgrasada y el 2% de aceite de gérmen en la mezcla seca durante el invierno, se asegura un porcentaje elevado de nacimientos y una acción favorable sobre la eclosión del huevo.

d) Procesos semejantes al desarrollado.

La hidrólisis de almidones por métodos microbiológicos, para la posterior utilización de éstos azúcares resultantes, ha sido tema de bastantes investigaciones, de las cuales se han tomado algunas condiciones para el desarrollo del presente trabajo, A continuación se presentan en forma muy resumida los principales procesos.

1) Proceso de amilo para producción de alcohol etílico

Este proceso consiste esencialmente en convertir el almidón a azúcares por medio de cepas microbianas seleccionadas. - El grano se remoja en agua para ablandarlo y facilitar su hidrólisis. Es mezclado después con dos veces su peso en agua y calentado a presión. Se acidula con 0,6 a 0,8 partes de su peso de HCl o  $H_2SO_4$  para facilitar su solubilidad. La masa estéril se enfría a  $40^{\circ}C$  e inoculada con un cultivo puro de *Mucor*, ya sea *M. rouxii* o *Rhizopus japonicus*, *R. tonkinensis* o *R. delemar*. Se aerea con una corriente de aire estéril por 24 horas, manteniendo la temperatura a  $38^{\circ}C$ . La masa se enfría a  $33^{\circ}C$  y se inocula con levaduras.

El uso de un proceso Amilo modificado para la sacarificación de harina de trigo fué descrito en 1946 por Erb y Hildebrandt. La sacarificación en su primer paso se lleva a cabo por acción de enzimas de un hongo. Para facilitar ésta hidrolisis se prepara una semilla o inóculo para las subsecuentes etapas en escala industrial.

Erb usó un cultivo de *Rhizopus delemar* o *R. boulard*, desarrollando el inóculo en matraces de 100 ml. con medio adecuado compuesto con 5% de harina, 0.2% de sulfato de amonio, y agua. Las esporas producidas por ésta semilla se suspenden en 3 lt. de agua e inoculada al medio estéril de la primera etapa de la producción teniendo malta, sulfato de amonio, sulfato de zinc, ácido fosfórico y agua. El medio se ha esterilizado por una hora a 121.1°C, se enfría a 32°C e inocula con la semilla preparada en el laboratorio, el pH de la masa debe ser de 3.8 a 4.2. El medio se aerea a una presión de 5 psig, en 20 horas el crecimiento es abundante. En la segunda etapa en la planta se utilizan recipientes con capacidad de 10 000 lt. el medio contiene aluminio, sulfato de zinc, sulfato de amonio y ácido sulfúrico, así como harina y malta. El pH es de 3.8 a 4.2, se inocula con el producto de la etapa anterior y se aerea a 5 psig, por 24 horas en caso de que existan sustancias que interfirieran con los constituyentes del medio, especialmente al aluminio, y que inhibían el crecimiento, se pueden eliminar con tratamiento con carbón, la masa que sirve de semilla se bombea a los fermentadores y se añade un 4% de inóculo de levadura, en base a la carga total, la cantidad de semilla de hongo y de levadura llenan aproximadamente un 30% del volumen total del fermentador. La mezcla se aerea por 3 a 4 horas, después el tanque se llena a su capacidad de trabajo adicionando el medio adecuado. La sacarificación y fermentación se completan en 40 horas, cuando el volumen del inóculo representa el 12% del volumen de la masa final, y en 55 horas si es el 6%.

La fermentación a que se refiere el proceso Amilo es de al-

cohol etílico, dado que utilizan las cepas microbianas necesarias para éste fin, el rendimiento del proceso es de un 85% aproximadamente.

ii) Uso de amilasa fungal.

La cantidad de amilasa necesaria para la sacarificación de granos, es considerablemente menor que la cantidad de malta necesaria para sacarificar la misma cantidad de granos. Si se usa malta se requerirá de 9 a 10% del peso total, en tanto que se requiere de 2.5 a 4% de amilasa. En la planta se operan dos unidades, ambas con una capacidad de 1 Ton/día. El crecimiento de la cepa se hace en el medio preparado por medio de aereación forzada. La cepa adecuada se incuba en el medio por espacio de 24 horas, en éste momento se inoculan bacterias productoras de ácido láctico, para aumentar la acidez. La masa se esteriliza por medio de vapor y se enfría a 38°C, se inocula entonces la semilla de levadura. Al haber sido tratado el grano por amilasa, que como posteriormente se indicará desdobra los almidones, los azúcares resultantes son fácilmente aprovechados por las levaduras. Cuando el crecimiento de levadura es abundante, se inoculan los fermentadores.

Los tubos para levadura se esterilizan una hora a 121°C, se enfría luego a 38°C y se inoculan con el cultivo de bacterias lácticas, se esteriliza nuevamente, enfría e inocula con levaduras. Después de una incubación de 14 horas, el crecimiento es abundante y la densidad de la masa ha disminuido notablemente. El cultivo se enfría a 33°C sosteniendo esa temperatura se lleva a los fermentadores.

Se requiere un periodo de 2 horas para llenar cada fermentador de 450000 lt. y la levadura se empieza a adicionar cuando se tienen 30 minutos de llenado. Durante la fermentación, la temperatura se controla a un máximo de 35°C por medio de serpentina.

#### iii) Proceso Balls-Tucker

Este proceso se desarrolló en 1943 para reducir costos en la sacarificación de trigo con fines de fermentaciones alcohólicas, utilizando las enzimas del trigo mismo, y disminuir la cantidad de malta necesaria. El trigo contiene suficiente cantidad de  $\beta$ -amilasa, pero es deficiente en  $\alpha$ -amilasa, por eso es necesario compensar de alguna forma esta deficiencia. El trigo molido se acidula a un pH de 5.2 a 5.8 y se añade 0.1% de sulfato de sodio para activar la forma inactiva de amilasa y floccular el gluten de trigo, se agita vigorosamente y después se deja reposar. El almidón se libera y una considerable porción del gluten forma una capa superficial, en la cual se encuentra la  $\beta$ -amilasa y la  $\alpha$ -amilasa ya activada, las cuales se separan para ser utilizadas posteriormente en la masa ya preparada.

#### iv) Hidrolisis del arroz por métodos microbiológicos.

(Proceso desarrollado por L. Murcia F. y E. Zetuna C.) Se refiere esencialmente a la hidrólisis de harinas de arroz por amilasa producida por *Aspergillus oryzae*, y posterior inoculación de *Saccharomyces carbagali*. Los tiempos de crecimiento se enumeran y discuten en dicha tesis profesional (43).

### e) Proceso Bioquímico

El aspecto bioquímico de la obtención de materias alimenticias a partir de almidones, incluye una serie de transformaciones. Este hecho nos obliga a dividir el problema en varias etapas. Juntamente con el tratamiento bioquímico está el tratamiento microbiológico y de Ingeniería, pero estos últimos se basan en el aspecto bioquímico. En forma general se puede decir que el proceso bioquímico se divide en tres etapas:

- i) Hidrolisis de los almidones contenidos en el endospermo del grano de arroz.
- ii) Aprovechamiento por las levaduras de los azúcares resultantes de la hidrolisis.
- iii) Obtención de productos de fermentación, procedentes de los microorganismos usados.

#### i) Hidrolisis

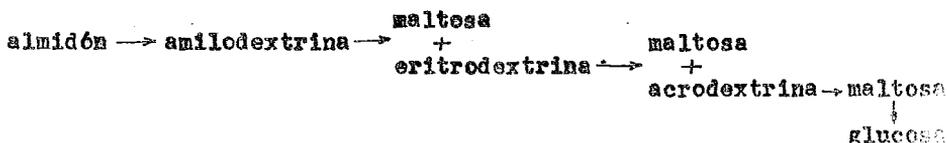
Hidrolisis en sentido general es la degradación de una molécula compleja a moléculas más sencillas con la intervención de agua para estabilizar las fracciones resultantes. La hidrolisis es el primer paso para posteriores fermentaciones. En el endospermo del grano de arroz hay un alto porcentaje de almidones, que son degradados por medio de enzimas.

Los almidones pertenecen al grupo de Polisacáridos, estos en general se caracterizan por formar soles coloidales más bien que verdaderas soluciones. El peso molecular es alto, llegando a pesar en ocasiones lo que una proteína.

Muchos polisacáridos son fuertemente hidrofílicos, existen

varios tipos de estos: Mucilagos, Celulosas, Polímeros de glucosamina y el que nos ocupa, Almidones o Hexosanas. El nombre de hexosanas deriva de que al hidrolizarse producen hexosas. La principal hexosana es el Almidón. Forma las reservas de material alimenticio de la mayoría de las plantas y es fuente de energía de los embriones de grano. El almidón existe en las células en forma de gránulos, teniendo estrias características. Estas estrias y el tamaño y forma de los gránulos son característicos de la planta de la cual proceden.

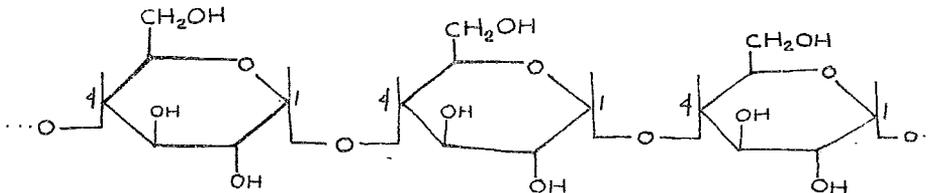
La amilasa o diastasa hidrolizan el almidón a dextrinas estas a maltosa, la cual es producto final de la acción diastática. Los ácidos y la maltasa continúan la hidrólisis hasta glucosa. La secuencia de degradación es la siguiente:



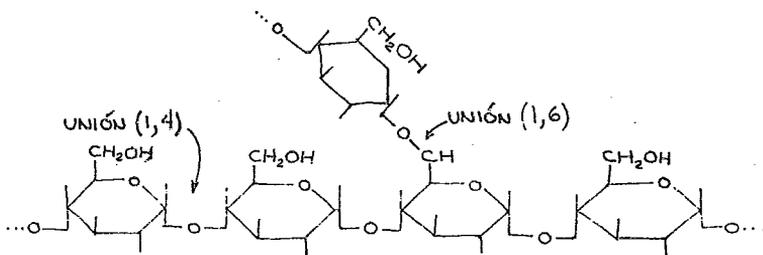
Las amilodextrinas, eritrodextrinas y acrodextrinas se diferencian por el color que da su reacción con yodo, esto es, azul, púrpura y café rojizo, respectivamente.

Se ha propuesto que estos cambios de color se deban al cambio de tamaño de partícula, más que a la formación de diferentes compuestos. La diastasa solamente peptiza los gránulos de almidón, de donde la serie de colores que se obtienen al reaccionar con yodo dependen del grado de dispersión, siendo únicamente un fenómeno coloidal de la misma forma que en los soles de

oro se observan diferentes coloraciones, de acuerdo con el tamaño de partícula; la estructura del almidón es una secuencia regular de unidades de  $\alpha$ -glucopiranosas con uniones glucosídicas 1-4.



En estas cadenas los residuos de glucopiranosas ocupan posiciones terminales que pueden tener 4 grupos OH libres, mientras que las que no están en posiciones terminales tienen únicamente 3. Experimentalmente, con metilación exhaustiva del almidón, se llegó a la conclusión que la longitud de la cadena de almidón es de 24 a 30 unidades de glucosa, dando un peso molecular de 4 000. La estructura real del almidón es posiblemente formando ángulos, que producen anillos cerrados sobre sí mismos.

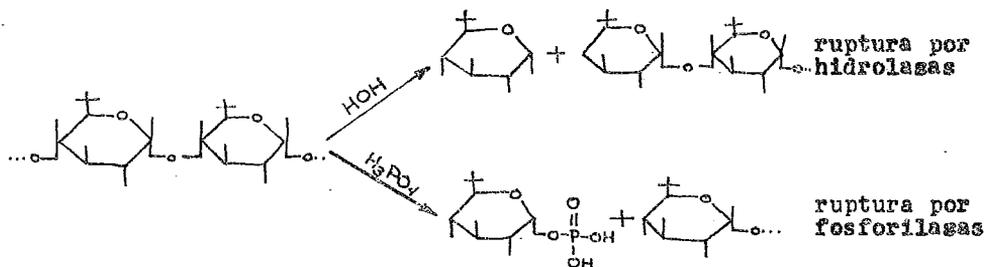
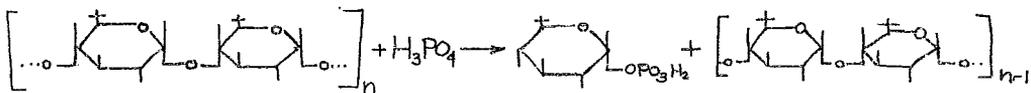


El almidón consta de dos tipos de polímeros,  $\beta$ -amilosa, que es fácilmente dispersable en agua para formar soles de ba-

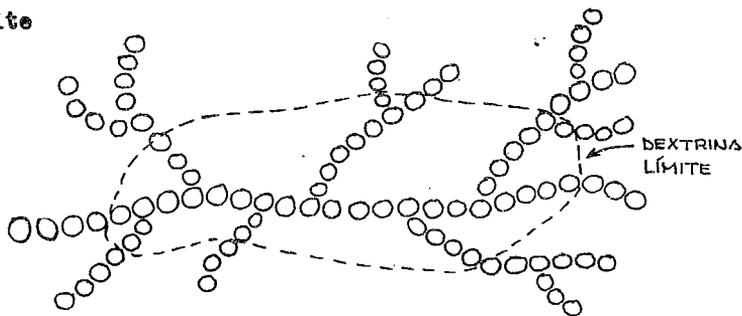
ja viscosidad, y  $\alpha$ -amilosa o amilopectina, no es fácilmente dispersable en agua, forma soles opalescentes de alta viscosidad, es prácticamente la fracción insoluble del almidón. Los almidones de diferentes fuentes orgánicas difieren ampliamente en contenido de  $\alpha$ -amilosa, el almidón de maíz contiene 11.5 a 15.6% de  $\alpha$ -amilosa, el de tapioca 16.3 a 17.5%, de trigo, 23 a 23.8%, de papa 1.7 a 1.9% y de arroz 15.9 a 17%.

La gelatinización del almidón por calentamiento con agua tiene un coeficiente de temperatura muy marcado. En general, no se observa ningún cambio abajo de 55°C, a ésta temperatura al observar en el microscopio, se encuentra que los gránulos han tomado un tamaño anormalmente grande y a medida que la temperatura aumenta, los gránulos crecen hasta llegar a un punto en el que estallan. Este punto se conoce como punto de gelatinización y es específico para cada fuente botánica del almidón. El almidón puede gelatinizarse en frío por medio de ciertas sales. El tiocianato de sodio, el de potasio así como el salicilato de sodio, son particularmente activas. Esta gelatinización no es igual a la efectuada con calor, dado que el volumen ocupado en un gel en "frío" es mayor que el ocupado por las partículas en un gel "caliente". El proceso se debe esencialmente a una isoterma de absorción.

La degradación del almidón es catalizada por amilasa, enzima ampliamente distribuida en la naturaleza, cataliza la ruptura fosforílica del enlace  $\alpha$ -1,4-glucosídico en la porción final no reductora de la cadena de almidón. La reacción reversible es la siguiente:



La amilasa cataliza la degradación completa de la cadena de amilosa no ramificada, a glucosa. Los polisacáridos ramificados como la amilopectina solo se destruyen en un 55% por que el enlace  $\alpha$ -1,6-glucosídico constituye una barrera sobre la cual la enzima es inactiva, el residuo se conoce como dextrina límite



Las dextrinas se distinguen del almidón por ser solubles en agua fría, y de los azúcares por ser solubles en alcohol, poseen dextrorrotación. Por tanto, del ataque del almidón por enzimas hidrolíticas, se obtiene maltosa y fracciones irregu-

lares denominadas dextrinas.

Existen también enzimas específicas para la ruptura de enlaces 1-4 y 1-6. El primero es atacado por  $\beta$ -amilasa, y la segunda por  $\alpha$ -amilasa. La carencia en un proceso dado de alguna de estas enzimas, ocasiona fenómenos de aglutinamiento, falta de solubilidad, o por otro lado, que el manejo del fluido se salga de las condiciones previstas por variaciones en las propiedades del mismo.

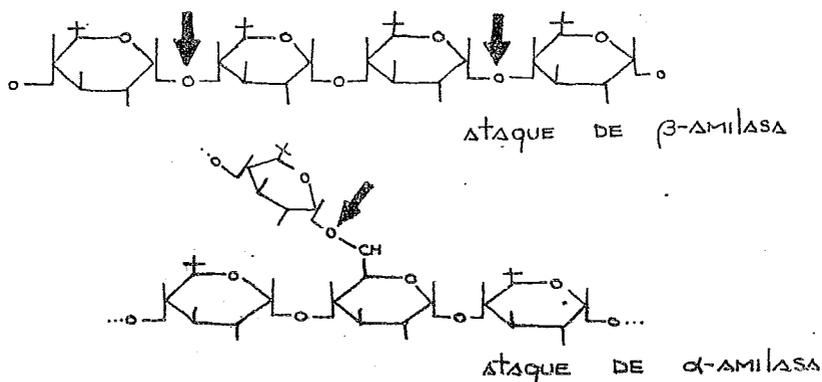
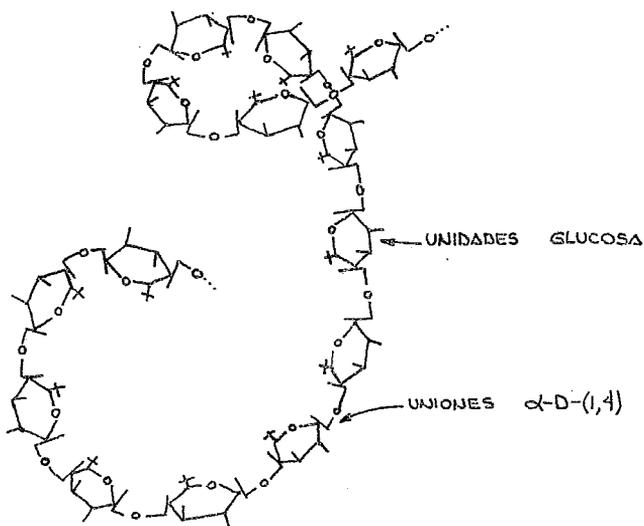


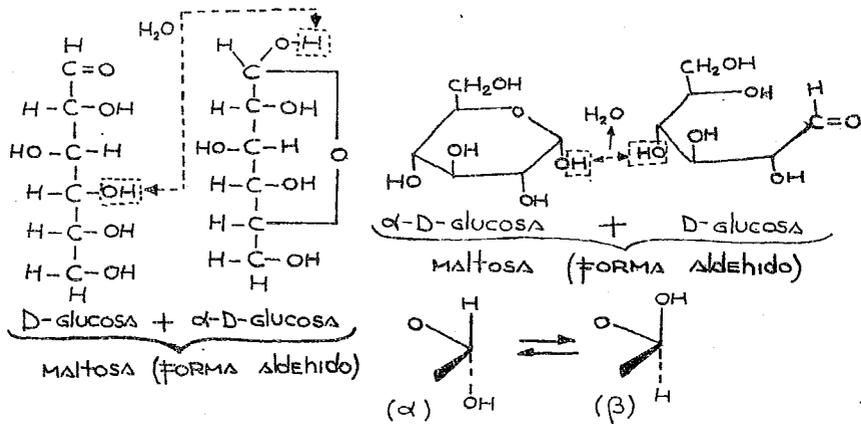
Tabla 13. Comparación de amilosa y amilopectina.

	amilosa	amilopectina
subunidad	glucosa	glucosa
unión glucosídica	$\alpha$ -(1,4)	$\alpha$ -(1,4) ; $\alpha$ -(1,6)
ramificación	no	aprox. 4%
peso molecular	4000-400 000	50 000-1 000 000
reacción con yodo	color azul-negro	color violeta-rojo

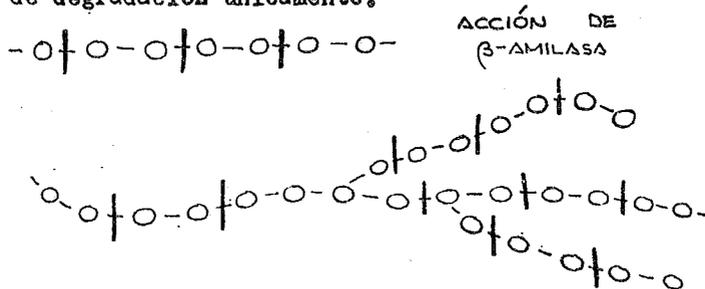


### CONFORMACION DE LA CADENA DE AMILOSA

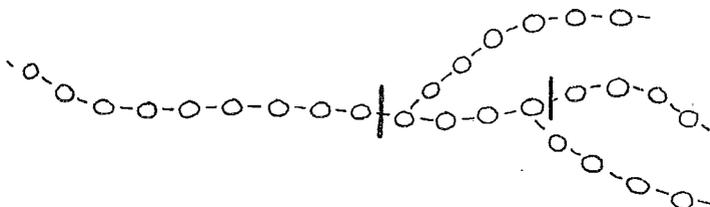
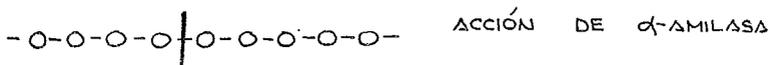
La maltosa (4- $\alpha$ -glucopiranosido glucosa) junto con dextrinas, es obtenida por la descomposición del almidón existente en los granos en germinación, los cuales tienen un alto contenido de amilasas. La malta que se prepara con granos en germinación es una fuente excelente de maltosa. Los almidones se descomponen también en maltosa por medio de amilasa, producida por microorganismos para después ser aprovechada. La hidrólisis parcial del almidón con ácidos minerales libera dextrinas, maltosa y glucosa. Se puede considerar que la maltosa se forma por la separación de los elementos del agua, del grupo hidróxido glucosídico de  $\alpha$ -D-glucosa y del grupo hidróxido alcoholico, en el carbono 4 de la D-glucosa.



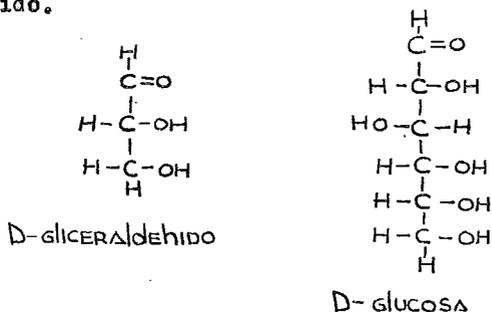
Puede verse que la maltosa existe en forma de aldehído y en forma cíclica  $\alpha$  y  $\beta$ . Presenta mutarrotación, la maltosa es por tanto un oligosacárido formado de una molécula de glucosa unida por un grupo hidróxido de C-4 de una segunda molécula de glucosa. Se dice entonces que éste azúcar tiene una unión  $\alpha$ -1,4-glucosídica. La maltosa es un azúcar reductor ya que tiene un grupo aldehídico potencialmente libre. Este disacárido no se encuentra en la naturaleza; se obtiene como producto de degradación únicamente.



Como oligosacárido se puede hidrolizar la maltosa a monosacárido, glucosa, catalizado por la enzima maltasa, también puede producirse una determinada cantidad de glucosa por la acción de  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasa

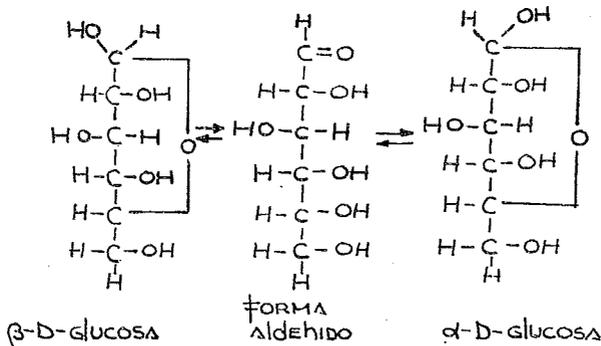


La glucosa, último paso en la hidrólisis del almidón, es junto con la manosa, galactosa y fructosa, las hexosas más comunes, con respecto a su isomerismo, es una D-azúcar, debido a que tiene la misma configuración de D-gliceraldehído en su último átomo de carbono, obviamente la L-glucosa deriva del L-gliceraldehído.



La glucosa no reacciona con el reactivo de Schiff para aldehídos; sólida es bastante inerte al oxígeno. Existen dos formas cristalinas de D-glucosa, por cristalización de agua se obtiene la  $\alpha$ -D-glucosa, por cristalización de ácido acético se obtiene la  $\beta$ -D-glucosa. Presentan mutarrotación, son anómeros pues difieren únicamente en la configuración del último átomo de carbono hemiacetal, transformándose una en otra a través de

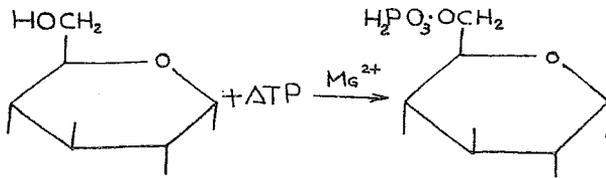
la estructura abierta. Ya que la forma cíclica tiene cinco átomos de carbono asimétricos, de acuerdo con la regla de Van't Hoff, hay 32 isómeros posibles, con 16 pares de enantiómeros. Por el grupo aldehído, la glucosa es azúcar reductor, reduce iones metálicos, preferentemente plata y cobre en solución alcalina



#### ii) Consumo de azúcares por levaduras.

En la primera etapa de hidrólisis se lleva a cabo por la incidencia de la primera cepa, *Aspergillus oryzae*, que produce las enzimas necesarias para degradar el almidón y producir azúcares reductores necesarios para ser aprovechados por el mismo hongo y por las cepas siguientes, y metabolizarse para obtener sustancias. La segunda etapa es, por tanto, el aprovechamiento de los azúcares resultantes, por los microorganismos. El problema inicial es transformar la glucosa en un compuesto metabolizable. La fosforilación preliminar se realiza a expensas de los enlaces ATP, ricos en energía.

Meyerhorff (1927) descubrió en la levadura la enzima hexoquinasa que cataliza ésta reacción, se cristalizó ésta enzima de las levaduras, con peso molecular de 96 000. Las velocidades



FOSFORILACIÓN DE GLUCOSA

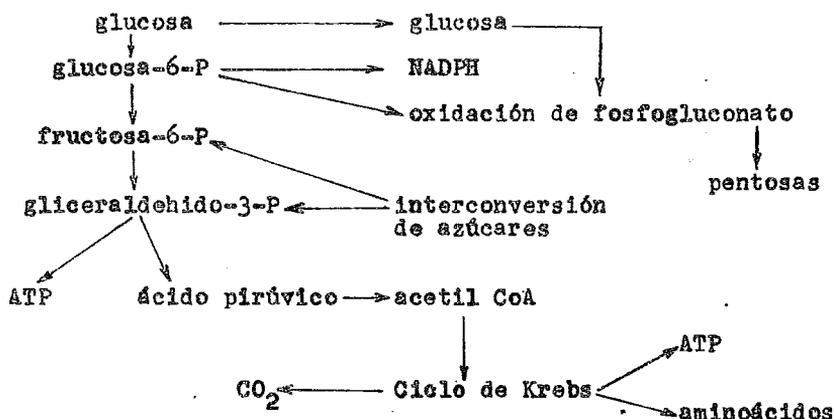
des relativas de la reacción dependen de la concentración de los azúcares en la mezcla de incubación. Un gran número de productos intermedios se producen en el proceso principal de oxidación de la glucosa a dióxido de carbono y agua, y en el proceso alternativo, fermentación alcohólica. Muchos de éstos productos intermedios se pueden emplear como componentes para la formación de gran variedad de compuestos orgánicos que se encuentran en el microorganismo. Algunos de los pasos en los dos tipos de proceso producen energía e indudablemente suministran mediante transferencia la energía que se necesita para la síntesis de nuevos compuestos. Todos los compuestos de carbono en el microorganismo pueden sintetizarse comenzando con glucosa, fructosa o sacarpsa.

Microorganismos como *Neurospora crassa* pueden crecer en seluciones que solo tengan iones inorgánicos, en cambio otras como *Leuconostoc mesenteroides*, es necesario que contengan en las soluciones nutritivas 18 aminoácidos para poder crecer.

Es de suponerse que el *Aspergillus oryzae* haya consumido la pequeña cantidad de aminoácidos disponibles en el medio y después haya producido los que la cepa misma necesita. Con respecto a

Saccharomyces carabajali, la segunda copa, no necesitó adición de nutrientes por tanto, también ésta produjo las materias que necesitó para crecer.

Diagrama de flujo del metabolismo del Carbono  
(Ciclo de Embden-Meyerhorf)



iii) Obtención de factores desconocidos del crecimiento.

Como el nombre lo indica, los factores desconocidos del crecimiento son compuestos cuya composición no ha sido especificada, pero cuyos efectos se conocen al observar el mejor crecimiento de animales a los cuales se les han añadido en la dieta.

Estos factores pueden quedar en solución en las aguas madres de aquí que también se les llame, solubles de fermentación o recuperados por concentración de estas aguas, al ser secado el producto.

Los factores desconocidos del crecimiento son productos

del metabolismo de los microorganismos.



Estructuralmente, se puede considerar que el hongo está formado principalmente por micelio y esporas. El micelio es una agregación de hifas que son fracciones filamentosas de protoplasma. Hay hifas de dos tipos: fértiles que están relacionadas con la producción de células reproductoras, y vegetativas cuya función es asegurar sustancias nutrientes, obteniéndolas del sustrato. Las hifas pueden ser septadas o no septadas. Las septadas tienen paredes que dividen a la hifa en células, las no septadas no las contienen, pero son multinucleadas. Los hongos aumentan de tamaño por extensión de las células o por división de las mismas en alguna parte de la hifa. Las células jóvenes del hongo están llenas de citoplasma denso, las adultas contienen además vacuolas y materias alimenticio de reserva, como globulos de grasa y glucógeno. Algunos investigadores proponen que la pared celular está compuesta en parte de quitina.

Las esporas pueden ser asexuales o sexuales. Las primeras pueden ser formadas en una cápsula cerrada o saco llamado esporangio, o pueden proceder de una hifa especial llamada conidia, en éste caso las esporas se llaman conidiosporas. Las segundas pueden proceder de varias fuentes: por clamidiosporas generalmente derivan de una célula vegetativa; ascosporas, esporas sexuales producidas por saco o asca, características de los Ascomycetes; zigosporas, esporas formadas como resultado de la conjugación de dos hifas terminales procedentes de diferentes colonias, representantes de la misma especie, por tanto son esporas producidas sexualmente. Desde el punto de vista de Microbiología Industrial, el término "hongo" se da a Saprofitas que crecen en materia orgánica, o soluciones, con la formación de masas

de micelio. Los micelios perforan cierta distancia de sustrato, especialmente cuando crecen en tejidos celulares o masas de materia amorfa.

Los hongos se caracterizan por su habilidad para elaborar una gran variedad de enzimas, ésta capacidad fisiológica se debe a su habilidad para sintetizar materiales necesarios para su crecimiento a partir de cantidades muy pequeñas de materia orgánica. Son esenciales ciertas materias para el crecimiento de los hongos, tales como Nitrógeno, Hidrógeno, Oxígeno, Azufre, Potasio, Fósforo, Magnesio y otros productos. En general, los hongos utilizan compuestos conteniendo Nitrógeno. Estos difieren en valor relativo, algunos estimulando el crecimiento, dando sustancias nutritivas y otros por su producción de cantidades adecuadas de producto final. El tipo de compuesto seleccionado es muy importante en la fermentación en la cual no solo interesa el rendimiento, sino también la pureza del producto terminado. Lo más usual son sales de amonio, nitratos, proteínas, peptonas, aminoácidos y urea.

La energía esencialmente procede de compuestos conteniendo carbono. En la degradación completa de un carbohidrato, se libera gran cantidad de energía. Muchos compuestos de carbono han sido examinados como fuentes energéticas para los hongos. El *Aspergillus oryzae* utiliza 51 compuestos, principalmente alcoholes y ácidos para su respiración.

Los hongos crecen satisfactoriamente en medios conteniendo almidón o azúcar, fuentes utilizables de nitrógeno y sales necesarias. El medio ácido es muy favorable.

Los medios pueden ser naturales o sintéticos. Naturales son

los tejidos o jugos de plantas o animales en su estado natural. Sin embargo es preferible para el estudio de una cepa, que existan medios que se puedan duplicar en cualquier momento y lugar. Estos medios sintéticos son preparados con azúcares puros, y con ciertos compuestos orgánicos o inorgánicos también puros.

Industrialmente los géneros más importantes son: *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* y *Penicillium*. El género *Aspergillus* se caracteriza por tener una hifa septada ramificada que puede ser incolora o tener colores brillantes.

El micelio es por lo general parcialmente sumergido en el sustrato y parcialmente aéreo. Las células en la base son alargadas, con pared celular delgada, las células de la base están sumergidas. La conidia se eleva perpendicularmente al eje mayor. Sus paredes son rugosas, puede ser o no septada. En el extremo, la conidia se alarga para producir una vesícula; ésta soporta la esterigma, es hemisférica, elíptica o de otra forma, la esterigma produce conidiosporas u otra esterigma, cuando hay dos series de esterigmas presentes, la primera, adyacente a la vesícula se designa como esterigma primaria, la siguiente esterigma, secundaria, en éste caso la conidia es producida por la esterigma secundaria.

La conidiospora es producida por una elongación y división celular de la esterigma. Otras conidias son producidas por la misma esterigma en forma semejante, con el resultado de que se produce una cadena no ramificada de conidias, en la cual la más lejana es la de más edad. Las conidias varían en tamaño, color y forma entre las diferentes especies

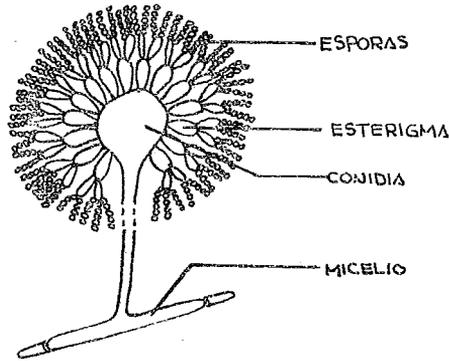
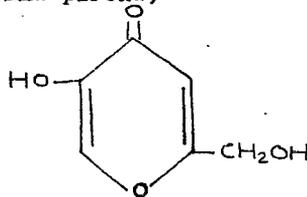


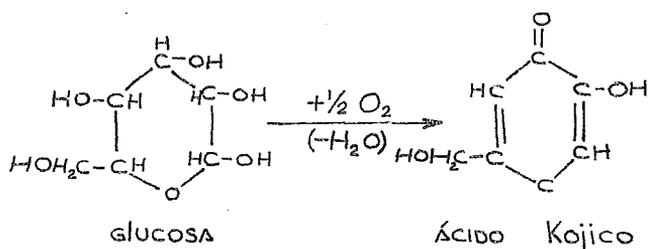
DIAGRAMA ESQUEMATICO DE *A. ORYZAE*

Entre las especies con mayor importancia se encuentran las del grupo *A. flavus-oryzae*, especialmente el *A. oryzae* es de gran importancia en oriente. En Japón el *A. oryzae* se utiliza para sa carificar almidones del arroz, en la manufactura de sake y otras bebidas alcohólicas, en la manufactura de shoyu o salsa de soya, en la manufactura de miso, un producto de frijos soya usado como alimento, en la preparación de nizaume, un jarabe a partir del arroz. El *A. oryzae* se usa también en la preparación de mezclas de enzimas conocidas como takadiastasa, polizimasa, digestina, oryzima y kashiwagidiastasa. Produce una sustancia llamada aspergilina con propiedades proteolíticas, fibrinolíticas y anticoagulantes. Por último, quizás uno de los más importantes productos del *Aspergillus oryzae* es el ácido kojico (2-hidroximetil-5-hidroxi- $\gamma$ -pirona)



Fórmula estructural del ácido kojico

El ácido kojico fué aislado por Saito (1907) en la fermentación del arroz por *A. oryzae*; es usado como reactivo analítico particularmente como el hierro, se usa también como insecticida y antibiótico, como intermediario en la formación de quelatos metálicos, etc. Según Yabuta se forma por oxidación y deshidratación de la glucosa.



Aunque otros autores sostienen diferentes caminos para su formación. Takata (1929) encontró que el *A. oryzae* tiene un contenido proteico de 38% y vitaminas del grupo B. Todos los aminoácidos esenciales están presentes. El contenido de lípidos en el micelio está entre 1-15% y en esporas, es de 14%. La naturaleza del azúcar y del nitrógeno en el medio tienen marcado efecto en la producción de lípidos, la cual se favorece por altas concentraciones de glucosa y bajas concentraciones de nitrato de amonio. La actividad enzimática es muy importante. Underkofler et al. (1946) usando *A. oryzae* lograron magníficos efectos en el rendimiento en la sacarificación de almidones. LeMense (1947) encontró altas actividades de maltasa y  $\alpha$ -amilasa.

ii) *Saccharomyces caribajali*.

Las levaduras pertenecen a la subdivisión de Talofitas designadas como Eumycetes u Hongos Verdaderos. Las levaduras se agrupan en las familias Saccharomycetaceae, Sporobolomycetaceae y Cryptococcaceae. Representan a un grupo de microorganismos intermedios entre las bacterias y los hongos superiores con respecto al tamaño de las células. Este grupo se caracteriza por una forma de reproducción vegetativa conocida como gemación. Se distribuyen ampliamente en la naturaleza, no solo en las capas superficiales del suelo, sino también en muchas formas de materia orgánica, especialmente plantas en donde abundan los carbohidratos.

Las células de las levaduras son generalmente esféricas, ovoides o elipsoidales. La forma de una célula activa no es un medio exacto para la identificación de una especie. Las levaduras no poseen flagelo y por tanto las células individuales no son motrices.

Tabla 14. Tamaño aproximado en micras de células del género y familia indicados (tres días a 25°C en agar).

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(3-10) $\mu$ - (4.5-15) $\mu$
<i>S. carlsbergensis</i>	(3.5-8) $\mu$ - (5-15.5) $\mu$
<i>S. mellis</i>	(2.5-5.3) $\mu$ - (2.5-7) $\mu$
<i>S. ludwigii</i>	(4-8.5) $\mu$ - (9-36) $\mu$

La pared celular de las levaduras cubre y protege el citoplasma y el material nuclear. Es permeable a algunas sustancias

La esporulación en las levaduras es muy importante por varias razones. Es la base de un método de reproducción, lleva a cabo una función importante en la producción de nuevos híbridos y sirve para mantener la especie en los cambios adversos en el medio. El núcleo de las células de levadura está relacionado directamente con la herencia. Cada núcleo contiene uno o dos conjuntos de cromosomas, cada cual contiene genes que determinan. Una célula reproductiva se conoce como gameto en las formas inferiores de vida, la diferencia entre las células se refiere como más y menos. Cada gamete lleva un conjunto de cromosomas en su núcleo, el número básico de cromosomas para una especie puede ser de dos tipos haploide, y éste se designa como  $1n$ . Cuando es doble el número de cromosomas, tales como se encuentra en un cigote resultante de la fusión de dos gametos, se conoce como número diploide y se designa como  $2n$ . -- Cuando dos gametos del mismo sexo se fusionan resulta un diploide, que se conoce como diploide ilegítimo. Entonces, la unión de dos gametos más o menos dan un diploide ilegítimo, si son de signo opuesto es un diploide legítimo. Lindgren (1945) clasifica las levaduras en dos grupos de acuerdo a su comportamiento sexual. En el primer grupo las células son haploides, siguiendo fusión nuclear, existe una etapa diploide por un tiempo corto pero es seguida de una meiosis. En el segundo grupo, en el que se encuentran los Saccaromyces, las células vegetativas son diploides y las ascosporas son haploides. La meiosis ocurre durante la esporulación.

Las levaduras contienen 68 a 83% de humedad. Las células se componen de compuestos de nitrógeno, carbohidratos, lípidos

vitaminas, minerales y otras sustancias. El contenido de nitrógeno en una levadura varía de 7 a 9%, pero puede ser inferior a 2.5 y superior a 14%. Un gran porcentaje del total de nitrógeno (64 a 73%) se encuentra como proteínas puras, el 10% como bases púricas, el 5% como pirimidinas, aproximadamente el 15% de nitrógeno está como aminoácidos, nucleótidos y otros productos.

La composición aproximada de aminoácidos en levaduras del género *Saccaromyces* es la siguiente:

Alanina	-
Arginina	2.4
Cistina	-
Acido glutámico	-
Histidina	2.7
Isoleucina	2.5
Leucina	3.8
Lisina	3.1
Metionina	0.65
Fenilalanina	2.1
Serina	-
Treonina	2.4
Triptofano	0.59
Tirosina	-
Valina	2.8

Estas cantidades son porcentaje en materia seca

Los lípidos en las levaduras consisten en glicéridos, ácidos, grasos fosfolípidos y esteroides. Las levaduras son excelentes

tes fuentes de vitamina B en la alimentación.

La clasificación de las levaduras ha presentado siempre - problemas por la gran cantidad de individuos que contiene ésta subdivisión. Lodder describe las subdivisiones de la familia - Saccaromycetaceae de la siguiente forma:

1. Subfamilia Eramascoideae
2. Subfamilia Endomycetoideae
3. Subfamilia SACCHAROMYCETOIDEAE

Tribu Endomycopseae

Género Endomycopsis

Tribu SACCHAROMYCETEAE (no tienen micelio) reproducción por gemación multilateral; desasimilación por medio de procesos fermentativos)

Género 1. SACCHAROMYCES (pseudomicelio y/o células reproducidas por gemación, en formas variables de - redondas a elongadas; la conjugación puede o no preceder inmediatamente a la formación de la asca; esporas generalmente ovales o redondas, de 1 a 4 por asca; las esporas se pueden conjugar; no se asimila el ion nitrato).

Género 2. Pichia

Género 3. Hansenula

Género 4. Schwanniomycetes

Género 5. Debaryomyces

Tribu Nadsoniense

Género 7. Saccharomycodes

Género 8. Hanseniospora

Género 9. Nadsonia

4. Subfamilia Nematosporoidae

Género 1. Monosporella

Género 2. Nematospora

Género 3. Coccidiascus

5. Subfamilia Lipomycetoideae

Género 1. Lipomyces.

La temperatura de crecimiento óptima para las levaduras es de 25 a 28°C. Los requerimientos vitales varían de una especie a otra y se usan para clasificar a las levaduras, los factores de crecimiento se numeran como sigue: 1) Inositol, 2) - Pantotenato de calcio, 3) Biotina, 4) Tiamina, 5) Piridoxina, 6) Acido nicotínico. El requerimiento se pone inmediatamente después del nombre de la especie de la levadura. Por ejemplo, *S. cerevisiae* 23, indica que requiere pantotenato de calcio y biotina para su crecimiento satisfactorio.

Tabla 15. Características de algunas especies de la familia Saccharomycetaceae.

*S. cerevisiae* *S. carlsbergensis* *S. mellis* *S. ludwigii*

Fermentación.

glucosa	débil	+	+	+
galactosa	+	+	-	-
maltosa	débil	+	-	-
lactosa	+	+	-	-
rafinosa	débil	-	-	+

Asimilación.

glucosa	+	+	+	+
---------	---	---	---	---

galactosa	+	+	+	-
suerosa	+	+	-	+
maltosa	+	+	-	-
lactosa	+	-	-	-

El rango de pH óptimo para crecimiento varía de 4 a 5, aunque a veces puede llegar a 3 o a 6. Las levaduras necesitan oxígeno para su crecimiento, por lo que la aereación adecuada es una parte muy importante. El aire se introduce cerca del fondo del tanque de fermentación y debe ser repartido homogéneamente mediante agitación u otro medio similar.

La función del oxígeno no es muy conocida pero en acción se debe esencialmente a un aumento de la respiración, agitación del medio, eliminación de materia tóxica y aumento en el crecimiento vegetativo de la levadura.

Las llamadas levaduras para la alimentación o levaduras nutritivas se propagan esencialmente para prósitos alimenticios principalmente como alimento para ganado. Son una magnífica fuente de vitaminas del complejo B, en estado sólido contienen un 50% de proteínas, como complemento alimenticio pueden proporcionar una dieta satisfactoria, en lugares donde las proteínas animales o vitaminas de complejo B escasean.

Las levaduras pueden utilizar peptonas o hexonas, son menos exactas en sus requerimientos de nitrógeno, pudiendo usar urea y nitratos. En general, no es necesario añadir factores promotores del crecimiento. Se usa actualmente como suplemento alimenticio del ganado, a muy bajo costo (\$3.00 el kg.) utilizándose 100kg. de levadura seca/ton. de alimento. Se pudieron cultivar levaduras del género *Saccharomyces* en almidón de papa

sin añadir nutrientes; 50% de los sólidos se recuperaron como levadura, el costo del producto fué de \$1.20 kg.

La presencia de purinas en las levaduras puede causar exceso de ácido úrico en la sangre, la cantidad de purina en - - 15-20 g. de levadura puede ser suficiente para dar la máxima - concentración de ácido úrico en la sangre. Según Leudin, 25g. de levadura dan 10  $\mu$ g. de lípidos, 6  $\mu$ g. de proteína, 200  $\mu$ g de tiamina, 500  $\mu$ g. de riboflavina y 3000  $\mu$ g. de ácido nicotí nico, así como cantidades apreciables de vitaminas A y B y ergos terol que representan el 20% de los requerimientos diarios. La producción de lípidos se favorece por condiciones fuertemente aerobias.

iii) *Streptomyces rimosus* y *Streptomyces venezuelae*.

Las verdaderas bacterias son totalmente diferentes de los hongos filamentosos y muchas características morfológicas los dividen en dos tipos separados. Hay sin embargo un grupo transicional entre las bacterias y los verdaderos hongos, éste es el grupo de los Actinomyces que incluyen características de ambos grupos.

El término Actinomyces no es válido taxonómicamente, dado que están clasificados como bacterias en el sentido estricto. Son Schizomyces del orden Actinomycetales, pero no todos los Actinomycetales se consideran Actinomyces. Los Actinomycetales son organismos unicelulares, con micelio delgado y ramificado que puede fragmentarse y subdividirse para formar esporas asexuales. En algunos géneros el micelio es aéreo. La hifa a-

parece morfológicamente similar a la de los hongos filamentosos, pero es mucho menos ancha, de 0.5 a 1.2  $\mu$  de diámetro, una dimensión similar a la de las bacterias. Para su proliferación por medios vegetativos, algunos Actinomycetes producen conidia, pero no se les conoce ninguna etapa de esporulación sexual.

A pesar de estar clasificados entre las bacterias, su semejanza con los hongos en particular con los Hongos Imperfectos es principalmente en cuatro propiedades: a) el micelio de los Actinomycetes superiores tiene ramificaciones típicas de los hongos; b) como los hongos, muchos Actinomycetes forman micelio aéreo, - así como conidia; c) el crecimiento de los Actinomycetes en medio líquido, rara vez resulta una suspensión turbia, asociada con las bacterias unicelulares, sino que ocurre en agregados; d) la velocidad de crecimiento no es exponencial, como en el caso de las bacterias, sino cúbica, característica de los hongos.

Por otro lado, la morfología, tamaño de la hifa, conidia y segmentación del micelio son muy semejantes a las encontradas en las bacterias. Algunos Actinomycetes que producen micelio no aéreo son muy semejantes a Mycobacterium y bacterias corineformes. Otro punto en común por las bacterias, es que pueden ser atacados por virus, cosa que no ocurre en los hongos.

Las colonias se pueden reconocer fácilmente en placas de agar, mientras que las colonias de bacterias consisten en abundante población, derivada de una sola célula por fisión binaria, las de los Actinomycetes derivan de una sola unidad propagadora. Las colonias de algunos géneros desarrollados en una superficie de agar, forman una película gruesa y firme que se adhiere fuertemente al sustrato, en algunos géneros la superficie aparece como polvillo

y a menudo pigmentada por las esporas aéreas producidas por otras colonias con micelio simple, la colonia es menos consistente.

Las principales influencias ecológicas para los Actinomycetes son la cantidad de materia orgánica, pH, humedad y temperatura. Los Actinomycetes son afectados directamente por la presencia de carbono metabolizable, como grupo, no son tolerantes a pH bajos y la población es inversamente proporcional a la concentración de iones hidrógeno. Muchas cepas de Streptomycetes decaen notablemente a pH bajos (menos de 5.0). Los Actinomycetes en acideces altas por lo general tienen una cuenta total de 1% de la cuenta viable; el contenido de humedad es también de suma importancia para éste orden.

Si las condiciones son superiores a la capacidad de retención de agua, éstos microorganismos aparecen raramente. Esto es consecuencia del metabolismo aerobio de los Actinomycetes y la consecuente inhibición del paso de O<sub>2</sub> libre. Por otra parte, los Actinomycetes son influidos tan seriamente por condiciones de semi-sequía, como las bacterias, y el grupo filamentosos tiende a un mejor desarrollo en bajos niveles de humedad. Su temperatura óptima es entre 28 y 37°C.

Los Actinomycetes se clasifican dentro del orden de los Actinomycetales, una categoría de las bacterias que incluye a microorganismos que forman células elongadas con tendencia a ramificarse. Difieren de los hongos filamentosos en que la hifa es siempre delgada, con diámetro que solo en casos extremos excede de una micra. Otra diferencia de los hongos es que en los Actinomycetales

no existe quitina y celulosa en la pared celular, como existe en los hongos. El orden contiene cuatro familias y nueve géneros, solo los últimos siete se incluyen en el término no taxonómico de Actinomycetes.

1. Mycobacteriaceae. (Micelio rudimentario o ausencia de él, no produce esporas).
  - a) *Micobacterium*. (Gram positivas, aerobias, mesofilicas, no motiles y generalmente no ramificadas)
  - b) *Micrococcus*. (Gram positivas, aerobias, mesofilicas, se encuentran en cadenas cortas o agregados).
2. Actinomycetaceae. (Forman verdadero micelio, se producen esporas por fragmentación de la hifa, en los organismos jóvenes la hifa es continua, pero posteriormente se fragmenta en segmentos bacilares o cocoidales).
  - a) *Actinomyces*. (Aerobios o microaerobios; no forman conidia, típicamente parásitos; causan enfermedades - animales y humanas).
  - b) *Nocardia*. (Aerobios obligados, se encuentran en células y filamentos delgados. Raramente forman micelio aéreo, colonias similares a las verdaderas bacterias).
3. Streptomycetaceae. (Forman micelio verdadero, el micelio vegetativo no se fragmenta, se producen esporas, pero no en el esporangio).
  - a) *Streptomyces*. (Conidia formada en cadenas o hifa aérea, aerobias, muy abundantes en el suelo).
  - b) *Micromonospora*. (Conidia formada sola, en la terminal de elon

gaciones cortas, nunca en cadenas, aerobias, con una excepción, crecimiento nulo a 50-65°C).

c) *Thermoactinomyces*. (Similares a *Micromonospora*, excepto que si hay crecimiento a 50-65°C).

4. *Actinoplanaceae*. (Forman micelio verdadero, esporas producidas en esporangios).

a) *Actinoplanes*. (Esporangiosporas motiles, raramente tienen micelio aéreo).

b) *Streptosporangium*. (Esporangiosporas motiles, micelio aéreo muy común).

Los *Actinomyces*, *Actinoplanes* y *Streptosporangium* han sido aislados del suelo pero son muy raros. *Micobacterium* y *Micrococcus*, son considerados como bacterias. *Micromonospora* y *Thermoactinomyces* son abundantes, pero les excede *Nocardia* y *Streptomyces*. Por tanto los últimos dos predominan, aunque *Nocardia* es difícil de distinguir, por su semejanza con las bacterias. La clasificación de *Actinomyces* en especies distintas y separadas es difícil, debido a que muchos coinciden en características aunque estén en grupos separados. Esto ha producido controversia en la clasificación taxonómica, con algunas especies, particularmente *Nocardia* y *Streptomyces*. De ésta forma se tiene que los *Actinomyces* primitivos son muy semejantes a las bacterias, especialmente *Nocardia*, *Micobacterium* y *Corynebacterium* son muy difíciles de definir según sus características.

*Streptomyces* difiere de *Nocardia* en que el primero posee micelio que no se divide en segmentos, pero da origen a una conidia.



Los Streptomyces forman un micelio bien desarrollado. Las esporas se forman por la división del esporangio, las divisiones progresan del extremo al origen del filamento. Las conidias totalmente formadas tienen forma oval o alargada, y recuerdan a las células de las verdaderas bacterias en tamaño y morfología.

En la hifa, el crecimiento es abundante en la zona apical, mientras que es menor en la zona restante. No se forma turbidez en un cultivo líquido estacionario, sino que las células crecen en la superficie en forma de hojuelas; en medio líquido aerado, el crecimiento de Streptomyces no es homogéneo y difuso, como en la mayoría de las bacterias, sino en forma de grumos como en los hongos. Las colonias en medio de agar son de gran consistencia, frecuentemente pigmentadas, pero no es rara la producción de pigmentos solubles en el agua, que se difunden en el medio. Un atributo característico de los Streptomyces es el olor que producen, semejante a tierra mojada.

Las colonias de Nocardia y las de las verdaderas bacterias son muy semejantes. Dada ésta similitud, muchas colonias de bacterias pueden contener Nocardia y pasar inadvertida, de tal forma que los llamados Actinomyces solo serán los Streptomyces presentes. Todas las especies de Streptomyces licúan la gelatina, la rapidez de licuefacción depende del organismo y del medio de cultivo. Muchos Actinomycetes producen enzimas diastáticas, algunos producen invertasa; unos pocos producen tirosinasa, que les permite convertir la tirosina de las proteínas en melaninas de color obscuro.

La habilidad de los Actinomycetes de producir algunos antibióticos ha sido considerada profundamente en los últimos años.

Se han obtenido cerca de 75 compuestos o preparaciones. Varían ampliamente en composición química, toxicidad a los animales o a las plantas, actividad in vivo y potencialidad quimoterapéutica. Algunos como la estreptomycina, clorafenicol, aureomicina, terramicina y neomicina han encontrado amplia aplicación en terapia humana y animal.

## **CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS**

a) Materiales en el Laboratorio  
Medios de cultivo  
Medios de semilla  
Medios de fermentación

b) Equipo  
Cristalería  
Fermentadores  
Centrífuga  
Secado en estufa  
Secado por aspersión

c) Métodos  
Conservación  
Semilla  
Fermentación  
Secado  
Molienda  
Control de azúcares reductores  
Control de aumento de micelio

## Materiales en el Laboratorio.

Los medios de conservación para cada cepa usada fueron: para *Aspergillus oryzae* que llevó a cabo la hidrólisis, se acondicionó por siembras sucesivas, al medio compuesto esencialmente de arroz quebrado (43). El medio usado para la conservación de éste hongo es un medio de Sabouraud modificado, que consiste en lo siguiente:

### A. Medio 1-C (para conservación de *A. oryzae*).

Neopeptona	1.0 g.
Fosfato Monopotásico	0.4
Sulfato de amonio	0.5
Extracto de levadura	0.4
Granillo de arroz	4.0
Dextrosa	4.0
Bacto agar	2.0

Agua destilada c.b.p. 100 ml.

pH = 5.6 a 6.5

Esterilizando en autoclave por 15 minutos a 15 lb/pulg<sup>2</sup>. Se procuró que la temperatura en el autoclave descienda lo más rápidamente posible, para evitar que la dextrosa se caramelize y de un color obscuro al medio.

Para *Saccharomyces carbajali*, la cepa que principalmente aprovechó los azúcares de la hidrólisis, se formuló un medio sin arroz. El medio para conservación de *S. carbajali* es el siguiente:

B. Medio 2-C (para conservación de *S. carbajali*).

Dextrosa	5.0 g.
Extracto de levadura	0.5
Fosfato monopotásico	0.2
Sulfato de amonio	0.5
Bacto agar	2.0

Agua destilada c.b.p. 100 ml.

pH = 5.6 a 6.5

Incubando por 24 horas a 30°C. Los dos medios anteriores dieron un pH aproximado de 5, por tanto, no es necesario añadir ácido para ajustar el pH.

Para *Streptomyces rimosus*, el medio de conservación fué exactamente igual al anterior, pero en una parte se neutralizó y en otra se dejó con el pH ácido original.

C. Medio 3-C (para conservación de *S. rimosus*).

Dextrosa	5.0 g.
Extracto de levadura	0.5
Fosfato monopotásico	0.2
Sulfato de amonio	0.5
Bacto agar	2.0

Agua destilada c.b.p. 100 ml.

pH = 7

Medio 3-Ca (conservación de *S. rimosus*)

idéntico al anterior, con pH ácido, o sea, medio 2-C.

Siendo los dos últimos medios muy semejantes, las manipulaciones se simplifican bastante.

Medios de cultivo para la propagación de semillas.

Estos son líquidos, por lo demás, de composición muy semejante a los de conservación.

D. Medio 1-S (semilla de *A. oryzae*)

Neopeptona	1.0 g.
Dextrosa	4.0
Fosfato Monopotásico	0.4
Sulfato de amonio	0.5
Extracto de levadura	0.4
Granillo de arroz	4.0
Agua destilada c.b.p.	100 ml.
pH = 5.6 a 6.5	

Medio 1-Sa (para *A. oryzae*, se usó para conocer el tiempo y porcentaje de hidrólisis del almidón, idéntico al medio 1-S, pero no contiene azúcar).

Neopeptona	1.0 g.
Fosfato Monopotásico	0.4
Sulfato de amonio	0.5
Extracto de levadura	0.4
Granillo de arroz	4.0
Agua destilada c.b.p.	100 ml.
pH = 5.6 a 6.5	

E. Medio 2-S (semilla de *S. carbagali*).

Dextrosa	5.0 g.
Extracto de levadura	0.5
Fosfato monopotásico	0.2

Sulfato de amonio 0.5 g.

Agua destilada c.b.p. 100 ml.

pH = 5.6 a 6.5

Cada matraz contenía 100 ml. de medio y se esterilizó por 15 minutos a 15 lb/pulg<sup>2</sup>.

Medios de cultivo para la fermentación final.

La semilla preparada en matraces se inoculó a fermentadores de 20 litros (capacidad total), usándose una capacidad de trabajo de 10 litros. El medio en el fermentador es el que sigue:

F. Medio 1-F (para fermentación)

Sulfato de amonio 0.5 g.

Fosfato Monopotásico 0.25

Agua de cocimiento de maíz 0.5

Nitrato de sodio 0.02

Sulfato de magnesio 0.05

Cloruro de Potasio 0.05

Sulfato férrico 0.001

Granillo de arroz (variable) Ver método Número 3.

Agua destilada c.b.p. 100 ml.

pH = 5.6 a 6.5

Nuevamente no es necesario usar ácido para ajustar el pH por que el producido en el medio es el adecuado; se esterilizó el medio colocado ya en el fermentador, durante una hora a 20 lb/pulg<sup>2</sup>. Todas las fórmulas de los medios fueron diseñadas después de estudiar diferentes medios de cultivo para estos microorganismos (Manual de Difco, Microbiologías, etc.) tomando valores promedio de

concentraciones de cada nutriente. Todos los medios se probaron después de esterilizarlos, incubándolos 24 horas a 30°C, antes de usarlos y viendo que no hubiese crecimiento de microorganismos - contaminantes.

#### Equipo

1. En el laboratorio se usó la cristalería ordinaria: tubos de ensayo, cajas Petri, Pipetas, etc.
2. Los cultivos para la propagación de semillas se hicieron en matraces erlenmeyer de 250 a 300 ml., con mamparas. Estos matraces, descritos por Solomons (15) reportan magníficos resultados. Las mamparas están en triángulo, elevándose una altura de 4 a 5 cm. de la base. Como tapón para el matraz se utilizaron en vez de torundas de algodón ordinarias, capas de gasa y algodón superpuestas; consisten en una capa de algodón sobrepuesta a una de gasa y sobre la cual hay otra de algodón. Debe procurarse que el hilo de una capa de gasa esté en sesgo con la anterior; lo mismo para las capas de algodón. Se sujeta el conjunto a la boca del matraz por medio de una liga o hilo grueso. Esta serie de sobreposiciones no debe pasar de un total de siete. Una vez sobrepuestos y antes de fijarlo al matraz, las capas se envuelven en papel y se esterilizan junto con todo el material. Se hicieron pruebas a varios tiempos usando matraces con y sin mamparas.
3. Los fermentadores que se usaron constan cada uno de un cuerpo principal de 30 cm. de diámetro y 50 cm. de altura. Estos fermentadores no tienen mamparas, por lo cual el rendimiento disminuye notablemente como se comprobó al hacer pruebas en matraces.

La tapa del fermentador contiene una entrada de aire y una salida para gases de deshecho. La flecha del agitador entra al centro de la tapa y el tubo de aereación a 12 cm. del centro, de 0.5 cm. de diámetro, entra hasta el fondo del fermentador, doblándose a 90° y desembocando en el extremo del agitador a 1.5 cm. del extremo de éste. El objeto de éste arreglo es que al girar el agitador, dispersa las burbujas de aire, oxigenando todo el medio. El agitador consta de dos paletas colocadas en el mismo plano, tanto el cuerpo del fermentador como el agitador están fabricados en acero inoxidable. Se trabajó en un sistema de tres fermentadores, cuyos agitadores están accionados por un sistema de poleas. Estas son en realidad tres poleas escalonadas y encontradas en tamaño con las poleas de la batería. Variando de polea se logran variaciones en la velocidad de agitación, así, se tuvieron velocidades de 184, 350 y 663 r.p.m. Todo el sistema es accionado por un motor de 1/2 H.P.

El cuerpo del fermentador estuvo sumergido hasta una altura de 30 cm. en un baño de agua con temperatura controlada. El aire necesario para la fermentación fué suministrado por una compresora con una presión de trabajo de 14.06 kg/cm<sup>2</sup>.

El sistema de esterilización y entrada de aire a los fermentadores fué el siguiente: a través de una tubería 0.5 cm. de diámetro el aire entraba a un filtro que consiste en un cilindro de 10 cm. de diámetro por 25 cm. de largo en cuyo interior se encuentran capas sucesivas de algodón. A la mitad de éste había una capa de 0.5 cm. de espesor de carbono activado, un excelente filtro para microorganismos contaminantes. Por medio de tuberías del mismo diámetro, el aire llega a un segundo filtro, igual al anterior

y de aquí se dividió en tres tuberías iguales, del mismo diámetro que las anteriores, una para cada fermentador. Después del segundo filtro, y ya sobre la tubería de cada fermentador, hay un tercer filtro ( para cada elemento), también de algodón y carbón activado, es más pequeño, de 8 cm. de largo por 4 cm. de diámetro. Todos los filtros son removibles y se esterilizan, ya preparados con algodón y carbono, en el autoclave, a 20 lb/pulg<sup>2</sup> durante una hora, se flamea la boca del tubo previamente a ser colocados. Después del tercer filtro está un manómetro, y en seguida un rotámetro, indispensable para controlar el flujo de aire. Inmediatamente, por medio de una tubería de plástico de 0.5 cm. de diámetro se conecta la entrada al fermentador. La entrada de aire a presión en el seno del medio, ayuda a la agitación, a la vez que oxigena.

La salida del tubo de gases de deshecho se protege con una cubierta de gasa estéril, es preferible protegerla con un filtro semejante a los anteriores. El hecho de que esta fermentación no produce espuma, o se produzca en cantidades moderadas, simplifica el tipo de fermentadores, ya que no son necesarios antiespumantes químicos o mecánicos.

Debido a que los fermentadores no tienen tubos de muestreo, se procedió a un método de muestreo consistente en introducir por el orificio de inoculación una varilla de vidrio de 0.5 cm. de diámetro, con la cual, a manera de pipeta se extrajo la muestra, éste método, no adecuado, corre el riesgo de contaminar el medio, a pesar de que se tomaron precauciones como es flamear el orificio, sostener durante la operación una flama cercana y esterilizar la varilla con la que se muestrea. Consecuentemente con la -

contaminación del medio puede venir una disminución del rendimiento, o producción de toxinas o materiales indeseables en la fermentación.

Tanto los fermentadores, tuberías, baño y filtros están contruidos en acero inoxidable 304.

4. La centrifuga usada para separar los sólidos es una Centrifuga-Separador Westfalia WG Tipo LWA 205 de 12 000 r.p.m. con capacidad para contener un material centrifugado de 1.1 kg. Consta de un motor de 1/2 H.P. que acciona la flacha que llega a un cabezal que consta de tres piezas superpuestas. La primera es una placa sosteniendo un eje sobre el cuál entran las otras dos, es de acero inoxidable de 15 cm. de diámetro y el eje es de 2 cm. de diámetro y 10 cm. de altura. La segunda pieza consta de una placa ligeramente combada hacia el centro y tres paletas triangulares que se apoyan en el eje de la primera pieza. Ajustada a las dos anteriores por medio de una banda está la tercera pieza, cónica truncada, denajdo un amplio espacio entre ésta y la segunda pieza, todo el conjunto es asegurado por una tuerca en la parte superior. Entre los espacios entre las diferentes piezas, especialmente entre la segunda y la tercera, se acumula el material sólido, que se alimentó por medio de un conjunto de platos superpuestos al cabezal. El objeto de tener tres platos es separar los líquidos de diferentes densidades, así, por el plato inferior sale el líquido de menor densidad, expulsado por centrifugación de la masa alimenticia. Cuando los espacios del cabezal están llenos, los sólidos de la masa salen junto con los líquidos, la densidad de ésta suspensión aumenta saliendo por el segundo plato, un líquido con aún mayor

densidad sale por el tercer plato.

Para contener la masa está un recipiente de acero inoxidable, con una capacidad de trabajo aproximada de 10 a 12 litros, del cual se alimenta una tolva que por medio de una prolongación alimenta el centro mismo del cabezal, introduciéndose por el eje hueco hasta la mitad y con perforaciones que permiten la salida de la masa entre la tercera y segunda piezas, en donde es propiamente centrifugada.

5. Para las pruebas de laboratorio, la torta obtenida se secó en estufa obteniéndose los resultados que se describen posteriormente. El sólido resultante se aglutina en forma muy compacta, siéndo necesario molerlo.

6. La molienda en el laboratorio se llevó a cabo por medio de un molino manual.

7. Se hizo una prueba de secado en un secador por aspersion. Dado que éste aparato se encuentra en el laboratorio de Ingeniería Química, fué solo experimental, presentando límites en su capacidad, no se puede trabajar a presiones altas de alimentación y atomización, ya que de hacerlo, la solución queda esparcida en el equipo sin que se logre el secado. El equipo está constituido por un calentador y filtro de aire, sistema de atomización, cámara de secado, sistema de transporte, recolección e instrumentos de control.

Antes de calentarse el aire de secado se hace pasar por lana de vidrio, posteriormente éste aire se calienta por medio de un juego de dieciocho resistencias eléctricas, del tipo de cinta estriada, dispuestas en tres bancos. Cada resistencia tiene 125 watts de capacidad y operan con corriente de 220 volts, tres fases y 50

ciclos.

El elemento más importante de un secador por aspersión es el dispositivo pulverizador. Consiste fundamentalmente en una boquilla o esprea para dos fluidos, con chaqueta de agua, un tanque de alimentación y la tubería necesaria para conectar estos equipos.

La esprea consiste en una línea de alimentación protegida por un tubo metálico, que contiene teóricamente aire a temperatura ambiente, para preservar la solución de un sobrecalentamiento, una línea de aire comprimido y dos líneas para circular agua de enfriamiento por la camisa que rodea la esprea, con el objeto de evitar un sobrecalentamiento de las mismas, ya que causaría tanto la deformación del material de construcción de la esprea, como la desviación de la pulverización dentro de la cámara de secado; ésta cámara de secado está construida totalmente de acero inoxidable 304, está formado de una sección cilíndrica de 93 cm. de diámetro interior con 150 cm. de alto, y un fondo cónico a 60°, terminando en una boca de descarga de 10 cm. de diámetro. En la sección cónica se localiza la entrada para aire de secado y el registro, con cuatro aberturas para las líneas conectadas al atomizador. Para evitar pérdidas de calor, la cámara está aislada por lana de vidrio y con envolvente exterior de acero a 95 cm. de diámetro, la sección cilíndrica está provista de una pequeña puerta de vidrio para observar tanto la atomización de la solución como la salida del material seco. El transportador de aire para secado es a través de ductos de acero inoxidable y por medio del ventilador equipado con un motor de 1/2 H.P. para corriente de 220 volts, tres fases y 50 ciclos. La colección de producto seco se efectúa en los ciclones equipados en su boca de descarga con recipientes

debidamente sellados.

Para regular el proceso se dispone de los siguientes instrumentos situados en el tablero de control; 2 válvulas reductoras para medir la presión de aire, de cero a 120 lb/pulg<sup>2</sup>, un termómetro indicador para medir la temperatura de aire del sistema; éste no es más que un termopar. El material de construcción de estos termopares para medir la temperatura del aire del sistema es la siguiente: 55% de cobre y 45% de níquel o 90% de platino y 10% de rhodio, el control de temperatura de aire de secado para el calentador eléctrico que actúa sobre el primer banco de resistencias, que está junto a la lana de vidrio.

## Métodos.

### 1. Conservación de las cepas.

#### A. Conservación de *A. oryzae*.

La cepa se sembró en el medio 1-C, se incubó a 28°C por 24 horas, teniendo un buen crecimiento. No fué necesario ajustar el pH del medio. Se resembró cada 10-15 días.

#### B. Conservación de *S. carbajali*.

Se sembró en medio 2-C, se incubó por 24 horas a 28°C, teniendo un buen crecimiento. Las resiembras se hicieron cada 8-10 días.

#### C. Observación de la variación de pH durante la esterilización.

Se hizo una prueba con los medios 1-C y 2-C tomándose los pH antes y después de ser esterilizados, para conocer las variaciones en la acidez del medio, en caso de ocurrir. Se suponía que los medios al ser esterilizados sufrieran algún cambio químico que afectara su acidez, por tanto se hizo ésta prueba a pH diferentes, en un rango de 4.5 a 7.0, esterilizándose posteriormente; ya estériles, se volvió a tomar el pH, comprobándose que no había variación.

#### D. Conservación de *Streptomyces rimosus* y *S. venezuelae*.

Ambos crecen en medio neutro. En el medio con el que se trabajó fué de pH de 5 aproximadamente y el neutralizarlo requiere más dificultades y costos, por tanto se probaron dos cepas de *Streptomyces*. Ambas se sembraron para su conservación en medio neutro, su crecimiento fué aceptable. El medio en el que se conservaron, 3-C es igual al medio 2-C pero ajustando a neutralidad.

Por otro lado se utilizó el medio 3-Ca, en el cual se sembraron también los dos tipos de Streptomycetes, pero sin neutraliza el medio, o sea, el medio 3-Ca y el medio 2-C son iguales.

## 2. Preparación de semillas y fermentaciones de prueba, en matraces.

Una vez comprobada la no variación de pH de los medios al ser esterilizados, así como el crecimiento satisfactorio de las cepas en los medios de conservación, se procedió a la hidrolisis y fermentaciones de prueba en matraces ya descritos (equipo 2). El análisis rutinario que se siguió se describe posteriormente y es el método de Underkofler.

### A. Semilla de *A. oryzae*.

Utilizando el medio 1-S, se inocula desprendiendo del medio de conservación con el asa de siembra una porción de las colonias de hongos, adicionándola al medio 1-S, ya preparado y estéril. Una vez inoculados los matraces se incubaron con agitación (matraces normales y con mamparas) a 30°C. Diariamente se tomaron muestras y se analizaron para conocer la cantidad de almidón hidrolizado; los azúcares reportados en los resultados son aproximados, debido a que hay algún consumo por parte del hongo. Las colonias crecen en forma de pequeños grumos.

### B. Determinación de porcentaje máximo de hidrolisis.

Para determinar éste porcentaje, así como el tiempo en que éste ocurre, con *A. oryzae*, se usó el medio 1-Sa, igual al medio de semilla 1-S, pero sin azúcares, con el objeto de que todos los azúcares reportados fueran producto de hidrolisis; se tomaron - muestras a diferentes tiempos, determinando azúcares reductores

por el método de Underkofler.

#### C. Semilla de *Saccharomyces carbajali*.

La inoculación a los medios de semilla 2-S se hizo añadiendo a los tubos de conservación unos 5 ml. de agua destilada estéril y agitando para formar una suspensión de levaduras, que representa aproximadamente 5% del volumen final de la semilla, vertiéndolo en el matraz con el medio 2-S ya preparado y estéril. Se incubaron los matraces (equipo 2) a agitación constante, tomándose muestras cada 24 horas para conocer el consumo de azúcar, por el método de Underkofler, aunque se hicieron algunas determinaciones por el método de Benedict, solamente para comparar resultados. El objeto de estas determinaciones es conocer la velocidad con la que las levaduras consumen los azúcares.

#### D. Semilla de *Streptomyces rimosus* y *S. venezuelae*.

Los matraces de semilla (2 normales y 2 con mamparas) se inocularon a pH distintos, unos a pH=7 y otros a pH=5.5, en los medios 3-S (neutros) se notó mejor crecimiento para las dos cepas, y de las dos, *S. rimosus* creció más abundantemente que *S. venezuelae*. Se incubó por 24 horas a 30°C a agitación constante.

#### E. Fermentación en matraces (inoculación de *A. oryzae* y *S. carbajali*).

Se llevaron a cabo fermentaciones en matraces normales y con mamparas (equipo 2); se inocula primero *A. oryzae* y de acuerdo con los resultados obtenidos en el método 2-A, se encontró el tiempo en el que se debería de inocular *S. carbajali*. O sea, el momento en el que existe la mayor cantidad de azúcares reductores.

#### F. Inoculación de *S. rimosus* en medio ya inoculado.

Los matraces de semilla se inocularon de la siguiente forma para observar el crecimiento de *S. rimosus* en medio en el que ya estaban presentes otros microorganismos; dos matraces con mamparas y dos normales, con medio 1-S se inocularon con *A. oryzae* dejando en incubación por 24 horas a 30°C, a agitación constante. A éste tiempo se inoculó *S. carbajali*, dejando en incubación otras 24 horas. Al cabo de éste tiempo los matraces se esterilizaron y se inoculó *S. rimosus* en un matraz con mamparas y uno sencillo, a un pH ajustado a neutralidad, en otros dos se dejó ácido. Se incubó 24 horas y después se sembraron los medios en cajas Petri con agar nutriente, obteniéndose un crecimiento en orden de abundancia que se reporta posteriormente.

#### 3. Fermentación.

Como ya se describieron los fermentadores, estos no tenían baffles ni válvula de muestreo. Se siguió una rutina semejante a los matraces. Se tenía una serie de parámetros (pH, temperatura, aereación, etc.) de los cuales, uno se varió de un fermentador a otro, en la batería de tres fermentadores (p.ej. temperatura). Una vez establecido cual sería el parámetro que variaría, se procedió a la inoculación de *A. oryzae* y a un tiempo determinado a la inoculación de *S. carbajali*.

El medio 1-F ya en los fermentadores (equipo 3) se esterilizó introduciendo el fermentador con el medio en un autoclave a una presión de 20 lb/pulg<sup>2</sup> por una hora, esto solubiliza en parte al almidón, formándose una masa densa. Cuando el medio estaba aún caliente, se inyectó aire y se agitó, pues dejándole enfriar se compacta formándose una masa sólida en el fondo, esto se observó

al dejar algunos fermentadores reposar por 24 horas antes de empezar a agitar, después se inoculó y se vió que solo la parte superficial de la masa sólida se hidrolizó, no penetrando el hongo a más de 1.5 cm. de la masa compacta, desde luego el rendimiento fué mínimo.

Ya estéril la masa se enfrió a 30°C y se inoculó con el hongo. Se pasó aire a presión por el tiempo necesario y después, sin esterilizar ni añadir nutrientes, se inoculó con levadura.

Los inóculos proceden de los matraces de semilla con el medio 1-S y 2-S. Se utilizó un pH de 4.4 no siendo necesario la adición de ácido por la reacción del medio de la acidez requerida, se trabajó a 28-30°C y se comprobó que un inóculo de un 1% es suficiente para el correcto funcionamiento del proceso.

La inoculación al medio de los fermentadores se hizo vertiendo totalmente el contenido de los matraces de semilla (100 ml.) al medio de los fermentadores. El orificio de inoculación se protegió sosteniendo cerca de él una flama, flameando tanto los bordes del orificio como su tapa antes y después de inocular, con el objeto de mantener una atmósfera relativamente estéril en el acceso al fermentador.

La cantidad de semilla vertida en el fermentador, conteniendo micelio de *A. oryzae* como amilasa en las aguas madres, fué suficiente para una hidrólisis satisfactoria.

Las levaduras se inoculan de la misma forma, vertiendo la suspensión de levaduras en el medio de fermentación, ya inoculado antes con *A. oryzae*, de tal forma que los azúcares producidos por la primera etapa se aprovechan inmediatamente en la segunda etapa, acortando el tiempo de crecimiento.

El *Streptomyces rimosus* fué asimismo inoculado cuando las dos cepas anteriores estaban en completa actividad. Siembras de control que se hicieron del medio de fermentación en cajas Petri, revelaron que el crecimiento de las tres cepas fué satisfactorio.

Se llevó a cabo el control de aereación en los fermentadores primero por un manómetro colocado a la salida de la compresora, indicando una presión constante de 50 lb/pulg<sup>2</sup>. Un segundo manómetro colocado después de los filtros y antes del rotámetro, indicó la presión de aire a la entrada de los fermentadores. El rotámetro regula e indica la entrada de aire, en pies<sup>2</sup>/hora, con una escala de cero a diez. El control de agitación se llevó a cabo tomando las velocidades de giro de las poleas en las diferentes posiciones, con un tacómetro. La temperatura se controló por una resistencia en el baño de agua. De la primera etapa (*A. oryzae*) a la segunda (*S. carbajali*) y a la tercera (*S. rimosus*) no se varió el parámetro que se deseaba determinar en su óptimo; analizando las muestras se conoció el momento óptimo de actividad de cada cepa. Es decir, independientemente de haber sido inoculadas una cepa tras otra, sin adicionar nutrientes se puede conocer los comportamientos de las cepas en relación a la producción de nutrientes a través de análisis de azúcares reductores, diariamente o a intervalos de tiempo menores, si es necesario, y por determinación de aumento de masa.

Cada prueba se dejó por un tiempo aproximado de ocho días, tomandomuestras diarias, con el objeto de conocer principalmente - la hidrólisis y consumo de azúcares reductores, y determinando los tiempos óptimos para inoculación, así como las cantidades hidrolizadas o consumidas y las condiciones óptimas. Para esto último se siguieron seis métodos, variando cada vez un parámetro distinto en

tres magnitudes, una para cada fermentador de la batería. Estos métodos fueron:

- A. Variación en el flujo de aire.
- B. Variación en la velocidad de agitación.
- C. Variación en el porciento de granillo utilizado.
- D. Esterilización e inmediata inoculación de un fermentador. Remojar 7 horas el arroz para ablandar el almidón. Inmediata inoculación del medio, sin remojar ni esterilizar.
- E. Inoculación de *S. rimosus* en dos casos: neutralizando el medio, después de que se ha inoculado con *A. oryzae* y *S. carbajali*, y sin neutralizar, esto es conservando un medio ácido.
- F. Acortando el tiempo total de procesado, esto es inoculando *S. carbajali* a diferentes tiempos y no a un tiempo establecido, como se hizo en los casos anteriores.

La temperatura óptima se obtuvo de la Bibliografía (15), (22), (26). El pH óptimo se encontró por determinaciones hechas en el laboratorio (43).

Una vez concluida la fermentación, la masa se reduce notablemente, se seca siguiendo uno de los siguientes métodos: centrifugación y secado en estufa (en el laboratorio) o centrifugación y secado por aspersion.

#### 4. Secado.

Una vez que se determinó el tiempo y condiciones óptimas para el trabajo, en los fermentadores y se obtuvo una masa sólida, a partir de los almidones, se procedió a separarla y secarla.

Para éste fin se llevaron a cabo dos métodos. El primero consistió en separar la masa por medio de centrifugación, se utilizó

para éste fin una centrifuga ya descrita en los equipos (equipo 4).

A. La masa en suspensión se llevó al recipiente superior del separador centrifugo, con un cupo total de 12 litros. Lentamente se pasó a la tolva principal y de allí al cabezal de la centrifuga, el cual lo separó desalojando el líquido a través de los platos con salida. El sólido quedó en el interior del cabezal. Una vez que pasó todo el líquido, se volvió a centrifugar, debido que a medida que el cabezal se llenaba, sólidos pasaban al líquido que se eliminaba y se corría el peligro de eliminar una cantidad apreciable de materias nutritivas, en especial levaduras. Así el rendimiento podía disminuir notablemente al no quedar atrapado en el cabezal la totalidad de la materia producida. Es de suponerse que el rendimiento aumentará en un secador industrial adecuado.

De la masa recuperada en el cabezal fué eliminada la mayor parte de agua, pero no la totalidad, ésta cantidad de agua retenida podía favorecer el desarrollo de esporas de los hongos que existen en la masa misma o en un caso peor, que se reprodujeran microorganismos contaminantes, procedentes del aire principalmente, produciendo materias indeseables. Por esto fué absolutamente indispensable eliminar casi la totalidad de agua presente. Esto se llevó a cabo en cantidades muy pequeñas de producto, en estufa.

El producto fué colocado en charolas de aluminio, en el interior de la estufa a 50°C por 4 a 5 días, al cabo de los cuales, se había eliminado una gran cantidad de agua; el producto entonces tomó el aspecto de trozos duros y de color café oscuro. Estos se redujeron por medio de un molino manual, obteniéndose un producto granulado de color más claro.

B. Estos últimos pasos se llevaron a cabo unicamente en el laboratorio cuando se manejaron cantidades pequeñas, en vías de experimentación. Se simplificó el proceso al utilizar un secador por aspersión. El secado en éste tipo de aparato se lleva a cabo como sigue: se conectó el ventilador-extractor, se ajustó el control a la temperatura deseada para el aire de secado, se conectaron los bancos de calentadores eléctricos como fuera necesario para obtener la temperatura deseada. Se suministró el aire al último banco de resistencias, aproximadamente a  $1.5 \text{ lb/pulg}^2$ , abriendo la válvula de la línea, ésta línea fué colocada al observar que el aire de entrada llegaba con bastante dificultad hasta el último banco de resistencias.

Se debe dar suficiente tiempo para que el aire alcance la temperatura deseada. No se debe permitir en ningún momento que los calentadores trabajen con el ventilador parado o con la puerta de la cámara abierta.

Se colocó el material preparado en el tanque de alimentación y se introdujo en el tanque a presión. Se observó la esprea para asegurarse que se estaban usando las presiones correctas, ya que cualquier cristal o grumo sólido taponaría la esprea, ocasionando una atomización desigual. Por esta razón, el material que alimente a la esprea debe ser homogéneo, recomendándose un agitador eléctrico. Se conectó el suministro de aire a la esprea y se ajustó la válvula de control a la presión deseada.

El aire para el secado entra al calentador a través del filtro de lana. Ya caliente, atravieza el conducto provisto de un termopar para medir la temperatura y penetra en la cámara de secado. En el centro de la cámara de secado está localizada la esprea atomizadora al sistema la solución mezclada con aire.

La corriente gaseosa cargada de material seco sale por la parte inferior de la cámara de secado, a través de un ducto entrando en el ciclón colector donde el producto seco se separó del aire y se colectó en el recipiente, dirigiéndose al segundo ciclón en donde se depositaron en el segundo recipiente las partículas más finas del secado. Los gases fueron extraídos por la parte superior del ciclón mediante el ventilador-extractor. La temperatura del aire de salida se midió con un termopar instalado en el codo que conecta el ciclón colector con el ventilador.

#### 5. Métodos de control.

Cada 24 horas y hasta las 192 en algunos casos, se tomaron muestras de 10 ml. para determinar:

- A) Hidrolisis del almidón y/o consumo de azúcares
- B) Aumento de micelio

A. El análisis rutinario que se sigue para la observación del proceso es la determinación de azúcares reductores por el método de Underkofler, se hizo éste análisis por ser el más rápido, sencillo y por estar diseñado para determinación semimicroquímica de los azúcares reductores totales en medios de cultivo (30).

En los matraces con medio 1-S en donde se inoculó *A. oryzae*, al final del tiempo de incubación, el crecimiento fué en grumos, se filtró entonces 5 ml. de medio sobre algodón para obtener un líquido manejable para la titulación, quedando en el medio filtrante el micelio y las partículas no hidrolizadas de almidón. El mismo método se sigue para separar sólidos de líquidos en los medios a analizar de los fermentadores. En el caso del medio 2-S no es necesario filtrar, pues éste medio no contiene almidones y las levaduras forman una suspensión bastante manejable para la titula

ción.

El método de Underkofler para analizar azúcares reductores totales es el siguiente: del líquido filtrado en el caso de medios 1-S y 1-F, se toma una alícuota de 0.1 ml. y se lleva a 5 ml. con agua destilada. A esto se le añaden 5 ml. de reactivo de Underkofler que consiste en lo siguiente:

Sulfato de cobre	37.5 g.
Tartrato doble de potasio y sodio	125.0
Carbonato de sodio anhidro	53.0
Yoduro de potasio	1.0
Sulfato de potasio anhidro	50.0
Yodato de potasio EXACTAMENTE	3.5665
agua destilada c.b.p.	1000 ml.

Este reactivo se ajusta con el potenciómetro a un pH de 9.48 con solución saturada de NaOH. El método, tal cual lo describe Underkofler, indica que al tubo en donde se va a hacer la determinación se le ajusta un tapón de hule provisto de un capilar corto, pero prácticamente se vio que no es necesario, y la exactitud de la determinación no se afecta. Estos tubos se sumergen en baño de agua hirviendo durante 30 minutos. Posteriormente se enfrían a  $-30^{\circ}\text{C}$  y se agregan 2 ml. de solución al 12.5% de yoduro de potasio y 25% de oxalato de potasio, en agua destilada, se agrega a cada tubo 2 ml. de ácido sulfúrico 7.5 N, MUY LENTAMENTE, evitando desprendimiento de  $\text{CO}_2$  con el subsecuente arrastre de yodo, ocurriendo lo cual, la titulación será falsa. Se agita la solución hasta que todo el óxido cúprico se haya disuelto y se titula el exceso de yodo con solución 0.05 N de tiosulfato de sodio, empleando como indicador en los últimos momentos de la titulación una solución de almidón al 1% en solución saturada de NaCl. El vira-

je es de azul oscuro (yodo-almidón) a azul claro (solución diluida de iones cobre). Previamente se ha construido una curva - standard que permite leer directamente mg. de azúcares reductores equivalente a ml. de tiosulfato de sodio gastados.

Las gráficas se construyeron tomando en cuenta la diferencia de ml. de tiosulfato gastados en un blanco a ml. gastados en la muestra, para obtener una gráfica con pendiente positiva, así - como porque el reactivo de Underkofler varía día a día y se estandarizan las lecturas al tomar en cuenta el incremento en lugar de los ml. directamente.

En promedio se usan alrededor de 9 ml. de y tiosulfato 0.05 N disminuyendo la cantidad usada a medida que aumente el azúcar presente. Las diluciones para titular fueron las siguientes: una alícuota de 0.1 ml. del medio a analizar se llevó a 5 ml., por tanto, el número de mg/ml que se obtengan al leer en la curva standard - deberá ser multiplicado por 5 y dividido entre 0.1 para obtener la concentración de azúcares reductores en el medio:

$$\text{mg/ml (medio)} = \frac{\text{mg/ml (titulación)}}{0.1} \times 5$$

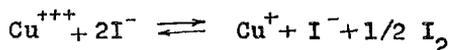
El medio original 1-S tenía 4.0% de azúcar, o sea una concentración de 40 mg/ml. El medio 2-S tenía 5.0% de azúcar o sea 50 - mg/ml. Estas cantidades fueron una base para conocer las cantidades de azúcar consumidos o producidos, según el caso.

Según Solomons (15) la hidrólisis del almidón da 10% o más de monosacárido de su peso original. Esta es una base teórica, por - que no se tiene certeza de que los azúcares producidos sean mono o disacáridos o en todo caso se produzcan dextrinas. Por otra parte se reportan dos gráficas y dos tablas, la primera presenta los

datos que se obtienen directamente de la titulación, se debe recordar que la alícuota tomada es de 0.1 ml llevada a 5 ml. de agua, más 5 ml. de reactivo de Underkofler, por ésta dilución se tiene una concentración de 0.8 mg/ml y 1.0 mg/ml respectivamente para los medios 1-S y 2-S. El hecho de hacer estas diluciones indica que el método de Underkofler es aplicable a concentraciones muy bajas, de aquí su nombre de método semimicroquímico.

El método de Underkofler de determinación de azúcares reducidos se basa en la reacción entre sulfato de cobre y yoduro de potasio. El óxido cuproso formado por la oxidación del azúcar se disuelve en medio ácido y se reoxida a sal cúprica por una cantidad conocida de yoduro de potasio. El exceso de KI se titula con tiosulfato de sodio. La oxidación se lleva a cabo en la presencia de exceso de sales cúpricas, las cuales no inhiben la oxidación.

Esencialmente la misma reacción entre sales cúpricas y KI es la base del método ya bien conocido de determinación yodométrica de cobre, estudiada por DeHaen en 1854; pero en éste caso la sal cúprica se reduce a yoduro cuproso en presencia de yoduro de potasio, con la liberación de yodo y cantidades equivalentes de cobre reducido. Esta última reacción, la reducción de sal cúprica a cuprosa, se ha usado para la determinación de azúcar, el exceso de cobre en su forma cúprica después de filtrar el óxido cuproso, se determina en ésta forma por el método descrito por Peters. Ambos procedimientos y posterior a éste el de Underkofler se basan en la siguiente reacción reversible:

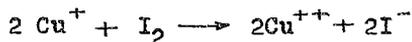


la cual bajo condiciones ligeramente diferentes se lleva a cabo hasta su terminación en cualquier dirección. Bray demostró que la reacción es perfectamente reversible y obedece la ley de acción de masas, dentro de ciertos límites en soluciones diluidas. El yodo libre puede ser eliminado completamente, siendo uno de los factores activos en la reacción, sin que ocurra desequilibrio.

La sal residual cúprica se convierte totalmente a yoduro cuproso, con la liberación equivalente de yodo:



en otro caso, la sal cuprosa se oxida a cúprica en presencia de un exceso conocido de yodo, con la conversión correspondiente de yodo a yoduro



El yodo formado del yoduro en el primer caso, y el exceso de yoduro en el segundo caso, se determinan por titulación con tiosulfato de sodio estandarizado, usando almidón como indicador. La dirección en la cual procede la reacción reversible depende de la concentración de sustancias activas (o iones). Para la conversión de sal cúprica a cuprosa completamente, la concentración de yoduro, que tiene mayor influencia, debe ser mayor. La sal cúprica es primeramente reducida y precipitada como toduro cuproso en presencia de cantidades considerables de yoduro soluble, el yodo liberado se reduce en la titulación con tiosulfato.

La subsecuente adición de más yodo corre el equilibrio al lado cúprico, pero la concentración de yoduro es tal que solo 15% del total de cobre puede estar en forma cúprica. La adición de -

oxalato (o tartrato) corre el equilibrio global al lado cúprico de la reacción, y a pesar del exceso de yoduro de potasio, el yoduro cuproso se disuelve y oxida con el yodo libre. El equilibrio se alcanza casi inmediatamente y no se afecta por la eliminación de exceso de yodo libre. Por lo general, el color azul del almidón no reaparece aún después de varios días. La solución toma color azul por el complejo con la sal de cobre, pero el punto azul de vire es muy claro y distintivo y no se confunde con el azul de una sal de cobre. Después de corto tiempo, a menudo antes de terminar la titulación, si la solución está en frío, se puede formar un precipitado de oxalato cúprico u oxalato de cobre y potasio - (en caso de usar oxalato, o usando tartrato, será tartrato cúprico o tartrato de cobre y potasio) pero no interfiere con la titulación.

Después de acidular la solución alcalina de cobre, tanto la sal cúprica como la cuprosa, reaccionado con yoduro o yodo respectivamente se pueden titular con solución estandarizada de tiosulfato. Los productos de oxidación del azúcar no reaccionan con yodo en solución ácida y no causan interferencia. No es necesario eliminar el óxido cuproso en la determinación de sales cúpricas, tampoco es necesario aislar el óxido cúprico. Cualquiera de los dos puede ser exactamente determinado aún en presencia del otro.

En vías de comparación se hicieron algunas determinaciones por el método de Benedict, aunque éste método es más bien aplicable a análisis clínicos. Consiste en lo siguiente: se diluyen 10 ml. de muestra con 90 ml. de agua, se mezclan y se colocan en una bureta. Se colocan 95 ml. de reactivo cuantitativo de Benedict

en una cápsula de porcelana, éste reactivo consiste en lo siguiente:

Sulfato de cobre puro cristalizado	18 g.
Carbonato de sodio	200 g.
Citrato de sodio	200 g.
Sulfocianuro de potasio	125 g.
Solución de ferrocianuro de potasio al 5%	5 ml.
Agua destilada c.b.p.	1000 ml.

Se disuelven con ayuda de calor el carbonato, citrato y sulfocianuro en 700 ml. de agua, filtrando a continuación. Se disuelve el cobre en 100 ml. de agua destilada y se vierte con lentitud sobre la otra solución, agitando constantemente. Se añade la solución de ferrocianuro, se enfría y se completa con agua destilada hasta 1 litro.

Se añade al reactivo 10 g. de carbonato de sodio cristalizado y un poco de piedra pómez, para regular la ebullición. Se calienta el reactivo hasta ebullición. Mientras que el reactivo está hirviendo, se deja caer sobre éste la muestra, un poco cada vez pero con cierta rapidez hasta que aparezca un precipitado de color blanco tiza y el azul del reactivo comience a desvanecerse. Entonces se añaden una o dos gotas más de muestra, hasta que desaparezca todo rastro de color. El reactivo está preparado de tal forma que 25 ml. son reducidos por 0.05 g. de azúcar, los resultados se reportan en porcentaje. Si la muestra contiene solo trazas de azúcares, se usa sin diluir siguiendo el mismo método.

Este método de Benedict, además de no ser específico para medios de cultivo, como lo es el de Underkofler, es más complicado

y da resultados semejantes a los obtenidos por el método de Underkofler, por lo que se descartó y se prosiguió el control de azúcares reductores para todo el proceso por éste último método.

Se hicieron titulaciones con muestras obtenidas de los equipos 2 y 3, obteniéndose los resultados que se describen después.

Con estos resultados se conoce el momento en que es óptima la hidrólisis producida. Se hicieron también determinaciones en medios semejantes al 1-S pero sin azúcares (medio 1-Sa) para determinar la máxima cantidad que puede hidrolizarse de almidón, y el tiempo en que ésta se lleva a cabo.

#### B. Determinación del aumento (en peso) de micelios.

Para comparar los diferentes crecimientos de los microorganismos, se siguió un método empírico, buscando que fuera práctico y sencillo y al aplicarlo exactamente igual en todos los casos se anuló cualquier error y fué posible hacer comparaciones en las diferentes fermentaciones hechas.

De las muestras de 10 ml. tomadas en todas las producciones, 5 ml. se usaron para ésta determinación que consistió en lo siguiente: centrifugar las muestras a 3 500 r.p.m. por 30 minutos en tubos de nalgene previamente tarados a peso constante a temperatura ambiente, lavar con agua destilada y centrifugar a la misma velocidad y tiempo, dos veces más; decantar el sobrenadante y escurrir en posición invertida por 5 minutos sobre papel filtro. Secar a 50°C por una hora, enfriar y pesar. Los resultados se reportan posteriormente.

-----

Con respecto a la influencia de los Streptomycetes en el pro-

ducto obtenido, se conocería solamente haciendo pruebas de digestibilidad, pues el fin de incluirlos en la fermentación es, como ya se mencionó, la producción de factores desconocidos del crecimiento, solo reconocibles por la vía antes señalada. Por otra parte, ésta etapa es optativa y solo se incluiría en el proceso si el balance general señala que es costeable.

### **CAPITULO III. RESULTADOS**

**a) Tabulación**

**b) Gráficas**

## Resultados.

Los resultados observados al esterilizar los medios de conservación a diferentes pH fueron (método 1-C):

Medio 1-C		Medio 2-C	
Sin esterilizar	Estéril	Sin esterilizar	Estéril
pH	pH	pH	pH
4.5	4.5	4.5	4.5
5.0	5.0	5.0	5.0
5.5	5.5	5.5	5.5
6.0	6.0	6.0	6.0
6.5	6.5	6.5	6.5
7.0	7.0	7.0	7.0

Por tanto, el pH no varía con la esterilización. Este dato fué muy importante dado que los hongos como las levaduras crecen a pH ácido. Este pH no fué ajustado con adición de ácido, sino que la combinación de elementos de los medios dá la acidez necesaria. El pH promedio de los medios 1-C y 1-S fué 5.5, de los medios 2-C y 2-S, fué 6.

Las cepas de *A. oryzae* crecen abundantemente en los medios señalados en una escala que a continuación se indica, se muestran los crecimientos de los cuatro tipos de cepas usadas (métodos 1-A, 1-B, y 1-D).

Escala: 0 crecimiento nulo

1	"	pobre
2	"	moderado
3	"	regular
4	"	bueno
5	"	excelente

<u>A. oryzae</u>		<u>S. rimosus</u>	
Medio 1-C	5	Medio 3-C	3
Medio 1-S	5	Medio 3-S	3
Medio 1-Sa	5	Medio 1-F	2
Medio 1-F	5	Medio 2-F	4
Medio 2-F	4		

<u>S. caribali</u>		<u>S. venezuelae</u>	
Medio 2-C	4	Medio 3-C	2
Medio 2-S	5	Medio 3-S	2
Medio 1-F	5	Medio 1-F	1
Medio 2-F	4	Medio 2-F	2

El crecimiento de *S. rimosus* y *S. venezuelae* en medios 2-C (ácido) y 3-C (neutro) fueron los siguientes, en la misma escala que la tomada para los anteriores (método 1-D):

Medio	Microorganismo	Tipo de matraz	Crecimiento (0 a 5)
3-C	<i>S. rimosus</i>	sencillo	3
3-C	<i>S. rimosus</i>	con mamparas	4
3-C	<i>S. venezuelae</i>	sencillo	2
3-C	<i>S. venezuelae</i>	con mamparas	2
2-C	<i>S. rimosus</i>	sencillo	2
2-C	<i>S. rimosus</i>	con mamparas	3
2-C	<i>S. venezuelae</i>	sencillo	1
2-C	<i>S. venezuelae</i>	con mamparas	1

HIDROLISIS DE ALMIDON POR A. ORYZAE EN MATRACES ERLLENMEYER SENCILLOS  
Y CON MAMPARAS.

(Método 2-A; control, método 5-A)

Medio (*)	Tiempo hrs.	Condiciones (**)	Azúcares red. (titulación) mg/ml (***)	Azúcares red. (medio mg/ml (****))	% Hidrolisis (*****)
			<u>gráfica 1</u>	<u>gráfica 2</u>	<u>gráfica 3</u>
1-S	0	con mamparas	0.8	40.0	-
"	24	"	0.81	40.5	1.14
"	48	"	0.05	2.5	-
"	72	"	0.25	12.5	28.4
"	96	"	0.52	26.0	59.9
"	120	"	0.53	26.5	60.0
"	144	"	0.62	31.0	70.5
"	168	"	0.64	32.0	72.5
"	192	"	0.66	33.0	75.0
"	264	"	0.67	33.5	76.3
"	0	sencillo	0.8	40.0	-
"	24	"	0.76	38.0	-
"	48	"	0.6	30.0	-
"	72	"	0.14	7.0	-
"	96	"	-	-	-
"	120	"	0.435	21.75	49.5
"	144	"	0.57	28.5	64.7
"	168	"	0.6	30.0	68.0
"	192	"	0.62	31.0	70.4
"	264	"	0.62	31.0	70.4

- (\*) Los medios 1-S tienen 4% de azúcar
- (\*\*) Para todos los casos, se incubaron con agitación, a 28°C
- (\*\*\*) Con una concentración inicial en el medio de 40 mg/ml, en la titulación se toma en cuenta que es una alícuota de 0.1 ml. llevada a 5 ml. Estas cantidades son las que se tienen directamente de la curva standard.
- (\*\*\*\*) En el medio, o sea (\*\*\*) corregido por el factor
- (\*\*\*\*\*) Tomando en cuenta el 100% teórico como 44 mg/ml (15)

A. oryzae consume primero el azúcar existente antes de empezar a hidrolizar. Es posible que existan al mismo tiempo los dos procesos; en la primera parte, el consumo de azúcares es imperante, en la segunda, lo es la hidrólisis.

#### HIDROLISIS DE ALMIDON EN MEDIO 1-Sa POR A. ORYZAE.

(Método 2-B)

Tiempo	Titulación (gráfica 7)		Medio (gráfica 8)		% Hidrólisis (gráfica 9)	
	con mampa ras	sencillo	con mampa ras	sencillo	con mampa ras	sencillo
0	-	-	-	-	-	-
24	0.09	0.05	5	3	12	5.4
48	0.25	0.1	13	5	28	12.5
72	0.44	0.27	21.5	13	40.5	30.0
96	0.5	0.31	25.0	16	57.5	36
120	0.54	0.35	27.0	17	62	37.5
144	0.58	0.38	28.4	17.8	64.5	39.8
168	0.6	0.4	30.0	18	65.5	40.0

Se notó una pequeña hidrólisis a las 24 horas, antes de empezar el consumo. Se comprobó que no hubiera error haciendo titu-

laciones a intervalos más cortos, alrededor de las 24 horas, encontrándose que efectivamente hay hidrólisis (métodos 2-A y 5-A)

Gráfica 7.

Medio	Condiciones	Tiempo hrs.	Azúcares red. (titulación) mg/ml	Azúcares red. (medio) mg/ml
1-S	con mamparas	0	0.8	40.0
"	"	17	0.808	40.4
"	"	21	0.809	40.45
"	"	24	0.81	40.5
"	"	27	0.809	40.49
"	"	29	0.807	40.39

CONSUMO DE AZUCARES.

S. carbajali consume el azúcar existente en el medio, no produce enzimas hidrolíticas, ésta observación se encamina solamente a conocer el tiempo que requiere S. carbajali para consumir los azúcares presentes (método 2-C y método 5-A)

Medio (*)	Tiempo hrs.	Condiciones (**)	Azúcares red. (titulación) mg/ml (***)	Azúcares red. (medio) mg/ml (****)
2-S	0	con mamparas	1.0	50
"	24	"	0.62	31.0
"	48	"	0.02	1.0
"	72	"	0.01	0.5
"	96	"	cero	cero
"	120	"	cero	cero
"	144	"	cero	cero

gráfica 5

gráfica 6

(continuación de la tabla)

Medio (*)	Tiempo hrs.	Condiciones (**)	Azúcares red. (titulación) mg/ml(***)	Azúcares red. (medio) mg/ml (****)
2-S	0	sin mampara	1.0	50
"	24	"	0.71	35.5
"	48	"	0.07	3.5
"	72	"	0.02	1.0
"	96	"	trazas	trazas
"	120	"	cero	cero
"	144	"	cero	cero

(\*) Contiene 5% de azúcar

(\*\*) En agitación constante a 28°C

(\*\*\*) Directamente de la curva standard

(\*\*\*\*) De (\*\*\*) corregido por el factor.

AUMENTO DE MICELIO EN MEDIO 1-S (en matraces con mamparas)

Tiempo hrs.	Sólidos en 5 ml. de medio gramos	Densidad aproximada g/ml
	<u>gráfica 10</u>	<u>gráfica 11</u>
0	1.75	0.35
24	0.3	0.06
48	0.57	0.114
72	0.8	0.16
96	0.9	0.18
120	0.95	0.19
144	0.97	0.194

Con respecto al medio 2-S, la levadura consume el azúcar hasta agotarla totalmente. Se observó que los medios con alta concentración de granillo al esterilizar, éste se gelatiniza, quedando una

masa compacta. Para comprobar si en ésta masa pueden penetrar los hongos se pusieron tres matraces con medio l-F y 15% de granillo, y tres con medio l-F y 10% de granillo. El medio se inculó con *A. oryzae*, el cual creció muy pobremente al principio, pero a partir del quinto día creció abundantemente, se empezó a licuar el medio, al sexto día se había licuado totalmente, los cambios ocurridos en medios con concentración de granillo de 10 y de 15% fueron muy semejantes. Esto se llevó a cabo con agitación constante.

## Fermentadores.

### PRUEBA 1. (Método 3-A)

Las condiciones para la primera prueba son:

Temperatura: 30°C

Presión: 5 lb/pulg<sup>2</sup>

Velocidad de agitación: 184 r.p.m.

Concentración de granilla: 15% en 10 litros de medio 1-F

La temperatura se estableció por la numerosa bibliografía que indica como temperatura óptima para éste tipo de microorganismos 28-30°C.

El medio del fermentador 1 presentó un aspecto de suspensión amarillenta, con olor amargo, mientras que los otros dos fermentadores son de medios muy espesos y blancos. Esto se debe seguramente a alguna contaminación que se presentó después de inoculado el fermentador con *A. oryzae*. Se colocó para conocer si se producía espuma y en que cantidades, una trampa.

Se observó que el microorganismo no produce espuma, los vapores de agua que salen por el tubo de deshecho, juntamente con el aire, se condensaron en el matraz; por tanto se eliminó la trampa protegiendo la salida únicamente con gasa estéril. La poca espuma producida se rompe en parte debido a que el aspa superior del agitador está rasando la superficie del medio.

El parámetro que se varió fué el flujo de aire:

Fermentador	Flujo de aire
1	2-3 ft <sup>3</sup> /hr. (0.054-0.081 m <sup>3</sup> /hr.)
2	6 ft <sup>3</sup> /hr. (0.162 m <sup>3</sup> /hr.)
3	9 ft <sup>3</sup> /hr. (0.243 m <sup>3</sup> /hr.)

La compresora está calibrada a 75 lb/pulg<sup>2</sup>, se inocularon los tres fermentadores con 100 ml. de medio de semilla, el cual fué incubado durante tres días, se llegó a la conclusión de incubar durante éste tiempo los medios después de analizar los resultados a través de las gráficas y observar cual era el momento en el que existía más hidrolisis. Se supone que al haber un máximo de hidrolisis, la actividad microbiana es óptima, por consiguiente se inocularon los fermentadores vaciando el medio de los matraces, con lo que se arrastra toda la amilasa producida iniciando inmediatamente la hidrolisis. Los resultados de la hidrolisis en los fermentadores son los siguientes:

Fermentador 1 (Método 5-A)

Tiempo hrs.	Azúcares reductores mg/ml	Porcentaje de Hidrolisis (*)
	<u>gráfica 12</u>	<u>gráfica 13</u>
0	-	-
24	10	6.05
48	11.5	7.0
72	12.5	7.6
96	20.5	12.4

(\*) Con 15% de granillo en 10 litros se tienen 150 mg/ml de almidón más 10% al hidrolizarse totalmente, el 100% teórico serían 165 mg/ml de azúcar.

A las 96 horas se inoculó S. carbajali, el consumo de azúcar fué el siguiente:

Fermentador 1 (Método 5-A)

Tiempo hrs.	Azúcares reductores mg/ml
	<u>gráfica 12</u>
96	20.5

(continúa)

120	21.5
144	22.0
168	22.0
..	26.2
218	32.0 (no hubo consumo)

De la misma forma, los resultados de hidrolisis de almidón y consumo de azúcares en los fermentadores 2 y 3 fueron los siguientes:

Fermentador 2

Tiempo hrs.	Azúcares reductores mg/ml	Porcentaje de Hidrolisis
	<u>gráfica 12</u>	<u>gráfica 13</u>
0	0	0
24	35.5	21.5
48	38.0	23.0
72	40.0	24.2
96	34.5	-
120	24.0	-
144	16.0	-
168	10.0	-
192	9.0	-
218	8.0	-

Fermentador 3

Tiempo hrs.	Azúcares reductores mg/ml.	Porcentaje de Hidrolisis
	<u>gráfica 12</u>	<u>gráfica 13</u>
0	0	0

(continúa)

24	23.0	20.0
48	33.5	20.3
72	27.5	-
96	25.0	-
120	10.0	-
144	9.0	-
168	8.0	-
192	8.0	-
218	8.0	-

Secadas en la estufa, las masas resultantes ya centrifugadas obtuvieron un aspecto duro y compacto, siendo necesario molerlas. El aspecto final del producto es una harina gruesa de color café amarillento. Los resultados obtenidos durante el secado fueron - los siguientes:

Temperatura promedio: 40°C (Método 4-A)

Gráfica 14

Tiempo hrs.	Fermentador 1 gramos	Fermentador 2 gramos	Fermentador 3 gramos
0	225	685	740
6	180	550	690
12	145	450	630
18	110	395	580
24	80	360	520
30	55	335	475
36	45	315	440
42	40	300	400
48	40	280	365
54	40	260	335
60	40	245	310

Analizando los datos anteriores, se ve que los parámetros óptimos en la Prueba 1 son:

AERACION: 6 ft<sup>3</sup>/hr. (0.162 m<sup>3</sup>/hr)

Temperatura: 30°C

Presión de aire: 5 lb/pulg<sup>2</sup>

pH: 4.5

Porcentaje de granillo: 15%

Velocidad de agitación: 184 r.p.m.

Hidrólisis máxima: 24.2%, ocurrida en el fermentador 2 con una aereación de 6 ft<sup>3</sup>/hr a las 72 horas.

El hecho de que en el fermentador 3 haya habido más producción no se tomó en cuenta, pues por defectos de agitación en todos los casos se presentó sedimentación, no es homogénea de uno a otro de los fermentadores, no pudiéndose considerar como una pérdida constante; el interés de ésta prueba en el secado es observar el efecto de la aereación en el rendimiento del micelio.

## PRUEBA 2

En ésta prueba se varió la velocidad de agitación.

Constantes:

Aereación: 6 ft<sup>3</sup>/hr. (0.162 m<sup>3</sup>/hr)

Temperatura: 30°C

Presión de aire: 5 lb/pulg<sup>2</sup>

pH: 4.5

Porcentaje de granillo: 15%

### Variación

Fermentador 1: 184 r.p.m.

Fermentador 2: 350 r.p.m.

Fermentador 3: 664 r.p.m.

Los fermentadores se esterilizaron, inmediatamente se empezaron a agitar, al bajar la temperatura se inocularon con *A. oryzae* y a las 96 horas con *S. carbajali*, sin esterilizar nuevamente ni añadir nutrientes, los resultados de la hidrólisis y consumo de azúcares fueron los siguientes:

Fermentador 1 (Método 5-A)

Tiempo hrs.	Azúcares reductores mg/ml	Por ciento de Hidrólisis
	<u>gráfica 15</u>	<u>gráfica 16</u>
0	0	0
24	2.0	1.21
48	3.5	2.13
72	33.0	22.0
96	45.0	27.6
120	39.0	-
144	17.5	-
168	4.5	-

Fermentador 2

Tiempo hrs.	Azúcares reductores mg/ml	Por ciento de Hidrólisis
	<u>gráfica 15</u>	<u>gráfica 16</u>
0	0	0
24	2.0	1.2
48	7.0	4.25
72	35.0	21.1
96	33.5	-
120	30.0	-

(continúa)

144	12.4	-
168	1.2	-

### Fermentador 3

Tiempo hrs.	Azúcares reductores mg/ml	Porcentaje de Hidrolisis
	<u>gráfica 15</u>	<u>gráfica 16</u>
0	0	0
24	2.0	1.21
48	4.5	2.25
72	41.5	27.6
96	40.0	-
120	38.0	-
144	20.0	-
168	2.0	-

Centrifugando 5 ml de medio, se obtuvo un aumento de peso de día a día, dividiendo entre los 5 ml. se obtiene en una forma aproximada la densidad de sólidos en el medio (Método 5-B):

Tiempo hrs.	Fermentador 1	Fermentador 2	Fermentador 3
	<u>gráfica 17</u>	<u>gráfica 17</u>	<u>gráfica 17</u>
0	6.55 g.	6.55 g.	6.55 g.
24	1.1	1.0	1.9
48	1.6	1.3	1.7
72	1.5	1.3	1.55
96	1.3	1.2	1.4
120	1.3	1.2	1.4
144	1.27	1.3	1.4
168	1.27	1.3	1.4

Densidad aproximada (de sólidos)

Gráfica 18

Tiempo hrs.	Fermentador 1 g/ml	Fermentador 2 g/ml	Fermentador 3 g/ml
0	1.31	1.31	1.31
24	0.22	0.20	0.38
48	0.32	0.26	0.34
72	0.30	0.26	0.31
96	0.26	0.24	0.28
120	0.26	0.24	0.28
144	0.26	0.26	0.28
168	0.26	0.26	0.28

Los resultados del secado del producto fueron los siguientes:

Temperatura promedio: 50°C (Método 4-A)

Gráfica 19

Tiempo hrs.	Fermentador 1 gramos	Fermentador 2 gramos	Fermentador 3 gramos
0	865	950	900
12	725	760	785
24	580	635	660
36	465	524	600
48	380	450	530
60	320	400	435
72	275	360	375
84	245	330	300
96	230	305	280
108	230	305	280
120	230	305	280

Las densidades finales en los tres fermentadores fueron:

Fermentador 1: 0.25 g/ml

Fermentador 2: 0.26 g/ml

Fermentador 3: 0.28 g/ml

Por tanto los parámetros óptimos de la Prueba 2 fueron:

Aereación: 6 ft<sup>3</sup>/hr. (0.162 m<sup>3</sup>/hr)

Temperatura: 30°C

Presión: 5 lb/pulg<sup>2</sup>

pH: 4.5

Porcentaje de granillo: 15%

VELOCIDAD DE AGITACION: 664 r.p.m.

Hidrólisis máxima: 55.1 mg/ml (33.5%) a las 96 horas en el fermentador 3.

### PRUEBA 3

(Método 3-C)

Tomando los óptimos obtenidos en las pruebas anteriores, (velocidad de agitación y flujo de aire), en base a los porcentajes de hidrólisis y a la curva que se produce, se estableció el tercer parámetro variable, que fué porcentaje de granillo en cada fermentador. En las dos pruebas anteriores se usó solamente *A. oryzae* y *S. carbajali*, en ésta se usó también *Streptomyces rimosus*. Los parámetros fijos fueron:

Aereación: 6 ft<sup>3</sup>/hr (0.162 m<sup>3</sup>/hr)

Temperatura: 30°C

Presión de aire: 5 lb/pulg<sup>2</sup>

Velocidad de agitación: 664 r.p.m.

pH: 4.5

Parámetro variable:

Fermentador 1: 15 % de granillo

Fermentador 2: 12% de granillo

Fermentador 3: 10% de granillo

Con éste parámetro variable y tomando en cuenta cual sería el 100% teórico en cada caso (10% más de su peso original) se obtuvieron los siguientes resultados (Método 5-A):

Fermentador 1

Tiempo hrs.	Azúcares reductores mg/ml	Porcentaje de Hidrólisis (*)
	<u>gráfica 20</u>	<u>gráfica 21</u>
0	0	0
24	3.5	2.3
48	7.0	3.6
72	23.0	15.2
96	35.0	21.3
120	28.2	-
144	17.8	-
168	9.2	-

(\*) Con 15% de granillo, el 100% teórico de hidrólisis es 165 mg/ml

Fermentador 2

Tiempo hrs.	Azúcares reductores mg/ml	Porcentaje de Hidrólisis (**)
	<u>gráfica 20</u>	<u>gráfica 21</u>
0	0	0
24	5.0	3.8
48	10.6	8.0
72	26.0	19.4
96	35.0	26.6
120	29.0	-
144	19.0	-
168	10.2	-

(\*\*) 12% de granillo, el 100% teórico de hidrólisis es 132 mg/ml

### Fermentador 3

Tiempo hrs.	Azúcares reductores mg/ml	Porcentaje de Hidrólisis(***)
	<u>gráfica 20</u>	<u>gráfica 21</u>
0	0	0
24	10.5	21.7
48	24.0	38.5
72	42.3	36.0
96	39.5	-
120	30.5	-
144	21.0	-
168	18.0	-

(\*\*\*) 10% de granillo, el 100% teórico de hidrólisis es 110 mg/ml

### Sólidos en el medio (Método 5-B)

Peso de sólidos en 5 ml. de medio centrifugado a 3 500 r.p.m.  
por 30 minutos.

### Gráfica 22

Tiempo hrs.	Fermentador 1 gramos	Fermentador 2 gramos	Fermentador 3 gramos
0	6.5	6.5	6.5
24	3.2	2.3	1.25
48	2.0	1.1	1.0
72	1.7	1.5	1.2
96	1.7	1.5	1.3
120	1.7	1.5	1.3
144	1.7	1.5	1.3
168	1.7	1.5	1.3

Densidad aproximada de sólidos en el medio (Método 5-B)

Gráfica 23

Tiempo hrs.	Fermentador 1 g/ml	Fermentador 2 g/ml	Fermentador 3 g/ml
0	1.3	1.3	1.3
24	0.62	0.47	0.25
48	0.4	0.22	0.2
72	0.34	0.3	0.24
96	0.34	0.3	0.26
120	0.34	0.3	0.26
144	0.34	0.3	0.26
168	0.34	0.3	0.26

Secado (Método 4-A)

Temperatura: 50°C

Gráfica 24

Tiempo hrs.	Fermentador 1 gramos	Fermentador 2 gramos	Fermentador 3 gramos
0	815	850	720
6	755	790	700
12	710	735	650
18	660	685	600
24	615	640	560
30	565	600	520
36	525	555	485
42	490	515	460
48	450	480	435
54	420	450	415
60	390	420	400
66	365	400	385

(continúa)

72	345	375	380
78	330	360	375
84	325	350	380

Por tanto los parámetros de la prueba final fueron:

Aereación: 6 ft<sup>3</sup>/hr. (0.162 m<sup>3</sup>/hr)

Temperatura: 30°C

Presión de aire: 5 lb/pulg<sup>2</sup>

Velocidad de agitación: 664 r.p.m.

% GRANILLO: 10%

pH: 4.5

Hidrólisis máxima: 42.3 mg/ml (38.5%) a las 72 horas en el fermentador 1.

#### PRUEBA 4.

(Método 3-D)

Teniendo los parámetros se buscó el resultado que den todos los óptimos juntos, con la siguiente diferencia:

Fermentador 1.- Esterilizar a 20 lb/pulg<sup>2</sup> por 1 hora

Fermentador 2.- El arroz se remoja por 8 horas para ablandarlo y facilitar su hidrólisis.

Fermentador 3.- Se inocula inmediatamente después de preparar el medio, sin remojar ni esterilizar.

En ésta prueba, a los mismos tiempos que la anterior, se inocularon *S. carbajali* y *S. rimosus*. Los fermentadores 2 y 3 tuvieron una fuerte contaminación, siendo eliminados. Los resultados en el fermentador 1 fueron:

Tiempo hrs.	Azúcares reductores mg/ml	% Hidrolisis	Sólidos en 5 ml. de medio gramos	Densidad de sólidos g/ml
	<u>gráfica 25</u>	<u>gráfica 26</u>	<u>gráfica 27</u>	<u>gráfica 28</u>
0	0	0	6.0	1.2
24	18.8	11.2	2.6	0.52
48	30.0	18.2	2.0	0.41
72	36.6	22.3	2.3	0.46
96	38.5	23.4	2.5	0.5
120	35.8	-	2.2	0.44
144	31.6	-	2.1	0.42
168	28.2	-	2.1	0.42
192	25.2	-	2.1	0.42

Secado

(Método 4-A)

Gráfica 29

Temperatura Promedio: 50°C

Tiempo hrs.	Peso del Producto gramos
6	725
12	515
18	365
24	270
30	225
36	225
42	224
48	224
54	223
60	223
66	223

(continúa)

78 223

84 223

PRUEBA 5

(Método 3-E)

Fermentador con medio 1-F (pH = 4.5)

Tiempo hrs.	Azúcares reductores mg/ml	% Hidrolisis	Sólidos en 5 ml. de medio gramos	Densidad de sólidos g/ml
	<u>gráfica 30</u>	<u>gráfica 31</u>	<u>gráfica 32</u>	<u>gráfica 33</u>
0	0	0	6.0	1.2
24	16.0	9.2	3.4	0.68
48	26.4	16.1	3.2	0.64
72	33.5	20.3	2.9	0.58
96	37.6	22.8	3.0	0.60
120	34.8	-	3.1	0.62
144	30.0	-	3.1	0.62
168	24.4	-	3.1	0.62

Fermentador con medio 2-F (pH = 7)

Tiempo hrs.	Azúcares reductores mg/ml	% Hidrolisis	Sólidos en 5 ml. de medio gramos	Densidad de sólidos g/ml
	<u>gráfica 30</u>	<u>gráfica 31</u>	<u>gráfica 32</u>	<u>gráfica 33</u>
0	0	0	6.0	1.2
24	7	4.5	2.2	0.44
48	12	7.3	2.1	0.42
72	22.8	13.9	2.5	0.5
96	28.0	17.0	2.6	0.52

(continúa)

120	26.4	-	2.6	0.52
144	20.0	-	2.6	0.52
168	12.8	-	2.6	0.52
192	8.2	-	2.6	0.52

Secado

(Método 4-A)

Gráfica 34

Tiempo hrs.	Peso Producto	
	Fermentador 1 gramos	Fermentador 2 gramos
0	675	680
6	600	605
12	545	556
18	490	510
24	450	463
30	410	442
36	375	400
42	340	386
48	315	340
54	295	320
60	275	290
66	265	275
72	255	260
78	250	255
84	240	255

PRUEBA 6

(Método 3-F)

Teniendo los óptimos juntos que anteriormente se determinaron,

se trató de acortar el tiempo de procesado. Se inocularon los fermentadores con *A. oryzae*, a las cuatro horas de hidrolisis se hizo lo siguiente:

Fermentador 1.- Inoculado con *S. carbajali*

Fermentador 2.- Inoculado con *S. rimosus*

Fermentador 3.- Inoculado con *S. carbajali* y *S. rimosus*.

A las cinco horas, o sea, una hora después de la primera inoculación:

Fermentador 1.- Inoculado con *S. rimosus*

Fermentador 2.- Inoculado con *S. carbajali*.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

En las primeras siete horas:

Fermentador 1.

Tiempo hrs.	Azúcares reductores mg/ml	% Hidrolisis	Sólidos en 5 ml. de medio gramos	Densidad de sólidos g/ml
	<u>gráfica 35</u>	<u>gráfica 37</u>	<u>gráfica 39</u>	<u>gráfica 40</u>
0	0	0	5.7	1.15
1	2.5	1.5	5.7	1.15
2	5.5	3.3	5.7	1.15
3	10.0	6.1	5.7	1.15
4(*)	10.5	6.4	5.7	1.15
5(**)	10.4	6.2	5.5	1.1
6	10.3	6.1	5.2	1.04
7	9.9	6.0	5.2	1.04

(\*) Inoculación de *S. carbajali*

(\*\*) Inoculación de *S. rimosus*.

Fermentador 2

Tiempo hrs.	Azúcares reductores mg/ml	% Hidrolisis	Sólidos en 5 ml. de medio gramos	Densidad de sólidos g/ml
	<u>gráfica 35</u>	<u>gráfica 37</u>	<u>gráfica 39</u>	<u>gráfica 40</u>
0	0	0	5.7	1.15
1	2.5	1.5	5.7	1.15
2	5.5	3.3	5.7	1.15
3	9.5	5.8	5.7	1.15
4 (*)	12.0	7.3	5.7	1.15
5 (**)	12.6	7.6	5.7	1.15
6	12.3	7.4	5.7	1.15
7	11.9	7.2	5.7	1.15

(\*) Inoculación de *S. rimosus*

(\*\*) Inoculación de *S. carbajali*

Fermentador 3

Tiempo hrs.	Azúcares reductores mg/ml	% Hidrolisis	Sólidos en 5 ml. de medio gramos	Densidad de sólidos g/ml
	<u>gráfica 35</u>	<u>gráfica 37</u>	<u>gráfica 39</u>	<u>gráfica 40</u>
0	0	0	5.7	1.15
1	2.5	1.5	5.7	1.15
2	5.5	3.3	5.7	1.15
3	9.0	5.4	5.7	1.15
4(*)	11.5	7.0	5.7	1.15
5	12.0	7.3	5.7	1.15
6	11.8	7.1	5.7	1.15
7	11.5	7.0	5.7	1.15

(\*) Inoculación de *S. carbajali* y *S. rimosus*

Resultados de las fermentaciones hasta las 168 horas

Fermentador 1

Tiempo hrs.	Azucares reductores mg/ml	% Hidrolisis	Sólidos en 5 ml. de medio gramos	Densidad de sólidos g/ml
	<u>gráfica 36</u>	<u>gráfica 38</u>	<u>gráfica 39</u>	<u>gráfica 40</u>
24	14.0	8.5	1.1	0.22
48	17.4	10.5	1.6	0.32
72	19.0	11.5	1.7	0.34
96	17.8	-	1.8	0.36
120	16.0	-	1.8	0.36
144	14.0	-	1.8	0.36
168	12.2	-	1.8	0.36

Fermentador 2

Tiempo hrs.	Azucares reductores mg/ml	% Hidrolisis	Sólidos en 5 ml. de medio gramos	Densidad de sólidos g/ml
	<u>gráfica 36</u>	<u>gráfica 38</u>	<u>gráfica 39</u>	<u>gráfica 40</u>
24	16.2	9.8	1.3	0.22
48	19.4	11.8	1.65	0.32
72	19.6	11.9	1.7	0.34
96	18.8	-	1.7	0.36
120	17.0	-	1.7	0.36
144	15.2	-	1.7	0.36
168	13.2	-	1.7	0.36

Fermentador 3.

Tiempo hrs.	Azucares reductores mg/ml	% Hidrolisis	Sólidos en 5 ml. de medio gramos	Densidad de sólidos g/ml
	<u>gráfica 36</u>	<u>gráfica 38</u>	<u>gráfica 39</u>	<u>gráfica 40</u>
24	18.6	11.2	1.5	0.30
48	18.8	11.4	1.7	0.34
72	17.8	-	1.9	0.38
96	16.4	-	2.0	0.40
120	15.0	-	2.0	0.40
144	14.8	-	2.0	0.40
168	13.4	-	2.0	0.40

Secado

(Método 4-A)

Gráfica 41

Temperatura Promedio: 50°C

Se reporta peso del producto.

Tiempo hrs.	Fermentador 1 gramos	Fermentador 2 gramos	Fermentador 3 gramos
0	630	610	685
6	585	560	610
12	540	515	575
18	510	480	530
24	475	450	500
30	440	410	465
36	415	380	440
42	390	350	415
48	370	320	395
54	350	290	375

(continúa)

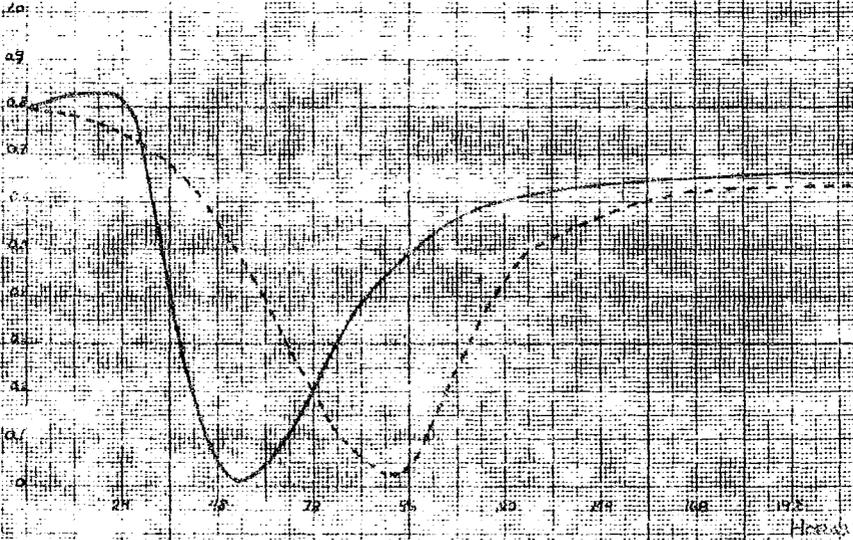
60	335	270	360
66	325	255	350
72	315	245	345
78	310	235	340
84	300	225	335

# Gráfico 1

Consumo de glucosa e formación de almidón por *Aspergillus oryzae* en levadura de semilla 1:5 (titulación)

— MATRICES CON MANDARIN  
- - - MATRICES SIN MANDARIN

mg/ml 1%



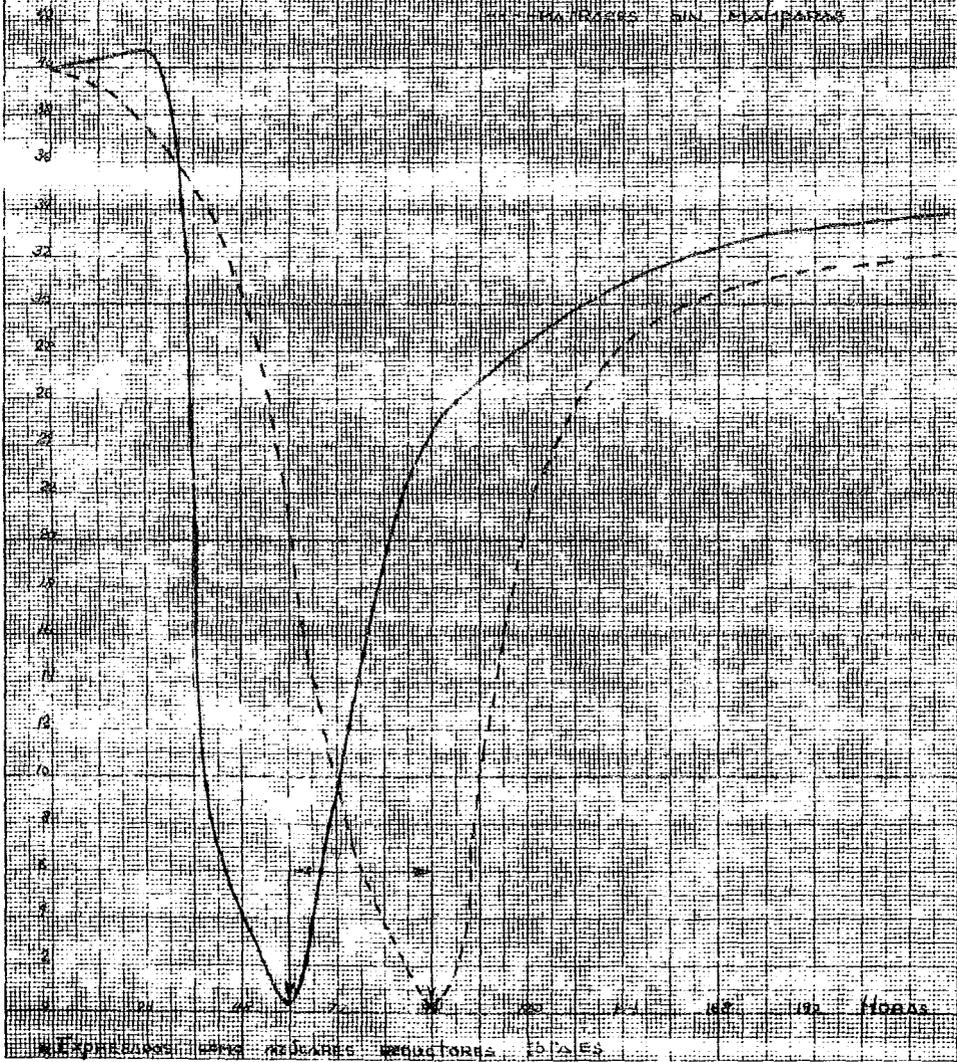
18) Expresado como azúcares reducidos totales

GRÁFICA 2

CONSUMO DE VAPOR Y HIDRÓLISIS DE ALUMINIO EN HIERRO 1-5

kg/m<sup>3</sup> (media)

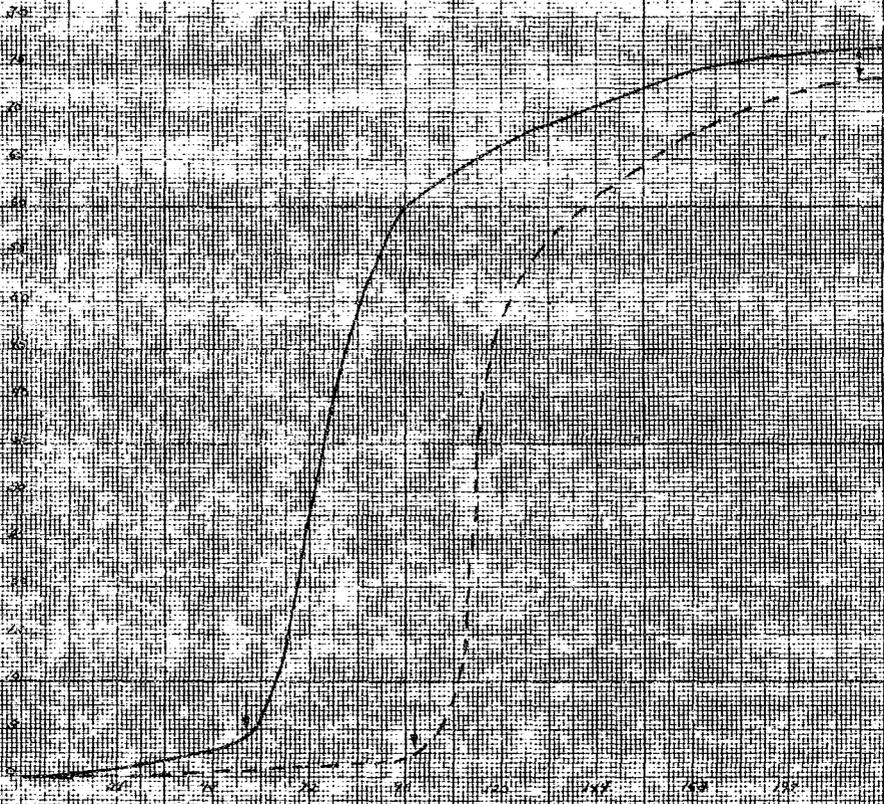
— MATRICES CON MATRICES  
- - - MATRICES SIN MATRICES



GRAPH 3

26.000 LIBROS EN MEDIO = 5  
DOS APERTURAS DE 2500  
CON MARMARA  
Y CON MARMARA

26.000 LIBROS



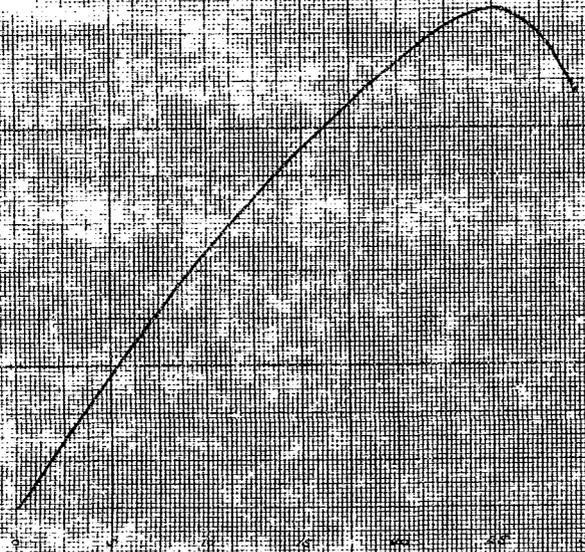
GRANDEZAS DE MARMARA 44 metros

GRAPHA 2

EVOLUCION EN MESES DEL GASTO DE  
LOS QUINCE AÑOS (27 AÑOS  
ANTICIPADOS CON INFLACION)

MESES GASTOS DE  
DUC FORÉS TERCALES

30.00  
29.75  
29.50  
29.25  
29.00  
28.75  
28.50  
28.25  
28.00  
27.75  
27.50  
27.25  
27.00  
26.75  
26.50  
26.25  
26.00  
25.75  
25.50  
25.25  
25.00

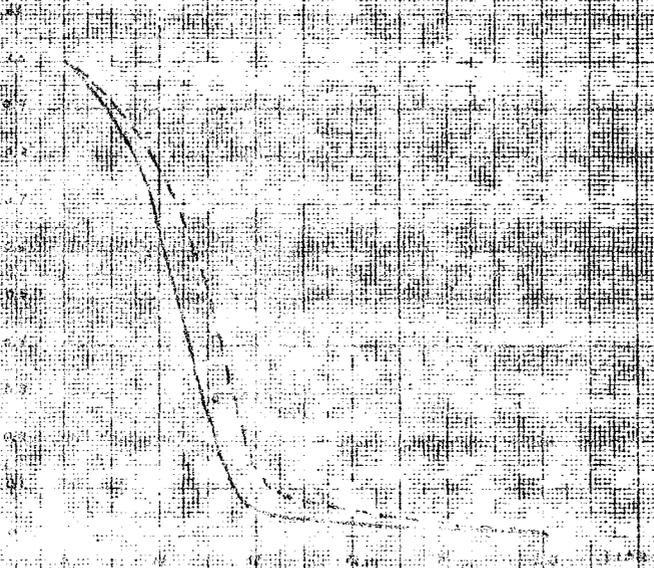


27 AÑOS

Figure 5

CS 1740 NO 2012 03 25 002  
SACRAMENTO COUNTY CALIFORNIA  
CITY OF SACRAMENTO  
SACRAMENTO COUNTY

ng/ml  
Kudapan  
Kudapan



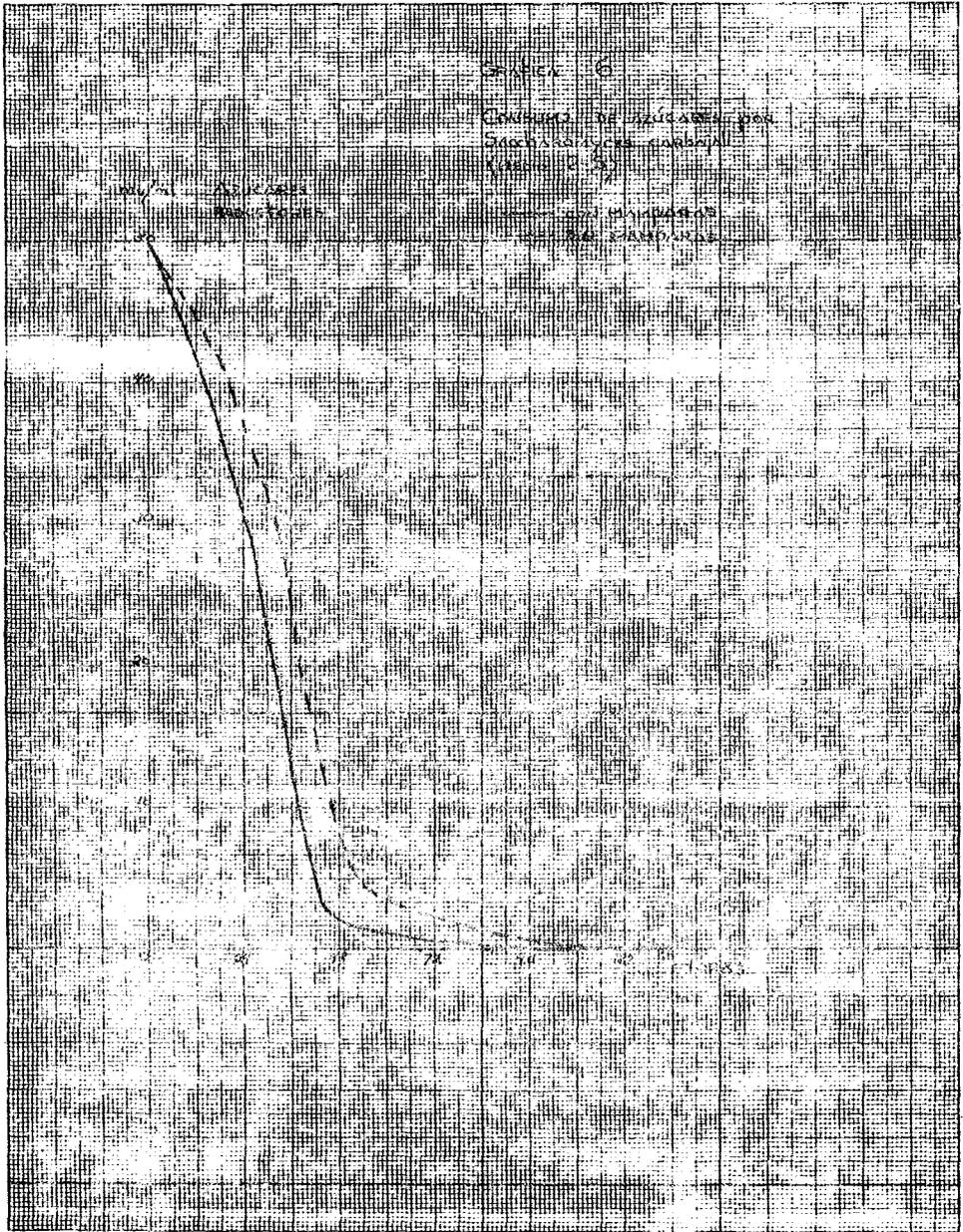


GRÁFICO 7

INDICADORES DE CALIDAD POR  
SECTOR ECONÓMICO EN  
PERU S.A. (1970-1975)

INDICADORES DE CALIDAD POR SECTOR ECONÓMICO EN PERU S.A. (1970-1975)

INDICADORES DE CALIDAD POR SECTOR ECONÓMICO EN PERU S.A. (1970-1975)

INDICADORES DE CALIDAD POR SECTOR ECONÓMICO EN PERU S.A. (1970-1975)

INDICADORES DE CALIDAD POR SECTOR ECONÓMICO EN PERU S.A. (1970-1975)

INDICADORES DE CALIDAD POR SECTOR ECONÓMICO EN PERU S.A. (1970-1975)

INDICADORES DE CALIDAD POR SECTOR ECONÓMICO EN PERU S.A. (1970-1975)

INDICADORES DE CALIDAD POR SECTOR ECONÓMICO EN PERU S.A. (1970-1975)

INDICADORES DE CALIDAD POR SECTOR ECONÓMICO EN PERU S.A. (1970-1975)

INDICADORES DE CALIDAD POR SECTOR ECONÓMICO EN PERU S.A. (1970-1975)

INDICADORES DE CALIDAD POR SECTOR ECONÓMICO EN PERU S.A. (1970-1975)

INDICADORES DE CALIDAD POR SECTOR ECONÓMICO EN PERU S.A. (1970-1975)

INDICADORES DE CALIDAD POR SECTOR ECONÓMICO EN PERU S.A. (1970-1975)

INDICADORES DE CALIDAD POR SECTOR ECONÓMICO EN PERU S.A. (1970-1975)

INDICADORES DE CALIDAD POR SECTOR ECONÓMICO EN PERU S.A. (1970-1975)

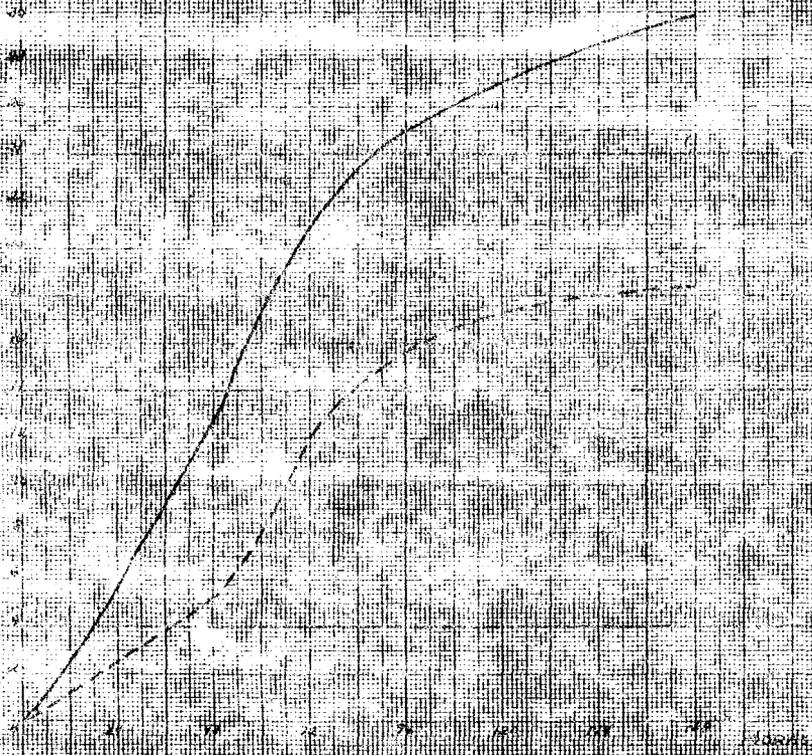
INDICADORES DE CALIDAD POR SECTOR ECONÓMICO EN PERU S.A. (1970-1975)

Graph 8

ANALYSIS FOR AMMONIA ON  
ASCERGILLUS ORYZAE CULTURE

100% AMMONIA  
- 50% AMMONIA

mg/ml Azocare  
RESULTS

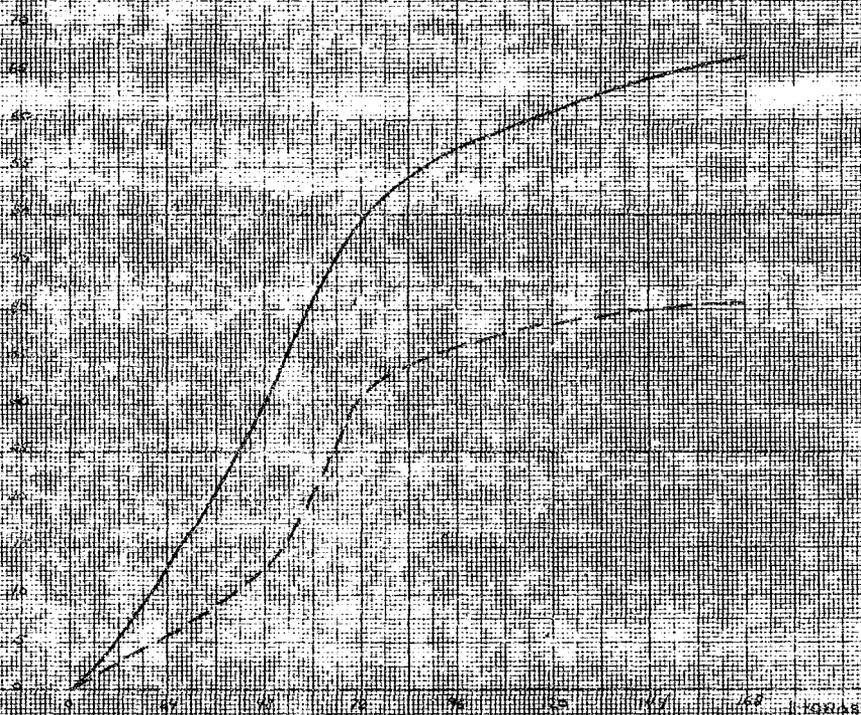


GRAFIK 9

% DE FISHOLAR EN UNO  
SA, PISA A. 2012

CON MARCHAS  
DE 50% Y 100%

% FISHOLAR

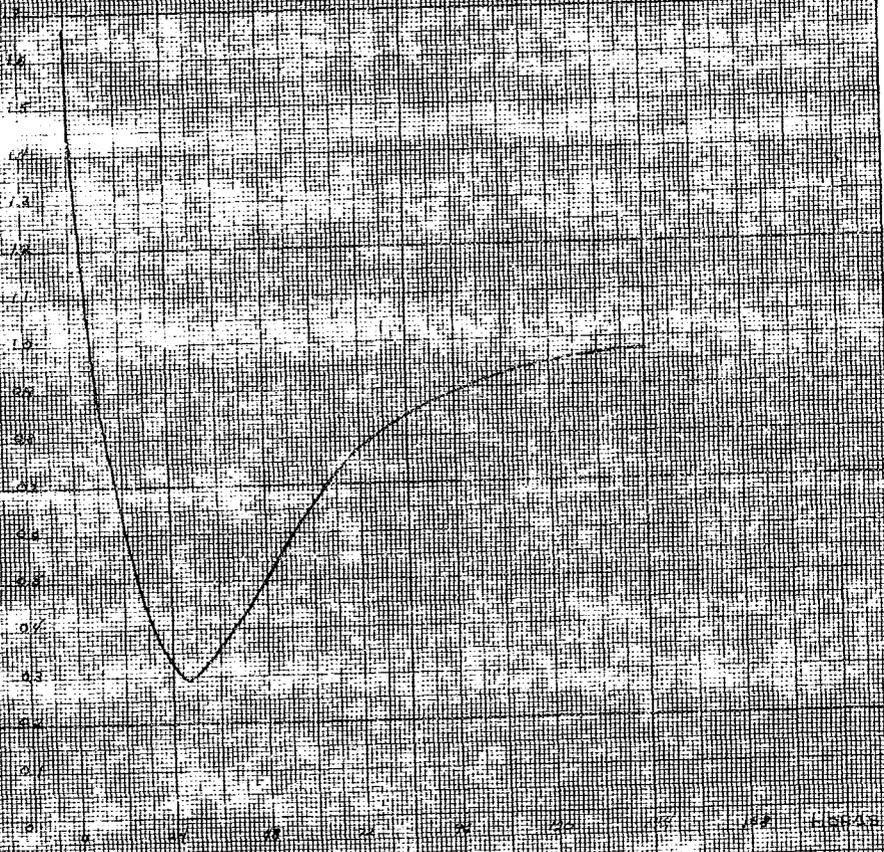


Marcha 50% y 100%

Gráfica 10

GRABOS DE SÓLIDOS  
EN CADA UNO DE LOS  
DÍAS

AUMENTO DE MUELLO EN  
CADA UNO DE LOS DÍAS CON A. ODY 2%



GRAFICA II

SENSIBILIDAD DE ASIMETRIA EN  
EL TIEMPO DE LOS ALUMINOS

$\rho = 5/11$

0.45

0.4

0.35

0.3

0.25

0.2

0.15

0.1

0

27

36

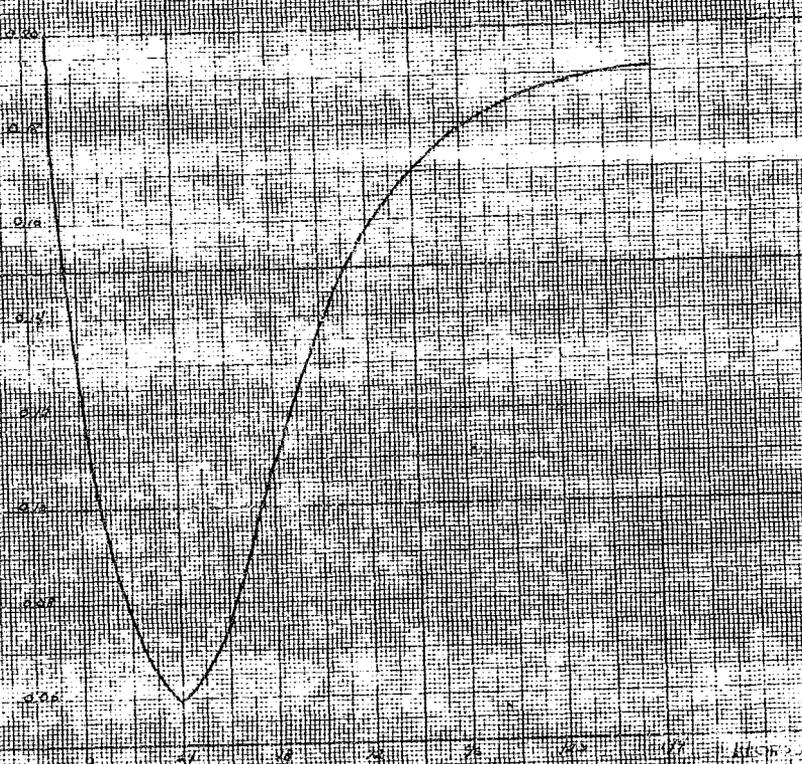
45

54

63

72

TIEMPO



GRAFICA 12

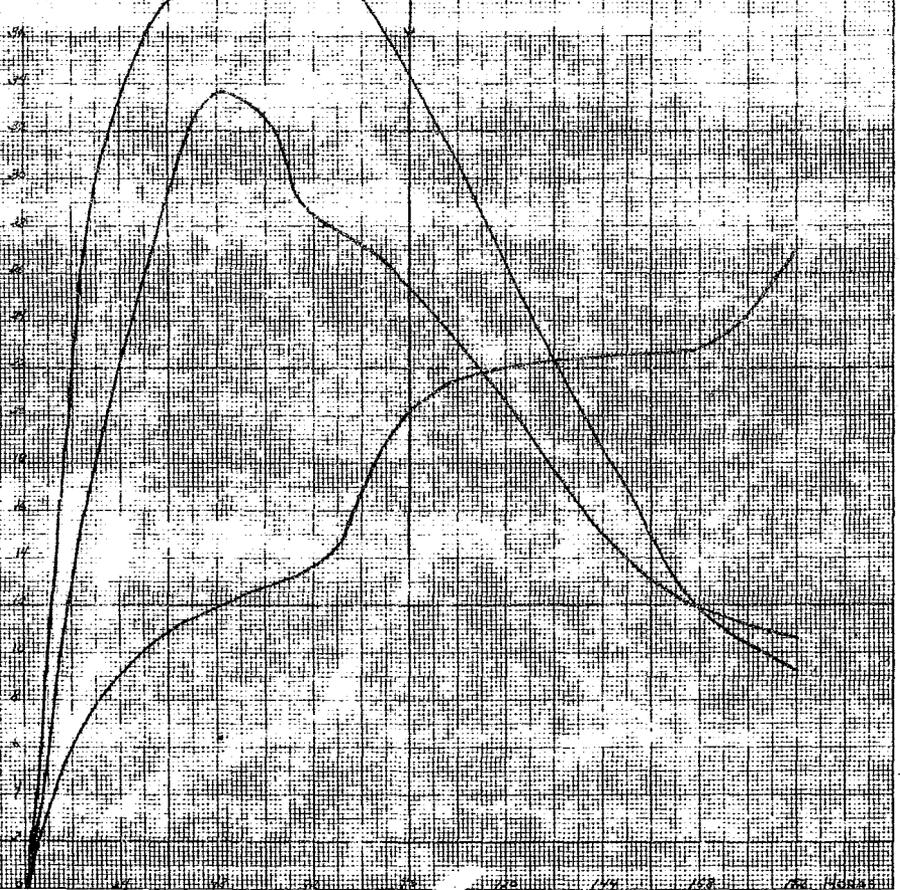
ANÁLISIS DE LA MIERDA POR LA DIFUSIÓN  
Y CONSUMO DE NITRÓGENO POR S. GAN-  
BARI EN MEDIO F-F

PRUEBA 1

ANÁLISIS  
DE MIERDA

100  
90  
80  
70  
60  
50  
40  
30  
20  
10  
0

MEJORA  
DE PASA/AI

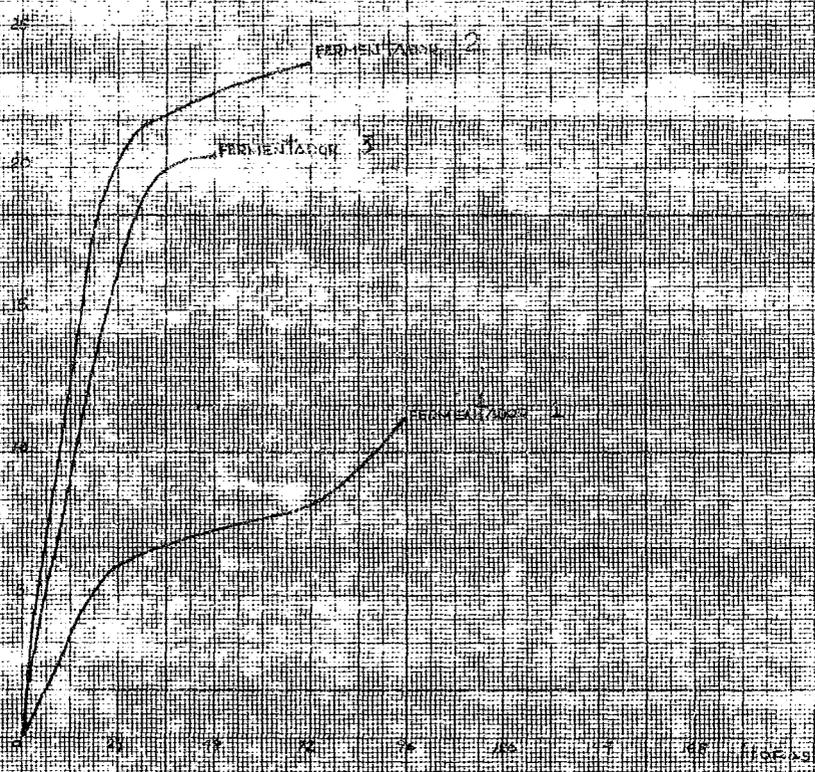


Graphica 3

% Fibrositas em FOLICULOS ANDRES

% Fibrositas

Exposura



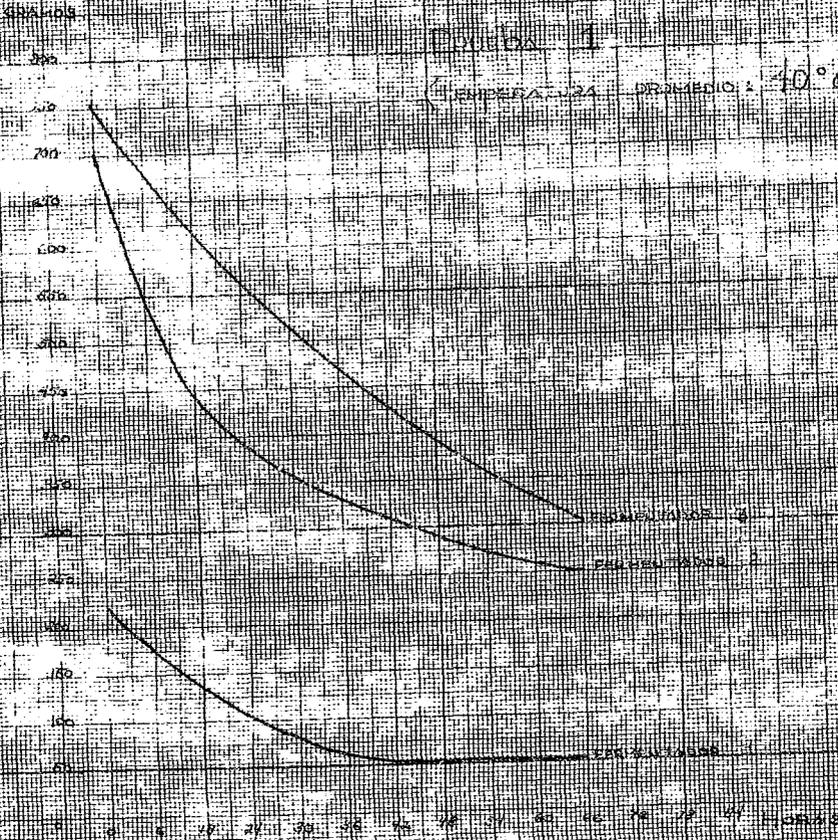
Base: 00 165/05 m/v (Análisis subcutánea 10 días)

GRÁFICA N.º

SECADO DE PRODUCTO DE FERMENTACIÓN

EXPERIMENTO N.º 1

TEMPERATURA PROMEDIO: 40°C



Gráfica 15

INDICIOS EN FERMENTADORES

Prueba 2

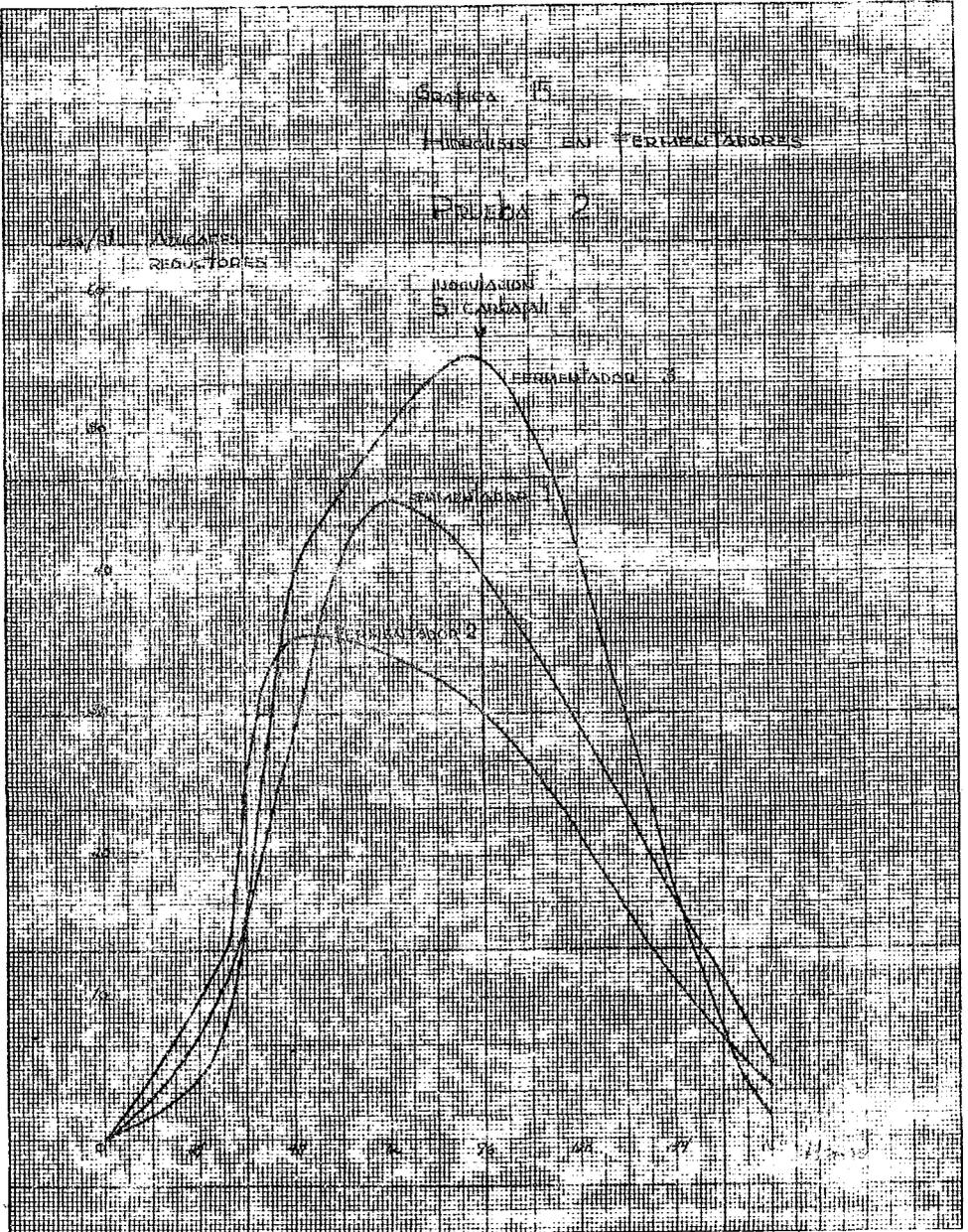
INDICACION  
REGULADORES

INDICACION  
5 CARBONATI

FERMENTADOR 3

FERMENTADOR

FERMENTADOR 2

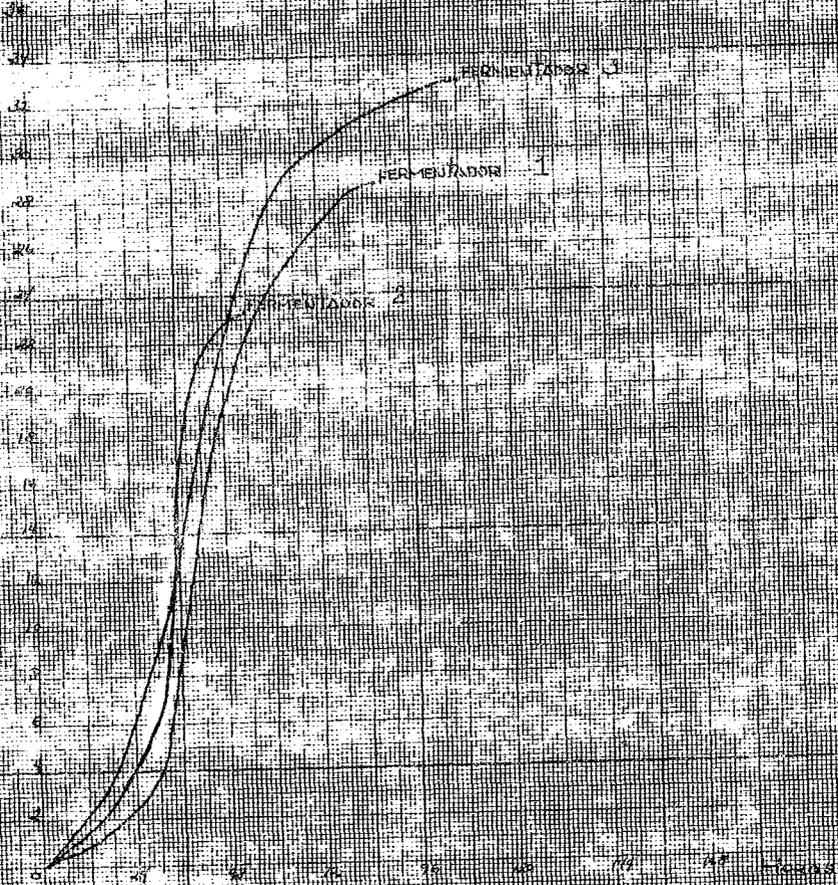


GRAFICA 16

% Hidrolisis

% HIDROLISIS EN FERMENTACION

PRUEBA 2

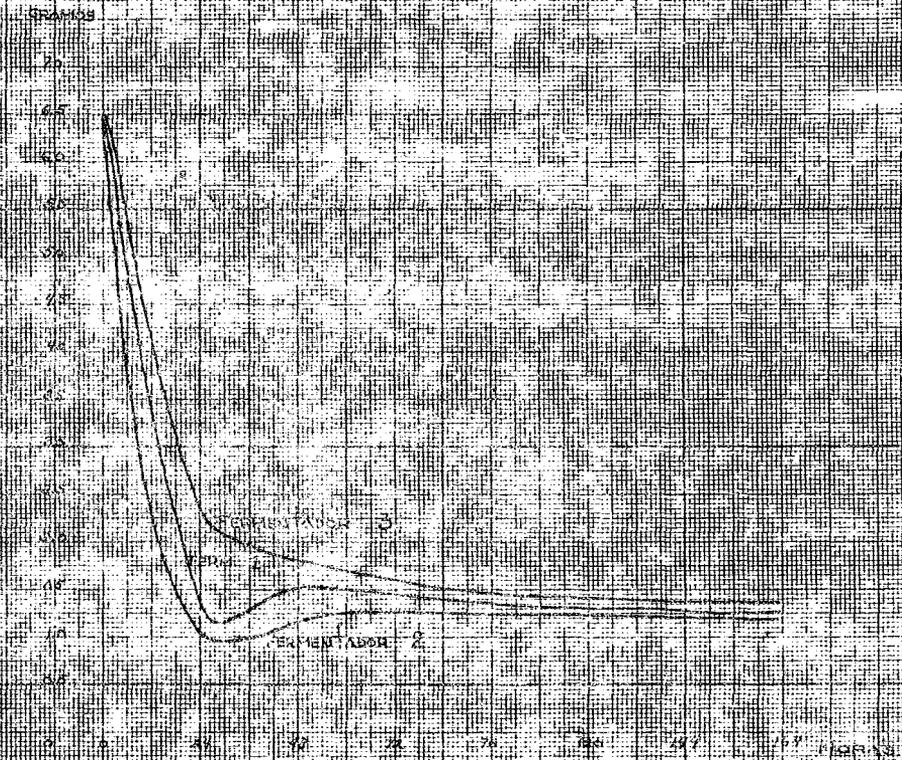


BASE: 100% = 165 GRAS (ALUMENOS REDUCTORES 100%)

Gráfica 7

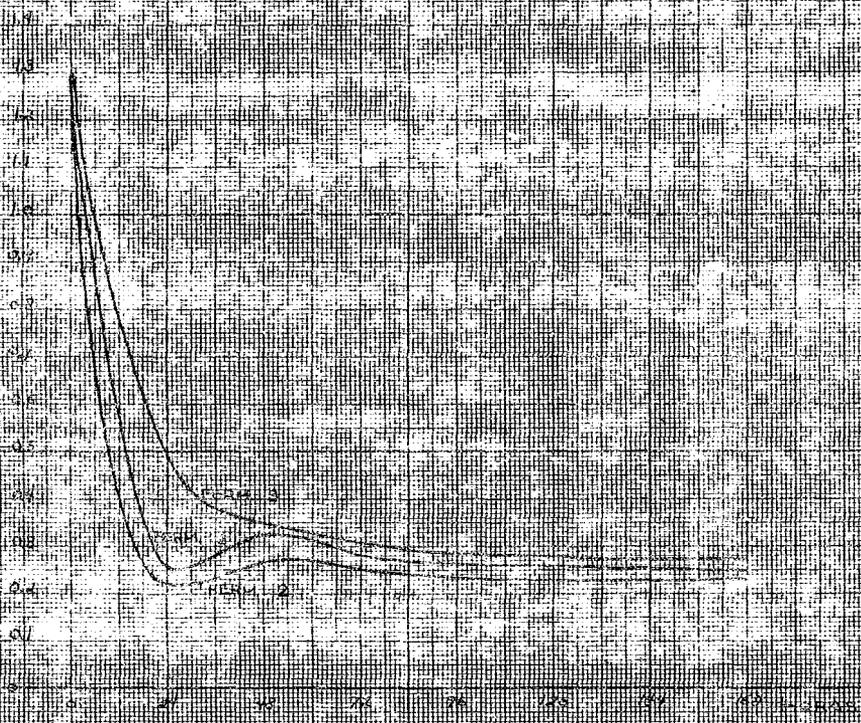
AUMENTO DE SÓLIDOS EN  
5 ml. DE MEDIO

EXPERIMENTO 2



GRÁFICA 18  
 SENSIBILIDAD DE SOLUCIONES  
 EN FERMENTADORES  
 DE CERVEZA

0.2%

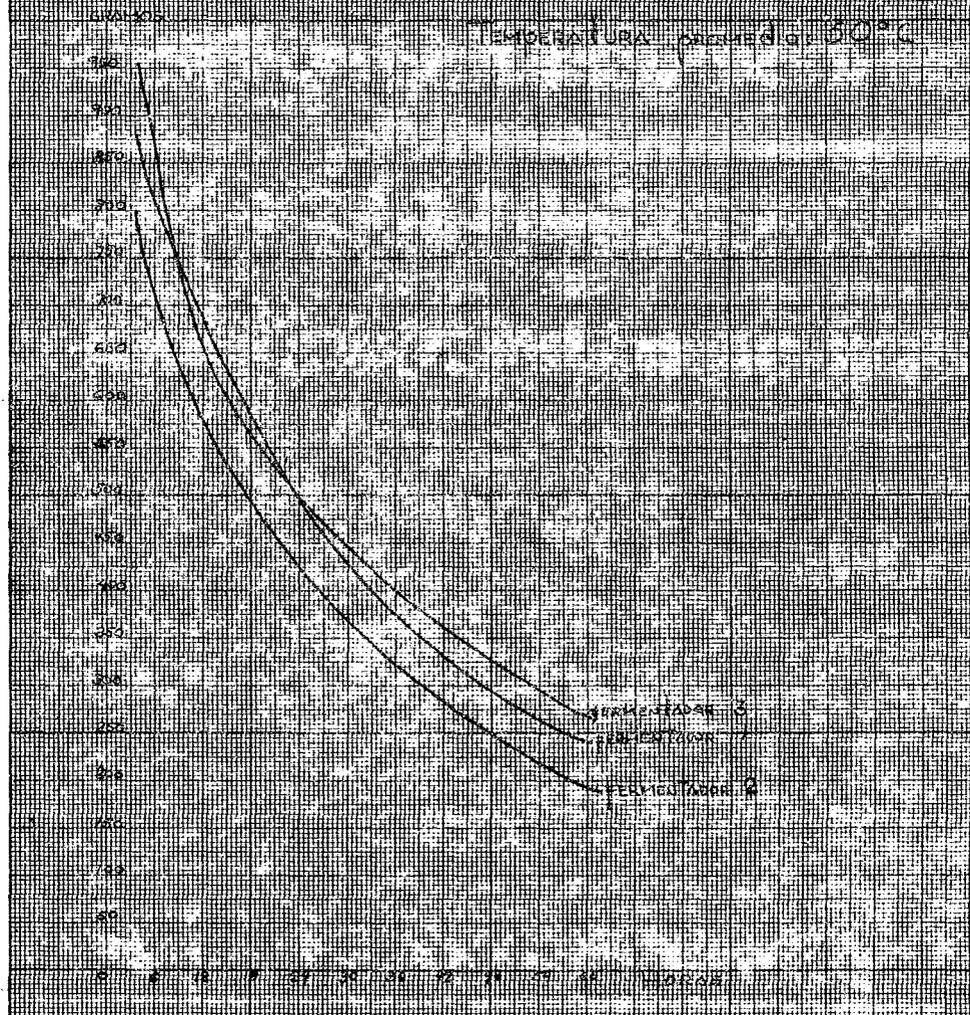


GRAFICA 9

GRABO DE PRODUCTO DE FERMENTACION

PRUEBA 2

TEMPERATURA MANTENIDA 30°C

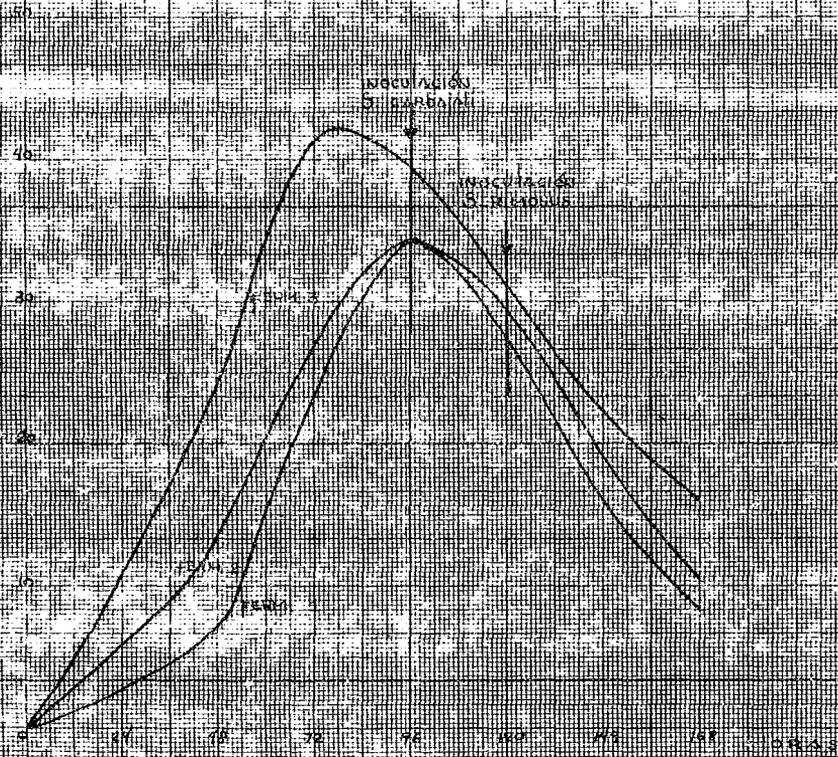


GRAFICA 20

INDICES EN FERMENTADORES

GRUPO A

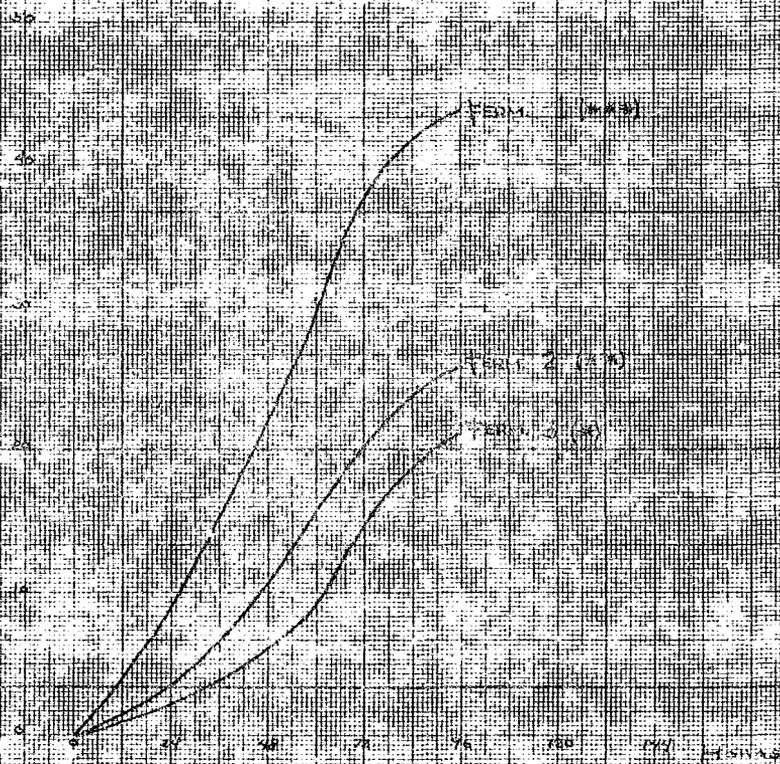
AS/OL KOUFARAS  
REDUCTORES



GRAFICA 21

% Hidrolisis en los fermentadores  
Prueba 3

% Hidrolisis



(*)	BASE	100%	=	10 mg/ml	(AZUCARES REDUCIDOS TOTALES)
(**)	BASE	100%	=	7.2 mg/ml	(AZUCARES REDUCIDOS TOTALES)
(***)	BASE	100%	=	16.0 mg/ml	(AZUCARES REDUCIDOS TOTALES)

Gráfica 22

Aumento de salinas  
en el S. de Uru

Prueba 3

GRADOS

20

18

16

14

12

10

8

6

4

2

0

-2

-4

-6

-8

-10

-12

-14

-16

-18

-20

-22

-24

-26

-28

-30

-32

-34

-36

-38

-40

-42

-44

-46

-48

-50

-52

-54

-56

0

20

40

60

80

100

120

140

160

HORAS

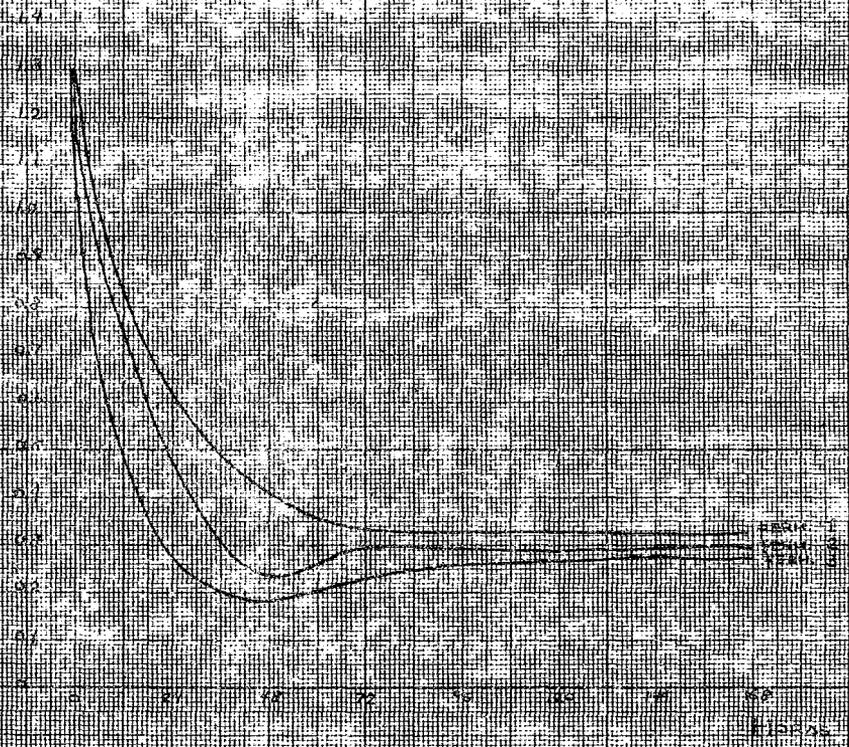
Prueba 1  
Prueba 2  
Prueba 3

График 23

Судьба аборигена  
из племени...

Рисунки 3

0,5/4



GRAFICA 124

SECAO DE PRODUCTO DE FERMENTACAO

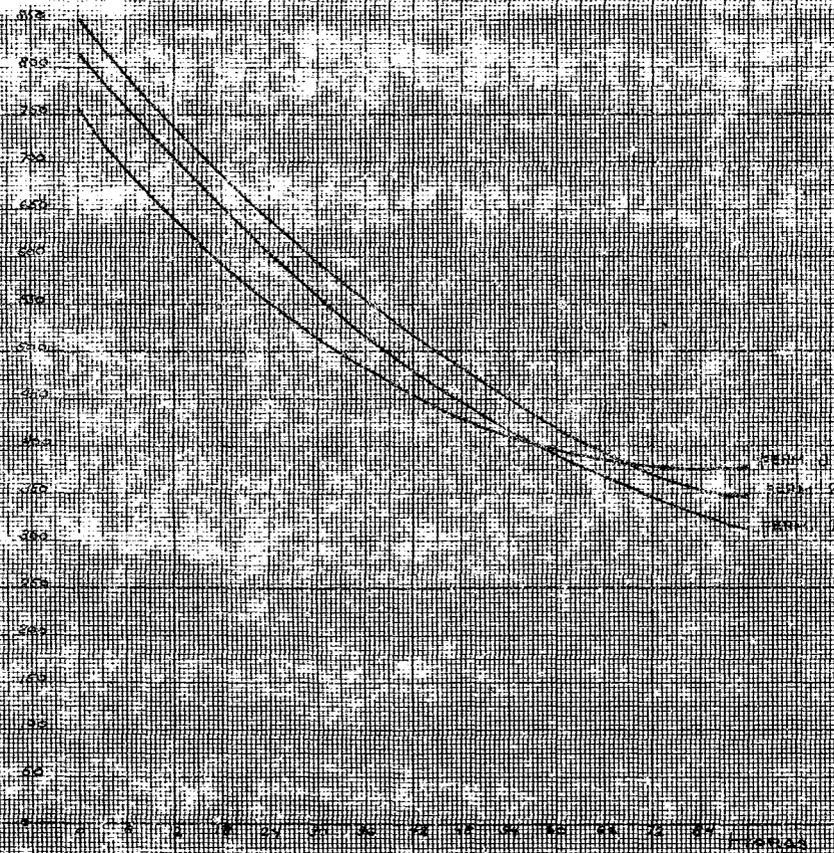
REJUBO 0

TEMPERATURA PROMEDIA 50°C

GRAMOS

900  
850  
800  
750  
700  
650  
600  
550  
500  
450  
400  
350  
300  
250  
200  
150  
100  
50  
0

0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 HORAS



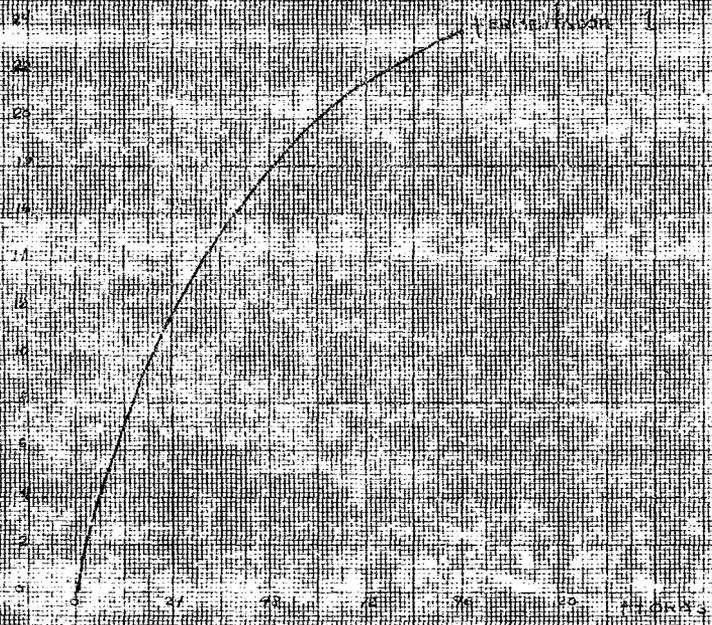


Gráfica 26

% de Hidroxisis  
Cuerpo 1-F

Pruebas 2

% Hidroxisis



Base: 10084 + 10 kg/l

Los cuerpos 2 y 3 se eliminaron

GRAFICA 27

OBJETOS EN SU DE ARIBA

PRUEBA 14

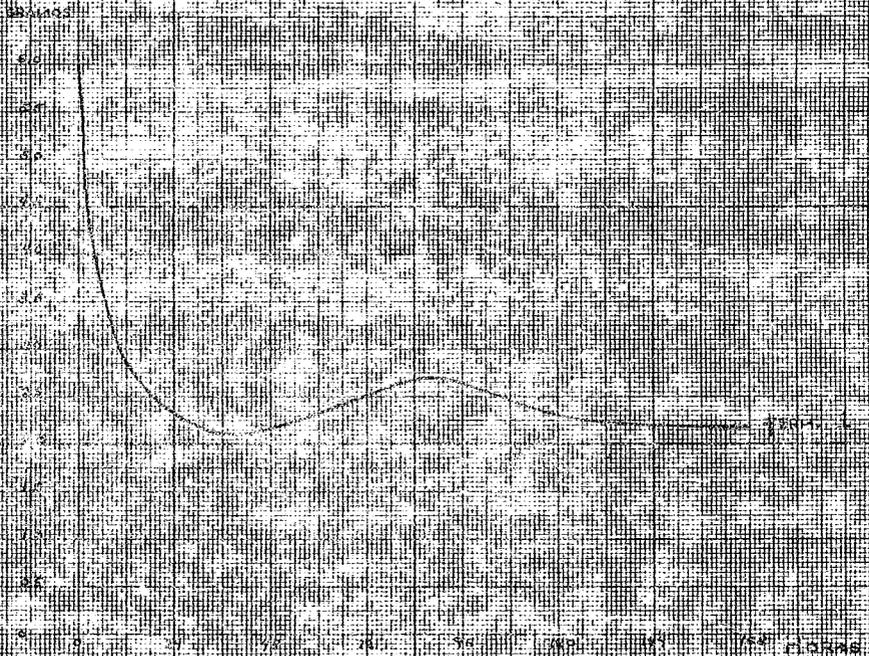


Gráfico 28

Número de horas  
de curso (H)

Problema 1

Q (ml/min)

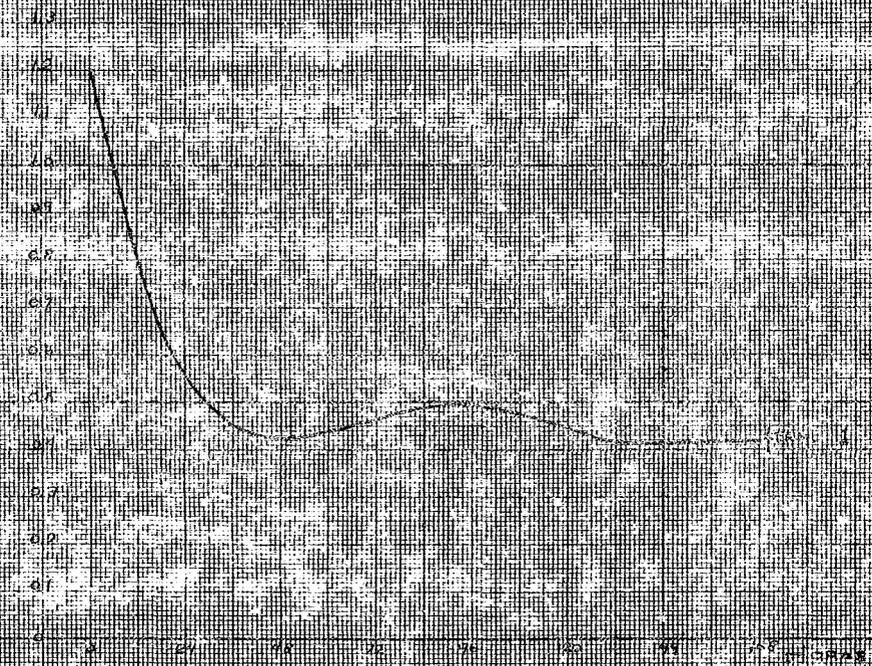


Gráfico 29

SERIE DE DATOS

GRUPO 4

Grupos

300  
280  
260  
240  
220  
200  
180  
160  
140  
120  
100  
80  
60  
40  
20  
0

0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100

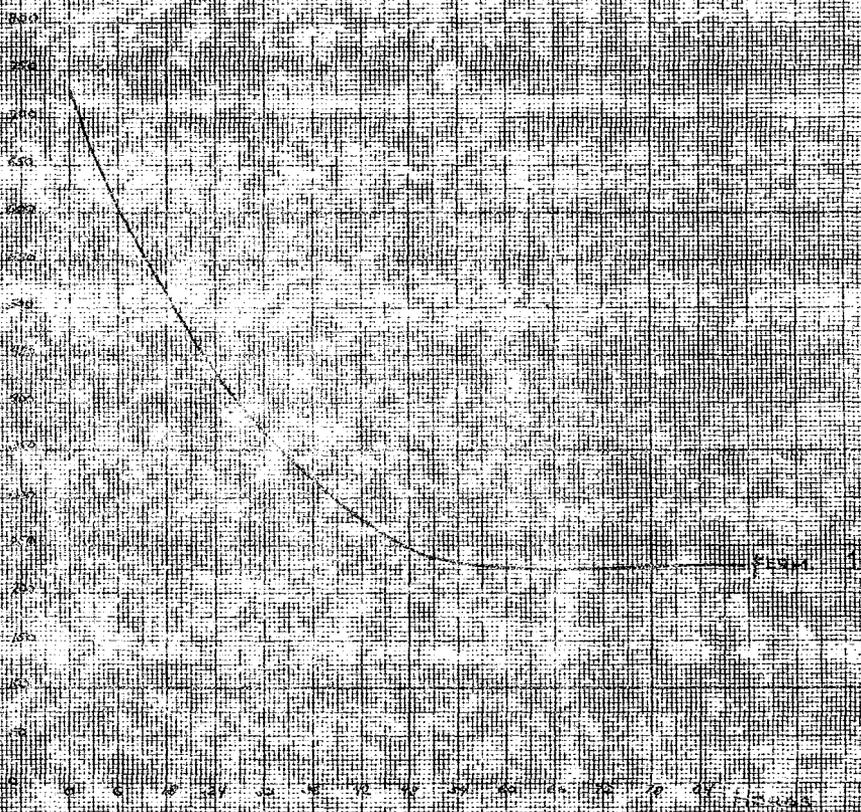
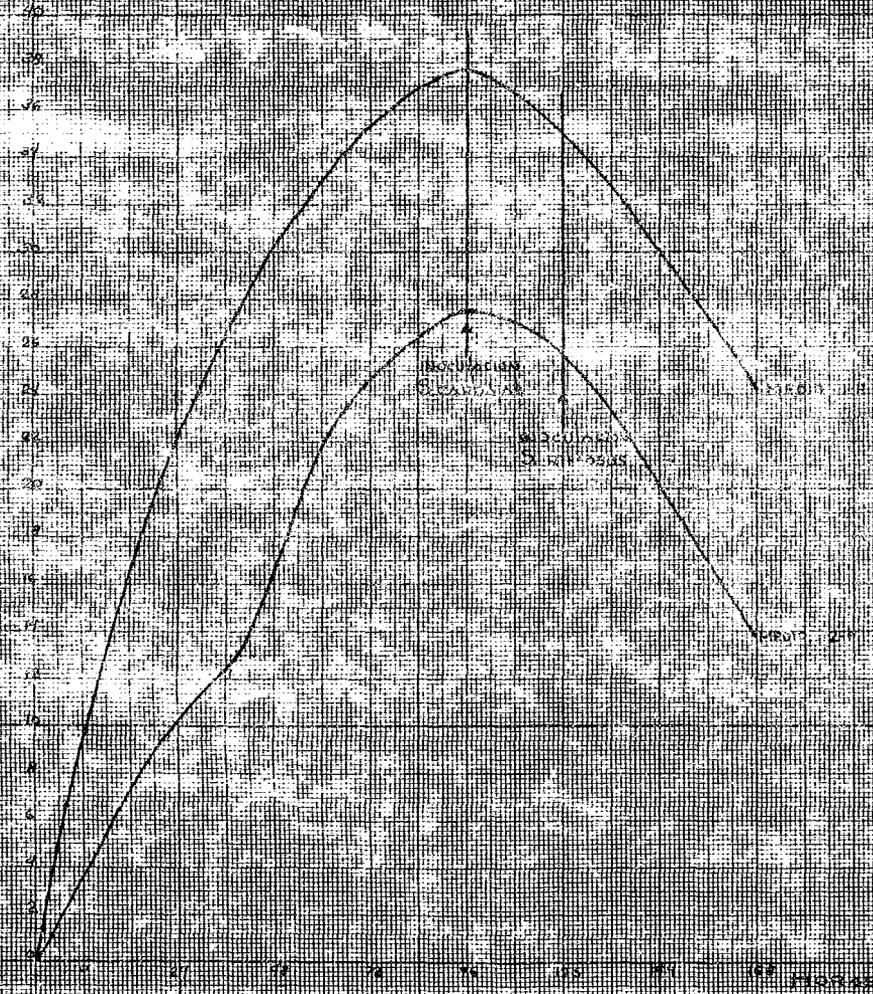


Gráfico 30

Flujo de calor y conductividad

PRUEBA 5

Flujo de calor  
conductores



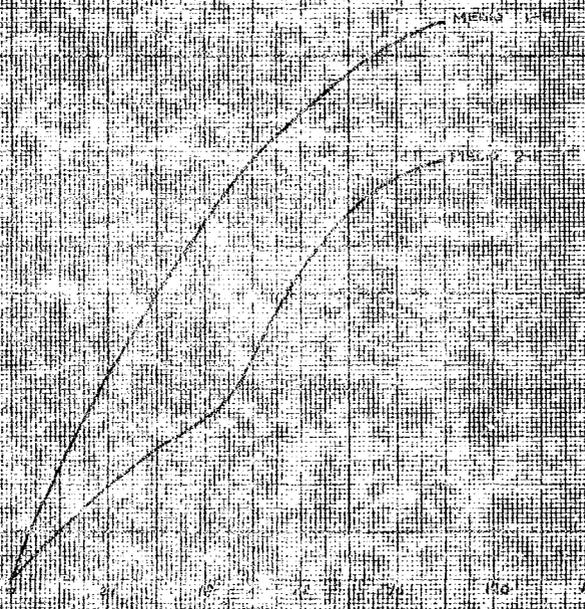
Gráfica 31

26 toneladas

Prueba 5

% Humedad

10  
20  
30  
40  
50  
60  
70  
80  
90  
100



BASE = 100% = 100 g/m<sup>3</sup>

ALUCANES REDUCTORES 100 g/m<sup>3</sup>

Gráfico 32

Solubilidad 5 ml. de agua

Prueba D

g/ml

20

10

0

-10

-20

-30

-40

-50

-60

-70

-80

-90

-100

-110

-120

-130

-140

-150

-160

-170

-180

-190

-200

-210

-220

-230

-240

-250

-260

-270

-280

-290

-300

-310

-320

-330

-340

-350

-360

-370

-380

-390

-400

-410

-420

-430

-440

-450

-460

-470

-480

-490

-500

-510

-520

-530

-540

-550

-560

-570

-580

-590

-600

-610

-620

-630

-640

-650

-660

-670

-680

-690

-700

-710

-720

-730

-740

-750

-760

-770

-780

-790

-800

-810

-820

-830

-840

-850

-860

-870

-880

-890

-900

-910

-920

-930

-940

-950

-960

-970

-980

-990

-1000

-1010

-1020

-1030

-1040

-1050

-1060

-1070

-1080

-1090

-1100

-1110

-1120

-1130

-1140

-1150

-1160

-1170

-1180

-1190

-1200

-1210

-1220

-1230

-1240

-1250

-1260

-1270

-1280

-1290

-1300

-1310

-1320

-1330

-1340

-1350

-1360

-1370

-1380

-1390

-1400

-1410

-1420

-1430

-1440

-1450

-1460

-1470

-1480

-1490

-1500

-1510

-1520

-1530

-1540

-1550

-1560

-1570

-1580

-1590

-1600

-1610

-1620

-1630

-1640

-1650

-1660

-1670

-1680

-1690

-1700

-1710

-1720

-1730

-1740

-1750

-1760

-1770

-1780

-1790

-1800

-1810

-1820

-1830

-1840

-1850

-1860

-1870

-1880

-1890

-1900

-1910

-1920

-1930

-1940

-1950

-1960

-1970

-1980

-1990

-2000

-2010

-2020

-2030

-2040

-2050

-2060

-2070

-2080

-2090

-2100

-2110

-2120

-2130

-2140

-2150

-2160

-2170

-2180

-2190

-2200

-2210

-2220

-2230

-2240

-2250

-2260

-2270

-2280

-2290

-2300

-2310

-2320

-2330

-2340

-2350

-2360

-2370

-2380

-2390

-2400

-2410

-2420

-2430

-2440

-2450

-2460

-2470

-2480

-2490

-2500

-2510

-2520

-2530

-2540

-2550

-2560

-2570

-2580

-2590

-2600

-2610

-2620

-2630

-2640

-2650

-2660

-2670

-2680

-2690

-2700

-2710

-2720

-2730

-2740

-2750

-2760

-2770

-2780

-2790

-2800

-2810

-2820

-2830

-2840

-2850

-2860

-2870

-2880

-2890

-2900

-2910

-2920

-2930

-2940

-2950

-2960

-2970

-2980

-2990

-3000

-3010

-3020

-3030

-3040

-3050

-3060

-3070

-3080

-3090

-3100

-3110

-3120

-3130

-3140

-

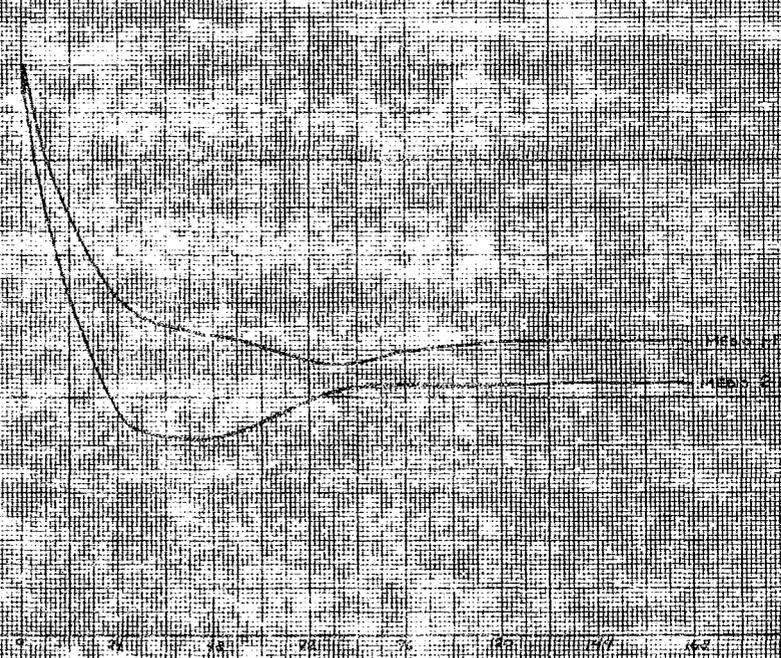
Gráfica 33

DETERMINACIÓN DE SOLUCIONES EN MEDIO

PRUEBA 5

$\sigma(\text{CAL})$

100  
90  
80  
70  
60  
50  
40  
30  
20  
10  
0



PRUEBA 1  
PRUEBA 2

GRÁFICA 34

SECADO DE PRODUCTO

Prueba 5

TEMPERATURA PROMEDIO 50°C

GRAMOS

100

90

80

70

60

50

40

30

20

10

0

100

110

120

130

140

150

160

170

180

190

200

210

220

230

240

250

260

270

280

290

300

310

320

330

340

350

360

370

380

390

400

410

420

430

440

450

460

470

480

490

500

510

520

530

540

550

560

570

580

590

600

610

620

630

640

650

660

670

680

690

700

710

720

730

740

750

760

770

780

790

800

810

820

830

840

850

860

870

880

890

900

910

920

930

940

950

960

970

980

990

1000

1010

1020

1030

1040

1050

1060

1070

1080

1090

1100

1110

1120

1130

1140

1150

1160

1170

1180

1190

1200

1210

1220

1230

1240

1250

1260

1270

1280

1290

1300

1310

1320

1330

1340

1350

1360

1370

1380

1390

1400

1410

1420

1430

1440

1450

1460

1470

1480

1490

1500

1510

1520

1530

1540

1550

1560

1570

1580

1590

1600

1610

1620

1630

1640

1650

1660

1670

1680

1690

1700

1710

1720

1730

1740

1750

1760

1770

1780

1790

1800

1810

1820

1830

1840

1850

1860

1870

1880

1890

1900

1910

1920

1930

1940

1950

1960

1970

1980

1990

2000

2010

2020

2030

2040

2050

2060

2070

2080

2090

2100

2110

2120

2130

2140

2150

2160

2170

2180

2190

2200

2210

2220

2230

2240

2250

2260

2270

2280

2290

2300

2310

2320

2330

2340

2350

2360

2370

2380

2390

2400

2410

2420

2430

2440

2450

2460

2470

2480

2490

2500

2510

2520

2530

2540

2550

2560

2570

2580

2590

2600

2610

2620

2630

2640

2650

2660

2670

2680

2690

2700

2710

2720

2730

2740

2750

2760

2770

2780

2790

2800

2810

2820

2830

2840

2850

2860

2870

2880

2890

2900

2910

2920

2930

2940

2950

2960

2970

2980

2990

3000

3010

3020

3030

3040

3050

3060

3070

3080

3090

3100

3110

3120

3130

3140

GRUPO 33

PROBETA EN LAS PROBAS 7 HORAS

PRUEBA 6

PROBETA INOCULADA  
RIBOSOMAS

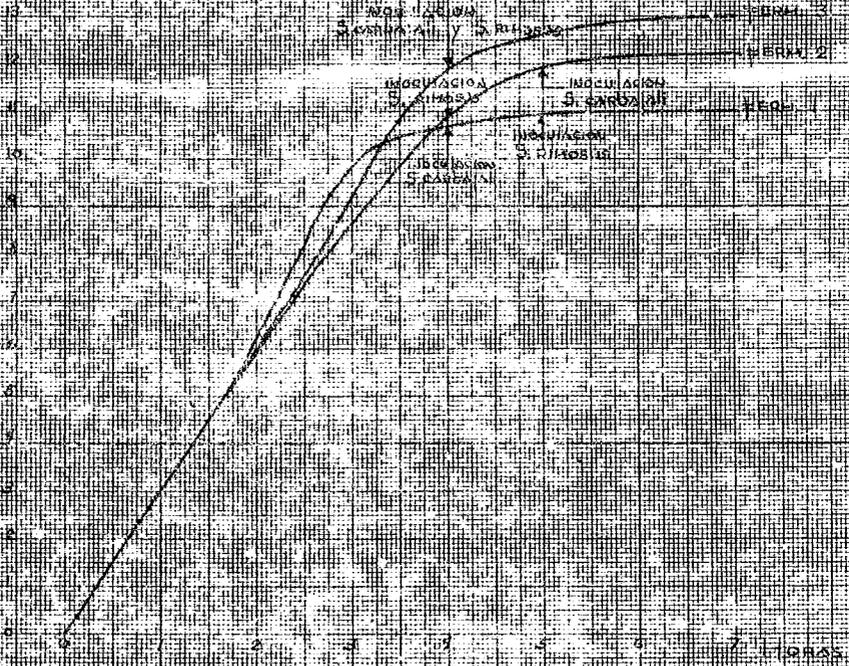


Gráfico 36

Índices y consumo de  
AQUÍFEROS

PALEOZOICO

1940

1941

1942

1943

1944

1945

1946

1947

1948

1949

1950

1951

1952

1953

1954

1955

1956

1957

1958

1959

1960

1961

1962

1963

1964

1965

1966

1967

1968

1969

1970

1971

1972

1973

1974

1975

1976

1977

1978

1979

1980

1981

1982

1983

1984

1985

1986

1987

1988

1989

1990

1991

1992

1993

1994

1995

1996

1997

1998

1999

2000

2001

2002

2003

2004

2005

2006

2007

2008

2009

2010

2011

2012

2013

2014

2015

2016

2017

2018

2019

2020

2021

2022

2023

2024

2025

2026

2027

2028

2029

2030

2031

2032

2033

2034

2035

2036

2037

2038

2039

2040

2041

2042

2043

2044

2045

2046

2047

2048

2049

2050

2051

2052

2053

2054

2055

2056

2057

2058

2059

2060

2061

2062

2063

2064

2065

2066

2067

2068

2069

2070

2071

2072

2073

2074

2075

2076

2077

2078

2079

2080

2081

2082

2083

2084

2085

2086

2087

2088

2089

2090

2091

2092

2093

2094

2095

2096

2097

2098

2099

2100

2101

2102

2103

2104

2105

2106

2107

2108

2109

2110

2111

2112

2113

2114

2115

2116

2117

2118

2119

2120

2121

2122

2123

2124

2125

2126

2127

2128

2129

2130

2131

2132

2133

2134

2135

2136

2137

2138

2139

2140

2141

2142

2143

2144

2145

2146

2147

2148

2149

2150

2151

2152

2153

2154

2155

2156

2157

2158

2159

2160

2161

2162

2163

2164

2165

2166

2167

2168

2169

2170

2171

2172

2173

2174

2175

2176

2177

2178

2179

2180

2181

2182

2183

2184

2185

2186

2187

2188

2189

2190

2191

2192

2193

2194

2195

2196

2197

2198

2199

2200

2201

2202

2203

2204

2205

2206

2207

2208

2209

2210

2211

2212

2213

2214

2215

2216

2217

2218

2219

2220

2221

2222

2223

2224

2225

2226

2227

2228

2229

2230

2231

2232

2233

2234

2235

2236

2237

2238

2239

2240

2241

2242

2243

2244

2245

2246

2247

2248

2249

2250

2251

2252

2253

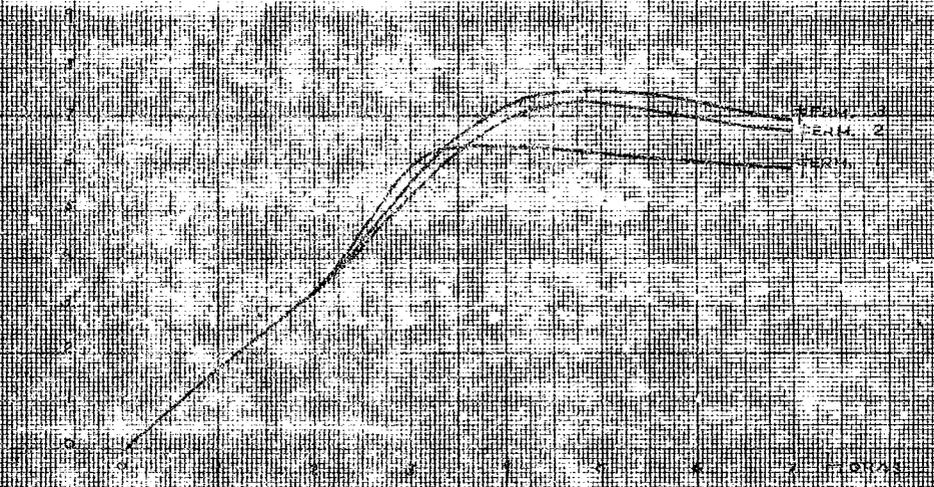
2254

Seiten 31

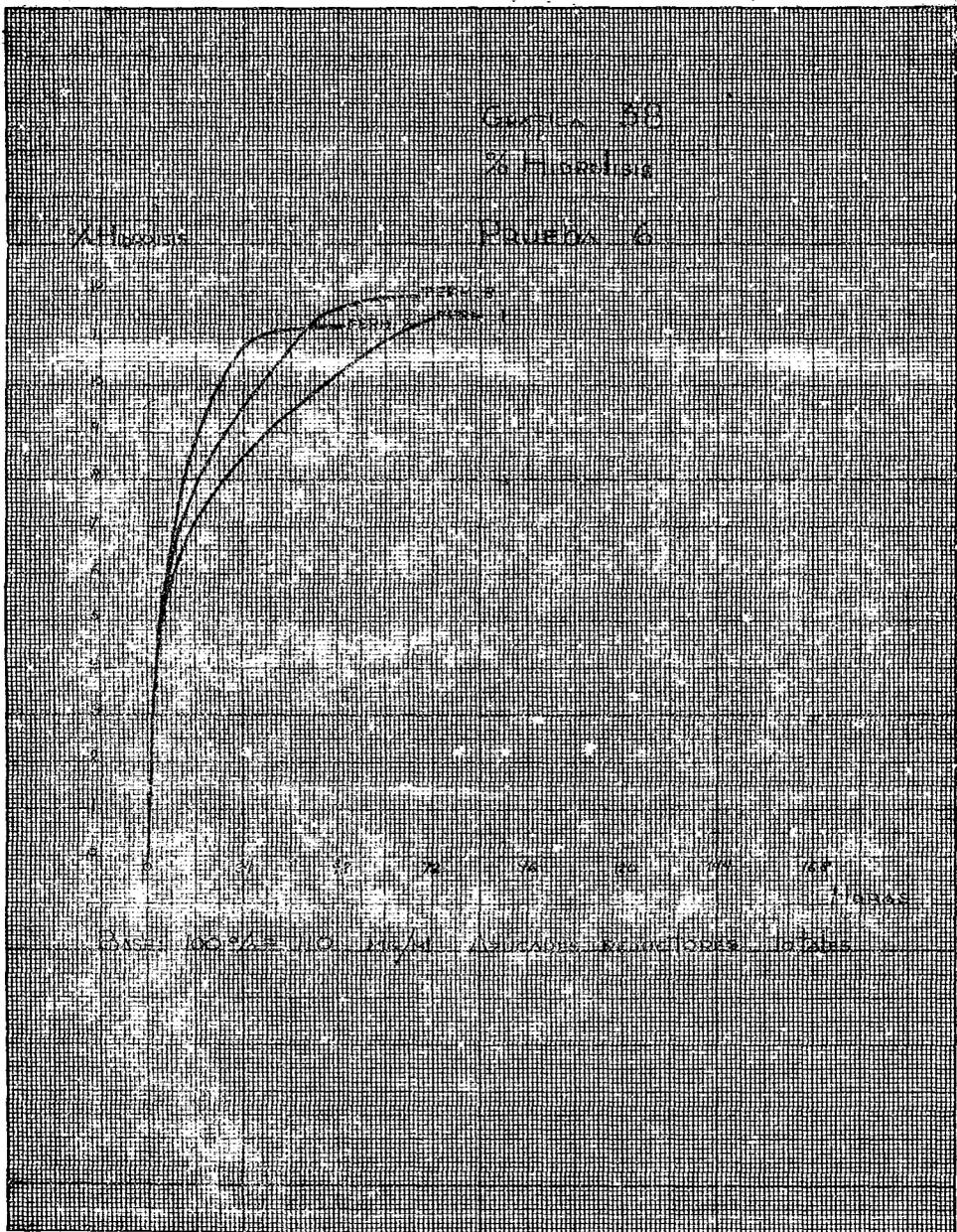
30. Himmels, reinen Jense

Paar 6

30. Himmels



30. Himmels, reinen Jense



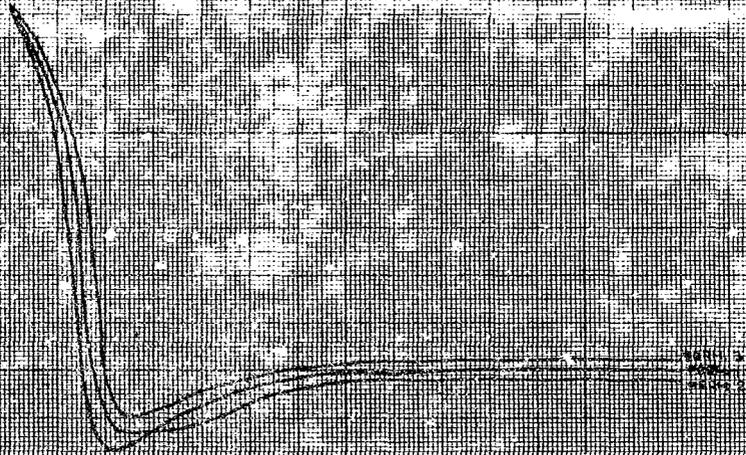
GRÁFICA 3ª

Aumento de sólidos  
al final de prueba

PRUEBA 6

g/l

100  
90  
80  
70  
60  
50  
40  
30  
20  
10  
0



PRUEBA 6

GRUPO 40

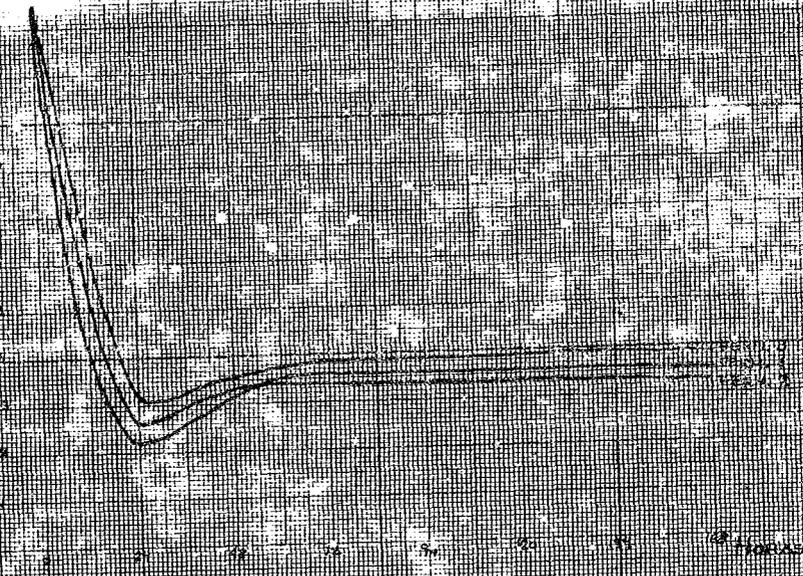
DENSIDAD DE SALDOS  
EN MESES 12

PRUEBA 6

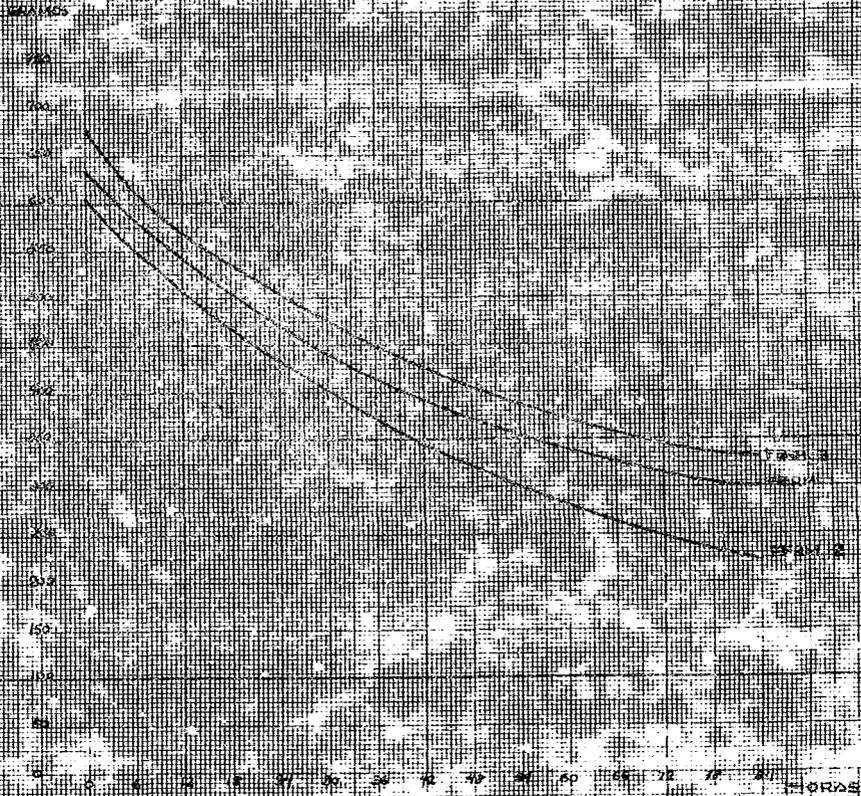
0.34

1.2

1.0  
0.8  
0.6  
0.4  
0.2  
0.0  
-0.2  
-0.4  
-0.6  
-0.8  
-1.0  
-1.2



GRUPO 4  
SECAO DE PRODUTOS  
PRUEBA 6



#### CAPITULO IV. DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

1. Variación de los medios al esterilizarse.
2. Crecimiento en medios de conservación.
3. Crecimiento en medios de semilla
4. Hidrolisis fungal del almidón
5. Consumo de azúcares reductores
6. Aumento de micelio
7. Fermentadores:
  - a) Variable: Flujo de aire
  - b) Variable: Velocidad de agitación
  - c) Variable: Porcentaje de granillo
  - d) Variable: Alandamiento de almidón
  - e) Variable: pH
  - f) Reducción del tiempo total.

## Discusión de los Resultados.

### 1.- Variación en los medios al ser esterilizados.

La importancia de éste punto radica en el hecho de la acidez necesaria para el crecimiento de la cena. Los componentes de los medios (C, S y F) son bastante estables, por lo tanto, esterilizando tanto en forma continua como in situ no se altera la acidez inicial.

Con respecto a la estabilidad de materias, algunos autores recomiendan esterilizar los azúcares aparte de los demás componentes. La forma más usual de suministrar energía al microorganismo es mediante carbohidratos, generalmente como almidones. Este material sufre un cambio al esterilizarse, ya que se gelatiniza dando como resultado un líquido muy viscoso y solo una parte, aproximadamente el 2% se incorpora sin sufrir cambios. Los geles de almidón se hidrolizan tanto por ácidos inorgánicos como por enzimas ( $\alpha$  y  $\beta$ -amilasa). Si se usa glucosa en un medio de cultivo, es preferible esterilizarla separadamente. Para resultados más satisfactorios se hace una solución concentrada de glucosa, por ejemplo 30-50% p/v ajustando ésta solución a un pH aproximadamente de 3.0. Cuando se autoclavea, ésta solución permanece incolora; en la presencia de aminoácidos y otros compuestos, especialmente en pH alrededor de 7, la glucosa reacciona al ser calentada produciendo coloraciones de color café oscuro (caramelo) que inhiben parcialmente el crecimiento de muchos microorganismos.

Muchos organismos, particularmente hongos, utilizan sales de amonio como fuente de nitrógeno, el sulfato de amonio es el más económico y más usado, aunque el uso de amoniaco para ajustar

pH es también una buena fuente de Nitógeno.

La alta densidad del medio resultante puede ser un problema en el manejo del mismo, en escala mayor. Si la esterilización es continua, la zona de temperatura sostenida (Figura 6 ) es donde ocurre la gelatinización, y consecuentemente la densidad aumenta a medida que pasa el medio; éste punto es muy importante para establecer balances y calcular tuberías y aditamentos necesarios. Por esto es necesario establecer el porcentaje de arroz óptimo, no solo con el fin de conocer la hidrólisis máxima, sino también para predecir el Reynolds que resulte al gelatinizarse el medio. Analizando más detalladamente estos resultados y haciendo pruebas posteriores, se puede determinar cual tipo de esterilización es más conveniente.

En cuanto a la reología del medio, es como la mayoría de los medios de cultivo, un fluido no-newtoniano. Como estos, se caracteriza por su cambio de viscosidad al variar el esfuerzo cortante.

Aparte de los almidones, los demás componentes del medio no representan ningún problema al esterilizarse.

## 2.- Crecimiento en medios de conservación.

Como se mencionó, el medio 1-C es una variación del medio de Sabouraud; es un medio muy rico en nutrientes, siendo el crecimiento del hongo abundante. La vida vegetativa del mismo se alarga por el uso de los medios ya descritos tal como se señala con más detalle en la Bibliografía (43).

Con el medio 2-C ocurre lo mismo, ya que se tiene abundante crecimiento. Con el medio 3-C se encontró el problema que al no ser un medio específico para Streptomycetes, el crecimiento de

*Streptomyces rimosus* fué satisfactorio, mientras que el de *Streptomyces venezuelae* fué muy pobre. Por ser la finalidad del medio la conservación de la cepa, es mejor usar pH neutro, aunque por otra parte la adaptación del microorganismo a un pH y a un medio en general más conveniente a los fines industriales sea otro punto de partida para estudios más profundos.

### 3.- Medios de semilla.

La primera prueba más tangible de la capacidad de desarrollo y asimilación del medio por los microorganismos, se tiene en los medios de semilla. En la Bibliografía (13), (22), (26) y (29), ya se habían encontrado suficientes referencias haciendo notar las ventajas de producir más turbulencias en un cultivo, con fines de mejorar la difusividad del Oxígeno (aire en contacto con el medio y a la vez con microorganismos) aunque es también muy importante la transferencia de energía (suficiente temperatura) para el crecimiento.

El matraz agitado es simplemente un mecanismo para producir un mayor contacto y la transferencia de Oxígeno al líquido del caldo de cultivo es entonces factor limitante para el crecimiento de microorganismos (tomando como base que el pH del medio es el correcto para la fisiología de la cepa).

Hay dos tipos de mesas para agitación: recíprocante y giratoria. Usando agitadores recíprocantes con una amplitud de 10 cm. y 96 ciclos por minuto, Auro et al. (1957) encontraron que la relación de transferencia de Oxígeno obedece a la siguiente ecuación

$$\log A = \frac{-1.657 (V_L)}{V_F \ 0.94} V_F + 7.9 \times 10^{-5} + 0.167$$

donde:

A = Velocidad de absorción de Oxígeno en  $\mu\text{M O}_2/\text{min.}$

$V_F$  = Volumen del matraz (ml.)

$V_L$  = Volumen del líquido (ml.)

La máxima velocidad de absorción de Oxígeno encontrada por estas ecuaciones coincide con la encontrada experimentalmente por Solomons. Los agitadores reciprocantes son recomendados para cultivo de organismos unicelulares, bacterias y levaduras. Con muchos hongos, el cultivo se vuelve rígido y el contenido del matraz tiende a oscilar suavemente en el fondo, en lugar de moverse todo el medio, terminando por formarse una capa superficial completamente esporulada, en donde se supone que existiera un cultivo sumergido.

Con agitadores rotatorios en matraces erlenmeyer sencillos, la absorción de oxígeno es baja, para aumentarla Smith y Johanson introdujeron mamparas en los frascos (4), (15). Las mamparas, además de aumentar la transferencia de Oxígeno, a menudo provocan formación de espuma, y consecuentemente ésta capa de espuma en la superficie del líquido disminuye el contacto gas-líquido, y con esto la difusión de oxígeno. Si se espera a que se forme espuma, es aconsejable adicionar antiespumante, pero sin que éste inhiba el crecimiento de microorganismos o interfiera de cualquier forma.

Los agitadores rotatorios se usan para el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos.

Tradicionalmente los matraces se sellan con torundas de algodón. Schultz (1964) mostró que la transferencia de Oxígeno a través de las torundas de algodón, sigue la Ley de Fick, para difusión, y la difusión aparente decrece al aumentar la densidad del tapón de algodón. Otros investigadores han encontrado que los ta-

pones de algodón ofrecen mucha resistencia para el paso del Oxígeno, acumulándose CO<sub>2</sub> en el interior del matraz.

Gaden usó por primera vez tapones formados por capas sucesivas de algodón y gasa no boricada, de aproximadamente 10 cm. de lado, dichas sobreposiciones no deben pasar de un total de 8, colocando la parte más suave hacia abajo. Una sola capa es suficiente para asegurar la esterilidad del frasco, la transferencia de Oxígeno se mejora según se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 16. Efecto de los diferentes tapones sobre la transferencia de Oxígeno en matraces agitados (15).

Agitador recíprocante, amplitud 5 cm., 120 ciclos por minuto, 100 ml. de medio en un frasco de 1 litro.

	mM O <sub>2</sub> /hr.	% de Reducción
Abierto	53.7	-
Con torunda de algodón	23.8	56.0
Con capas de gasa-algodón	29.8	44.5

En todas las pruebas se usaron agitadores rotatorios. El crecimiento de las levaduras en medios de semilla presentó un aspecto de suspensión muy fina, que precipitó rápidamente.

El crecimiento de *Aspergillus oryzae* fué en agregados, formados de micelio, característico de los cultivos de hongos en medio líquido; semejante crecimiento presentaron los cultivos de *Streptomyces*.

El crecimiento de *Streptomyces rimosus* y *S. venezuelae* en medios 3-C y 2-C en matraces se observó a simple vista, sembrando

do después en caja Petri; la abundancia de crecimiento se hizo sobre una base arbitraria en donde 5 representa el máximo observado y 0, crecimiento nulo.

4.- Hidrólisis de almidón por *A. oryzae* en matraces erlenmeyer con mamparas y normales, (Gráficas 1 a 4) y consumo de azúcares.

La finalidad de ésta prueba es conocer el incremento de hidrólisis y consumo de azúcares, teniendo en cuenta medios de igual composición química, pero uno con mayor turbulencia que el otro.

Como se mencionó, el objeto de producir más turbulencia es que la difusión de Oxígeno a través del medio aumenta, Oxígeno necesario para el crecimiento de los microorganismos. La cantidad de  $O_2$  necesaria ha sido calculada experimentalmente y en teoría por varios autores (1), (3) y (12). Como *A. oryzae* es un cultivo aerobio, el aumento de  $O_2$  en el medio favorece su crecimiento en velocidad y número de organismos. Aquí se tradujo éste crecimiento en cantidad de almidones hidrolizados; es de suponerse que entre mayor sea el número de individuos presente, mayor será la cantidad de enzimas amilolíticas producidas, y por tanto, mayor la hidrólisis.

Los medios 1-S contenían glucosa en un 4%, según Solomons (15), la hidrólisis total de almidones da 10% o más de su peso inicial de monosacáridos, por lo que, si inicialmente se tenían 40 mg/ml de almidón el 100% de hidrólisis teórica será 44 mg/ml. Sobre ésta base se hicieron los cálculos para obtener el porcentaje de hidrólisis.

*A. oryzae* necesita carbohidratos como nutrientes esenciales para su crecimiento, e indudablemente utiliza primero los más -

accesibles (Gráfica 2). Se propone que los dos procedimientos - (hidrolisis y consumo de azúcares) ocurren al mismo tiempo, debido que al mismo tiempo de metabolizar los azúcares presentes, se produce amilasa, pero se observó que en una primera fase (hidrolisis) el consumo de azúcares es más rápido y mucho más notable que la hidrolisis, posiblemente debido a que los organismos metabolizan azucares facilmente fermentables y luego los dificilmente fermentables.

Se llegó a un punto en que los azúcares se han consumido totalmente, y empieza a notarse con mucha claridad la hidrolisis. Extrapolando la curva, se encontró que en matraces con mamparas éste punto en el que la presencia de azúcares reductores detectables por el método de Underkoffler es nula en el medio, es a las 54 horas aproximadamente (Gráfica 3). En matraces normales, ocurre a las 96 horas. Esta diferencia de 42 horas es de mucha importtancia en la reducción del tiempo de fermentación, en escala industrial. Igualmente es importante para conocer el momento óptimo para inocular al siguiente microorganismo al medio ya hidrolizado.

A partir de éste momento, la curva empieza a subir, siendo la hidrolisis claramente notable. En matraces con mamparas, la curva acerca su pendiente a cero, a partir de las 120 horas, en éste punto coincide con la de matraces normales, con la diferencia que a éste tiempo en matraces con mamparas se tiene un 70% de hidrolisis, mientras que en los otros se tuvo 64.7%.

En lo que se podría llamar primera fase (consumo), la pendiente en matraces con mamparas es mayor que la de matraces normales, pero a partir del momento en que empieza la hidrolisis, ambas son muy semejantes, aunque se observó que la primera curva se tiende

antes que la segunda y más lentamente teniendo a las 264 horas una diferencia de 6% de hidrólisis.

El tiempo óptimo entonces, para inocular *S. carbajali*, es cuando la curva cambie de pendiente por segunda vez, y esto se lleva a cabo en matraces con mamparas. Por otro lado, en matraces con mamparas se observó a las 24 horas una pequeña hidrólisis. Esta se pudo deber a la esterilización en autoclave, o por el pH del medio, ligeramente ácido.

#### 5.- Consumo de azúcar por levaduras, (Gráficas 5 y 6)

Se tuvo que el consumo total de azúcares es mayor y más rápido en matraces con mamparas por las razones ya escritas. La finalidad de hacer ésta prueba es conocer la cantidad de azúcares en un cierto tiempo y con ésta base, en condiciones óptimas, analizar el medio en una situación dada y saber si el metabolismo de los carbohidratos por las levaduras es correcto.

#### 6.- Aumento de micelio, (Gráficas 10 y 11).

Para balances de masa, es necesario conocer la cantidad que se tiene, pero por incluir el proceso métodos biológicos, debe de tomarse en cuenta que los almidones presentes, fueron metabolizados, alguna parte asimilada para el crecimiento de los organismos con aumento de número de individuos y por tanto aumento de masa, y otra parte, al hidrolizarse se solubilizó en el medio. Las levaduras crecen en medio líquido en forma de suspensión, pero al mismo tiempo que consumen azúcar, aumenta la población.

Por todo esto se estudió el aumento de sólidos en el medio, que fueron llamados genéricamente "micelio", por considerarse que el aumento de micelio es el más representativo, si bien es necesario recordar que en un principio la masa total disminuye por los

ya mencionados efectos de solubilización y formación de geles al esterilizarse.

La gráfica de aumento de sólidos por unidad de volumen forma una curva con un rápido decrecimiento que es máximo alrededor de las 24 horas, a partir de entonces empieza a aumentar hasta formar una línea horizontal.

En un principio los sólidos en el medio están constituidos solamente por arroz que sirvió de fuente de carbohidratos, el decrecimiento tan rápido es posible de que se haya debido a que al esterilizar se produjeron geles, (pequeña hidrólisis ya observada). Después de ésta solubilización de almidones empieza el consumo de estos por el microorganismo, y entonces empieza el notable aumento de masa constituida por micelio y por almidones no hidrolizados.

El máximo de masa obtenido por crecimiento de micelio es de 50% de la masa inicial.

La densidad que se obtuvo en cada momento formó una curva semejante y es de importancia para balances de masa con equipo mayor.

El medio 1-3a presentó los mismos fenómenos observados en 1-S con la diferencia de que en éste medio, no había azúcar, la fase de consumo no existe, sino únicamente la hidrólisis. Aquí se observó que a las 168 horas la diferencia de hidrólisis en matraces con mamparas y sencillos es de 25% y en éste punto, la curva empieza a ser horizontal.

A. oryzae, por tanto, hidroliza en tal forma, que llega momento en el que no quede más polisacárido por degradar, ahora que si la concentración inicial de almidón es de 40 mg/ml, y el máximo -

obtenido de azúcares reductores es 32 mg/ml: el 30% restante está formado por azúcares no reductores, o por almidón no hidrolizado o ambos. Esta no degradación puede deberse a que el microorganismo está en fase descendente y ya no produce enzimas suficientes para degradar almidón.

Según los resultados obtenidos al analizar los procedimientos efectuados en matraces con medios 1-S, 2-S y 1-Sa, tanto con mamparas como sencillos, es claramente notable que conviene usar el medio 1-S (gráfica 2) que a diferencia del medio 1-Sa (gráfica 7) contiene 4% de azúcar, lo que lleva a ésta conclusión es el hecho de que a las 96 horas se tiene mayor porcentaje de hidrólisis en el medio 1-S que en el medio 1-Sa.

Se escogió, pues, como semilla el medio 1-S aunque como se verá posteriormente, por razones de costo, no se usa el azúcar en el medio de fermentación así como por que el rendimiento disminuye por falta de mamparas, y posibles contaminaciones al no haber válvula de muestreo. Con respecto al medio 2-S (gráfica 6) la levadura consume el azúcar hasta agotarla totalmente.

#### FERMENTADORES.

##### Prueba 1. Variable: Flujo de aire.

La cantidad óptima de aire para un microorganismo específico se determina por métodos experimentales (2). En éste caso solamente se hizo variar el flujo de aire en forma controlada y se tomaron muestras de las cuales se analizaron azúcares reductores totales y aumento de micelio. Solamente se hicieron éstos dos análisis por ser los más rápidos, haber sido ya estandarizados e indicar la relación aire-crecimiento.

El  $O_2$  es vital para el crecimiento de organismos aerobios, pero es útil conocer una cantidad óptima, tanto por que no exista desperdicio en el trabajo mecánico para suministrar aire por compresoras, como para calcular con exactitud tuberías, válvulas y otros aditamentos. El exceso de  $O_2$  puede provocar también un decrecimiento en efectividad de la producción de microorganismos, al interferir en su metabolismo por ejemplo, oxidando productos metabolicos.

En el fermentador 1 (gráficas 12 y 13) con un flujo de 2-3  $ft^3/hr$  se tuvo una línea siempre con pendiente positiva, aún después de que fué inoculado *S. carbajali*, ésta cantidad de  $O_2$  no fué suficiente para *S. carbajali* el cuál no consume el azúcar producido, la población de *S. carbajali* debió ser sumamente pequeña. En cuanto al consumo necesario de azúcares por *A. oryzae* en competencia con la producción de las mismas siempre es superior la última, consumiéndose algo y quedando la mayor parte en solución en el medio.

El fermentador 2 con flujo de 6  $ft^3/hr$  presentó una abundante hidrólisis. El cambio de pendiente a las 48 horas indicó que a ese tiempo empezó a ser dominante el consumo de azúcares por *A. oryzae* y/o por otros microorganismos indeseables presentes, ya que de gráficas anteriores en las que no existió contaminación la línea se -tiende al llegar a determinado porcentaje de hidrólisis, pero no -desciende. Lo mismo ocurrió en el caso del fermentador 3.

La parte importante de ésta prueba fué conocer que a una aereación en el fermentador 3 de 10  $ft^3/hr$  se inhibe en cierta forma la producción de enzimas debido a la cantidad de  $O_2$ . Se podría pensar que un exceso de  $O_2$  puede oxidar algún compuesto intermedio en el metabolismo de carbohidratos, impidiendo la formación de amilasa

en cantidades suficientes.

En éste caso en el que hubo contaminación de los medios, el rendimiento sufrió una baja; es muy notable la gran hidrólisis - que se produjo en las primeras 24 horas en los fermentadores 2 y 3. La hidrólisis máxima ocurrió a un flujo de 6 ft<sup>3</sup>/hr a las 72 horas. El secado del producto a una temperatura promedio de 45-50°C sigue la forma clásica de curvas de secado (6), (9), y (15).

#### Prueba 2.- Variable: Velocidad de agitación.

El O<sub>2</sub> debe ser distribuido uniformemente a través de todo el medio para tener un crecimiento homogéneo y consecuentemente degración homogénea de azúcares que conduce a aprovechamiento integral del medio evitando zonas de menor rendimiento.

La dispersión de O<sub>2</sub> se lleva a cabo por agitadores-aereadores de diversos diseños (2), (4), (31). Se efectuó prácticamente mediante el dispositivo descrito en el equipo 3, consistiendo en un agitador bajo cuya flecha descarga el tubo de aereación. La existencia de mamparas aumenta la turbulencia, la uniforme dispersión de O<sub>2</sub> a la vez de aumentar el área de contacto microorganismo-almidón.

Como en nuestros fermentadores no había mamparas, se produce más bien un vórtice, entre más violenta fué la agitación, mayor - fué el vórtice, mayor el volumen ocupado por éste y en consecuencia mayor el área de contacto medio-aire, además de las burbujas alimentadas por la base y que fueron dispersadas con rapidez proporcional a la velocidad de giro del agitador (gráficas 15 y 16).

Con las constantes de temperatura (30°C) presión (5 lb/pulg<sup>2</sup>) pH (5.0), porcentaje de granillo (15%) y la obtenida en la prueba

1, flujo de aire (6 ft<sup>3</sup>/hr), se varió ahora la velocidad de agitación que fué :

Fermentador 1: 184 r.p.m. (como se tenía en la prueba 1)

Fermentador 2: 350 r.p.m.

Fermentador 3: 664 r.p.m.

El fermentador 3 presentó la máxima hidrólisis e inmediatamente que se inoculó *S. carbajali*, la curva descendió, en los fermentadores 2 y 3, aunque posiblemente hubo alguna contaminación que hizo que la curva descendiera antes, es más marcado el descenso a partir de la inoculación de levadura. Se concluyó que entre mayor sea el área de contacto microorganismo-O<sub>2</sub> en el medio, mayor será el crecimiento. Por falta de equipos, no se elevó aún más la velocidad de agitación, pero sería una comprobación a esa proposición.

El aumento de micelio fué exactamente el mismo que en la prueba con matraces (gráfica 17). Se observó en el fermentador 1 una clara disminución y subsecuente aumento de masa, que supone una solubilización de almidón y después crecimiento de micelio, esto es también muy claro en el fermentador 2. En el fermentador 3, la curva desciende rápidamente, tendiéndose después, posiblemente debido a solubilización o formación de geles de almidón y posteriormente a crecimiento de micelio en tales cantidades que se equilibren, dando como resultado una constante; ésta es alterada al empezar a agotarse los almidones, y ya degradados a azúcares, ser aprovechados por el microorganismo, y crecer la cantidad de masa total.

El período de decrecimiento del microorganismo es determinante en éste aspecto, pues al ser menos apto para producir enzimas, metaboliza menos almidones. Debe recordarse también que los azúcares resultantes son factibles de solubilizarse y/o formar geles lo

cual disminuye la masa total. El aumento de densidad (gráfica 18) es resultado directo de las observaciones anteriores, aunque hay que hacer la salvedad de que se refiere a densidad de sólidos únicamente, ya que el medio líquido puede contener geles, y por tanto la densidad global del medio de cultivo no se determina por los métodos seguidos. El secado es igual al caso 1 (gráfica 19).

Prueba 3.- Variable: Porcentaje de granillo constituyente del medio

El objeto de la variación de porcentaje de granillo es obtener el porcentaje óptimo, esto es, saber si la producción de enzimas es suficiente para hidrolizar más almidones o por lo contrario sería preferible el porcentaje actual para obtener mayores rendimientos. Al producirse determinada cantidad de amilasa, se hidroliza una cantidad estequiométrica de almidones, los cuales ya degradados son o bien consumidos por el microorganismo, como fuente de carbohidratos, o bien, quedan en el medio. La pregunta al efectuar ésta prueba es: Son estequiométricas las cantidades de almidón agregadas en el medio con relación a las enzimas producidas?, o es necesario aumentar o disminuir ésta cantidad de almidón?.

Se obtiene un porcentaje aproximado al analizar la hidrólisis de cada fermentador (gráfica 20 y 21) con diferentes porcentajes de granillo, cada 24 horas; por otra parte, objeto de estudio más profundo es determinar las producciones de azúcares, proteínas, y almidón óptimos para constituir un complemento alimenticio. El 100% de hidrólisis teórico es en base a que se produce el 10% más de su peso original en monosacárido (15), así en el fermentador 1 el 100% con 15% de granillo es 165 mg/ml de monosacárido. En el fermentador 2, el 100% con 12% de granillo es 132 mg/ml y en el fermen

tador 3, con 10% de granillo, es 110 mg/ml.

Se observó el mayor porcentaje de hidrólisis a las 72 horas en el fermentador 1, o sea con 10% de granillo. Los resultados analizados son los que se reportan como porcentaje pues a mayor cantidad de almidones, mayor cantidad de azúcares producidos, pero la acción enzimática es aún mayor sobre una cantidad de almidones obteniéndose un mayor porcentaje de azúcares reductores, una vez hidrolizados a azúcares son en parte aprovechados por el microorganismo para su desarrollo. El balance total de azúcares-almidones-amilasa es igual para los tres fermentadores, pero en el fermentador 1 fué mayor la cantidad de azúcares producidos con igual cantidad de enzimas; en el 3 fué mayor la cantidad de azúcares, en total, pero con respecto a los almidones sin degradar, es menor que el 1 (en porcentaje) tomando como base las cantidades estequiométricas que se producen de almidones degradados.

La levadura creció en su curva característica, en igual forma para los tres medios, los cuales tienen nutrientes suficientes para asegurar éste crecimiento; la cantidad de almidón en el fermentador 3 podría decirse que quedó sobrada, y en el fermentador 1 se acercó más a la cantidad necesaria para ser degradada totalmente.

Se ha establecido que el aumento de 10% es solo en el caso de degradarse totalmente hasta monosacárido, no es éste el caso pues no se cuenta con medios apropiados para llevar a cabo la hidrólisis completamente; por otra parte, las enzimas no atacan todos los enlaces glucosídicos, sino que algunos permanecen intactos, obteniéndose disacáridos o aún dextrinas. Por tanto lo que se cuantea como azúcares reductores totales son tanto monosacáridos como otros azúcares reductores. La cantidad estequiométrica

necesaria de enzimas para degradar al 100% todos los almidones es función de muchas variables, tales como número de microorganismos, actividad de éstos, período de crecimiento en que se encuentran, nutrientes necesarios y tratamiento anterior del almidón, es decir, si se han ablandado de alguna forma para facilitar el ataque enzimático.

El mayor porcentaje de hidrólisis se tuvo con menor cantidad de granillo, sería necesario disminuir aún más la cantidad de almidones para determinar experimentalmente el máximo porcentaje de hidrólisis, con el mínimo de almidones. Esta cantidad es también determinada por el volumen del inóculo. Además de las variables simultáneas mencionadas (porcentaje de granillo y volumen del inóculo) es importante también el volumen de granillo que arrojan los beneficios de arroz en relación al costo del proceso y el balance nutritivo óptimo del complemento alimenticio. Las pruebas de aumento de micelio, y densidad de sólidos son similares a los casos anteriores (gráficas 22 y 23).

Prueba 4.- Variable: Ablandamiento del almidón.

El fin de ésta prueba fué conocer el efecto de un ablandamiento previo de almidón. El ablandamiento disgrega las moléculas de amilosa y amilopectina facilitando el ataque de las enzimas. Asimismo, si no fuera necesario esterilizar sin que la contaminación sea muy fuerte, o sea controlada, la economía del proceso aumentaría notablemente. El arroz remojado por ocho horas antes de inocular, se ablandó en parte. El resultado fué una fuerte contaminación. Sería posible evitar o disminuir ésta contaminación utilizando soluciones bactericidas, las cuales existen en

gran variedad en el mercado. Experimentalmente se puede conocer si éstas soluciones son eficaces para cada caso, y si es posible eliminarlas sin que dejen residuos que ataquen a las cepas usadas en el proceso. Pueden ser también eliminadas impurezas y microorganismos contaminantes pasando una corriente de vapor de la misma forma que se hace en el secado del grano al ser cosechado. Por último, estos métodos que tienden a eliminar la esterilización están sujetos a costos para una y otra forma de tratar el grano antes de pasar a formar parte del medio del fermentador.

El fermentador al cual no se remojaron los almidones antes de ser inoculado, también ofreció una fuerte contaminación y lo mismo que al anterior se le puede aplicar toda la discusión anterior con la deficiencia en éste que al no ablandarse el almidón, el ataque enzimático es más difícil.

En el fermentador esterilizado obviamente no ocurrieron contaminaciones apreciables y fué el único utilizado para seguir la hidrólisis y consumo por tres cepas: *A. oryzae*, *S. carbajali* y *S. rimosus* (gráficas 25 y 26). La hidrólisis siguió un curso normal semejante a las fermentaciones en matraces, y la inoculación de *S. carbajali* marcó el inicio de un consumo muy pronunciado. La curva descendente no fué alterada por *S. rimosus*. Se puede concluir que *S. rimosus* no requiere gran cantidad de azúcares para crecer, además que existen en el medio almidones sin hidrolizar, que también pueden ser fuente de carbohidratos. Es muy posible también que el crecimiento de ésta cepa no haya sido satisfactorio, ya que se llevó a cabo en un pH aproximado de 5.0. El aumento de micelio (gráfica 27) y secado (gráfica 29) fué muy semejante a los anteriores.

Prueba 5.- Variable: pH

La hidrólisis en el medio 2-F (pH=7) es mucho menos efectiva, por ser el medio óptimo para hongos un pH ácido, aún así, existió degradación y tanto en éste medio como en el 1-F, la curva desciende bruscamente con la inoculación de *S. carbajali* (gráficas 30 y 31). Al inocular *S. rimosus*, la curva en el medio 2-F cambia más rápido que en el medio 1-F, debido posiblemente, como ya se mencionó, en que éste medio el pH de crecimiento para *S. rimosus* es el apropiado y el metabolismo de los azúcares se lleva a cabo con mayor rapidez y eficacia. El aumento de masa fué mayor en el medio 1-F debido a dos razones posibles: a) dentro de las primeras 48 horas, el almidón (que representa la mayor masa) fué degradado más en el medio 1-F, debido a una mayor producción y acción enzimática por tener el pH adecuado; b) después de las 48 horas empieza el crecimiento paralelo para ambos, si bien en el medio 1-F es mayor el crecimiento de *A. oryzae*, en el medio 2-F es mayor el crecimiento de *S. rimosus*, los cuales en promedio se igualan dando curvas paralelas.

Prueba 6.- Reducción del tiempo total de Fermentación.

El acortar el tiempo de procesado es muy importante para la eficiencia total. En nuestro trabajo se notaron las siguientes desviaciones:

Fermentador 1.- El brusco cambio de pendiente de la gráfica a las 3 horas (gráficas 35 y 37) es debido posiblemente a consumo de azúcares por *A. oryzae* que en éste momento tuvo un cambio no previsto en su metabolismo, o por alguna contaminación, pues a par-

tir de entonces la curva no se alteró, por tanto la hidrólisis y el consumo de azúcares se anulan dando una línea casi recta, que declina hasta las 72 horas.

Fermentador 2.- La inoculación de *S. carbajali* y *S. rimosus* al mismo tiempo hicieron que la curva se empezara a tender, llegando a un máximo a las 56 horas, y de aquí empezó a declinar. La hidrólisis y consumo se anularon dentro de las primeras 7 horas, aumentando después la hidrólisis por encontrarse posiblemente el *A. oryzae* en una fase máxima actividad y producción de enzimas y posiblemente también por producir *S. carbajali* o *S. rimosus* algún factor que activó el crecimiento (gráficas 36 y 38).

Fermentador 3.- La inoculación de *S. rimosus* alteró la pendiente de la curva, empezando a tenderse, ésta parte horizontal de la gráfica no se altera al ser inoculado *S. carbajali*, y aumenta lentamente hasta las 32 horas, momento en que cambió de pendiente hacia el lado negativo (gráficas 35 y 36).

Los momentos en que declina la hidrólisis y empieza a ser más notable el consumo de azúcares, pueden deberse a que la producción de amilasa disminuye y además por que hay otros microorganismos que requieren carbohidratos para su crecimiento (gráfica 37).

De ésta última prueba se concluyó que el tiempo de procesado sí puede disminuirse. El máximo de hidrólisis disminuye en un tiempo de 24 horas (gráfica 37) Las variaciones en los rendimientos proteicos se obtendrían por estudios posteriores. El aumento de micelio es muy semejante en los tres fermentadores. Esto implica que ninguna cepa interfiere con las otras dos, ocasionandose crecimientos simultáneos. El secado fué similar a los anteriores (gráfica 39 y 41).

## CAPITULO V. CONCLUSIONES.

1. Proyección a planta semi-piloto
  - a) Mezclado
  - b) Fermentación
  - c) Esterilización y aprovisionamiento de aire
  - d) Centrifugación
  - e) Secado
  - f) Mezclado de sólidos
  
2. Conclusiones
  - a) Trabajo precedente
  - b) Procesos semejantes
  - c) Hidrólisis
  - d) Cantidad de arroz quebrado y salvadillo
  - e) Rendimiento
  - f) Aprovechamiento de los azúcares
  - g) Valor alimenticio
  - h) Cepas
  - i) Materiales y Métodos
  - j) Control
  - k) Resultados
  - l) Planta
  - m) Localización de la Planta

## PROYECCION A PLANTA SEMI-PILOTO

Los procesos de fermentación tienen en común muchas operaciones unitarias de la Ingeniería Química. Por ejemplo, las fermentaciones aerobias incluyen la mezcla de tres fases heterogéneas: microorganismos, medio y aire. Otras operaciones unitarias incluyen transferencia de masa de oxígeno del aire al organismo y transferencia de calor del medio de fermentación. El análisis de las fermentaciones por técnicas de operaciones unitarias son una gran ayuda para el estudio del comportamiento de las mismas, aunque algunos autores consideran que llevarlas a escala industrial es en gran parte en forma empírica. El mecanismo de absorción de oxígeno en fluidos no-Newtonianos, que generalmente caracterizan a los medios de fermentación puede ser evaluado antes de emplear procedimientos industriales. De las operaciones auxiliares al fermentador, las más importantes desde el punto de vista de la Ingeniería son la esterilización de grandes volúmenes de medio y el suministro de aire estéril.

Un análisis de procesos fermentativos industriales muestran que hay muchas reacciones comunes con procesos puramente químico. Un proceso de fermentación puede ser clasificado por los mecanismos incluidos en la conversión de materia prima a productos. En éstas se incluyen reducciones, oxidaciones simples y complejas, conversiones del sustrato, transformaciones, hidrólisis, polimerizaciones y biosíntesis complejas llevadas a cabo en la célula. Los procesos unitarios que se llevan a cabo son un gran ejemplo de actividad química que se desarrolla por los microorganismos,

La fermentación también puede ser vista desde el punto de vista de una reacción catalizada, en la cual las enzimas son el catalizador y el material celular es el soporte. El control adecuado de procesos es también muy importante para el correcto diseño del mismo. En algunos procesos hay variables como temperatura, flujo de aire y agitación, fácilmente controlables, mientras que en otros hay variables que presentan dificultades desde el punto de vista de conservar la esterilidad del medio. Entre éstos se puede citar el control de pH que hasta hace poco tiempo se pudo hacer sin riesgo de contaminación, dado el gran avance de la Ingeniería Química.

En el proceso que ocupa el presente trabajo, en escala experimental se tendrán cinco operaciones fundamentales y las auxiliares, tales como suministro de aire, bombeo, enfriamiento del líquido, suministro de vapor para calentamiento de los enchaquetados, etc.

Las sales, junto con el agua necesaria para formar el medio y el arroz se introducen en una mezcladora en la cual se forma un medio homogéneo, éste se esteriliza y pasa al primer fermentador, o de otra forma se esteriliza dentro del fermentador. En éste primer fermentador se inocula *A. oryzae* para la hidrólisis de los almidones pasando después al segundo fermentador en donde se inocula *S. carbajali* y *S. rimosis*; el producto se centrifuga para eliminar el exceso de agua y se esteriliza para pasar al secado por aspersión. El producto ya seco se mezcla con salvadillo y finalmente se empaqueta. Las operaciones que se llevan a cabo son:

#### 1. Mezclado de pastas ligeras

## 2. Fermentación

- a) Esterilización de la pasta
- b) Hidrólisis de los almidones
- c) Fermentación final
- d) Esterilización y suministro de aire

## 3. Centrifugación de la torta

## 4. Secado

## 5. Mezclado de sólidos

El siguiente lineamiento dá una idea muy general de lo que sería una planta semipiloto para la obtención de un concentrado protéico para el ganado a partir de subproductos del arroz.

El enfoque es hacia el tipo de material usado, no entrando en balances de masa y energía. Desde luego que partiendo de la base establecida de cantidades disponibles de materia prima para el proceso en México, se pueden proyectar los equipos para una escala industrial, existiendo dos posibilidades: una, establecer una sola planta para procesar todo el arroz quebrado, y la segunda, una planta pequeña incorporada a los beneficios de arroz. El criterio para escoger cual sería más conveniente es la disponibilidad de materia prima, balance económico, medios de transporte etc.,.

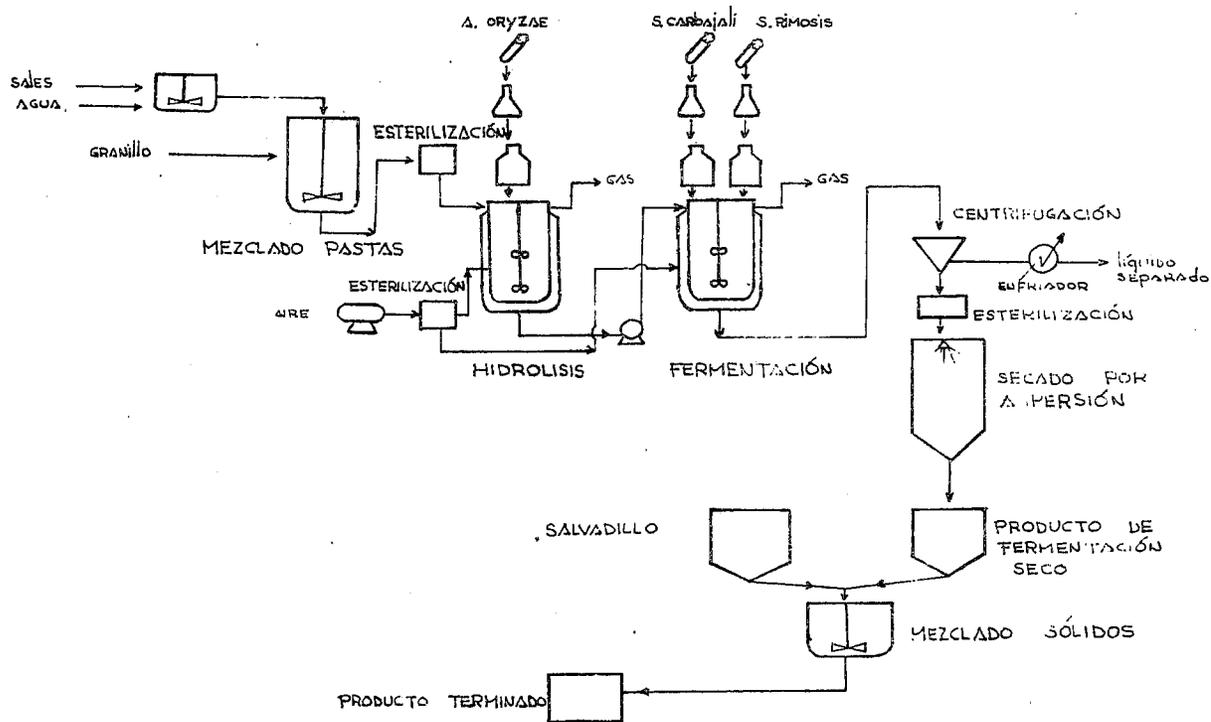


Fig. 1 . DIAGRAMA DEL PROCESADO DE SUBPRODUCTOS DEL ARROZ.

## 1. MEZCLADO.

La operación de mezclado la tenemos en dos situaciones fundamentales:

- a) Para mezclar las sales nutrientes para la formación del medio, junto con el arroz y agua.
- b) Para mezclar el producto ya seco con salvadillo, otro subproducto de beneficiadoras, y el cual como ya se mencionó es rico en vitaminas del complejo B.

El mezclado de pastas (caso a) y de sólidos (caso b) implican la íntima interposición de dos o más sustancias para formar un producto más o menos homogéneo. Los aparatos para mezclar pastas se utilizan cuando el material es demasiado viscoso para fluir fácilmente a la zona de succión de un agitador. En el caso de la hidrólisis del arroz la masa no es muy viscosa, pero no presenta la fluidez necesaria para utilizar equipos para líquidos.

Hay muchos tipos de mezcladoras para éstos fines pero se mencionan los tres más apropiados para éste proceso.

Las mezcladoras de cubetas intercambiables mezclan líquidos viscosos o pastas ligeras, especialmente en los procesos alimenticios. Una cubeta intercambiable contiene el material que ha de mezclarse, el agitador consta de varias placas verticales o dedos soportados en un cabezal giratorio y colocadas cerca de la pared de la cubeta. El agitador se monta excentricamente con respecto al eje de la cubeta y ésta descansa sobre un soporte que puede girar en dirección opuesta a la del agitador, de modo que durante la operación pueda llevarse todo el líquido o toda la pasta hasta las placas. Cuando se termina la operación, se levanta la cabeza

del agitador, retirando las placas de la cubeta, se limpian éstas y se reemplaza la cubeta por otra, llena de nueva carga.

En la mezcladora batidora la cubeta es estacionaria. El agitador tiene movimiento planetario; a medida que gira tiene un movimiento de precesión, de modo que llega repetidamente a todas -- las partes del recipiente. La forma de las paletas es tal que pueden pasar cerca de las paredes y del fondo del recipiente.

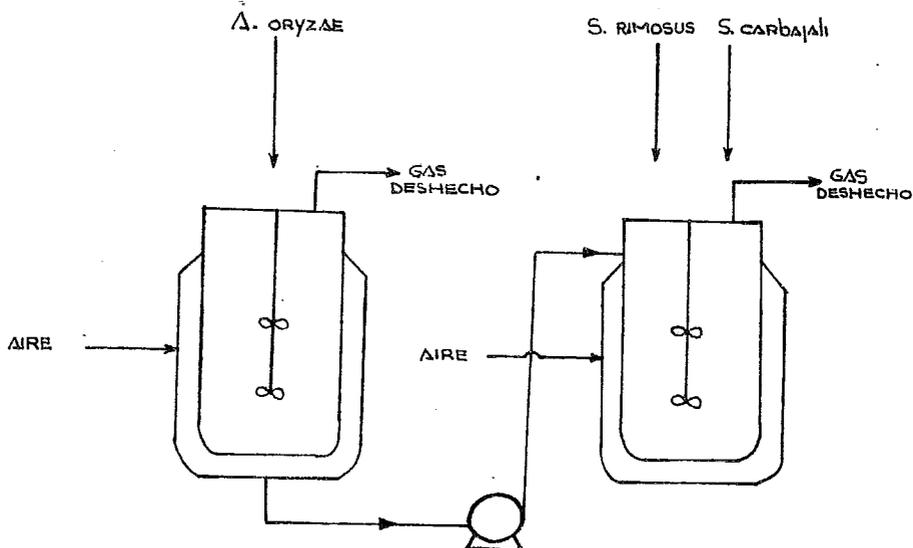
Una mezcladora de moletas posee una acción de mezclado diferente a la de las otras máquinas. El moletado es una acción de -- frotamiento o fricción similar a la efectuada con un mortero y su mano. El recipiente es estacionario y el eje central vertical es accionado de forma que las ruedas se muevan en un camino circular sobre una capa de sólidos (arroz quebrado) situada en el fondo -- del recipiente. La acción de frotamiento resulta del deslizamiento de las ruedas sobre los sólidos. Unos rastrillos levantan el medio debajo de las ruedas, o a una abertura en el piso del recipiente cuando se desea descargar la mezcladora. Las moletadoras -- son buenas mezcladoras de sólidos y pastas, son especialmente eficientes para recubrir las partículas de un sólido de pequeñas cantidades de líquido.

En una batidora el mezclado se hace con hojas o cuchillas colocadas helicoidalmente sobre un eje horizontal que gira en un canal abierto o dentro de un cilindro cerrado. Los sólidos entran -- en forma continua por un extremo de la cámara y descargan por el otro. Mientras está en la cámara, el medio es cortado, mezclado, empujado de modo que actúan sobre él todas las cuchillas. Para -- mezclado más rápido y mejor hecho se utilizan cámaras de mezcla-

do de doble eje y con canal abierto. La cámara de la mayoría de los molinos cerrados es cilíndrica, pero en algunos la sección es poligonal para impedir que los sólidos sean arrastrados por el eje. Las batidoras mezclan líquidos con sólidos para formar suspensiones espesas. Algunas tienen enchaquetado para enfriar o calentar el medio.

La parte resultante de la primera mezcla es pasada a través de esterilización continua hasta el primer fermentador. Es posible también efectuar la esterilización in situ, esto es, en el fermentador mismo, pero esto disminuye el tiempo de vida del fermentador al someterlo a la acción del medio caliente. Las formas de esterilización se describen en el siguiente punto.

## 2. FERMENTACION:



Esta segunda parte está compuesta de dos fermentadores, en el primero se lleva a cabo la hidrólisis de los almidones y en la segunda la fermentación, es decir, la transformación de los azúcares por medio del metabolismo de levaduras y actinomicetes.

El medio procedente del mezclador se esteriliza, ésto se puede efectuar de acuerdo a cálculos más detallados por dos caminos: esterilización in situ o esterilización continua.

La cantidad que se utilice de medio es la necesaria para tener un nivel de trabajo equivalente a 70-75% del volumen total del recipiente.

Por referirse a dimensión semipiloto, el inóculo procede de matraces, no de fermentadores más pequeños, como ocurriría en el caso de escala industrial. El volumen es de 5-10% del volumen de trabajo; para el segundo fermentador, el volumen para cada inóculo será también de 10% con respecto al volumen de trabajo.

El medio que sale del primer fermentador se bombea al segundo, los requisitos para éste tipo de bombas que dañen lo menos posible a los microorganismos, se dan posteriormente.

Dado que la hidrólisis no se lleva a cabo hasta su terminación en el primer fermentador, sino que sólo se inicia para disminuir el tiempo total de procesado, tiene que terminarse en el segundo fermentador al mismo tiempo que comienza el consumo de los azúcares por los TRES microorganismos presentes, el daño que sufre el hongo al pasar por las bombas debe ser mínimo para estar en condiciones de seguir produciendo amilasa suficiente.

Hay muchos tipos de fermentadores que se pueden considerar

especialmente en escala de prueba, pero sólo unos pocos son aplicables a procesos aerobios industriales. El tipo más ampliamente usado es el cilindro baffleado con agitación y aereación en la pro-pela. Este tipo de recipiente se puede tener capacidad desde un litro hasta varios miles. Las dimensiones relativas son las mismas, pero con ligeras variaciones de acuerdo a su capacidad. En los tamaños más pequeños se omite el enchaquetado y la temperatura se controla por medio de un baño de agua. El enchaquetado de los fermentadores de gran tamaño suele ser sustituido por serpentines internos, con el fin de dar suficiente área de transferencia de calor.

Se puede hacer un balance posterior de calor en base a la energía suministrada por la agitación y la generación de calor de los microorganismos.

Se considera también el trabajo del aire pasando a través del medio y las pérdidas de calor debidas a la corriente de aire suministrada si ésta tiene una temperatura y humedad de salida mayores a las de entrada. El coeficiente de transferencia de calor global para el medio no inoculado es similar al del agua, pero cae a valores comparables con pastas cuando hay gran crecimiento de micelio.

La acción del agitador es muy compleja, sirve para dispersar el aire entrante en forma de burbujas finas y distribuir éstas y la solución rica en oxígeno que rodea la propela a otras partes del recipiente. Mezcla también los microorganismos con el medio nutriente. En recipientes muy altos se usa más de una propela, pero la distancia óptima entre éstas es difícil de establecer. Para

ra un líquido de reología constante y conocida se debe asegurar la mayor uniformidad del medio. Una de las características de los sistemas de fermentación, especialmente en los que hay organismos filamentosos, es que las propiedades reológicas cambian a medida que aumenta la fermentación.

Si la viscosidad de un fluido Newtoniano se define como:

$$\tau = \mu \frac{dv}{dR}$$

donde:  $\mu$  = viscosidad del líquido

$\tau$  = esfuerzo cortante

$\frac{dv}{dR}$  = gradiente de velocidad

El valor de  $\mu$  en un fluido Newtoniano es independiente de  $\frac{dv}{dR}$  y es generalmente dependiente de la temperatura del fluido, Si se grafica  $\tau$  contra  $\frac{dv}{dR}$ , la característica de flujo de un líquido newtoniano será una línea recta que pasa por el origen, la tangente es igual a la viscosidad del líquido.

Por otro lado, los medios de cultivo a los que nos referimos tienen otras características de flujo. No son líneas rectas sus representaciones de comportamiento  $\tau$  contra  $\frac{dv}{dR}$ , y son por tanto no newtonianas, dentro del grupo de fluidos no newtonianos (plásticos de Binham, Plásticos Pseudoplásticos y Dilatantes), está el comportamiento de la mayoría de los medios de fermentación, aunque no se han hecho estudios amplios al respecto. El flujo de este tipo de fluidos puede ser representado como:

$$\tau = K \left( \frac{dv}{dR} \right)^n$$

donde

$K$  = índice de consistencia

$n'$  = índice de comportamiento de flujo

Para un plástico de Bingham la curva sigue la siguiente ecuación

$$\tau - \tau_y = \eta \left( \frac{dv}{dr} \right)$$

donde:

$\tau_y$  = esfuerzo, lo cual significa que un fluido no "fluirá" a menos que le oponga un esfuerzo mayor.

$\eta$  = coeficiente de rigidez, independiente de  $dv/dr$

En éste grupo estaría el medio de cultivo de éstos procesos. Por ésto, es más difícil dispersar los nutrientes uniformemente y suministrar oxígeno a los microorganismos. Es posible mejorar la fermentación controlando la viscosidad, por ejemplo, el medio puede ser diluido para que la fermentación proceda más satisfactoriamente.

En relación al aprovisionamiento de aire, es más común que éste sea introducido cerca del extremo inferior del agitador, éste se lleva a cabo por boquillas sencillas o dobles o por un tubo poroso.

Existen otros tipos de fermentadores. El fermentador de vórtice es similar al anterior pero no tiene mamparas. Gira a determinada velocidad que asegura un vórtice profundo, en la cabeza del cual entra el aire. Este tipo evita grandemente la producción de espuma que causa problemas en el tipo con mamparas. La capacidad efectiva del recipiente es disminuida por el espacio ocupado por el vórtice. En recipientes grandes es difícil causar un vórtice con el agitador, condición indispensable para obtener suficiente transferencia de oxígeno, además que la estabilidad del agitador es difícil de mantener bajo éstas condiciones. El fermentador Waldhef incluye los dos tipos antes mencionados, sea tiene un agitador aereador y está parcialmente equipado con mamparas. Esta unidad ha sido usada con éxito en la preparación de levaduras para la alimentación. Se usan otros diseños en la manufactura de levaduras para alimentación, muchas usando variaciones en la aereación por vórtice evitando espuma y otros recirculando por bombas.

Se usan también tambores rotatorios horizontales, pero la transferencia de masa es baja comparada con los fermentadores baffleados y es muy difícil utilizarlos para grandes cantidades de medios.

Las condiciones de operación se comparan con las encontradas en muchos procesos químicos. Las temperaturas no exceden de 120°C y la presión de 15 a 16/pulgadas éstas condiciones solamente ocu-

rren durante un pequeño lapso de tiempo durante la esterilización. Además el recipiente debe soportar la cabeza estática del medio que alcanza hasta una atmósfera, en recipientes grandes. Solo en casos muy especiales el pH sale del rango de 5 a 10. En algunos casos el proceso se lleva a cabo en condiciones de corrosión por tanto el acero inoxidable es el que dá mayor servicio - por lo general. Cuando se ha escogido el material para la construcción, el diseño mecánico del recipiente debe llevarse a cabo por métodos standard. Esto es importante para evitar puntos en que pueda existir infección o contaminación. Todos los puntos de entrada o salida deben diseñarse para presentar superficies lisas ésto es, libres de puntos en donde pueda haber acumulación y en donde sea difícil hacer penetrar el calor durante la esterilización. Desde luego que la lámina debe ser de alta calidad, exenta de rugosidades u otro defecto. Siempre que sea posible, el recipiente debe ser de una sola pieza; si no es posible evitar la soldadura, ésta no debe ser porosa y recubierta con un material inerte y no poroso como politetrafluoroetileno.

#### Inoculación y Muestreo.

La figura 2 y 3 muestra las conexiones requeridas para la transferencia aséptica de una suspensión de esporas a un tanque. El recipiente para la suspensión y sus tuberías son primeramente esterilizadas; el sistema se conecta con la línea directa del tanque por medio de un bypass. Después de esterilizar tuberías y válvulas del tanque, se utiliza la presión misma del aire estéril para inocular el tanque con la suspensión de esporas. O sea, según la figura, la suspensión se conecta en los puntos A y B, se cierran entonces las válvulas H e I, esterilizando con vapor las tuberías a través de las válvulas E, F y G, después de esto las

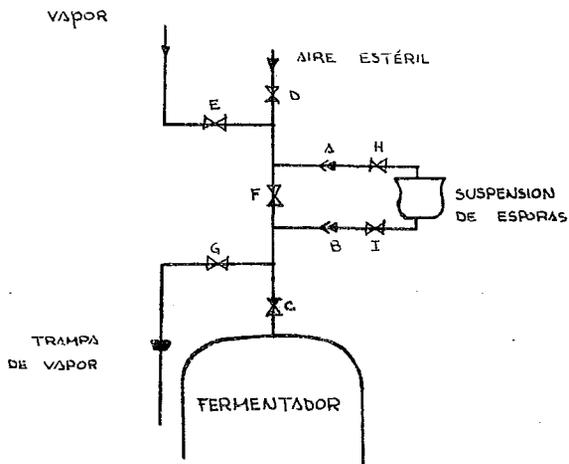


Fig. 2. TRANSFERENCIA ASEPTICA DE ESPORAS A UN FERMENTADOR

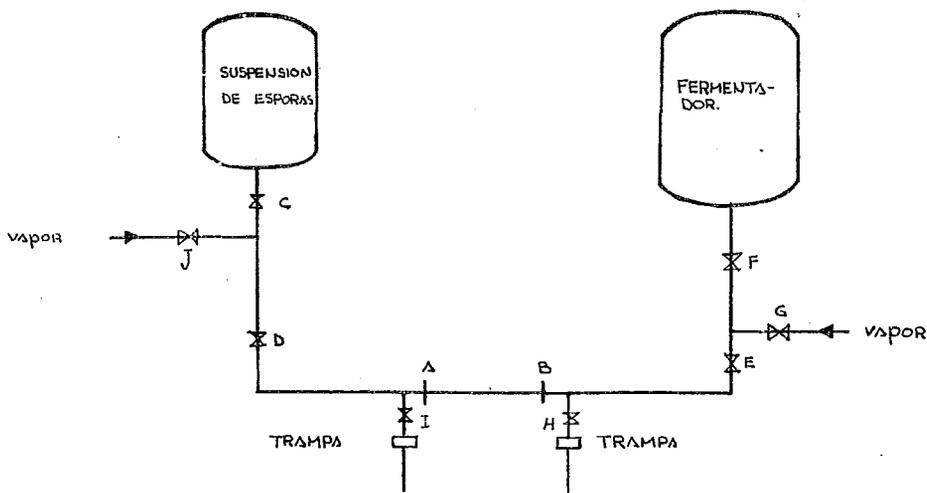


Fig. 3. INOCULACION ASEPTICA A UN FERMENTADOR

válvulas E y G son cerradas y se abre la válvula D, enfriando la línea con aire estéril, una vez que ha bajado la temperatura, la válvula F se cierra abriendo las válvulas H, I y C; ya inoculado el tanque se desconectan los puntos A y B. La figura ilustra otra técnica de inoculación. Dos recipientes se conectan en las juntas A y B; para esterilizar el medio en el fermentador se pasa por las válvulas J y G a través de E, D y F dentro del fermentador. Durante éste tiempo la válvula C se cierra mientras que H e I están ligeramente abiertas para eliminar el condensado. Una vez estéril el medio se cierran G, J, H e I y se abren F, E y D. El medio se enfría hasta la temperatura de inoculación, entonces se abre C y la semilla se transporta al fermentador simplemente por gravedad o por diferencia de presiones, finalmente F y C se cierran y la línea se reesteriliza antes de desconectar los puntos A y B.

Es frecuentemente necesario muestrear el medio durante la fermentación, la figura 4 muestra una línea de muestreo. Generalmente las válvulas A, B y C están cerradas y el extremo de la línea de muestreo está sumergido en una solución esterilizante. Cuando se requiere muestrear, se elimina el recipiente que contiene el germicida y se pasa vapor a través de B y C en cantidades suficientes para esterilizar la sección. Después B y C son cerradas parcialmente y A se abre ligeramente para permitir el paso de la muestra y para enfriar la línea. C es abierta y la muestra del fermentador se recoge en un recipiente estéril. Después del muestreo la línea se reesteriliza con vapor cerrando A y sumergiendo al último el extremo de la línea en la solución germicida.

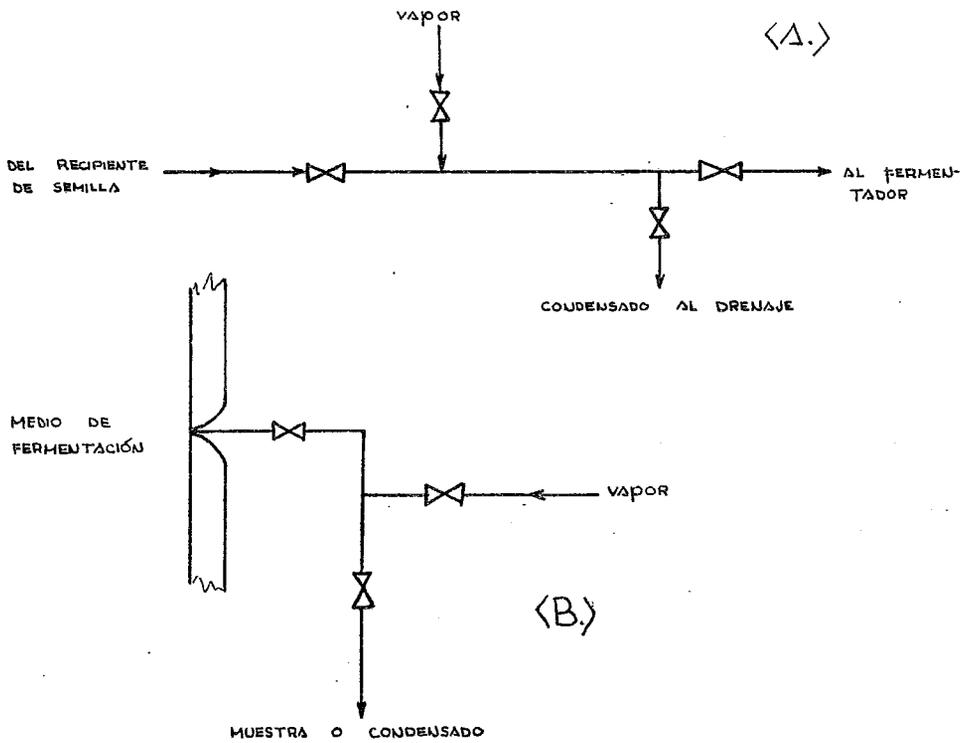


Fig. 4. SELLOS DE VAPOR EN:  
A. LÍNEA DE TRANSFERENCIA.  
B. LÍNEA DE MUESTREO.

**Dimensiones standard y aditamentos generales, comunes a todos los fermentadores. El enchaquetado se elimina en fermentadores pequeños, sustituyéndolo por un baño de agua.**

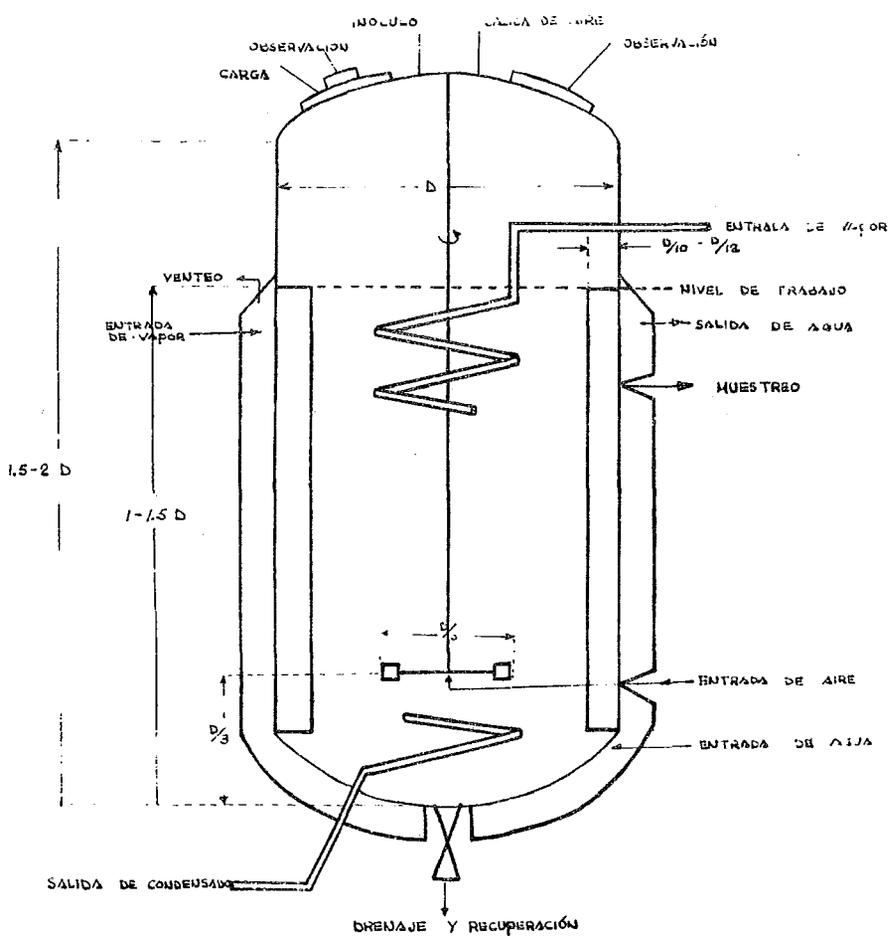


Fig. 5. PARTES Y DIMENSIONES BÁSICAS DE UN FERMENTADOR

### Aditamentos auxiliares.

Se ha mencionado la necesidad de adición del material al fermentador o transferir todo o parte de su contenido a otro recipiente, evitando la contaminación. Además, si el material que se extrae del recipiente sirve como inóculo a otro recipiente, ésta transferencia de material debe hacerse con el mínimo daño, para el microorganismo usado. La contaminación puede ocurrir por que el organismo indeseado esté en la masa transferida, o por que esté en el equipo de transferencia. La primera puede ser eliminada por adecuada esterilización del medio y del equipo, y la segunda se ocasiona por defectos en el manejo del medio o en el material. Para evitar ésta segunda causa, la selección de líneas de tuberías, válvulas y otros aditamentos debe seguir los principios enunciados para el fermentador mismo, especialmente en la falta de defectos. Los lubricantes deben ser esterilizados por calor o por adición de algún antiséptico en el caso último se deben tomar precauciones para no dañar la fermentación. Las válvulas de diafragma evitan dificultades asociadas con otros tipos, dado que el diafragma sirve para sellar la salida a la atmósfera. Este tipo de válvulas sirve al control de flujo manual o automático. El material del diafragma debe ser resistente no solo al medio, sino también a las repetidas esterilizaciones con vapor. Como otra precaución contra contaminaciones a través de válvulas, se usa un sello de vapor en las conexiones que por el momento no se utilizan.

La sección de la línea se mantiene bajo presión de vapor abriendo la válvula de entrada. Esto asegura la esterilidad de la línea. El recipiente debe tener controles y medidores de nivel del líquido, espuma, presión temperatura y pH.

## Equipo para control

a) Temperatura, presión y flujo de aire.

En los pequeños fermentadores de laboratorio, frecuentemente se pierde más calor por radiación y evaporación en la corriente de aire del que es generado por el proceso microbiano y la acción de agitación del impulsor y el aire. Para mantener el calor necesario es preciso utilizar un enchaquetado o un baño. Al aumentar el tamaño del recipiente, la superficie de irradiación por unidad de volumen decrece y el flujo volumétrico se reduce. Dependiendo de la naturaleza de la fermentación, la intensidad de la agitación, el flujo de aire y la diferencia de temperatura con el medio exterior, se puede suministrar calor por serpentines o por enchaquetado. La temperatura del medio se mide por termopares. Un método similar de control se usa para el flujo de aire, por ejemplo, utilizando un orificio o un medidor Venturi como sensor.

En la mayoría de las fermentaciones las variaciones de presión no son importantes, mientras que ésta se mantenga positiva, para evitar riesgos de contaminación. Una simple válvula en la línea de salida es suficiente y puede ser ajustada para una presión dada. En combinación con una válvula de no retorno en la línea de entrada, ofrece protección en el caso de una falla en el sistema de abastecimiento de aire.

#### b) Medida de pH

El desarrollo de electrodos de vidrio o metal resistentes a la esterilización permite la medida y control de pH in situ. Las desviaciones en el rango deseado se pueden deber a desarrollo inadecuado del medio o a algún desorden en el metabolismo de los microorganismos. Los electrodos medidores se pueden situar en el interior del fermentador. En ambos casos, los electrodos deben poder reemplazarse en caso de falla, sin suspender la fermentación. Deben de chequearse diariamente contra un electrodo patrón.

#### c) Control de espuma

Como resultado de la agitación y el paso de aire, muchos medios producen espuma, bajando aereación y/o agitación se puede reducir, pero también se reduce la productividad. En recipientes con mamparas y con inyección de aire, las vibraciones ultrasónicas y aditamentos mecánicos, ayudan a disminuir la espuma, sin embargo, son muy necesarios los antiespumantes químicos, en el caso de la industria alimentaria se utilizan aceites vegetales y animales. - Estos son usados dependiendo del efecto que causen en el medio, - se trata desde luego, de usar el mínimo posible de antiespumante, tanto por el aspecto económico como por el riesgo de que interfiera en la fermentación. La espuma se puede detectar usando un polo aislado de la pared del recipiente (que forma el otro polo) de un circuito que se cierra cuando la espuma toca el primer polo. Completando el circuito se puede usar éste para activar una alarma o para añadir algún agente antiespumante.

#### d) Mecanismos auxiliares.

Siempre que sea posible, la transferencia de masa de un equipo a otro se debe hacer por gradientes de presión o de gravedad. -

Esto evita problemas mecánicos asociados con el uso de bombas, o alguna fuente potencial de infección. Los diseños de las bombas deben ser lo más sencillo posible, de modo que permitan la entrada de vapor para esterilización.

### Esterilización del recipiente y el medio.

En un amplio rango de temperatura, abajo y arriba en el cual el crecimiento del microorganismo es óptimo, muchos organismos - pueden sobrevivir, ya sea en estado vegetativo o en esporas. Sobre una cierta temperatura crítica, de acuerdo a la especie del microorganismo así como a su estado, éste decae y muere. Sobre - éste punto la velocidad de decaimiento es exponencial en relación a la temperatura absoluta. En una temperatura supercrítica, el número de supervivientes decae con el tiempo. En general, las esporas son más resistentes en estado seco que en solución acuosa. Esto nos da un criterio para el vapor que se usará en la esterilización. Si el medio se esteriliza en el fermentador de tal forma -- que tanto el equipo como el medio se esterilizan juntos, se le denomina esterilización in situ. En otros casos se encuentra conveniente esterilizar el medio separadamente del equipo, aquí se tiene la ventaja de que el recipiente no está sujeto a la corrosión del medio caliente. Para la esterilización in situ se ha encontrado conveniente el uso de temperaturas de  $121^{\circ}\text{C}$  y vapor saturado - de 15 lb/pulg. La mayor parte de los organismos ya sea en estado vegetativo o en esporas mueren rápidamente a estas temperaturas. Sin embargo muchos medios de fermentación contienen partículas sólidas en suspensión y se necesita bastante tiempo para que el calor penetre en cualquier organismo embebido en las partículas, es

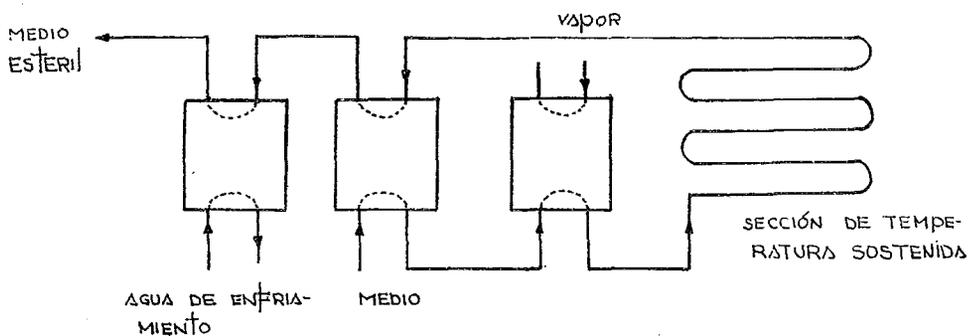
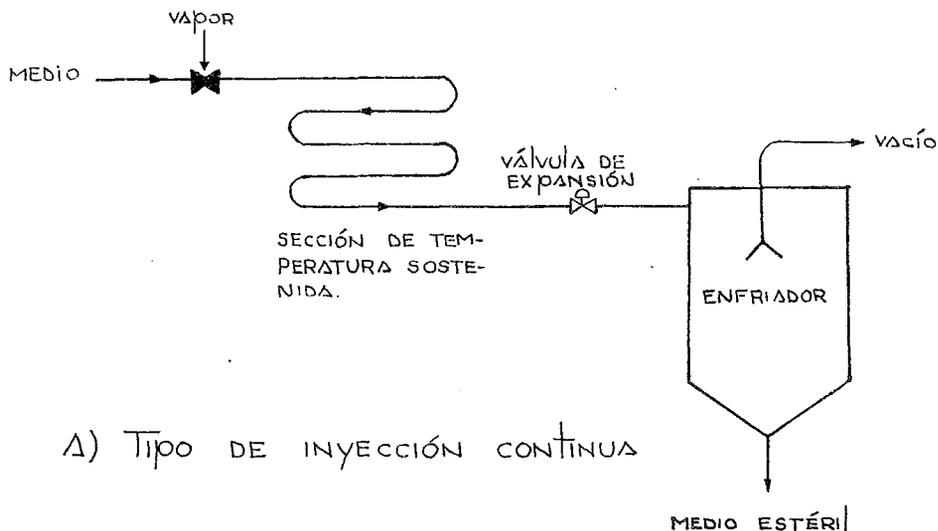


Fig. 6. ESTERILIZACION CONTINUA

por eso que la temperatura de esterilización es sostenida por algún tiempo.

Además de la inactivación de microorganismos, el calor de esterilización provoca cambios químicos en el medio, ya sea descomposición de compuestos sensibles al calor o interacción especialmente entre amonio o aminoácidos y carbohidratos, que pueden producir inhibidores.

La interacción entre carbohidratos y otros constituyentes del medio puede evitarse esterilizando los carbohidratos separadamente y añadirlos al medio cuando ya esté frío. El daño, aunque mayor, puede reducirse si se produce un rápido enfriamiento. Los materiales altamente sensibles al calor pueden esterilizarse separadamente por irradiación o por filtración.

Las altas temperaturas en periodos cortos de tiempo, sin reducir la efectividad en la esterilización, si reducen el daño. - Esto se aplica en esterilización continua. El fermentador es primero esterilizado vacío y se mantiene una pequeña presión positiva en su interior por medio de aire. El medio se prepara en un recipiente separado y se bombea a través de una unidad esterilizante al fermentador. En éste sistema no es económico usar altas temperaturas. Como resultado, el tiempo en que se sostiene la máxima temperatura se reduce notablemente, así los periodos de calentamiento y enfriamiento son del orden de segundos. Para medios libres de partículas en suspensión, una temperatura de 150-160°C da una esterilización virtualmente instantánea y los cambios químicos son despreciables. Con sólidos en suspensión es más difícil llegar a temperaturas óptimas y hay que dar tiempo para la penetración de calor en los sólidos. La temperatura necesaria en éste ca

so depende del tipo y naturaleza del sólido que se trate. Sin embargo se puede considerar como temperatura clásica de esterilización  $135^{\circ}\text{C}$  con 5 minutos ó  $121^{\circ}\text{C}$  con 20 minutos. El enfriamiento del medio se lleva a cabo en un cambiador indirecto del tipo de platos, pero el calentamiento puede ser tanto indirecto como directo, inyectando vapor. En éste último caso se tiene un factor de dilución, lo mismo que la esterilización in situ. Las limitaciones en relación al daño que se ocasiona por el calor se aprecian en el rendimiento de la fermentación. Una curva característica de temperatura-tiempo de esterilización se muestra a continuación.

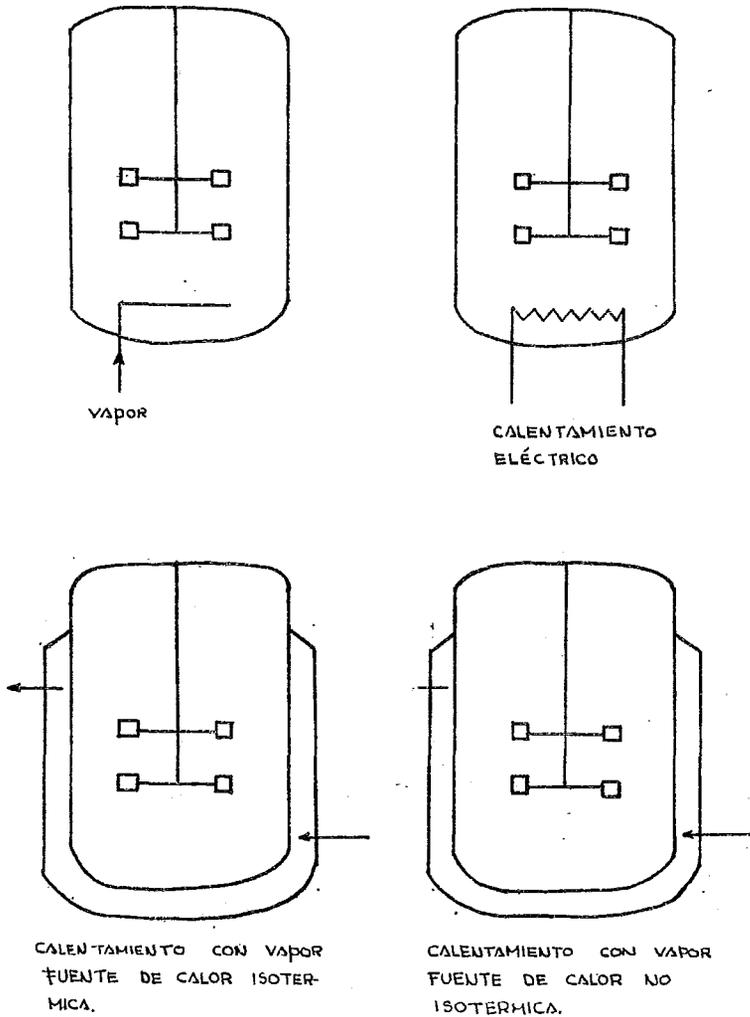
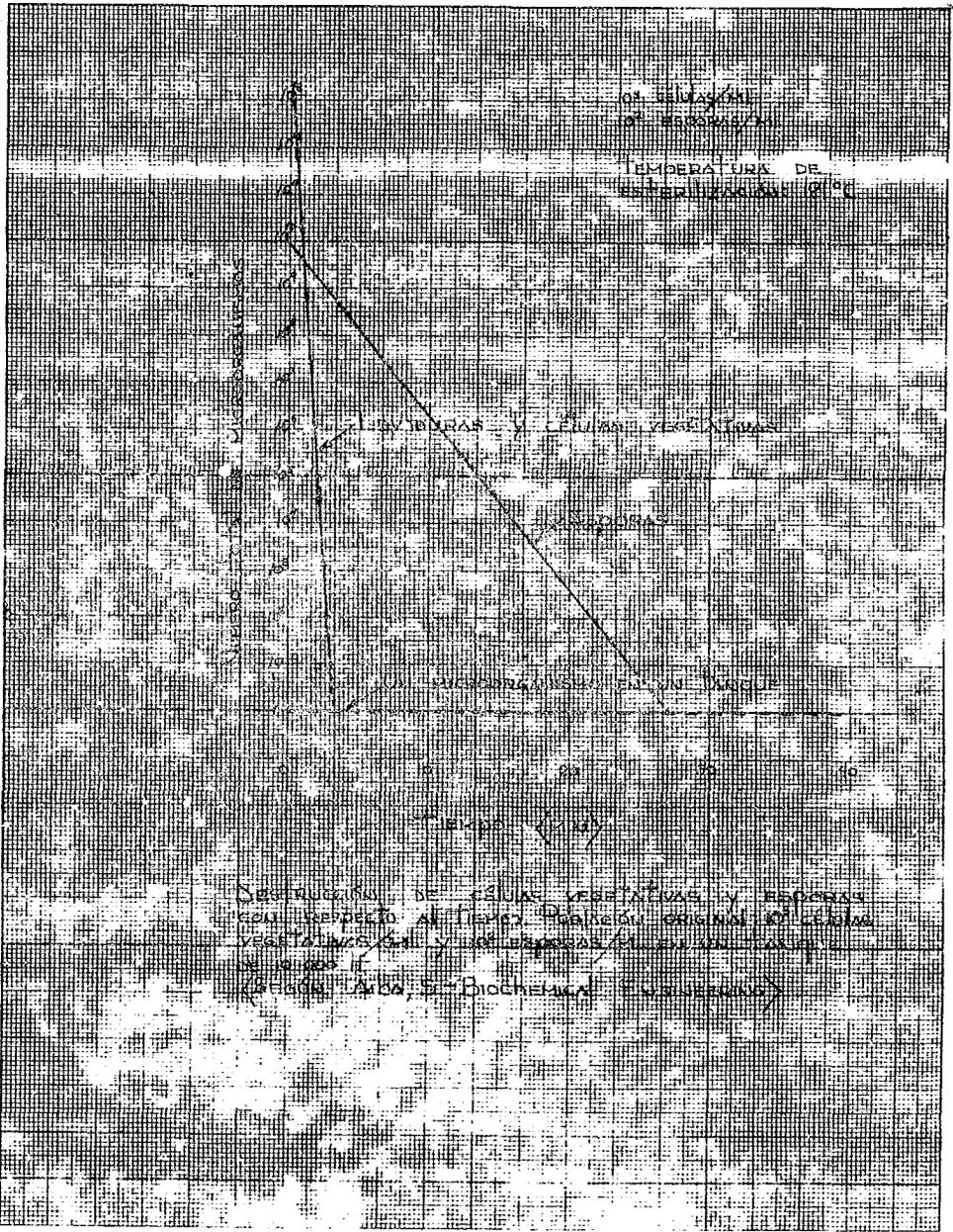
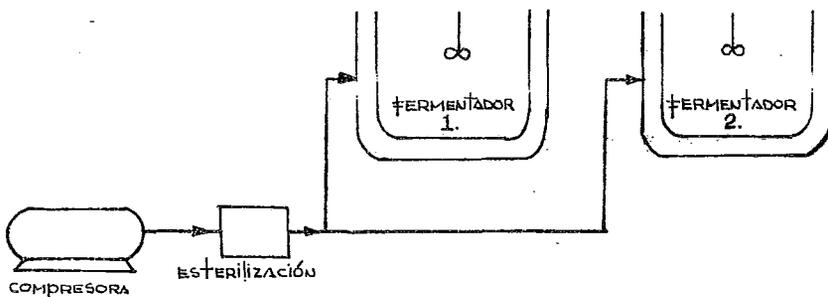


Fig. 7. Equipos para esterilización de medios in situ





### 3. ESTERILIZACION Y APROVISIONAMIENTO DE AIRE.



El aire se usa en los fermentadores para proporcionar oxígeno, eliminar volátiles, mantener una presión positiva, disminuyendo el riesgo de contaminación, y para dar fuerza motora en la transferencia entre recipientes. En éste último aspecto se puede usar para eliminar el uso de bombas que aumentan la complejidad mecánica y el riesgo de contaminación. A medida que el recipiente aumenta de tamaño, aumenta también la presión requerida por la salida del aire para vencer la cabeza estática del líquido, tomando en cuenta las pérdidas en válvulas y tuberías, se requiere por termino medio una presión de 40 lb/pulg<sup>2</sup> en el compresor. Durante la compresión, la temperatura aumenta con la siguiente relación:

$$\frac{T_2}{T_1} = \frac{P_2}{P_1}^{(n-1/n)}$$

donde:

$T_1, T_2$  = Temperaturas absolutas del aire entrando y saliendo del compresor.

$P_1, P_2$  = Presiones absolutas del aire entrando y saliendo del compresor.

$n$  = constante

El valor de  $n$  y por tanto el aumento en la temperatura, dependen de la naturaleza del ciclo de compresión. En una compresora isoentrópica,  $n=1$ , en un ciclo adiabático,  $n=1.4$ . Muchas compresoras actúan en condiciones casi adiabáticas en las cuales  $n=1.3$ . Esta expresión es utilizada para compresoras de una etapa y de etapas múltiples, siempre que no haya enfriadores entre etapas.

Excepto en el laboratorio, el uso de calor de compresión es la única forma por la cual el aumento de temperatura se usa para esterilización de aire. Para muchas instalaciones comerciales, aún el uso de calor de compresión resulta poco económico. Es necesario por tanto considerar procesos alternativos en los cuales los organismos pueden ser inactivados o eliminados de la corriente de aire. Entre los métodos considerados están el lavado usando sustancias esterilizantes, precipitación electrostática e irradiaciones. El último es poco económico debido a las altas intensidades necesarias. El lavado y precipitación electrostática no son suficientemente efectivos, en el lavado se corre el riesgo de arrastre de sustancias hasta el fermentador, las cuales pueden interferir la fermentación.

En la práctica, muchos microorganismos forman agregados o se adhieren a partículas pequeñas o gotas de agua en la corriente de

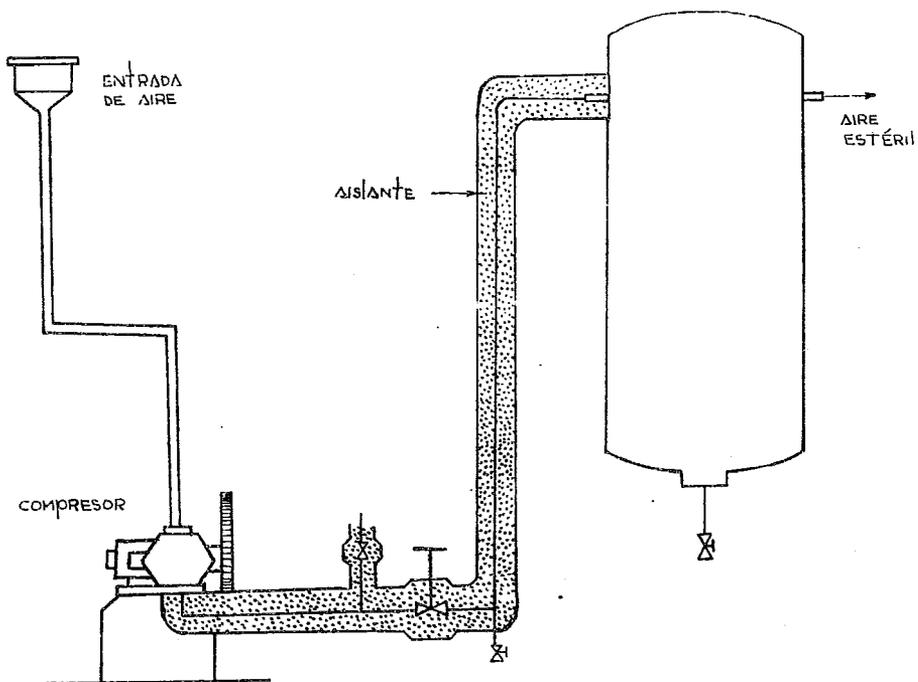


FIG. 8. ESTERILIZACIÓN DE AIRE CON CALOR GENERADO POR COMPRESIÓN

aire dentro del compresor, Algunos son eliminados por el filtro de salida, algunos son inactivados en el compresor, pero muchos quedan presentes en el aire comprimido.

La única forma satisfactoria y económica de eliminarlos es por filtración. Los filtros pueden ser: filtros absolutos en los cuales los poros son tan pequeños que no permiten el paso de microorganismos. A medida que aumenta el espesor de la película de organismos se bloquea el filtro. Es importante evitar canaladuras entre el filtro mismo y el armazón. La humedad en el aire reduce notablemente la efectividad.

#### 4. CENTRIFUGACION.

El producto de fermentación, una masa ligera, se pasa después a centrifugación. El fin de ésta operación no es eliminar toda el agua en la pasta, sino una parte, con el objeto de que la cantidad de agua que se necesita eliminar en el secado sea menor, con la consiguiente disminución de trabajo para el mismo.

El enfriador a través del cual pasa el agua eliminada permite la disminución de temperatura del fluido para que pueda ser utilizado posteriormente, si éste es conveniente.

Los sólidos que forman una torta porosa pueden ser separados de los líquidos por una centrifugación filtrante. La suspensión se introduce como alimentación en una cesta rotatoria provista de paredes perforadas o acanaladas. Recubriendo la pared se encuentra un medio de filtración tal como lona o tela metálica. La presión producida por la acción centrifuga, obliga al líquido a pasar a través del medio filtrante, dejando el sólido. Si se corta la alimentación de la cesta y se deja girar durante poco tiempo,

escurre gran parte del líquido residual contenido en la torta, dejando solamente los sólidos. Cuando el material filtrado hay que secarlo posteriormente por medios térmicos, puede obtenerse un ahorro considerable con el uso de una centrifuga.

Una clase común de centrifugas por cargas en los procesos industriales es la centrifuga con suspensión superior. La cesta está suspendida en la parte inferior de un eje vertical giratorio que es accionado desde arriba y gira libremente. Un medio filtrante recubre la pared perforada de la cesta rotatoria a través de un tubo o vertedero de entrada. El líquido sale a través del medio filtrante hasta la carcasa y luego para el conducto de descarga. El líquido lavado puede rociarse sobre los sólidos para eliminar el material soluble, enseguida se hace girar la torta. Se desconecta el motor y se reduce la velocidad de la cesta, casi hasta detenerla. Cuando la cesta gira lentamente, se descarga mediante una cuchilla, se desprende la torta del medio filtrante y la deja caer a través de una abertura situada en el fondo de la cesta. La mayor parte de estas centrifugas operan a ciclos de 10 a 30 minutos por carga.

En las centrifugas discontinuas la cesta gira con velocidad constante sobre un eje horizontal. La suspensión de alimentación se introduce en forma de lluvia dentro de la cesta a intervalos adecuados durante espacios de tiempo controlados. La cesta se descarga mientras gira a toda velocidad, mediante una cuchilla que asciende periódicamente y descarga en un vertedero. Las centrifugas automáticas tienen gran capacidad de producción para medios que escurren fácilmente. Generalmente no se pueden utili-

zar cuando la alimentación tiene partículas más finas que 150 mallas. Por ésta razón no son muy recomendables para medios de cultivo en los que haya levaduras.

Un separador centrífugo continuo para materiales gruesos es la centrífuga de vaivén. La cesta de la centrífuga se carga a través de un embudo de alimentación giratorio. El objeto del embudo es acelerar progresivamente la alimentación que entra por el lado estrecho del embudo, procedente de un tubo fijo situado en el eje de rotación de la cesta. Se desplaza hacia la parte ancha del embudo, ganando velocidad a medida que se desplaza y cuando sale de éste a la pared de la cesta está girando en el mismo sentido que la pared y a velocidad muy semejante. El líquido fluye a través de la pared de la cesta, que puede estar cubierta con tela metálica. Se forma una capa de sólidos, ésta se mueve sobre la superficie de filtración por medio de un impulsor de vaivés. Cada golpe del impulsor mueve los sólidos unos pocos centímetros hacia la parte exterior de la cesta; durante el movimiento de retroceso se libera una parte de la superficie de filtración, sobre la cual empiezan a depositarse más sólidos. Cuando los sólidos alcanzan la parte superior, caen en el interior de la carcasa y pasan a un colector de descarga.

La eficiencia de la centrifugación dependerá de la consistencia de la torta, necesaria para alimentar el secador, el cual a su vez depende de requerimientos propios del mismo (tipo de esprea secado a co- o contracorriente, etc.) y sobre todo a que no deben ser afectadas las propiedades alimenticias del producto. Esta, -- después de la centrifugación pasa nuevamente por esterilización. -- El fin es que, como se trata de un caso de micelio principalmente al entrar en el secador o aún en tuberías o válvulas, pueden quedar atrapados algunos microorganismos pudiendo producir resultados no convenientes, como contaminaciones, etc. Para evitarlo se esteriliza la masa mediante esterilización continua ya descrita. Esta masa ya estéril, pasa al secador.

#### 5. SECADO.

El secado por aspersión es ampliamente usado en la industria de alimentos y bioquímica por secar materiales sensibles al calor. Los altos coeficientes de transferencia combinados con las grandes áreas , se reflejan en los tiempos particularmente cortos de secado, que en muchos casos son del orden de segundos. Las caídas de temperatura permanecen bajo la temperatura de bulbo húmedo del gas que seca , hasta que el secado es casi completo, y el proceso entonces daña en un mínimo la sustancia a secar. Además, la naturaleza continua de la operación y su alta eficiencia térmica hacen bastante económica ésta técnica. Los secadores por aspersión son también usados para controlar la forma del producto. La forma más general de los secadores por aspersión es la que se muestra en la figura

El material que se va a sacar se introduce por la esprea y el gas para secar se introduce por la parte superior y se hace circular a corriente paralela con las gotas a través de la cámara, mientras que el gas se extrae a través de un ducto central. La mezcla del gas y el producto es afectado por el tipo de esprea el cual tambien controla el tamaño y forma del producto, así como la velocidad del secado. Las mayores variaciones sin embargo se tienen cuando existe flujo de aire caliente en corriente paralela a contracorriente o mezclando ambos cuando el aire se recircula dentro de la cámara. La eficiencia térmica depende en gran parte del proceso de transferencia de calor al material, la difusión del vapor del material al campo vecino y la difusión del líquido a través de las superficies sólidas formadas. Estas consideraciones se aplican a cualquier tipo de secador, pero se complican en el presente caso, por la interacción entre gotas, características particulares de la esprea y los problemas asociados con la dinámica del gas y movimiento de las partículas,

Al diseñar un secador por aspersion, se debe tomar en cuenta la determinación del tamaño de la planta así como obtener la mejor calidad del producto en relación a la velocidad del secado, así mismo, el diseño mecánico total, el diseño del equipo para calentar el medio y coleccionar el producto y la posibilidad de recircular el gas.

La eficiencia de la operación está determinada especialmente por el area superficial producida, así como el tamaño y uniformidad de las partículas. Si se producen gotas de un solo tamaño, sus velocidades de secado pueden ser facilmente determinadas, --

principalmente si se trata de materiales sensibles al calor. La cámara de secado es entonces diseñada conociendo los requerimientos de masa y de calor. En la práctica, sin embargo, hay un amplio rango de tamaño de partículas entre mayor sea éste, mayor será el problema. Por ejemplo, el tiempo de residencia de las partículas dentro del secador depende del tiempo requerido para que la gota mayor se seque, pero deben tomarse precauciones para que la gota menor no se sobrecaliente. El aspecto más importante es la temperatura del secado que debe ser tal que no dañe el material. Este factor influye en las condiciones de la entrada del aire y en el tipo de secador usado, haciendo que la temperatura superficial de la gota sea cercana a la temperatura de bulbo húmedo del gas circundante. La temperatura de bulbo húmedo depende de la temperatura de bulbo seco y de la cantidad de humedad presente y en el secado de materiales sensibles al calor hace considerar la reducción de una o de ambas condiciones (humedad y temperatura). Sin embargo, al formarse en las gotas una capa sólida, la temperatura de bulbo húmedo aumenta siendo entonces necesario que esté en contacto con un gas parcialmente enfriado, esto es, usar un secador de corriente paralela.

Otra consideración es el tamaño y forma del producto. El tamaño de la partícula depende esencialmente del tipo de esprea usada, y la densidad y forma de la partícula depende de la velocidad del secado y de las propiedades reológicas del material.

Antes de llevar a cabo los balances de materia y energía se deben determinar las condiciones de salida, éstas se calculan y se conoce el equilibrio vapor-líquido en el sistema. El equilibrio

del vapor depende de la concentración de la masa aumentada, ésta determina la máxima humedad del producto. Entonces un balance entre la cantidad de líquido eliminado del producto y la humedad que entra con el gas será una base para determinar el mínimo necesario de gas. Se emplea un reciclo con calentamiento de gas para aumentar la eficiencia térmica del proceso.

Una vez que el flujo del aire ha sido determinado, se estima la sección transversal del secado, para que el material alimentado no choque contra las paredes. La velocidad del aire del secado dependerá si se lleva a cabo a contracorriente o a corriente paralela. Enseguida se determina la altura del secador.

Los factores para escoger la espesa dependen del tipo especial de secado y características del líquido alimentado. En caso de producción de micelio en que se trata de una pasta muy viscosa se emplean espesas grandes. Se debe de tener cuidado para evitar las incrustaciones alrededor de la salida.

En la cámara de secado las corrientes de gas y de líquido deben ser llevadas en contacto para la eficiencia al mezclar sea la máxima, ésta eficiencia se define como sigue:

$$\eta_o = \frac{t_1 - t_2}{t_1 - t_s} \times 100$$

donde:

$t_1$  = temperatura de entrada del aire a la cámara

$t_2$  = temperatura de salida del aire de la cámara

$t_s$  = temperatura ambiente

Esto dá una eficiencia global, pero no toma en cuenta las pérdidas de calor y cambios en la capacidad calorífica del aire. La eficiencia de evaporación es:

$$\eta_e = \frac{t_1 - t_2}{t_1 - t_s}$$

e indica el acercamiento a la saturación en el medio secante - donde  $t_s$  es la temperatura de saturación adiabática en el interior. Los secadores a contracorriente dan mayor eficacia térmica, pero se tiene una temperatura mayor en el producto, por lo que no se puede usar en materiales muy sensibles al calor. La corriente paralela es menos efectiva, pero tiene la ventaja de dar menos temperatura.

La eliminación de materia seca no ofrece mayores dificultades, excepto que en algunos casos las partículas más pequeñas - pueden ser arrastradas por el gas de salida. En algunos casos es conveniente colectar el producto fuera de la cámara. Este método es adecuado para materiales sensibles que se pueden deteriorar - si están en contacto con superficies calientes.

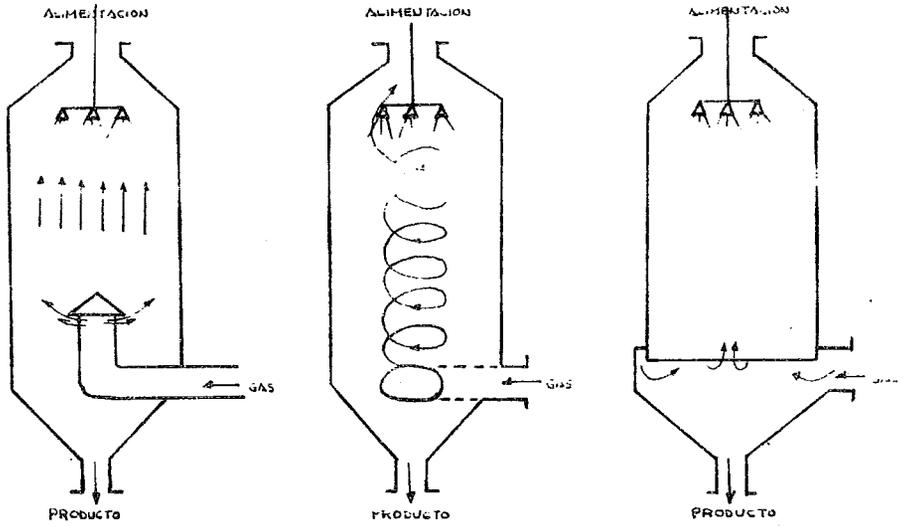


Fig. . SECADORES POR ASPERSION A CONTRA-CORRIENTE.

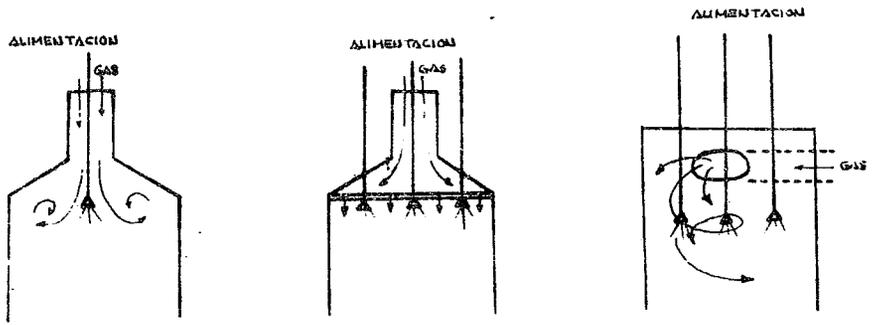


Fig. 9. SECADORES POR ASPERSION A CO-CORRIENTE

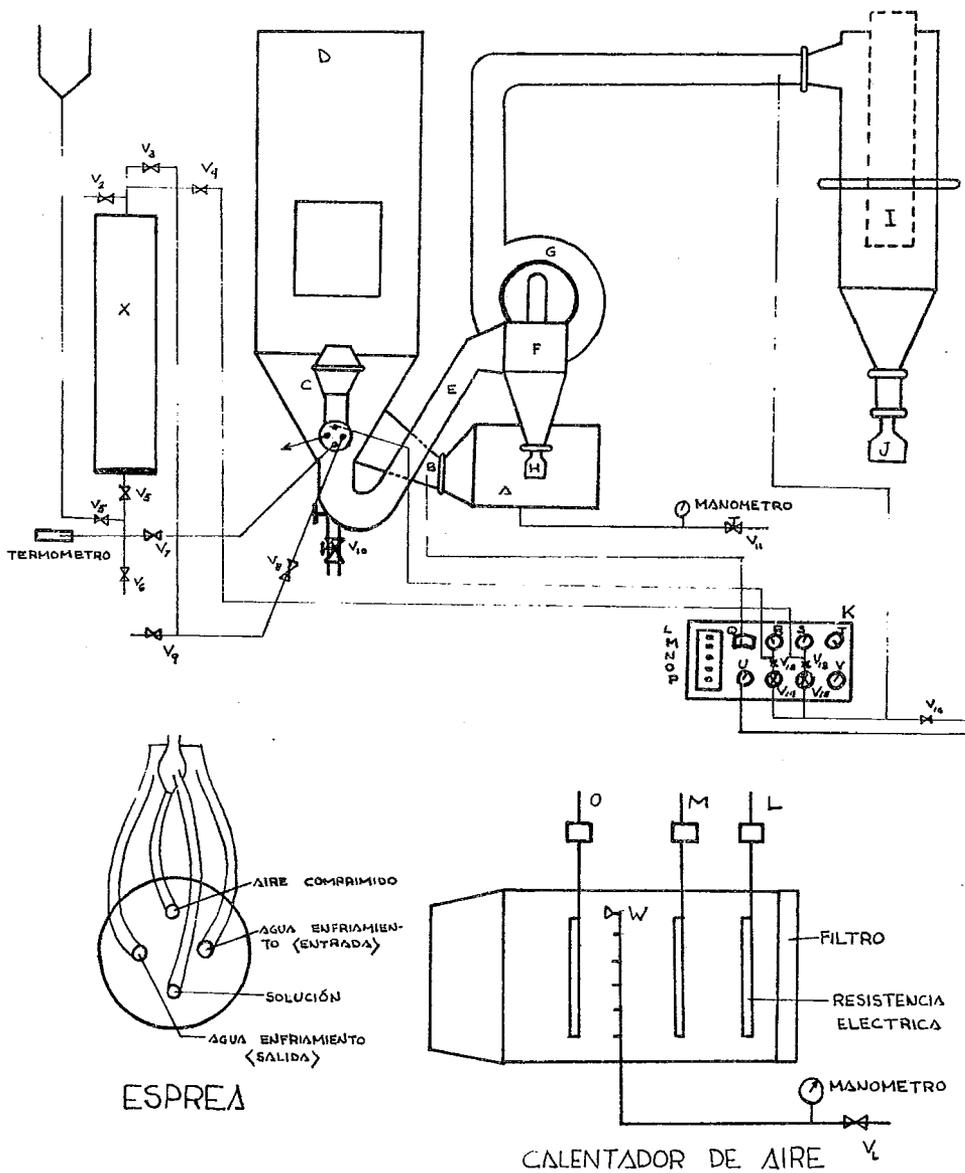
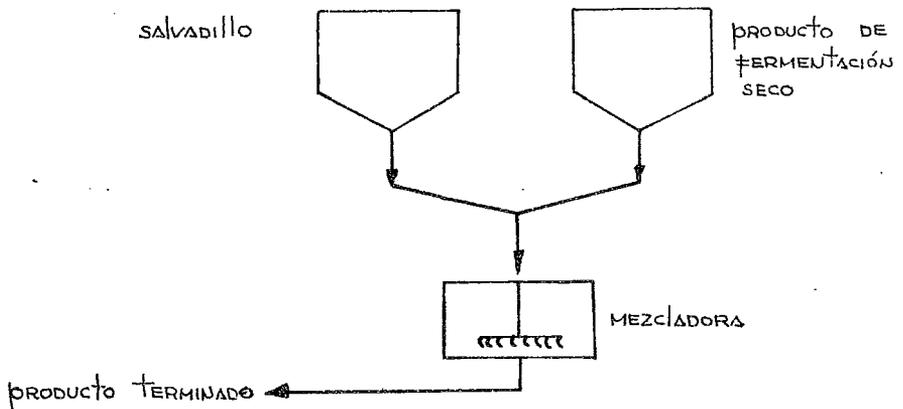


Fig. 10. SECADOR POR ASPERSIÓN

FIGURA 10.

- a) Calentador de aire
- b) Ducto para aire caliente
- c) Atomizador
- d) Cámara de secado
- e) Descarga de la cámara
- f) Ciclón colector No. 1
- g) Ventilador-extractor
- h) Colector de polvos No. 1
- i) Ciclón colector No. 2
- j) Colector de polvos No. 2
- k) Instrumentos de control
- l) Contacto para resistencia termostática
- m) Contacto para resistencia eléctrica
- n) Contacto disponible
- o) Contacto para resistencia eléctrica
- p) Contacto para el motor del ventilador-extractor
- q) Control de temperatura de aire caliente
- r) Presión de aire de atomización
- s) Presión al tanque de alimentación
- t) Indicador de temperatura de salida de la cámara de secado
- u) Hidrómetro para determinar la humedad de gases de salida
- v) Hidrómetro para determinar la humedad ambiente
- w) Aire de enfriamiento al último banco de resistencias
- x) Tanque alimentador (monta jugos)

## 6. MEZCLADO DE SÓLIDOS



La masa ya seca pasa al segundo mezclador, con el cual se adiciona el salvadillo. Para ese caso es necesaria una mezcladora de polvos secos. Aunque algunos equipos descritos para el mezclado de pastas son también usados para mezcla de sólidos, su eficiencia es mucho menor al aplicarse a éste fin. Los siguientes equipos ejercen su efecto por acción mecánica, como las mezcladoras de cintas, levantando, dejando caer y enrollando repetidamente el material. Una mezcladora de cintas está formada por un canal horizontal que tiene un eje central y un agitador de cintas helicoidales. Se montan dos cintas que actúan en direcciones contrarias sobre el mismo eje; una mueve lentamente el sólido en una dirección y la otra lo lleva repetidamente en dirección contraria. Las cintas pueden o no ser contrarias. El mezclado se origina por la turbulencia producida por los agitadores de sentido contrario y no solamente por el movimiento de los sólidos a través del canal. Algunas mezcladoras de cintas operan introdu-

ciendo sólidos que mezclan hasta obtener resultados satisfactorios; otras mezclan de forma continua sólidos que se introducen por un extremo del canal y descargan en el otro.

El canal es abierto o ligeramente cubierto, en condiciones ordinarias y cerrado y con paredes fuertes cuando la operación es a presión o al vacío. Las mezcladoras de cintas son eficaces con polvos que no fluyen facilmente.

Muchos materiales se mezclan por agitación dentro de un recipiente lleno que gira sobre un eje horizontal, la mayoría de las mezcladoras rotativas no contienen elementos de molienda. Otras mezcladoras giratorias manejan solo polvos secos más ligeros; la mezcladora de doble cono es muy común para éste tipo de sólidos. Se introduce por arriba una carga hasta llenar el 50-60% del volumen total, se cierran sus extremos y se agitan los sólidos por 15 a 20 minutos, se detiene la máquina y se descarga el material mezclado por el fondo del recipiente hasta una tolva o transportador. La mezcladora de tambores genelos se fabrica con dos cilindros unidos en forma de V y se hace girar sobre un eje horizontal, como la mezcladora de doble cono, puede contener accesorios mecánicos para separar los aglomerados de sólidos.

Los polvos ligeros y finos pueden mezclarse en forma continua esparciendolos en una capa delgada por acción centrifuga. Los ingredientes secos se introducen continuamente cerca del centro de un disco giratorio de alta velocidad que los arroja dentro de la carcasa estacionaria. Los esfuerzos cortantes que actúan sobre los polvos, mezclan perfectamente los distintos materiales. En algunas máquinas el disco es vertical; en otras, horizontal, en algunos aparatos proyectados para el mezclado la alimentación pre-

mezclada se introduce dentro de un rotor doble horizontal que lleva pernos cortos y verticales cerca de la periferia para aumentar la eficiencia. Un disco gira con altas velocidades, a veces es necesario pasar repetidamente el material por la máquina, a través de varias dispuestas en serie. Para obtener buenos resultados, la alimentación premezclada debe ser bastante uniforme, pues casi no hay retención de material en el aparato y no hay posibilidad de recombinar el material que ha pasado con el que está entrando.

## CONCLUSIONES.

### I.- Trabajo Precedente.

El trabajo que antecede al presente, que ya antes se mencionó, es la determinación de microorganismos adecuadas, así como de los medios de cultivo, óptimos para el crecimiento de la cepa escogida. Debe notarse que los rendimientos obtenidos en éste trabajo preliminar fueron menores, de lo cual podría ser causa que se sembró separando pequeñas fracciones de la colonia, mientras que aquí como ya se dijo, se inoculó vaciando el contenido del recipiente de semilla en el fermentador, con lo que se arrastra gran cantidad de amilasa existente en la solución.

Por razones de facilidad de manejo se evitó sembrar en medio sólido, para después separar éstas fracciones e inocularlas (16), se pensó que sería más conveniente adicionar al final el salvadillo ya que la manipulación de éste así como su tratamiento para esterilizarlo pueden perjudicar las vitaminas del complejo B existentes. Por otro lado, las dimensiones del equipo desde un principio manejando los dos subproductos serían mucho mayor que manejando solamente uno (granillo) y consecuentemente aumentara el costo y dificultad de manejo.

Se siguió el proceso delineado con anterioridad pero se varió en puntos tales como composición de los medios de fermentación, etc. por considerarse más prácticos de ésta última forma, pero se mantuvieron las condiciones básicas como pH, temperatura y cepas usadas. En éste último punto se aumentó la posibilidad de utilizar *S. rimosus*, así como la inoculación de *A. oryzae* y *S. carbagalli* a intervalos cortos.

Generalizando, el trabajo de estudio microbiológico y bioquí

mico detallado en la tesis precedente (43), fué una base para desarrollar éste, y se variaron puntos de menor importancia que no procederían en una planta, en caso de seguirse como se establecieron.

## II.- Procesos semejantes.

Este no es un proceso novedoso, sino que desde 1939 (26), se han llevado a cabo procesos semejantes. La parte que se podría reportar como nueva es la utilización de amilasa unicamente para degradar los almidones, y las levaduras que se han usado son para producir materias que puedan ser alimenticias, no para fermentación alcoholica como es la finalidad de otros procesos. Además se tiene que las dos cepas (mas una opcional) crecen al mismo tiempo en el mismo medio, sin aparente interferencia de una en otra.

## III.- Hidrólisis fungal o ácida.

La hidrólisis puede llevarse a cabo con ácidos inorgánicos o con enzimas. Como se trata de discutir la aplicación de microorganismos a la producción de alimentos se utilizó la hidrólisis fungal. Además el micelio que se produce al hongo, está constituido de proteína, que también puede ser alimenticia. Por otra parte, ya se mencionó que la esterilización, ablandamiento de almidones, y pH bajo facilitan el ataque enzimático a uniones glucosídicas.

## IV.- Cantidades de arroz quebrado y salvadillo. Relación

Como la producción que se toma de arroz palay (al año) es de aproximadamente 21,000 ton., la cantidad de arroz quebrado hasta un 25% al año es 1,200 ton., y de salvadillo es 2.4/l (en 10 lt. de medio, 1kg. de arroz quebrado) la cantidad de salvadillo adi-

cionada por cada carga de fermentador fué de 420 g. Con ésta relación se aprovecha íntegramente la cantidad de salvadillo subproducto de un beneficio.

#### V.- Rendimiento.

El rendimiento, puesto que no todos los almidones se degradan y en caso de degradarse no se llega totalmente a monosacárido, no es en realidad el 100% que se reporta, sino que existe una variante, por otra parte el método de Underkofler cuantea azúcares reductores totales, los cuales, ya sean o nó monosacáridos, son aprovechados por los microorganismos como fuente de carbohidratos, por tanto el rendimiento final es en base al análisis bromatológico básico, relacionando las proteínas producidas con respecto a una cantidad determinada de materia prima con alto contenido de almidón.

#### VI.- Aprovechamiento de los azúcares.

Es un aprovechamiento integral, ésto es, la cantidad producida es suficiente para suministrar carbohidratos a los microorganismos. Se supone la existencia de productos metabólicos determinable, nuevamente, mediante pruebas más complejas, digestibilidad, crecimiento, etc. en las que no se profundizó por alejarse de la idea principal del trabajo.

#### VII.- Valor alimenticio del producto terminado.

Como lo que se desea producir es un concentrado protéico para servir de aditivo en los alimentos, es necesario en primer lugar hacer un análisis bromatológico y después variar el porcentaje para que se adicione al forraje para obtener un alimento balan

ceado con un óptimo de digestibilidad. Es necesario también determinar la composición óptima de éste aditivo, como se mencionó en la discusión de los resultados.

#### VIII.- Cepas.

Las cepas crecieron satisfactoriamente en los medios, lo cual permitió proceder al resto de la investigación; no sufrieron mutaciones y llevaron a cabo perfectamente la función necesaria de cada una de ellas. Son fáciles de conservar resembrando aproximadamente cada 8 a 10 días, o bien liofilizadas, como de hecho se obtuvieron originalmente. En cuanto a *S. rimosus* el problema que presenta es su crecimiento en pH neutro; éste podría ajustarse usando sales de amonio las cuales serían también una magnífica fuente de nitrógeno, pero el uso de ésta cepa está condicionado al balance alimenticio que se determinaría por pruebas de digestibilidad, así como por costos de operación para neutralizar los medios.

#### IX.- Materiales y Métodos.

En los fermentadores, aunque el producto final fué bastante aceptable, se tuvieron disminuciones en los rendimientos por falta de aditamentos adecuados para muestreo; la forma en que se muestreó, en varios casos ocasionó contaminaciones. También la falta de mamparas ocasionó la ausencia de turbulencia y consecuentemente la difusión de aire en cantidades adecuadas para un óptimo crecimiento de las cepas. La temperatura controlada por baño maría no fué problema, pues el baño llega a la altura en que está el medio y la temperatura fué bastante homogénea durante todo el tiempo de fermentación y en toda el area de transferencia, con la salvedad -

de que hay que adicionar periódicamente agua, para mantener el nivel, para compensar la evaporación.

El secado en el laboratorio fué suficiente para obtener un mínimo de humedad, pero se tuvo el problema que las capas superficiales de masa alcanzaron mayor temperatura que las internas, - sufriendo daño las primeras por exceso de calentamiento y formando finalmente un sólido compacto que fué necesario moler. Este -- problema, obviamente no se presenta en un secador por aspersion - calculado para el caso.

(Los métodos para conservación, preparación de semillas y fermentación son los comunmente usados). El almacenaje del producto - terminado en éstas condiciones de mínima humedad, no presenta ningún problema.

#### X.- Control.

El control principal es con respecto al porcentaje de hidrólisis que ocurre, usándose entonces el método de Underkefler por mayor rapidez y facilidad. El aumento de micelio es importante para conocer el aumento de individuos en el medio. El control bromatológico y de digestibilidad es muy importante que se estudie posteriormente para conocer puntos que no están suficientemente claros.

#### XI.- Resultados.

El crecimiento en el fermentador fué satisfactorio. El tiempo óptimo de hidrólisis máxima varió de una prueba a otra, pero - en general se encontró entre las 72 y 96 horas. El tiempo de procesado se encontró bastante factible de acertarse, sin que el cre

cimiento de una cepa interfiera en el crecimiento de la otra.

### XII.- Planta

La visualización de las operaciones necesarias para obtener el producto terminado, se basó en operaciones de cada parte en plantas ya construidas con procesos similares, u operaciones aplicables en general (secado y mezclado). El diseño exacto de cada parte, así como de la planta deberá ser objeto de estudio más profundo. Así como de balances detallados de materiales y energía. En general, de las operaciones que se llevaron a cabo se puede concluir lo siguiente:

#### a) Mezclado.

El mezclado de los alimentos que constituyen el medio de cultivo es un mezclado de pastas; aunque en el fermentador hay agitación es preferible que las sales entren disueltas desde un principio, para tener un producto homogéneo para las siguientes operaciones de esterilización y fermentación.

#### b) Esterilización.

Previa a la fermentación está la esterilización del medio, debido a que es una cantidad pequeña la que se trabaja en una planta semi-piloto, es preferible la esterilización in situ, en vez de esterilización continua usada para grandes cantidades de medio, en el plano industrial ( 4 ). La esterilización de recipientes, tuberías etc, son por medio de vapor. No es recomendable en una planta industrial la esterilización in situ o batch, por reducir el tiempo de vida de los recipientes.

#### c) Fermentación.

Los fermentadores con chaqueta presentan la ventaja de ocupar menor espacio y menor pérdida de calor, aunque se requiere de generación de vapor u otro medio de calentamiento. Un fermentador con capacidad de trabajo de 50 litros resultaría muy adecuado a los fines semi-piloto.

#### d) Inoculación y muestreo.

El inóculo procede de un recipiente en el cual se tiene un volumen equivalente a 5-10% del volumen de trabajo a su vez debe proceder de una semilla de unos 75-100 ml. obtenida por inoculación de la cepa en medio adecuado. Este aumento progresivo de volumen es con el fin de aprovechar el crecimiento logarítmico de los microorganismos, aumentarlo exponencialmente en un recipiente a otro. El inóculo no presenta problemas de contaminación si se toman precauciones de esterilidad en la región cercana al orificio de inoculación, flama o luz u.v. Es conveniente que la cepa no sea expuesta a luz ultravioleta para evitar mutaciones. El muestreo se hace por medio de válvulas adecuadas las cuales están acondicionadas para evitar la contaminación, generalmente por medio de sellos de vapor. El volumen de la muestra es de 25 a 30 ml. (diariamente o a intervalos más cortos, de ser necesario). Los aditamentos auxiliares, (electrodos, termopares, válvulas, bombas, etc.,) deben cumplir los requisitos de saneamiento y esterilidad ya establecidos.

#### e) Control.

Básicamente son temperatura, presión, flujo de aire, pH, espuma. Esta última no es necesaria por no producirse espuma en la fermentación, pero se menciona por ser una rutina en casi todas las fer

mentaciones, además de que de existir alguna contaminación, se produce espuma, como se observó en el laboratorio. Presión y flujo de aire no deben variarse en cuanto se establecen y se dá comienzo a la operación; pH es variable en un rango de 5.6 a 6.5 y temperatura de 28 a 30°C.

#### f) Aereación.

Su esterilización se recomienda por medio de filtros de algodón y carbón activado, los cuales deben ser renovados periodicamente para evitar bloqueos. El tubo de descarga del aire debe estar en el extremo inferior de la flecha del agitador, o de otra forma ser un agitador-aereador (4), (15), ésto es para tener una distribución del aire.

#### g) Centrifugación.

Es con el objeto de separar parte del agua comprendida en el producto, pues de otra forma el trabajo necesario en el secado sería mayor al tener que eliminar toda el agua. El líquido centrifugado puede separarse y analizarse, dado que podría servir como base para medios de cultivo, o aún recuperar sustancias nutritivas.

#### h) Secado.

No presenta ningún problema al ser el más adecuado el secado por aspersión, con corrientes paralelas, obteniéndose un producto granulado homogéneo. La temperatura de secado debe ser moderada para no perjudicar los compuestos del material protéico.

#### i) Mezclado de sólidos.

Finalmente y en una proporción de 2.4 de granillo procesado a 1 de salvadillo se mezclan éstos dos sólidos en mezcladoras. El almacenaje de éste producto final, dado que contiene muy poca humedad es sencillo, en sacos o bolsas con capa de paño, sin gran peligro de contaminación, aunque debe de cuidarse sobre todo de contaminación de insectos (gorgojos).

### XIII.- Centralización o regionalización de plantas.

Se ha llevado a cabo una discusión en el aspecto químico y se consideran equipos en una forma general. En el aspecto de centralizar la producción de aditivo para alimentos se debe recordar que aunque se ha discutido acerca del arroz, éste subproducto se eligió por ser un problema planteado, pero puede llevarse a cabo materiales en cuya composición exista abundancia de almidón. Entre éstos se encuentran algunos tipos de plantas silvestres que crecen abundantemente en zonas pantanosas del sureste del país, ricas en almidones y que no son aprovechadas en absoluto. el proceso por tanto, mediante tratamiento previo de los almidones en tal forma que el ataque por enzimas sea factible, y conveniente en el rendimiento final, puede llevarse a cabo con muchas materias primas. En función a éstas se determina la fase económica del proceso. La facilidad en el transporte así como facilidad de instalación, disponibilidad de materias auxiliares, esencialmente agua, determinaría la centralización o regionalización del proceso. Así mismo, podría estudiarse la posibilidad de adaptarla a la planta beneficiadora de arroz en forma de "planta paquete".

Las materias primas que se mencionan son todas de fácil mane

jo, bajo costo y con excepción del granillo de arroz, los elementos son de fácil almacenaje y duración

Estos temas se solucionan mediante el estudio profundo de la Ingeniería del Proceso, pero también son resultado de operar durante algún tiempo, si es necesario relativamente largo, una planta piloto. De aquí se obtendrían datos más exactos para aplicarlos a un aumento de escala.

**CAPITULO V. BIBLIOGRAFIA.**

BIBLIOGRAFIA.

Libros

1. Alexander, M.  
INTRODUCTION TO SOIL MICROBIOLOGY  
John Wiley & Sons. New York. 1961
2. Aiba, S. et al.  
BIOCHEMICAL ENGINEERING  
Academic Press. London. 1965
3. Bennett, T.D.  
GRAPHIC BIOCHEMISTRY  
Vol. 1.- Chemistry of Biological Molecules  
Vol. 2.- Metabolism of Biological Molecules  
McMillan Co. New York. 1965
4. Blakebrough, N. (editor)  
BIOCHEMICAL AND BIOLOGICAL ENGINEERING SCIENCE  
Vols. 1 & 2  
Academic Press. London. 1968
5. Conn, E. & Stumpf, P.  
BIOQUIMICA FUNDAMENTAL  
John Wiley & Sons. New York. 1960
6. Foust, A. et al.  
PRINCIPLES OF UNIT OPERATIONS  
John Wiley & Sons. New York. 1960

7. Gortner, R. A.  
OUTLINES OF BIOCHEMISTRY  
John Wiley & Sons. New York. 1944
8. Laguna, J.  
BIOQUIMICA  
La Prensa Médica Mexicana. México D.F. 1963
9. McCabe, W. & Smith, J.  
OPERACIONES BASICAS EN INGENIERIA QUIMICA  
Vols. 1 & 2  
McGraw Hill Co. México D.F. 1968
10. Mertz, E.T.  
BIOQUIMICA  
Publicaciones Culturales. México D.F. 1971
11. Morrison, R. & Boyd, R.  
ORGANIC CHEMISTRY  
Allyn and Bacon, Inc. Boston.
12. Prescott, S. & Dunn, C.  
INDUSTRIAL MICROBIOLOGY  
McGraw Hill Co. New York. 1959
13. Rainbow, C. & Rose, A. (editors)  
BIOCHEMISTRY OF INDUSTRIAL MICROORGANISMS  
Academic Press. London. 1963.
14. Revultas González, L.  
BROMATOLOGIA ZOOTECNICA Y ALIMENTACION ANIMAL  
Salvat Editores. Barcelona. 1953

15. Solomons, G.L.  
MATERIALS AND METHODS IN FERMENTATIONS  
Academic Press. London. 1969
16. Treybal, R.  
MASS TRANSFER OPERATIONS  
McGraw Hill Co. New York. 1968
17. Underkofler, L.A. et al.  
INDUSTRIAL FERMENTATIONS  
Vols. 1 & 2.  
Chemical Publishing Co. Inc. New York. 1954
18. Waksman, S.A.  
SOIL MICROBIOLOGY  
John Wiley & Sons. New York. 1952
19. Waksman, S.A.  
THE ACTINOMYCES.  
Chronica Botanica Co. Waltham Mass. 1950

Revistas

20. Adams, et al.  
SUBMERGED CULTURE OF FUNGAL AMYLASE  
Ind. Eng. Chem. 39, 1615 (1947)
21. Elzinga, E. & Laskin, A.  
PROTEINS FROM PETROLEUM  
Enc. od Chem. Eng. Volumen Suplementario, 846 (1971)
22. Erb, N. et al.  
MOLD AS AN ADJUNCT IN GRAIN FERMENTATIONS  
Ind. Eng. Chem. 38, 792 (1946)

23. Peters, A.  
PROTEINS FROM A NO-BIOLOGICAL SOURCE  
Jour. of Chem. Eng. 78, 25 (1971)
24. Shaffer, P. & Hartmann, A.  
THE IODOMETRIC DETERMINATION OF COPPER AND  
ITS USE IN SUGAR ANALYSIS.  
Washington University Medical School Bulletin  
St. Louis, 1920
25. Shaffer, P. & Hartmann, A.  
IODOMETRIC DETERMINATION OF REDUCING SUGARS  
Jour. of Biol. Chem. 45, 365 (1921)
26. Underkofler, L. A. et al.  
SACCHARIFICATION OF STARCHY GRAIN MASHES FOR  
THE ALCOHOLIC INDUSTRY. COMPARISON OF SEVERAL  
SACCHARIFYING AGENTS.  
Ind. Eng. Chem. 32, 544 (1940)
27. Underkofler, L.A. et al.  
SACCHARIFICATION OF STARCHY GRAIN MASHES FOR  
THE ALCOHOLIC INDUSTRY. USE OF MOLD AMYLASE.  
Ind. Eng. Chem. 31, 734 (1939)
28. Underkofler, L.A. et al.  
FUNGAL AMYLASE AS SACCHARIFYING AGENT IN  
ALCOHOLIC FERMENTATIONS.  
Ind. Eng. Chem. 35, 814 (1943)
29. Underkofler, L.A. et al.  
SACCHARIFICATION OF GRAIN MASHES FOR ALCOHOLIC  
FERMENTATIONS. (PLANT SCALE USE OF MOLD AMYLASE)  
Ind. Eng. Chem. 38, 980 (1946)

30. Underkofler, L.A. et al.  
A SEMIMICROMETHOD FOR DETERMINATION OF REDUCING  
SUGARS IN FERMENTATION MEDIA.  
Iowa St. Coll. Jour. of Sci. 17 (2):251-6
31. Martínez, A.  
APROVECHAMIENTO DEL PULIDO DEL ARROZ EN LA EXTRAC  
CION DEL ACEITE Y CERA POR EL PROCESO FILTRACION-  
EXTRACCION.  
I.M.I.Q. Febrero 1970. Vol X Num. 2

Publicaciones Gubernamentales

32. A.O.A.C. (Association of Official Agricultural Chemists)  
OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL  
AGRICULTURAL CHEMISTS.  
Horwitz, W. (editor), 8th. edition. 1955.  
Published by the A.O.A.C.  
Washington, D.C.
33. Banco Nacional de Comercio Exterior  
REVISTA DE COMERCIO EXTERIOR. ARROZ.  
Octubre 1970. México D.F.
34. Dirección Nacional de Estadística.  
6o. CENSO INDUSTRIAL DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS  
(Beneficios de Arroz)
35. Rice Council  
AMERICAN RICE IN DIET  
Houston Tex. 1970

36. U.S. Department of Agriculture  
PRODUCTION OF ETANOL FROM WHEAT  
Agricultural Handbook No. 12  
Washington, D.C. 1954
37. U.S. Department of Agriculture  
COMPOSITION OF FOOD. (RICE).  
Agricultural Handbook No. 8  
Washington D.C. 1954
38. U.S. Department of Agriculture  
RICE IN THE UNITED STATES. VARIETIES AND PRODUCTION.  
Agricultural Handbook No. 289  
Washington D.C. 1966.

#### Manuales

39. Crane Co. (Engineering Division)  
FLOW OF FLUIDS THROUGH VALVES, FITTING AND PIPES.  
Technical Paper No. 410. 1969.
40. Merck & Co. Inc.  
THE MERCK INDEX  
Stecher, P. (editor) 8th. edition  
Rahway, N.J. 1968.
41. Manual de Fermentadores marca Basel.  
Basilea, Suiza. 1971.
42. Perry, J. (editor)  
CHEMICAL ENGINEERS' HANDBOOK  
McGraw Hill Co. New York. 1963.

Tesis Profesionales

43. Murcia F.,L. y Zetuna C., E.

APROVECHAMIENTO DE LOS SUBPRODUCTOS DEL ARROZ PARA PRODUCIR  
POR METODOS MICROBIOLOGICOS, UN CONCENTRADO PROTEICO PARA  
EL GANADO.

Fac. Química. U.N.A.M. 1973.

44. Reynosa I., J

ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE EL ACEITE Y CERA CONTENIDOS EN  
EL PULIDO DE ARROZ.

Fac. Química, U.N.A.M. 1959.