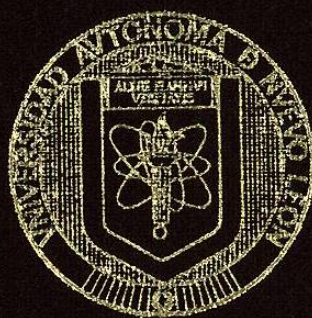


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES



FERMENTACION DE LOS GRANOS AGOTADOS EN  
LA INDUSTRIA CERVECERA PARA PRODUCIR  
PROTEINA UNICELULAR

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OPTAR AL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

PRESENTA

SERGIO SALVADOR FERNANDEZ DELGADILLO

MONTERREY, N. L.

AGOSTO DE 1983

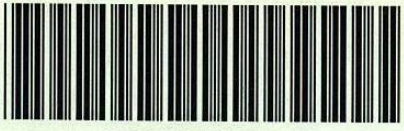
REFRANDE DE LOS GRANDES EN LA INDOESTIA  
CERRVHOBRA PARA PRODUCCION UNICOEJUIAAR

REFRANDE DE LOS GRANDES EN LA INDOESTIA  
CERRVHOBRA PARA PRODUCCION UNICOEJUIAAR

REFRANDE DE LOS GRANDES EN LA INDOESTIA  
CERRVHOBRA PARA PRODUCCION UNICOEJUIAAR

REFRANDE DE LOS GRANDES EN LA INDOESTIA  
CERRVHOBRA PARA PRODUCCION UNICOEJUIAAR

Z 5 5 2 1  
F C Q  
1 9 8 3  
F 4



1020066874



FAC. CIENCIAS  
QUIMICAS



REGION ESTADOS  
SUPERIORES BIBLIOTECA

INVENTARIADO  
AUDITORIA  
U.A.N.L.

---

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES



FERMENTACION DE LOS GRANOS AGOTADOS EN  
LA INDUSTRIA CERVECERA PARA PRODUCIR  
PROTEINA UNICELULAR

## TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

PRESENTA

SERGIO SALVADOR FERNANDEZ DELGADILLO

MONTERREY, N. L.

AGOSTO DE 1988

TM  
ZSS21  
FCA  
1983  
F4



153129

Señor coordinador de la maestría en microbiología industrial, la tesis elaborada por el Q.I. Sergio Salvador -- Fernández Delgadillo, intitulada:

FERMENTACION DE LOS GRANOS AGOTADOS EN LA INDUSTRIA CERVECERA PARA PRODUCIR PROTEINA UNICELULAR.

Ha sido aceptada como requisito parcial para optar al -- grado académico de maestro en ciencias, especialidad en Microbiología Industrial.

En virtud de haber cumplido íntegramente con el reglamento de tesis vigente y a la vez solicitamos a usted -- la aprobación final.

COMITE DICTAMINADOR DE LA TESIS

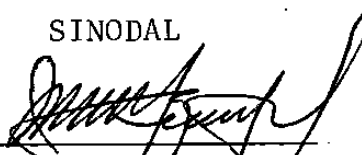
ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. JORGE VALENZUELA P.

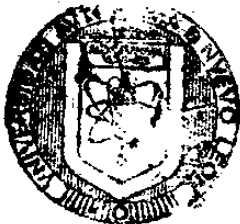
SINODAL

  
\_\_\_\_\_  
M.C. ARNULFO CANALES G

SINODAL

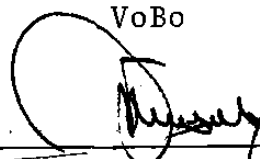
  
\_\_\_\_\_  
DR. MANUEL RODRIGUEZ Q.

FAC. C. S. Q. S.  
QUINTANA ROO



DIVISION ESTUDIOS  
SUPERIORES BIBLIOTECA

VoBo

  
\_\_\_\_\_  
DR. JORGE VALENZUELA P.

## R E S U M E N

Se hace un análisis de las características nutricionales de los granos agotados en la industria cervecera para -- considerarlos como parte de un medio de cultivo que utilizado en un proceso fermentativo proporcione un producto con un contenido mayor de proteína.

En dicha fermentación se utiliza un actinomiceto mesofílico aislado del suelo, que fué seleccionado entre varias cepas que mostraron buen crecimiento en el medio de fermentación utilizado . El microorganismo mencionado -- fué identificado como Streptoverticillum lavenduligriseus y proporciona un incremento neto del 100 % respecto al contenido original de los granos agotados ( 25 % de proteína base seca ).

También se determinan experimentalmente, los óptimos para parámetros de fermentación tales como pH, Temperatura, proporción sólido-líquido, etc. .



## I N D I C E   G E N E R A L

	Página
1.- INTRODUCCION	1
2.- MATERIALES Y METODOS	6
2.1. AISLAMIENTO DEL MICROORGANISMO	6
2.2. SELECCION DEL MICROORGANISMO	7
2.3. IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO	7
2.4. MEDIO DE CULTIVO	8
2.5. ESTERILIZACION	8
2.6. INOCULO	9
2.7. FERMENTACION	9
2.8. METODOS DE ANALISIS	9
3.- RESULTADOS	12
4.- DISCUSION Y CONCLUSIONES	15
5.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	20
6.- APENDICE DE TABLAS	22
7.- APENDICE DE GRAFICAS Y FIGURAS	35

# I N D I C E   D E   T A B L A S

	Página
TABLA I.- FUENTES DE PROTEINA NO CONVENCIONALES.	23
TABLA II.- TIEMPO EN QUE SE DUPLICA LA BIOMASA.	24
TABLA III.- SUSTRATOS UTILIZABLES EN LA PRODUCCION DE PROTEINA UNICELULAR.	25
TABLA IV.- PRODUCTOS DE LA BIODEGRADACION DE RESIDUOS ORGANICOS.	26
TABLA V.- SUBPRODUCTOS SOLIDOS EN LA INDUSTRIA CERVECERA.	27
TABLA VI.- COMPOSICION DE LA MASILLA SECA	28
TABLA VII.- ANALISIS ELEMENTAL DE LA MASILLA SECA	29
TABLA VIII.- COMPOSICION QUIMICA DEL MEDIO DE CULTIVO EXPERIMENTAL EN SU PARTE BASAL.	30
TABLA IX.- CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS DEL MICROORGANISMO AISLADO.	31
TABLA X.- CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DEL MICROORGANISMO AISLADO.	32
TABLA XI.- CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS DEL MICROORGANISMO AISLADO.	33
TABLA XII.- RESULTADOS OBTENIDOS EN FERMENTACIONES QUE INVOLUCRAN SUSTRATOS SEMEJANTES A LA MASILLA Y CUYA FINALIDAD EN INCREMENTAR EN CONTENIDO PROTEINICO.	34

# INDICE DE GRAFICAS Y FIGURAS

Página

FIGURA NUMERO 1.- ANALISIS CROMATOGRAFICO DEL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES EN EL MEDIO DE CULTIVO ANTES DE INCUBAR.	36
FIGURA NUMERO 2.- ANALISIS CROMATOGRABICO DEL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES EN EL MEDIO DE CULTIVO DESPUES DE 6 DIAS - DE INCUBACION.	37
GRAFICA 1.- SELECCION DE LA CEPA	38
GRAFICA 2.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE MA- SILLA SOBRE LA PRODUCCION DE PROTEINA	39
GRAFICA 3.- EFECTO DEL pH SOBRE LA PRODUCCION DE PROTEINA.	40
GRAFICA 4.- EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA PRODUCCION DE PROTEINA.	41
GRAFICA 5.- VARIANTES EN EL PROCESO.	42

## 1.- INTRODUCCION.

Un constante aumento en la población mundial durante las últimas décadas, ha acarreado como consecuencia, un incremento en la demanda de alimentos, sobre todo en los que proporcionan un balance adecuado de materiales proteínicos. Por tal motivo, los hombres de ciencia de hoy en día, han tenido que considerar el uso de fuentes de proteína no convencionales, clasificando como tal, a cualquier producto que proceda de un proceso diferente al agrícola y/o ganadero. Como ejemplo de ellos podemos citar a los enlistados en la tabla I, siendo el último punto de la misma en el cual fijaremos nuestra atención.

El concepto de proteína unicelular, no ha sido aceptado por los biólogos en su totalidad, es un nombre genérico que resulta inapropiado en muchos casos ( 1 ), sin embargo referiremos como tal a los conglomerados celulares conocidos también como biomasa microbiana, producida ésta en procesos fermentativos que involucran la acción de bacterias, algas y hongos microscópicos y levaduras.

En la producción de proteína unicelular, encontraremos ventajas y problemas específicos para cada microorganismo en especial, sin embargo , podemos resumir de la manera siguiente, las ventajas generales de los microorganismos sobre las plantas y animales como productores de proteína ( 2 )

- 1.1.- Los microorganismos tienen tiempos de generación muy cortos, lo cual implica un rápido incremento de biomasa en pequeños intervalos de tiempo ( tabla II ).
- 1.2.- Los microorganismos pueden ser modificados genéticamente de manera fácil, pueden inducirse mutaciones utilizando agentes químicos y/o físicos, y, después de largos procesos de escalamiento, pueden llegar a obtenerse células mutantes con las características requeridas.
- 1.3.- Contienen un alto porcentaje de proteína. Muchos microorganismos contienen entre un 7 y 12 por ciento de nitrógeno ( base seca ), y este dato resulta ser siempre más alto que en muchos alimentos comunes, aún después de hacer la corrección para el nitrógeno de purinas y pirimidinas.
- 1.4.- La producción de proteína unicelular puede basarse en materias primas que son disponibles en grandes cantidades ( tabla III ).
- 1.5.- La producción de proteína unicelular puede realizarse de manera continua, independientemente de cambios climatológicos, con mínimos requerimientos de agua y una pequeña área de trabajo.

En la tabla III se menciona la utilización de desechos agrícolas e industriales como materia prima para producir prote

ina unicelular. Uno de los principales componentes de dichos materiales es la celulosa, compuesto orgánico de alto peso molecular que además tiene como característica favorable ser fácilmente renovable y ser el material de desecho más abundante sobre la superficie terrestre.

La biodegradación de residuos agrícolas, municipales e industriales, ha sido estudiada con gran interés en los países desarrollados, ya que por medio de la misma, se ha logrado obtener sustancias de mayor utilización comercial ( tabla IV ).

Es común encontrar en la literatura científica, trabajos de investigación en los que se involucra la fermentación de una gran variedad de materiales sólidos de desecho con el fin de producir proteína unicelular y en ocasiones, -- con la finalidad de facilitar la acción microbiana, se han aplicado de manera práctica pretratamientos físicos y/o químicos ( 3 ). A la vez, se han desarrollado paralelamente nuevas técnicas de fermentación, extracción y purificación del producto obtenido ( 4 ).

En este tipo de trabajos, se ha desarrollado el uso de una variedad extensa de cepas microbianas, encontrándose entre las más utilizadas, las bacterias, los actinomicetos y los hongos ( 5 ) siendo dependiente la elección del microorganismo, de las características del sustrato a biodegradar. Entre los actinomicetos más utilizados, encontramos a los géneros Streptomyces, Thermoactinomyces y --

Thermomonospora, con resultados satisfactorios en todos los experimentos ( 6 ).

En la industria cervecera se obtienen como subproductos una variedad de materiales sólidos ( tabla V ). Algunos de ellos tienen ya, importante aplicación industrial, las levaduras por ejemplo, se utilizan como una fuente excelente de vitaminas del complejo B, los ácidos nucleicos extraídos de las mismas, se utilizan como saborizantes en algunos alimentos procesados ( 7 ). La reutilización de la tierra de diatomáceas, después de un proceso de regeneración resuelve el problema del desecho ( 8 ). Los subproductos restantes, por contener sustancias biodegradables abren rutas de trabajo e investigación.

Los granos agotados " masilla " como les denominaremos en el presente trabajo, a pesar de haber pasado por una parte del proceso cervecero, en el cual pierden una parte de sus materiales solubles, muestra complejidad en su composición química ( tabla VI ). Por tal razón, para considerarla como parte de un medio de cultivo, se consideró su composición elemental ( tabla VII ), en la cual se resalta notablemente la concentración de carbono, por tal razón, se pensó en ella como una gran fuente de este elemento, todo esto sin pasar por alto la posibilidad de que ese carbono resultase ser de difícil asimilación microbiana. Volviendo a la tabla VI observaremos que un 15% de la masilla seca corresponde a fibra cruda, dentro de lo que se



incluye la celulosa, lignina y pentosanas presentes en -- todos los productos de origen vegetal. El carbono restante pertenece a compuestos orgánicos de mas fácil asimilación, como por ejemplo, almidón , proteínas, ácidos nucleícos y azúcares reductores.

La masilla como tal tiene un uso comercial, se utiliza -- mezclada con levadura residual como alimento para ganado vacuno ( 9 , 10 , 11 ) pero el alto contenido de almidón y fibra cruda en la misma, hace difícil su suministro como alimento para animales no rumiantes. Otros usos de este desechos son, su utilización como combustible, como material de empackado y construcción y para producir furfural ( 12 ), etc.

La posibilidad de utilizar la masilla como alimento balanceado y hacer extensivo su suministro a cualquier tipo de animal, nos motivó a realizar este trabajo, mismo que a -- continuación describiremos y que tiene como finalidad --- principal, incrementar el contenido de protefna en dicha -- masilla mediante un proceso fermentativo que involucra la biodegradación del almidón y celulosa contenidos en la misma.

## 2.- MATERIALES Y METODOS.

### 2.1.- Aislamiento del microorganismo.

Se prepararon 3 series de 10 matraces de Erlenmeyer de 250 ml, llenos hasta la marca 100 con los siguientes materiales.

SERIE 1.- Masilla tal y como se obtiene de la planta.

SERIE 2.- Masilla prensada y lavada.

SERIE 3.- Licor obtenido del prensado y lavado de la masilla.

La suspensión de inóculo fué preparada adicionando 100 gr. de una mezcla de tierra y excremento de ganado vacuno en 500 ml. de agua de la llave y un mililitro de esta suspensión fué utilizado como inóculo para cada matraz.

Posteriormente todos los matraces se incubaron a 35°C durante 48 horas y después de este período, de cada matraz se sembró por estrías en 3 campos sobre cajas de petri con teniendo agar nutritivo.

Las cajas se incubaron a 35°C durante 24 horas y al final de la incubación, de la amplia gama de especies microbianas se eligieron siete, las cuales después de un proceso de purificación fueron resembradas en agar nutritivo inclinado, incubadas a 37°C durante 48 horas y almacenadas en el refrigerador a 4°C haciendo resiembras cada dos meses utilizando el mismo medio de cultivo.

## 2.2.- Selección del microorganismo.

El proceso de selección se inició con la preparación de una nueva serie de matraces de Erlenmeyer de 500 ml., conteniendo 100 ml. de medio de cultivo basal ( Tabla VIII ) y 50 g. de masilla húmeda ( 10 % de humedad ). El contenido de cada matraz fué licuado durante 5 minutos para promover la homogenización de la mezcla y además disminuir el tamaño de partícula. Los matraces se esterilizaron en el autoclave a 121 °C y 15 libras por pulgada cuadrada de presión durante 30 minutos y posteriormente se inocularon con 10 ml. de un cultivo puro de 24 horas de edad en caldo nutritivo, de cada una de las cepas seleccionadas. Solamente en el caso de las colonias de aspecto fúngico, la inoculación se realizó utilizando 1 ml. de una suspensión de esporas en amortiguador de fosfatos pH 6 ( 1.5 g. de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 3.5 g. de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  en un litro de agua ). Para tratar de estandarizar el número de esporas utilizadas en cada inoculación, se tomó la transmitancia de la suspensión a 600 nm. resultando ser del 60 % .

Todos los matraces se incubaron en un agitador con control de temperatura regulado a 35 °C con una agitación de 250 r.p.m. y un período de incubación de 10 días. Durante este lapso de tiempo, solamente se realizaron determinaciones de proteína en muestras de masilla fermentada seca.

## 2.3.- Identificación del microorganismo.

La elección de una cepa microbiana con las características -

deseadas, planteo la necesidad de realizar pruebas que nos proporcionaran información acerca de la identidad de la misma y poder realizar de esta manera su clasificación en alguno de los grupos microbianos establecidos, para lo cual se procedió a realizar pruebas bioquímicas, observaciones microscópicas ( microcultivos de Henrici ) y macroscópicas del microorganismo aislado, todo esto basado en la metodología descrita en el Manual Bergey de Bacteriología Determinativa ( 13 ).

#### 2.4.- Medio de cultivo.

Para diseñar o complementar un medio de cultivo que resulte adecuado a nuestros intereses, se consideraron los factores que a continuación se anotan.

- a).- Composición química de la materia prima.
- b).- Requerimientos nutricionales del microorganismo.
- c).- Características de las enzimas que actúan durante el proceso.

En la tabla VIII se reporta la composición del medio utilizado, y en la sección 3 haremos consideraciones importantes acerca de su composición.

#### 2.5.- Esterilización.

El medio de cultivo íntegro ( masilla + sales basales ), fue calentado en baño maría durante 30 minutos para promover la gelatinización del almidón residual contenido en la masilla ( 14 ) y posteriormente se esterilizó en el autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  y  $1.055 \text{ Kg/cm}^2$  (  $15 \text{ lb/pulgada}^2$  ) de presión durante 1 ho-

ra, sirviendo ésto como tratamiento térmico para facilitar la acción de celulasas sobre los correspondientes polímeros carbonados ( 15 ).

#### 2.6.- Inóculo.

El microorganismo seleccionado, fué cultivado en cajas de Petri conteniendo agar nutritivo hasta que la esporulación se presentó ( 48 horas aproximadamente ) y luego se suspendieron las esporas en un amortiguador de fosfatos pH 6 hasta obtener una concentración que a 600 nm presentara una densidad óptica de  $A = 0.2218$ , ésto con el fin de estandarizar en número de esporas en cada inoculación.

#### 2.7.- Fermentación.

Las condiciones de fermentación tales como relación sólido líquido, temperatura, pH, serán determinados experimentalmente; sin embargo, podemos decir que las fermentaciones se realizaron en matraces de Erlenmeyer de 250 ml. trabajando al volúmen de 100 ml. y todos ellos fueron agitados a 250 r.p.m. durante 6 días.

#### 2.8.- Métodos de análisis.

Previo a la fermentación, se realizó un análisis bromatológico de la masilla siguiendo los métodos que para cereales recomienda la American Society of Brewing Chemists y durante el transcurso de la misma, se realizó una serie de análisis, en los cuales el tipo de control deseado definió las características de la muestra.

a.- Sobrenadante ( obtenido por centrifugación de una alícuota del medio de fermentación ).

- Almidón residual.

- Carbohidratos solubles.

b.- Masilla fermentada seca ( alicuota evaporada a sequedad en el horno de vacío a 80°C y 6 libras por pulgada cuadrada de presión negativa ).

- Proteína.

- Celulosa residual.

Para controlar el consumo de almidón, solo se realizó una prueba yodométrica cualitativa. El análisis cualitativo de carbohidratos fué realizado utilizando cromatografía descendente en papel ( Whatman # 1 ) con el siguiente sistema de eluentes : n- butanol, piridina, agua, 6:4:3 v / v. El proceso de revelado utiliza una solución de p- anasidina 0.1M y ácido ftálico en etanol al 96 % ( aplicado por aspersión sobre el papel ) y calentando en la estufa a 105°C durante 5 minutos ( 16 ). En la determinación cuantitativa de carbohidratos se utilizó el método del fenol ( 17 ).

Las determinaciones de proteína y celulosa residual se realizaron de la siguiente manera, una cantidad de masilla seca se extrajo 3 veces con NaOH 1 N a 100°C durante 10 minutos, la proteína se determinó en los extractos utilizando el método de Biuret ( 18 ). El residuo se lavó con agua y se le hizo una nueva extracción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 67% durante 30 minu--

los a temperatura ambiente, a los extractos obtenidos se les determinó por el método arriba mencionado, los carbohidratos totales = celulosa residual ( 19 ) .



### 3.- RESULTADOS.

En el estudio y selección de la cepa microbiana, cuyos resultados son mostrados en la gráfica número 1, se nota que la cepa marcada como cepa 7 resultó ser la más adecuada ya que con su uso se logró un incremento aproximado del 100 % en el contenido proteínico de la masilla ( base seca ) después de 4 días de fermentación. En el proceso de identificación del microorganismo elegido, se realizaron pruebas macroscópicas y microscópicas además de reacciones bioquímicas, y los resultados obtenidos son mostrados en las tablas IX, X y XI, correspondiendo todas las características de nuestra cepa a las descritas en el Manual Bergey de Bacteriología Determinativa para *Streptoverticillum lavenduligriseus*.

La gráfica número 2 muestra los resultados obtenidos en la experimentación para determinar la concentración óptima de masilla que debería ser utilizada ( relación sólido-líquido ) y en ella puede observarse que el máximo porcentaje de incremento en el contenido proteínico de la masilla corresponde a la relación 60 g. de masilla húmeda en 100 ml. de medio basal, además de que las concentraciones de masilla que condujeron a la obtención de los más altos rendimientos en el contenido de proteína, dan su máximo a las 96 horas de incubación. Además, cabe aclarar aquí, que el almidón contenido en la mezcla de fermentación dejó de dar coloración azul con el yodo inclusive en la mayor relación sólido-líquido.

La gráfica número 3 muestra los resultados de la determinación del pH de máxima producción de proteína y la gráfica número 4 los de la determinación de la temperatura óptima, resultando que a pH cercanos a la neutralidad ( pH - 6 ) y temperaturas alrededor de la ambiental ( 30 - 35 °C ), los mejores rendimientos son obtenidos.

Con todos los parámetros de control bien definidos ( concentración de la fuente de carbono, pH, Temperatura y agitación, sólo hacía falta realizar una fermentación para rastrear en ella las variantes del proceso y su constancia. Los resultados obtenidos son mostrados en la gráfica número 5.

En dicha gráfica podemos observar que la línea correspondiente a la concentración de carbohidratos solubles, presenta una caída muy pronunciada en los primeros días de fermentación, considerándose que las enzimas de fermentación muestran su máxima actividad, mientras que la línea correspondiente a la proteína total, aumenta de manera exponencial durante los primeros 4 días de fermentación, y, después de ese período presenta una decaída. Podemos observar también aquí que la proteína soluble se incrementa después del mismo tiempo, lo cual indica que la lisis celular empieza a ocurrir, detalle que resulta raro, ya que la concentración de carbohidratos solubles es aun alta ( ésto podría atribuirse a deficiencias en la agitación o aireación ) Cabe aclarar aquí, que mientras el cultivo se mantiene agi-

tado, la esporulación no ocurre.

Al hacer un estudio por cromatografía, de los carbohidratos presentes en el sobrenadante, antes y después de 6 días de fermentación, se observó que antes de la inoculación, la celobiosa y la arabinosa aparecen en gran concentración, ésto debido a que la celulosa y la hemicelulosa contenidos en la masilla sufren hidrólisis por efecto del calor ( figura número 1 ). De igual manera podemos observar en la figura número 2, que después de 6 días de fermentación, no se detecta rastro alguno de celobiosa en el medio de cultivo, y a la vez se ponen en evidencia glucosa y xilulosa en el cromatograma, lo cual certifica la capacidad biodegradativa del microorganismo frente a los polisacáridos mencionados.

#### 4.- DISCUSION Y CONCLUSIONES.-

Aunque el interés principal de nuestro trabajo se centra en incrementar el contenido proteínico de la masilla a partir de la biodegradación de celulosa, lo cual se realiza en parte, no se puede pasar por desapercibida la presencia de un buen porcentaje de almidón y, además considerar también la presencia de un polímero carbonado formado de pentosas y ácidos de azúcares conocido con el nombre de hemicelulosa, que igual que otros polímeros carbonados, dá productos de hidrólisis asimilables por los microorganismos ( 20 ). Al considerar la posibilidad de biodegradar y utilizar todo el material carbonado posible para biosintetizar proteína, y considerar los materiales mencionados como parte de un medio de cultivo, hubo necesidad de observar la literatura científica en el area y tomar en cuenta lo que se dice de la relación C:N en medios de cultivo formulados con fuentes de carbono similares a la masilla. Algunos autores mencionan que en éste tipo de trabajos, el nitrógeno no debe actuar como limitante del crecimiento microbiano ( 21 ). En trabajos de este tipo, se observó que la relación C:N oscila desde 10 hasta 30 partes de carbono por cada parte de nitrógeno ( 22 ). En la tabla VII se puede observar que el carbono y nitrógeno en la masilla se encuentran en una relación 20:1, sin embargo, se decidió agregar sulfato de amonio a nuestro medio de cultivo experimental, considerando la posibilidad de que parte del ni-

trógeno contenido en la masilla correspondiese a compues--  
tos nitrogenados no asimilables como tal por parte de nuestro  
microorganismo. Con la adición de sulfato de amonio, -  
se aseguró también la presencia de azufre inorgánico nece-  
sario en la biosíntesis de aminoácidos sulfurados ( cisteína  
na, cistina, etc. ). Otros compuestos orgánicos tales como  
las vitaminas, podrían ser requeridos por nuestro microor-  
ganismo para mantener su metabolismo activo. Para llenar -  
tales requerimientos, se utilizó extracto de levadura como  
un ingrediente mas del medio de cultivo ( el extracto de -  
levadura es utilizado en la mayoría de los experimentos de  
biodegradación de celulosa ).

La presencia de polímeros carbonados en la masilla, prevee  
la presencia de amilasas y celulasas en el proceso de bio-  
degradación, ambos tienen pH de actividad óptima alrededor  
de 6, siendo éste mismo el pH óptimo de crecimiento de ---  
nuestra cepa. Por tal motivo, se decidió utilizar una mez-  
cla de fosfatos como solución reguladora del pH, satisfi--  
ciendo también de ésta manera, los requerimientos de fósforo  
y potasio en el medio de cultivo.

Se adicionaron también al medio, sales de calcio y de magnesio  
sio, ya que estos elementos en su forma iónica actúan como  
cofactores de las amilasas y las celulasas respectivamente.  
Después de la certificación de la capacidad biodegradativa  
del microorganismo en estudio por medio de los resultados -

cromatográficos obtenidos ( figuras números 1 y 2 ), podemos confirmar también la capacidad de nuestro microorganismo para asimilar las pentosas y hexosas presentes en el medio de cultivo después de la etapa hidrolítica en la fermentación. esta aseveración puede basarse en el estudio de las características bioquímicas de la cepa, donde se muestran resultados positivos de asimilación para todos los azúcares involucrados en el proceso.

Podemos decir también que la mayor parte de los azúcares mencionados son utilizados en procesos catabólicos de biosíntesis, principalmente a los de materiales de construcción celular ( proteína, ácidos nucleicos, etc. ), ya que durante la fermentación no se detecta un viraje del pH hacia el rango ácido ( esto sin la presencia de sustancias amortiguadoras ), lo cual significa que no hay producción de ácidos orgánicos durante la misma y por consecuencia no hay pérdida de carbonos en la biosíntesis de subproductos en una proporción que pudiese afectar el rendimiento.

El hecho de que después de 4 días de fermentación la lisis celular ocurra y que parte de la proteína se disuelva en la fase líquida del medio de fermentación, nos inclinó a realizar una evaporación de la masilla fermentada en opción a la filtración y tener pérdidas de producto en ese procedimiento.

Al obtener el producto fermentado seco, se observó la pre-

sencia de cascarillas remanentes de la fermentación no susceptibles de biodegradación por parte de nuestro microorganismo, además de que dichas cascarillas resisten en parte la hidrólisis ácida aplicada en la determinación de celulosa residual. por tal razón, consideramos que dichas cascarillas son ricas en lignina y por consecuencia concluimos que nuestro microorganismo es incapáz de biodegradar este compuesto.

La presencia de una alta concentración de carbohidratos solubles en el caldo de fermentación, cuando con nuestro microorganismo se obtiene un máximo de producción de proteína, hace pensar en la posibilidad de realizar fermentaciones mixtas que eleven aún mas el contenido de proteína de la masilla. Sin embargo, consideramos que tales carbohidratos residuales ayudarían a mantener un balance adecuado de nutrientes en la utilización del producto fermentado como alimento para ganado.

El aspecto del producto fermentado, da la idea de ser harina de algún cereal molido, con sabor y olor agradables, por lo cual este producto podría ser aprovechado también en alimentación humana, despues de las determinaciones de digestibilidad y toxicidad del mismo.

Para finalizar, afirmaremos categóricamente que el proceso fermentativo utilizado da excelentes resultados de bio transformación de materiales ( Polisacáridos - Proteína ) con la utilización de una cepa pura de *Streptoverticillum*



*lavenduligriseus*. Para corroborar lo anterior, presentamos en la tabla XII una comparación entre los porcentajes de incremento en el contenido proteínico, en fermentaciones con sustratos semejantes al aquí utilizado.

5.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1.- Murray Moo + Young., Proc. Biochem., 22 ( 1976 ).
- 2.- Kihlberg R., Ann. Rev. Microbiol., 26 : 427 ( 1972 ).
- 3.- Nesse N., Wallick J. and Harper J.M., Biotechnol. Bioeng. XIX : 323 ( 1976 ).
4. Hedenskog G., Mogren H., Enebo L., Biotechnol. Bioeng. XII : 947 ( 1970 ).
- 5.- Bellamy W.D., Biotechnol. Bioeng., XVI : 869 ( 1974 ).
- 6.- Mandels M., Andreotti R.E., Proc. Biochem., 6 ( 1978 ).
- 7.- Brooks R.B., Halford M.H., Skinner R.N., Proc. Inst. Brew. (12<sup>th</sup> Convention Australia and New Zeland ), 73 ( 1972 ).
- 8.- Porter W., Wallerstein Lab. Comm., 34 ( 114 ) : 125 ( 1971 ).
- 9.- Linton J.M. and Sibald I.R., Brew. Dig., 56 ( 3 ): 58 - ( 1971 ).
- 10.- Hunt L.A., MBAA Tech. Quart., 6 ( 4 ) ; 37 ( 1971 ).
- 11.- Love G.A., Brew. Dig., 56 ( 7 ) ; 90 ( 1970 ).
- 12.- Sherrard E.C., Kressman F.W., Ind. Eng. Chem., 37: 5 ( 1945 ).
- 13.- Buchanan R.E., Gibbons N.E. The Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8<sup>th</sup> Edition., The William's and Wilkin's Co Baltimore ( 1974 ).
- 14.- Mc William J.C., Hall R.D. and Harris G., J. Inst. Brew., 62 : 226 ( 1956 ).
- 15.- Neese N. and Wallick J., Brew. Dig., 58 ( 4 ) : 22 ( 1976 ).
- 16.- Peitersen N., Biotechnol. Bioeng., XVII : 361 ( 1975 ).
- 17.- Dubois M., Guilles K. A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and --- Smith F., Anal. Chem., 28 ( 3 ): 350 ( 1956 ).

- 18.- Hebert D, Phipps P.J. Strange R.E., Methods in micro--  
biology., Ribbons W. and Norris J.R. Ed., Vol. 5B --  
Academic Press, New York ( 1972 ).
- 19.- Mandels M., Proc. Biochem. 14 ( 1979 ).
- 20.- Ladisch M.R., Proc. Biochem., 21 ( 1979 ).
- 21.- Kihlberg R. Ann. Rev. Microbiol., 26 : 427 ( 1972 ).
- 22.- Tatcher F.S., Ann. Rev. Microbiol., 16 ( 8 ) : 1140 --  
( 1954 ).
- 23.- Mateles R.J. and Tanenbaum S.R., Econ. Bot., 22 ( 1 ) :-  
42 ( 1968 ).
- 24.- Casas- Campillo C., Rev. Tecnol. Alim., 11 : 124 ( 1976 ).
- 25.- Pomeranz Y., Brew. Dig. 58 ( 4 ) : 49 ( 1976 ).
- 26.- Chahal D.S. and Gray W.D., Biodeterioration of Materials.  
Micorbial and Allied Aspects., Walter H.H. and Elpick.  
Elsevier, London ( 1968 ).
- 27.- Updegraff D.M., Biotechnol. Bioeng., XIII : 77 ( 1971 ).
- 28.- Rogers C.J., Coleman E., Spino D. F. and Purcell T.C. ---  
Environ. Sci. Technol., 6 : 715 ( 1972 ).
- 29.- Peitersen N. , Biotechnol. Bioeng., XVII : 361 ( 1975 ).
- 30.- Ericksson K.E. and Larsson K., Biotechnol. Bioeng., XVII :  
327 ( 1975 ).

APENDICE DE TABLAS

TABLA I.- FUENTES DE PROTEINA NO CONVENCIONALES, ( 23 )..

---

- 1.- PROTEINA DE PESCADO CONCENTRADA.
  - 2.- HARINA DE SEMILLAS OLEAGINOSAS.
  - 3.- PROTEINAS DE HOJAS VERDES
  - 4.- PROTEINA UNICELULAR.
-

TABLA II.- TIEMPO EN QUE SE DUPLICA LA BIOMASA, ( 24 ).

ORGANISMOS	TIEMPO
BACTERIAS Y LEVADURAS	12.5 - 87 minutos.
ALGAS Y HONGOS	2.0 - 48 horas.
PLANTAS SUPERIORES ( alfalfa )	1 - 2 semanas.
AVES ( pollos )	2 - 4 semanas.
PORCINOS	4 - 6 semanas.
BOVINOS	1 - 2 meses.

TABLA III.- SUSTRATOS UTILIZABLES EN LA PRODUCCION DE - -  
PROTEINA UNICELULAR, ( 25 ).

---

SUSTRATO	FUENTE
HIDROCARBUROS	GAS NATURAL, FRACCIONES DE PETROLEO CRUDO, n-PARAFINAS PURIFICADAS.
CARBOHIDRATOS	AZUCARES, ALMIDONES, HIDROLIZADOS DE MADERA.
ALCOHOLES	METANOL Y ETANOL DERIVADOS DE REFINERIAS.
RESIDUOS AGRICOLAS	BAGAZO Y PULPA, RESIDUOS CITRICOS, RESIDUOS DE LA PULPA DE LA MADERA.
RESIDUOS DOMESTICOS E INDUSTRIALES.	MELAZAS, AGUAS RESIDUALES - RESIDUOS DE PLANTAS PROCESADORAS DE ALIMENTOS.
DIOXIDO DE CARBONO	GAS FLUIDO Y GAS DE FERMENTACION.
RESIDUOS ANIMALES - RECICLABLES.	RESIDUOS DE GANADO Y AVES - DE CORRAL.

---

TABLA IV.- PRODUCTOS DE LA BIODEGRADACION DE RESIDUOS ORGANICOS.

---

- A).- ENZIMAS ( celulasas ).
  - B).- AZUCARES DE BAJO PESO MOLECULAR.
  - C).- GASES COMBUSTIBLES ( metano ).
  - D).- PROTEINA UNICELULAR.
-



TABLA V.- SUBPRODUCTOS SOLIDOS EN LA INDUSTRIA CERVECERA.

---

- 1.- GRANOS AGOTADOS.
  - 2.- LUPULO AGOTADO.
  - 3.- LEVADURA.
  - 4.- TIERRA DE DIATOMEAS.
  - 5.- MATERIALES SOLIDOS EN SUSPENSION ( trub ).
-

TABLA VI.- COMPOSICION DE LA MASILLA SECA.

---

MATERIA SECA	92.0	%
CENIZAS	3.6	%
FIBRA CRUDA	15.0	%
EXTRACTO ETereo	6.2	%
EXTRACTO LIBRE DE NITROGENO	41.4	%
PROTEINA	25.9	%
CALCIO	0.27	%
FIERRO	0.025	%
MAGNESIO	0.140	%
FOSFORO	0.500	%
POTASIO	0.080	%
SODIO	0.26	%
COBALTO	0.100	%
COBRE	21.3	mg./ kg.
MANGANESO	37.6	"
COLINA	1587.0	"
ACIDO FOLICO	0.22	"
NIACINA	41.4	"
RIBOFLAVINA	1.5	"
TIAMINA	0.7	"
VITAMINA B <sub>6</sub>	0.66	"
ACIDO PANTOTENICO	8.6	"

---

TABLA VII.- ANALISIS ELEMENTAL DE LA MASILLA.

---

CARBONO	48.70	% base seca
HIDROGENO	6.83	"
NITROGENO	2.87	"
AZUFRE	0.36	"
CENIZAS	4.31	"
OXIGENO ( por diferencia ).	36.93	"

---

TABLA VIII.- COMPOSICION QUIMICA DEL MEDIO DE CULTIVO --  
EXPERIMENTAL EN SU PARTE BASAL.

---

EXTRACTO DE LEVADURA	1.0 g / l.
CLORURO DE SODIO	6.0 "
SULFATO DE AMONIO	2.5 "
FOSFATO DE POTASIO MONO- BASICO	0.5 "
FOSFATO DE POTASIO DIBA- SICO	0.5 "
SULFATO DE MAGNESIO	0.1 "
CLORURO DE CALCIO	0.1 "

---

TABLA IX.- CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS DEL MICROORGANIS-  
MO ASILADO.

---

- 1.- HIFAS CENOCITICAS QUE MUESTRAN MESOSOMAS A LAS  
24 - 72 HORAS DE EDAD.
  - 2.- ESPORANGIOFORO EN FORMA DE VERTICILO.
  - 3.- CADENAS DE ESPORAS LARGAS Y FLEXIONADAS QUE --  
MUESTRAN GANCHOS EN SUS EXTREMOS EXTERIORES.
  - 4.- ESPORAS OVALADAS DE SUPERFICIE LISA.
-

TABLA X.- CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DEL MICROORGANISMO ---  
AISLADO.

---

A.- ASIMILACION DE CARBOHIDRATOS.

ARABINOSA	POSITIVA
GLUCOSA	"
XILOSA	"
RHAMNOSA	"
FRUCTOSA	"
GALACTOSA	"
RAFINOSA	"
MANITOL	"
SACAROSA	"

B.- INVESTIGACION DE ENZIMAS.

CELULOSA	POSITIVA
AMILASA	"

---

TABLA XI.- CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS DEL MICROORGANISMO AISLADO

---

- A. \_ CRECIMIENTO DE FORMA IRREGULAR SOBRE TODA LA SUPERFICIE DEL MEDIO
  - B. \_ MICELIO AEREO DE ASPECTO ATERCIOPELADO Y DE COLOR VERDE GRISACEO
  - C. \_ EL MICELIO EN EL MEDIO MUESTRA UNA PIGMENTACION CAFE VERDOSA DESPUES DE 72 HORAS.
-

TABLA XII.- RESULTADOS OBTENIDOS EN FERMENTACIONES QUE INVOLUCRAN SUSTRATOS SEMEJANTES A LA MASILLA Y CUYA FINALIDAD ES INCREMENTAR EN CONTENIDO PROTEINICO.

SUSTRATO	MICROORGANISMO	% DE PRO- TEINA BASE SECA.	TIEMPO DE FERMENTACION	REFERENCIA
PULPA DE MADERA	Trichoderma sp.	20	-----	26
PAPEL PERIODICO	Myrothecium verrucaria.	10	6 días	27
CELULOSA*	Aspergillus fumigatus.	13.3	4 días	28
PAJA DE CEBADA*	Trichoderma viride.	21 - 26	4 días	29
POLVO DE CELULOSA	Sporotrichum pulverulentum.	6	6 días	30
CELULOSA AMORFA	Sporotrichum pulverulentum.	32	6 días	30
MASILLA	Streptoverticillium lavenduligriseus	25	4 días	éste trabajo.

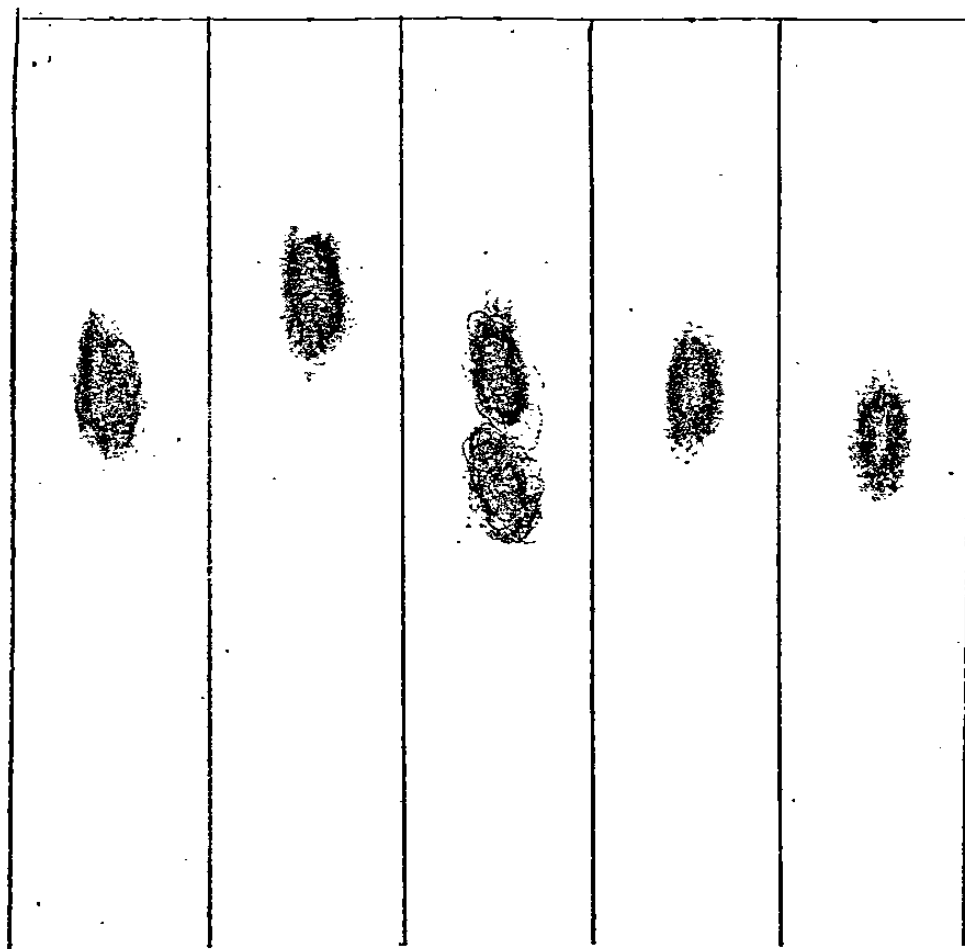
\* DESPUES DE HIDROLISIS ALCALINA.



APENDICE DE GRAFICAS Y FIGURAS



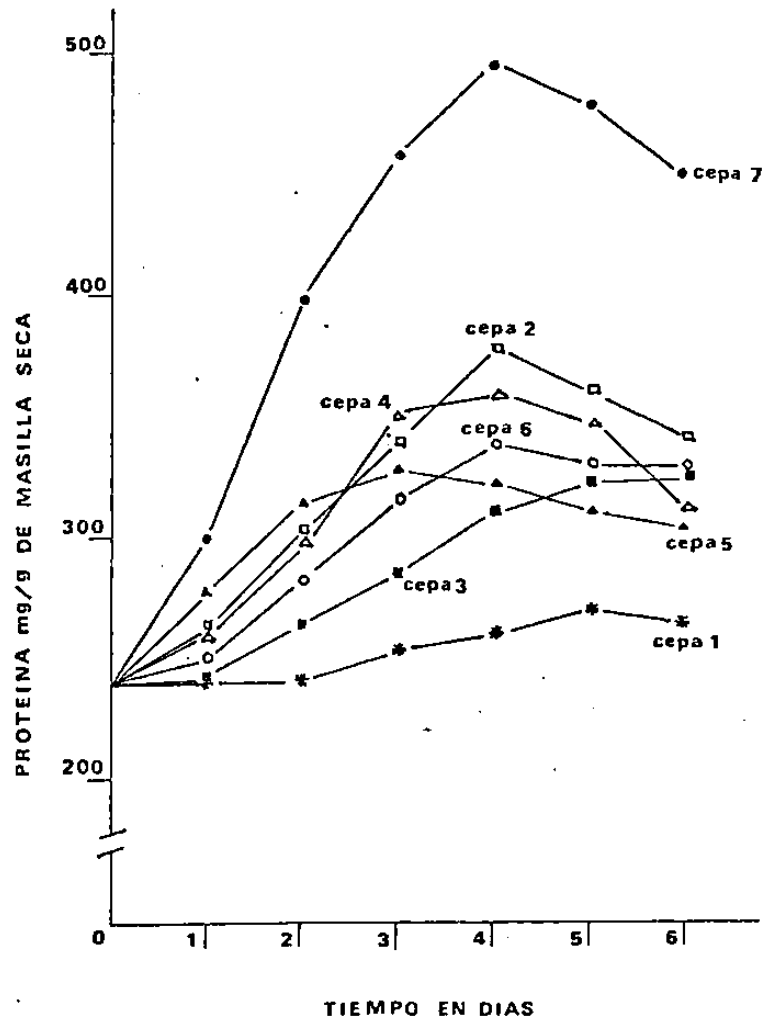
Figura número 1. - ANALISIS COMATOGRAFICO DEL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES EN EL MEDIO DE CULTIVO ANTES DE INCUBACION.



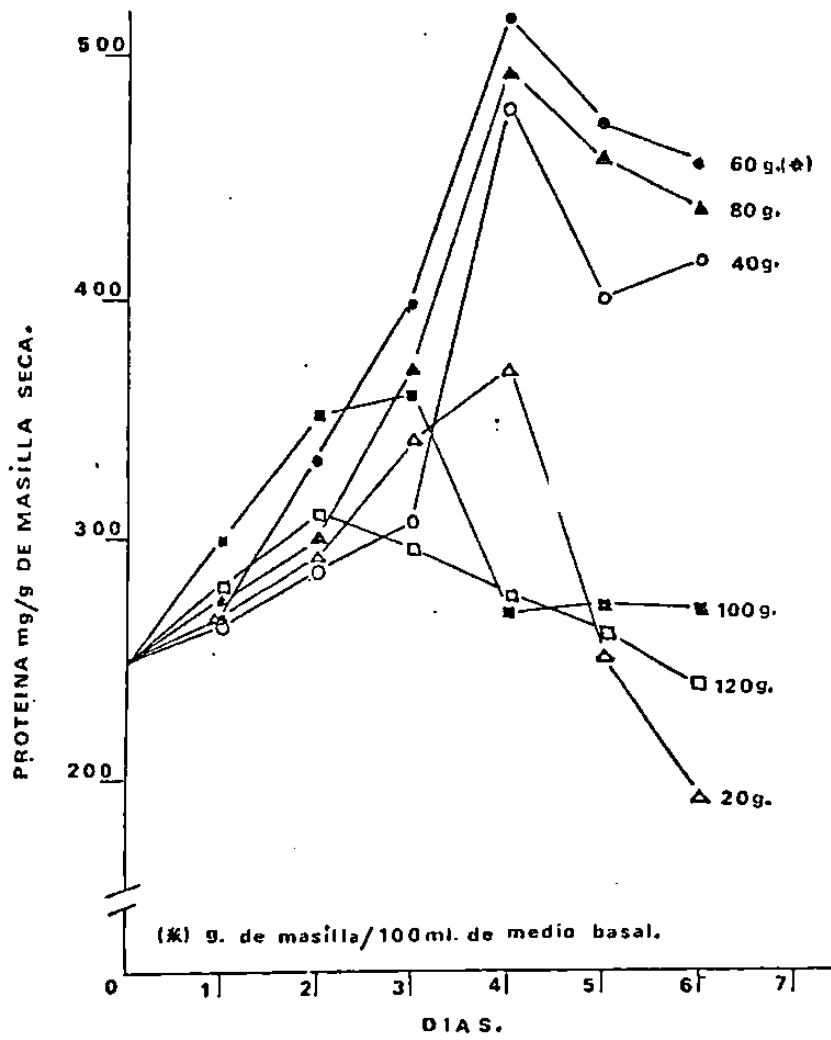
ARABINOSA      CELOBIOSA      MUESTRA      GLUCOSA      XILOSA

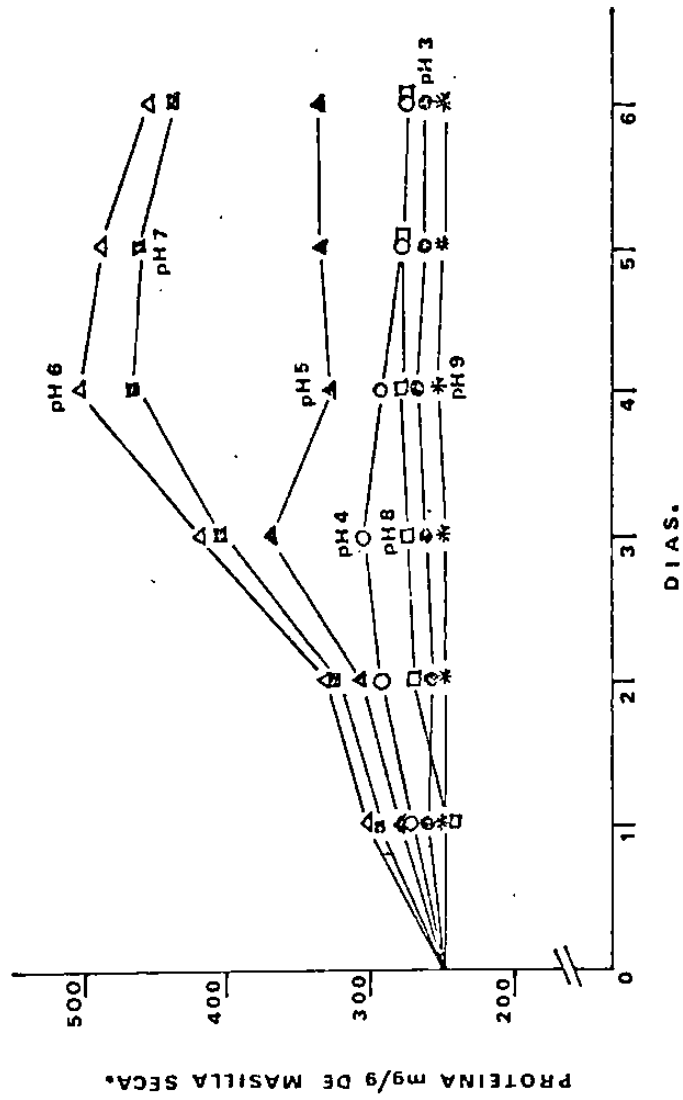
Figura número 2.- ANALISIS CROMATOGRAFICO DEL CONTENIDO DE - -  
CARBOHIDRATOS SOLUBLES EN EL MEDIO DE CULTIVO  
DESPUES DE 6 DIAS DE INCUBACION.

GRAFICA 1.- Selección de la cepa.

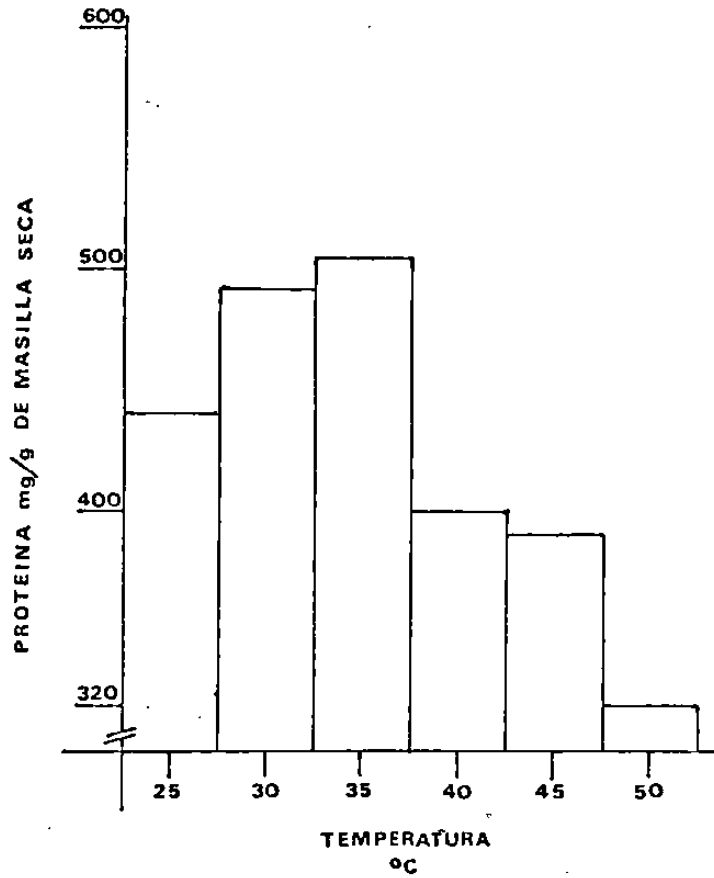


GRAFICA 2.- Efecto de la concentración de masilla sobre la producción de proteína.



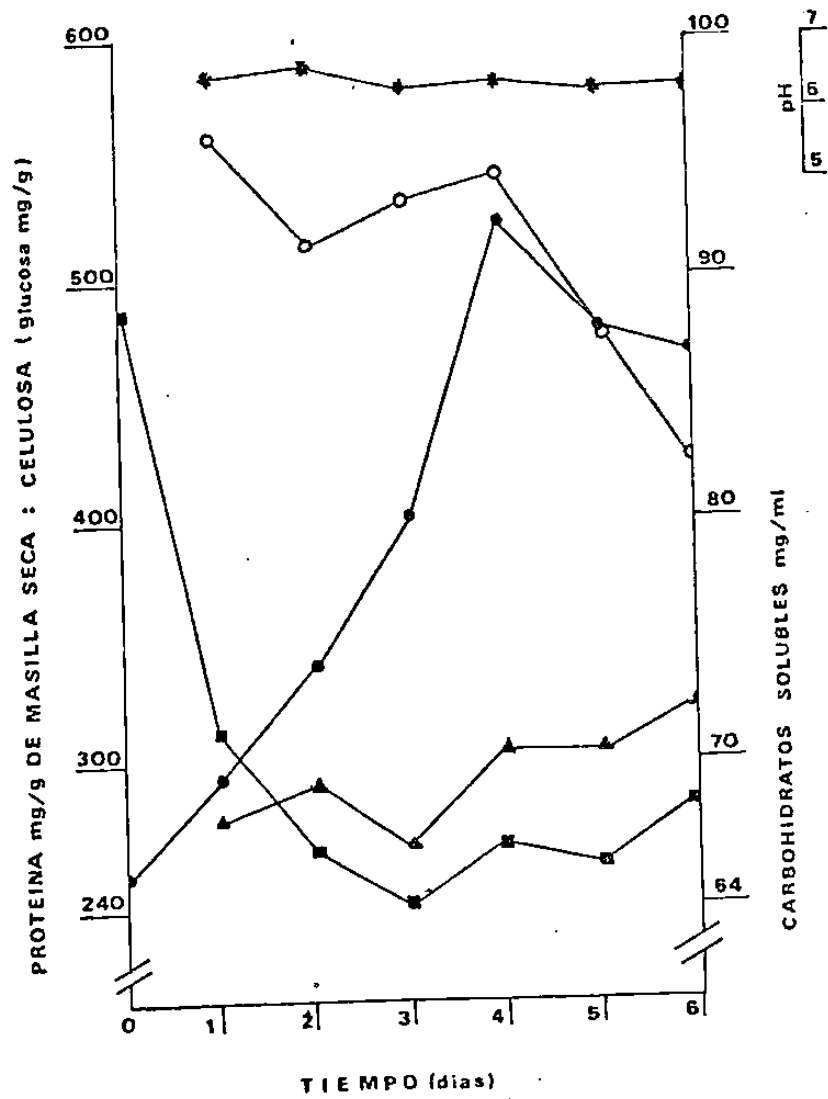


GRAFICA 3.- Efecto del pH sobre la producción de proteína.



Tiempo de fermentación = 6 días

GRAFICA 4.- Efecto de la temperatura sobre la producción de proteína.



GRAFICA 5.- Variantes en el proceso: ● proteína, ■ carbohidratos solubles, ▲ proteína soluble, \* pH, ○ celulosa residual.





## B I O G R A F I A   D E L   A U T O R

El autor, originario del estado de Durango, nació un 26 de Septiembre de 1954, es hijo de Manuel Fernández Fernández y de Velia Delgadillo de Fernández, matrimonio - que sólo engendró 2 hijos, el autor y otro varón llamado Horacio. La instrucción primaria fué recibida en la escuela primaria Aquiles Serdán de Cacalilao Veracruz, los estudios secundarios fueron realizados en la Secundaria oficial de Pánuco Veracruz, perteneciente a la universidad veracruzana, posteriormente cursó el Bachillerato en la escuela Preparatoria Federal de Cd. Lerdo Durango, pasando de ahí a realizar estudios de Química Industrial - en la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, obteniendo el grado de Licenciatura en Química Industrial en septiembre de 1975. En los años siguientes y hasta 1980 estuvo haciendo estudios de Maestría en Microbiología Industrial en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Nuevo Leon, participando además como maestro en diversas ramas especializadas de la Microbiología. En 1980 contrae matrimonio con Gloria E. Quiroga Escamilla, con la cual ha engendrado 2 hijos, Karla Alejandra y Sergio Eduardo, y fija su domicilio permanente en Monterrey Nuevo Leon. Actualmente trabaja como coordinador de Microbiología y Bioquímica en la gerencia de Investigación y desarrollo de la Cervecería Cuauhtemoc, S.A.



