

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



"OBTENCION DE PROTEINA UNICELULAR DE
Saccharomyces exiguus CRECIDA EN ETANOL COMO
PRINCIPAL FUENTE DE CARBONO Y ENERGIA"

TESIS

COMO REQUISITO PARA OBTENER
EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS

(ESPECIALIDAD MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL)

PRESENTA

Q.B.P. LUIS J. GALAN WONG

MONTERREY, N. L.

JUNIO DE 1981.

TM

OR151

G3

c.1



1080074536

OBTENCION DE PROTEINA UNICELULAR DE

Saccharomyces exiguus

CRECIDA EN ETANOL COMO PRINCIPAL FUENTE DE CARBONO Y ENERGIA.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

"OBTENCION DE PROTEINA UNICELULAR DE *SACCHAROMYCES EXIGUUS*
CRECIDA EN ETANOL COMO PRINCIPAL FUENTE DE CARBONO Y ENER
GIA".

TESIS QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS (ESPECIALIDAD MICROBIOLOGIA-
INDUSTRIAL).

PRESENTA: Q.B.P. LUIS J. GALAN WONG.

JUNIO 1981.

FAC. CIENCIAS
QUIMICAS



DIVISION ESTUDIOS
SUPERIORES BIBLIOTECA


DR. JORGE VALENZUELA PEREZ


DR. MANUEL RODRIGUEZ QUINTANILLA


DR. JOSE W. BUSTOS ALDAMA

TM
9111
63



OBTENCION DE PROTEINA UNICELULAR DE *Saccharomyces exiguus*
CRECIDA EN ETANOL COMO PRINCIPAL FUENTE DE CARBONO Y ENER

-GIA.

<u>I N D I C E:</u>	<u>P A G I N A:</u>
Agradecimientos.....	01
Introducción.....	02
Antecedentes.....	04
A. Levadura como fuente de protef- na unicelular.....	04
B. Otros microorganismos como fuen te de protefna unicelular.....	09
C. Sustratos usados para producir protefna unicelular.....	10
D. Metanol y etanol como sustratos para producir protefna unicel- lar.....	11
E. Procesos industriales en los - cuales interviene <i>Saccharomyces</i> <i>exiguus</i>	18
Materiales y métodos.....	21
Resultados.....	29
Discusión.....	37
Resúmen.....	41

DEDICATORIA:

A MI FAMILIA:

Padre - JOSE LUIS GALAN MUZQUIZ.

Madre - LUCILA WONG DE GALAN.

Esposa - ELVA NELLY FRANCO

Hijos - JOSE LUIS

NELLY MARIA

LUCILA ADRIANA.

A G R A D E C I M I E N T O S

COMITE DICTAMINADOR DE TESIS:

DR. JORGE VALENZUELA PEREZ
Por su Asesoría prestada durante este
trabajo.

DR. MANUEL RODRIGUEZ QUINTANILLA
DR. JOSE W. BUSTOS A.
Por su revisión y comentarios del pre
sente trabajo.

SRITA. BERTHA SALCIDO RAMIREZ
Secretaria del Centro de Investigaciones
Biológicas por la transcripción mecano--
gráfica de esta tesis.

I N T R O D U C C I O N

Actualmente la falta de proteína animal y vegetal es problema mundial, una alternativa es usar microorganismos como fuente de ésta.

Los microorganismos poseen una serie de propiedades tales como: Alto contenido en proteínas y valor nutricional, tiempos de duplicación cortos, diversidad en rutas metabólicas, adaptabilidad para crecer en diversos sustratos y producción bajo condiciones totalmente controladas (no sujeta cambios climatológicos), haciéndolos por tanto, sumamente atractivos para usarlos como fuente de proteína.

Nuestro país cuenta con una industria petroquímica en aumento, de la cual se obtienen diversos productos para consumo interno y exportación. Entre éstos últimos: amoníaco, polietileno, polovinilo, metanol, y está en posibilidades futuras de obtener etanol sintético.

Hoy en día, entre los microorganismos estudiados en procesos de obtención de proteína unicelular a partir de etanol, están: *C. utilis* (32), *C. ingenes* (36,37), *C. -----
etanothermophilum* (44), *Rodotorula gracilis* (31), *Hansenula anomala* (72), *Acinetobacter calcoaceticus* (43, 42).

Por otra parte, tratar de investigar la posibilidad de usar otros microorganismos además de los ya conocidos requiere de integrar diversos conocimientos, así como bastantes años de estudio experimental. Entre los objetivos principales de este trabajo están:

- 1o. Obtener proteína unicelular de *Saccharomyces exiguus* crecida en etanol como principal fuente de carbono y energía.
- 2o. Determinar la influencia de tres factores de enriquecimiento: agua de cocimiento de levadura (ACL), extracto de levadura y líquido de remojo de maíz (LRM), sobre el crecimiento de *Saccharomyces exiguus* en medios de cultivo con etanol como principal fuente de carbono.
- 3o. Conocer la composición química proximal de la biomasa anteriormente obtenida y cuantificada de aminoácidos de la proteína de *Saccharomyces exiguus* crecida en etanol con tres factores de enriquecimiento respectivamente.

A N T E C E D E N T E S

A.- LEVADURAS COMO FUENTE DE PROTEINA UNICELULAR.

Actualmente las levaduras son usadas en diversos procesos industriales obteniéndose de éstos productos tales como: EnZimas, coenzimas, cerveza, vinos, pulque, bebidas - destiladas (ron, brandy, etc.), productos farmacéuticos (riboflavina) y como alimento para consumo humano y animal, y otros más. (23,46,54,65)

Entre los productos hoy en día con potencialidad industrial, se destaca obtener levaduras para consumo humano y animal (9, 50).Las cuales reúnan características favorables como fuente de alimento; durante la segunda guerra mundial 16,000 toneladas de *Candida utilis* fueron consumidas por alemanes (7). Por otra parte, resulta barato obtener proteína unicelular comparada contra otros tipos de proteínas: res, cerdo, albúmina de huevo, etc. señalando un contenido en aminoácidos favorable o igual a los anteriores pero deficiente en algunos aminoácidos esenciales (11): dos factores tienden a incrementar el uso de microorganismos para producir de ellos, alimentos a humanos y animales: Primero, la posibilidad de usar materiales de deshecho, y segundo, el desarrollo técnico en cultivo continuo de microorganismos, lo cual quizá afecte profundamente la economía del proceso (8, 16). Por otro lado, las levaduras reúnen --

una gran parte de propiedades deseables para que un microorganismo pueda ser utilizado para producir proteína de origen unicelular (SCP), en base a su composición: no tóxica, alta digestibilidad, elevado contenido en proteínas, grasas, carbohidratos y buen sabor (17). Las levaduras comparadas con bacterias tienen como ventajas: tamaño grande (fácil de separarlas de los caldos de fermentación, bajo contenido en ácidos nucleicos, larga historia de ser usadas como alimento, alto contenido en lisina y habilidad de crecer a pH bajos; como desventajas tiene: baja velocidad de crecimiento, bajo contenido de proteínas (44, 66) y más bajo contenido en metionina que las bacterias para procesos de proteína unicelular (41).

Estudios de digestibilidad con ratas, muestra que proteínas substituídas de carne por levaduras de cerveza son altamente digestibles, siendo éstas 92% comparables con las de huevo completo que resultó 95.5% y que cuando la primera se le adiciona 1% de metionina, fué igual a esta última (15). También al evaluar proteína unicelular en dieta para cerdos encontró que ésta es altamente digestible.

Actualmente es bien conocido que el hombre carece de la URICASA, enzima que desdobla el ácido úrico, siendo este ácido acumulado a partir de las bases púricas de --

los ácidos nucleicos; por otra parte, el grupo Protein Calorie Advisor y de la United Nation System (PAG) recomienda un máximo de 4 g. de ácidos nucleicos al día por 100 g. de proteínas y 2 g. por día representa un límite práctico de segunda en la población adulta. Una alternativa es usar métodos para reducir los ácidos nucleicos si va a consumo humano (69, 73). *Geotrichum candidum* es muy prometedora para producir proteínas para animales, conteniendo 32.0 g. de proteína cruda, 12.7 g. de extracto etéreo y 37.2 g. de carbohidratos totales por 100 g. de peso seco, todos los aminoácidos ----- esenciales fueron detectados. Entre las plantas que se reportan hoy en día produciendo biomasa a partir de etanol están representadas en el Cuadro I. Las levaduras reportadas como candidatos para producir biomasa a partir de etanol, -- ver el Cuadro II.

C U A D R O I

PLANTAS PRODUCIENDO BIOMASA A PARTIR DE ETANOL

PAIS	COMPANIA	CAPACIDAD EN BIOMASA	MICROORGANISMO USADO
U.S.A.	Amoco Foods. (Minnessota).	4,500 toneladas/año.	<i>C. utilis</i> (levadura)
Checoeslovaquia	Kojetin	4,000 toneladas/año	<i>C. utilis</i> (levadura)
Japón.	Mitsubishi Petrochemical Co.	Planta piloto.	<i>C. acidothermophilum</i> (levadura) <i>C. ethanolthermophilum</i> (levadura)
* Suiza	Exxon & Nestlé	Planta piloto	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (bacteria)

Tomado de Dimmling & Seipenbush (14)

* Laskin (43, 42).

C U A D R O I I

ALGUNOS GENEROS DE BACTERIAS Y LEVADURAS REPORTADOS COMO CANDIDATOS PARA PRODUCCION DE BIO-

-MASA SOBRE ETANOL.

B A C T E R I A S

Acetobacter
Acinetobacter
Arthrobacter
Bacillus
Brevibacterium
Corynebacterium
Hyphomicrobium
Pseudomonas

L E V A D U R A S

Candida
Debaromyces
Endomycoopsis
Hansenula
Mycoderma
Pichia
Rhodotorula
Saccharomyces

B.- OTROS MICROORGANISMOS COMO FUENTE DE PROTEINA --
UNICELULAR.

Otros microorganismos para producir proteína unicelular a partir de diversos sustratos destacan bacterias y algas.

Productos de oxidación de carbón vegetal han sido utilizados para producir proteína unicelular, entre ellos: ácido acético (34), fórmico, pirocatéico y otros más, usando diversos microorganismos tales como: *Enterobacter cloacae*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *Pseudomonas putida*, -- *Pseudomonas indoloxidans*, encontrando un máximo de biomasa seca de 3.5 g/l. al usar *E. cloacae* (49).

En el cuadro II se muestran aquellas bacterias - reportadas como candidatos para producir biomasa a partir - de etanol. Las bacterias fotosintéticas son básicamente --- anaeróbicas requiriendo también la presencia de luz para -- crecer, sin embargo, bajo ciertas condiciones ambientales - de cultivo varias especies de bacterias fotosintéticas crecen aeróbicamente, particularmente *Rhodopseudomonas* y ----- *Rhodospirillum* que son aeróbicas facultativas y crecen en - presencia de oxígeno, pudiéndose usar para producir proteína unicelular (60). Estudios comparativos de tres especies de levaduras y *Chlorella*, informan que *Chlorella pyrenoidosa* parece ser una magnífica fuente de proteína y aminoácidos esenciales (58).

C.- SUSTRATOS USADOS PARA PRODUCIR PROTEINA UNICELULAR Y ASPECTOS ECONOMICOS.

Entre los diversos sustratos reportados para producir proteína unicelular, están los hidrocarburos, - - - - proceso que no ha sido permitido en Japón (por fuerte oposición de grupos minoritarios de consumidores de levaduras derivadas a partir de hidrocarburos) obligándolos a exportar su tecnología a otros países (78). Además de éstos, están: celulosa, etanol, metanol, ácido acético, isopropanol, metano, subproductos agrícolas, almidón de vegetales (sorgo, yuca) y otros más (20, 43).

El hacer proteína de origen unicelular (SCP) económica deberá tomar en cuenta tres criterios básicos:

- a) Buscar sustratos baratos para el crecimiento de los microorganismos.
- b) Buscar el microorganismo capaz de utilizar el sustrato.
- c) Solución de problemas de ingeniería encontrados en la comercialización del producto (74).

En términos económicos, la selección de un proceso de SCP depende de la localización y utilización del sustrato.

Lo más significativo en el costo, para la producción de la proteína, es el sustrato (43-77% del proceso)

concluyendo que el metanol y el etanol serán sustratos de - fuerte elección a un futuro sobre otros (40).

Un fuerte incentivo económico es emplear microorganismos con bajos coeficientes de mantenimiento (m). Para procesos de biomasa, el impacto de la (m) es mínimo sobre el $Y \cdot x/s$ cuando el microorganismo exhibe bajo (m). Si exhibe un rápido descenso sobre el $Y \cdot x/s$. No debe seleccionarse el sustrato para producir biomasa en base solamente al ---- $Y \cdot x/s$, sino en base al precio en sustrato a largo tiempo y disponibilidad, sustratos de cero costo obviamente son una ventaja, pero no se dispone de ellos en grandes cantidades en una localidad para suplir una planta de producción grande, si la disponibilidad no es un problema, se requiere algún tipo de pretratamiento (ejemplo: hidrólisis de celulosa) ó postratamiento (remoción de aceites residuales), causando ésto un costo adicional (1).

D.- METANOL Y ETANOL COMO SUSTRATOS PARA PRODUCIR --
PROTEINA UNICELULAR.

Asthana, 1971. Aísla de suelo cuatro diferentes actinomicetos y dos especies de levadura en cultivos de enriquecimiento que utilizan metanol como única fuente de carbono usando *Toruposis glabrata* en matraces agitados, determina que el extracto de levadura es un factor que se requiere para crecer, posteriormente en fermentadores de un litro determina que a una temperatura de 30° C., un tiempo de ge-

neración mínimo de 8 horas y no crece a pH abajo de 2 y superior a 9 (3).

Entre los géneros de levaduras que usan metanol como principal fuente de carbono, están: *Kloeckera*, *Torulopsis*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula* y 35 diferentes cepas de -- *Candida boidinii* y *Picchia pinus* (13, 70) así como bacte--- rias (55).

Trabajando con *Torulopsis mathanosorbosa*, una -- nueva especie no reportada en el Manual de Lodder y usando 0.25% de líquido de remojo de maíz como sustituto de una -- mezcla de vitamina, se reporta para esta levadura un tiempo de duplicación de 4 horas (79).

Entre las ventajas del metanol está el bajo costo, disponibilidad, alta pureza y uso restringido por pocos microorganismos, lo cual minimiza problemas de contamina--- ción, fácil manejo y almacén, baja demanda de oxígeno y calor (10). Además puede ser producido de un amplio rango de sustancias, hidrocarburos, carbón vegetal ó nafta y gas natural (33).

Las levaduras asimilantes de metanol son incapaces de crecer en otros compuestos con carbono (C.), metano, metilamina, formaldehído y formato, indicando que la utilización de compuestos C., no está ampliamente dispersa en le--- vaduras y muchos organismos procariotes (13).

Entre las bacterias que utilizan metanol resaltan: *Pseudomonas extoquenes*, *Ps. rosea* MO-1, *Ps. methylotropa* MP-4, *Ps. metanolica*, *Methylomonas methanolica*. Para *Ps. methanolica* reporta en cultivo "Batch" un $Y_{x/s}$ de 0.40 y máximo de μ 0.49 hrs. $^{-1}$ (22). La alcohol-oxidasa dependiente de FAD y catalasa con enzimas inducibles en *Candida boidinii*, creciendo en metanol y que están localizadas en unos microcuerpos intracelulares denominados peroxisomas los cuales actúan en secuencia (56). Por otra parte, pollos de engorda alimentados con 15% de SCP derivada de metanol, fué usada en dietas normales encuentran limitantes en aminoácidos azufrados, debiendo considerar en segundo término a la arginina para aves de engorda (38, 76).

Metanol y etanol producidos por oxidación catalítica de correspondientes hidrocarburos han sido utilizados como fuente de carbono por levaduras y bacterias para producir alimentos, debido a que los alcoholes son altamente puros, completamente solubles en agua, requieren poco oxígeno y generan menos calor que los hidrocarburos; en el futuro estos sustratos deberán ser tomados como muy prometedores (29).

El etanol y metanol como sustratos para producir SCP presentan desventajas en costo y disponibilidad, entre algunas de sus desventajas se señala la disponibilidad y costo de etanol y metanol como sustratos para produ-

cir biomasa (SCP). Otras objeciones incluyen la pared celular, el alto contenido de ácidos nucleicos y el carecer de textura para nutrición humana; otro problema es la susceptibilidad de algunos individuos a altos porcentajes de proteína de levadura en la dieta, lo cual provoca trastornos gastrointestinales (29).

Hernández y Johnson, 1967 (25). Trabajando con *Candida utilis* en medios de cultivo limitantes con etanol (0.02 M), como fuente de carbono y teniendo el primero extracto de levadura 0.5 g/lto. y el segundo adicionado de aminoácidos, encuentra en el primero un $Y_{x/s}$ de 0.68 y un mayor g. peso seco/lto. En este último, de 1.35., 0.62 en el primero y menor tiempo de generación en el segundo, 1.8 horas y 3.5 horas en el primero (26).

Fracciones de "gas oil" no alcanos han sido considerados como sustratos para producir biomasa (78). Estos materiales no son, sin embargo, adecuados para el propósito de producir ácidos grasos típicos. Desde este punto de vista, el etanol sintético es una excelente fuente de carbono, siendo un problema la volatilidad y toxicidad del sustrato. Krumphanzl et. al. 1973 (31). Trabajando con *Rhodotorula gracilis* crecida en etanol sintético y fermentación de n-alkanos, menciona que esta levadura se inhibe a un 2 - 2.5% (v/v) y a 7.5% (v/v) para su crecimiento, estableciendo que la pérdida del etanol por la salida de ga-

ses va a depender de: a) Aereación, b) Temperatura, c) Cantidad de etanol y se hace necesario mantener un rango de -- 0.1 - 0.3% (v/v) como su óptimo no debiendo exceder de 2% - (v/v). No se han encontrado diferencias en la producción de biomasa, ni diferencias significativas en los aminoácidos - de la proteína cuando se usó etanol de fermentación y sinté- tico trabajando en semicontínuo (31).

Las características nutritivas de *Hansenula ano- mala* crecida en etanol de síntesis son: Contenido protéico del 51.2%, espectro de aminoácidos satisfactorio aunque pre- sentando deficiencias en aminoácidos azufrados de tipo me- tionina y cistina pero con un contenido en lisina, superior a otras levaduras crecidas en hidrocarburos (72).

La riboflavina estimula el consumo de etanol y - la producción de L-malato en *Schizopyllum commune*. Reportes anteriores mencionan que esta cepa asimila etanol y produce cantidades considerables de L-malato con altos rendimientos 0.6 g., L-malato/100 ml. de medio de cultivo a partir de -- etanol (68).

En cultivo "batch" con *Candida ingenes* y usando etanol como única fuente de carbono y energía, se obtienen un $Y_{x/s}$ de 0.53 y un t_d 4 horas 0.17 hrs. -1 en condicio- nes de 30° C. 700 r.p.m. IVVM y etanol 1% añadido a diver- - sos intervalos de tiempo logrando hasta 26 g. lto. de bioma- sa (36).

Entre los primeros microorganismos que se usaron en este tipo de procesos está *Candida utilis* A 49, crecida en etanol sintético como única fuente de carbono y energía, pasta de levadura como factor de crecimiento y sales inorgánicas. Se produce proteína unicelular en fermentadores de 15 lts. obteniendo alrededor de 10 g. de levadura por litro -- (32).

El rendimiento de *Saccharomyces cerevisiae* ---- desarrollada en un medio con etanol como factor limitante - de crecimiento y sales minerales, es función de dos factores: pH y temperatura. Se ha encontrado un rendimiento mínimo de 0.635 a un pH 4.1 y una temperatura de 28.3° C. (18).

Usando *Mycoderma* en condiciones de cultivo continuo en medios conteniendo 5% de etanol se determina un coeficiente de utilización del etanol de 58 al 59% y se reporta que el contenido de la proteína de la biomasa es igual - en valor nutritivo a la caseína, concluyendo que el etanol es una excelente materia prima para ser usada en nutrición animal.

El etanol puede ser utilizado por muchas bacterias y levaduras como fuente de carbono y energía y esto a la vez resulta en una desventaja, ya que determina una --- gran facilidad para que los medios de cultivo puedan contaminarse. Por otra parte el Japón ha desarrollado procesos

con *Candida*, desarrollada a altas temperaturas y bajos valores de pH, reduciendo así los problemas de contaminación. En Madrid España, se tiene programada una planta para producir 100 Kg/día de *Hansenula anomala* crecida en etanol y entre sus planes está el producir 100,000 toneladas por -- año (43).

Factores como pH, temperatura, agitación y reciclo de nutrientes, afectan el costo de operación, bajos pH 2.5 - 4.0, minimiza problemas de contaminación en sistemas no estériles y altas temperaturas 35 - 45° C., disminuye los problemas de enfriamiento. Por otra parte, menciona -- un proceso de obtención con *Candida ethanothermophilum* para obtener SCP a partir de etanol en cultivo "batch" usando fermentadores de 30 litros conteniendo 17 litros de medio a 40° C.T., aereación IVVM, pH 3.5 con la cual se obtiene una $\mu = 0.45$ hrs. -1 , Y $x/s = 0.84$ (44).

En el presente, la capacidad mundial de producción de etanol sintético es de alrededor de dos millones de toneladas por año del total: 1.15 E.U.A., Europa 0.65 y 0.13 la República Popular de China y Corea (14). El primero cambió su tecnología de producir etanol de melaza por procesos sintéticos desde 1950 (51) (52).

Entre los requerimientos del producto final se incluyen: 1) Polvo seco soluble, 2) No color y olor, ----

3) Baja cuenta viable, 4) No microbios patógenos, 5) Alto -
valor biológico, 6) Bajo RNA y otros factores tóxicos, 7) -
Buena funcionalidad. (69)

E.- PROCESOS INDUSTRIALES EN LOS CUALES INTERVIENE -
Saccharomyces exiguus.

Entre las levaduras responsables del levantamien-
to de masas agrias de panadería, está *Saccharomyces exiguus*,
preferida mejor que *Saccharomyces cerevisiae* debido a tres
propiedades entre las que está crecer mejor que la segunda
en ácido acético (66).

Por otra parte, se encontró que para esponjar ma-
sas agrias *Saccharomyces exiguus* es eficaz debido a: - - -
1) Que tolera mayor cantidad de ácido, 2) Es resistente a -
la cicloheximida, 3) Es incapaz de utilizar maltosa y entre
los requerimientos nutricionales de *Saccharomyces exiguus* -
está la metionina y requiere ácido pantoténico y parcialmen-
te biotina, además requiere niacina y tiamina, concluyendo
que solo la tiamina incrementa los rendimientos celulares -
arriba de 400 g/ml. De ésta ya no aumenta el crecimiento de
Saccharomyces exiguus y no requiere huellas de metales y so-
lo lo afecta el manganeso (24). Sustituyendo todo esto por
extracto de levadura fresca preparada de acuerdo a Kline, -
encuentra que ésta proporciona los factores nutricionales -
necesarios (30, 66).

Los vinos de palma son conocidos en muchas áreas del mundo, conteniendo un promedio aproximado de 4-5% de etanol y un pH de 3-4. Se han aislado repetidas veces cepas de *Saccharomyces exiguus* como levadura que interviene en este tipo de producto sobre todo en vinos de palma de Nigeria (46, 47).

PRODUCCION MUNDIAL DE PROTEINA FUNGICA (1975-1980) (63)

PAIS	ORGANISMO	SUBSTRATO	CAPACIDAD TONELADAS/AÑO
Checoslovaquia	Levadura	Etanol	100,000
		N-parafinas	100,000
Finlandia	Hongo filamentosos	Licor de sulfito	10,000
Francia	Levaduras	Gas - Oil	100,000
Gran Bretaña	Levaduras	N-parafinas	100,000
	Hongos filamentosos	Carbohidratos	4,000
Italia	Levaduras	N-parafinas	200,000
Japón	Levaduras	N-parafinas	100,000
Rumania	Levaduras	Metanol	60,000
U.R.S.S.	Levaduras	N-parafinas	200,000
Estados Unidos	Levaduras	Etanol	5,000

MATERIAL Y METODOS

1.- LEVADURA USADA.

Actualmente es bien conocido que un precursor intermedio importante que se forma al crecer un microorganismo en etanol como principal fuente de carbono, es el ácido acético que posteriormente es rápidamente metabolizado para obtener energía (42); por tal motivo, en el presente trabajo se utilizó un microorganismo con buenos antecedentes para crecer en medios con ácido acético, que fué *Saccharomyces exiguus* (66), cepa aislada por Jorge Saldaña, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, quien la obtuvo de una muestra de agua miel y la identificó por los Métodos de Lodder (44, 45).

II.- MANTENIMIENTO DE LA CEPA.

Se efectuó por el método de resiembras periódicas en medios conteniendo agar de Saboraud glucosa 2% (Merck), pH 5 y por el método de liofilización; éste último se efectuó sembrando la cepa en agar Saboraud glucosa 2%, incubándolas a 30° C., por 48 horas. Posteriormente se suspendieron en leche desnatada al 10% estéril y transfiriendo 0.1 ml. asepticamente a ampulas de liofilización estéril las cuales se conectaron a un equipo de liofilizar Lab Con - Con -¹ y se mantuvieron 8 horas a -20° C., y un vacío de 150 micras Thor. Una vez secas se sellaron al vacío y se comprobó éste por medio de un detector luminoso en cada ampula. -

Se almacenaron a temperatura de refrigeración (26).

III.- MEDIOS DE CULTIVO.

El etanol fué proporcionado por el Ingenio Azucarero de El Mante, Tamaulipas, destilado en columnas. Tenía una pureza aproximada de 95% (v/v). El alcohol fué adicionado a un medio de cultivo de sales minerales conteniendo: -- NH_4Cl 5.0 KH_2PO_4 5.0 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5, CaCl_2 1.6 g/lto mas "factor de enriquecimiento". De éstos, el L.R.M. fué -- proporcionado por Productos de Maíz, Guadalajara. El A.C.L. se preparó (21) y Extracto de Levadura (Merck) (28, 71).

IV.- CONDICIONES EXPERIMENTALES DE FERMENTACION.

Los experimentos a escala de matraz fueron extrapolados a un microfermentador de 14 litros (New Bruswick -- Scientific Co.), conteniendo un volúmen de trabajo de 7.7 - litros bajo las siguientes condiciones: agitación: 400 r.p.m., aereación IVVM y 30° C. de temperatura, el antiespumante usado fué de silicones (Dow-Corning FG-10) usando 1 ml., concentrado al inicio y en las siguientes horas diluido en agua al 10% (64). La espuma fué controlada automáticamente el pH inicial fué de 4.0 y el tiempo de fermentación de 30 horas.

V.- PREPARACION DEL INOCULO.

La cepa se activó en medio de agar Saboraud glucosa 2% (Merck) y se dejó a 30° C. por 24 horas. Posterior

mente se inoculó a matraces de un litro (Erlenmeyer) conteniendo 500 ml. de medio base, 30 p.p.m. de extracto de levadura y 1% (v/v) de etanol. Se dejaron los matraces en --agitación a 200 r.p.m. a temperatura ambiente hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 absorbancia, medida con un espectrofotómetro Coleman Junior 11. a una longitud de onda 620 nm. Se utilizaron 700 ml. de este cultivo para inocu--lar el fermentador de 14 litros conteniendo 7 litros del - mismo medio (9).

VI.- ADICION DE ETANOL.

El medio base conteniendo los factores de enri--quecimiento fueron estilizados al autocloro a 121° C. por 30 minutos. Una vez enfriados a temperatura ambiente fué - adicionado el inóculo y el etanol se agregó a diversos in--tervalos de tiempo. Esto fué con el fin de evitar la pérdi--da de etanol por volatilización (31).

VII.- CINETICA DEL CRECIMIENTO.

Se utilizaron los siguientes parámetros para es--tablecer la cinética de crecimiento de *Saccharomyces exi--guus*: Densidad óptica, peso seco, pH y cuantificación de - etanol. Esto sirvió para determinar el coeficiente de ren--dimiento, tiempo de generación y velocidad de crecimiento.

a) Densidad óptica:

Se efectuaron en un espectrofotómetro Junior 11 Coleman. Las determinaciones se hicieron a 650 nm inmedia--

tamente después de tomar las muestras, efectuándose en cel
das de 5 mm de diámetro interno y usando como blanco el me
dio de cultivo sin células (27).

b) Peso seco:

Se realizó usando membranas "Milipore" de 25 mm.
de diámetro con poros de 0.2 μ m. Las membranas se mantuviere
ron en una estufa de secado a 100° C. durante 18 horas hasta
tener peso constante y se pesaron. Se filtró 1 ml. de -
cultivo, se lavaron las células con solución salina al ---
0.85% y los filtros fueron llevados de nuevo hasta peso --
constante. La diferencia en peso se convirtió a peso seco
celular/litro de medio (75).

c) Cuantificación del etanol:

Del filtrado libre de células obtenido anterior-
mente, se tomó en una microjeringa 0.5 μ l., los cuales fuere
ron inyectados a un cromatógrafo de gases Beckman modelo -
GC-72-15 con integrador electrónico y detector de inoniza-
ción de flama, usando N₂ como gas transportador. La colum-
na usada fué "Porapack Q" de 1.83 metros de largo y 0.32 -
cm. de diámetro y las condiciones de análisis fueron las -
siguientes: temperatura de la columna, 140° C., temperatu-
ra del inyector 130° C., temperatura del detector 140° C.
En el registro se usó atenuación de 128 y velocidad de carta
ta de 2.54 cm/min. (5, 35) (62).

d) Coeficiente de Rendimiento:

Una vez calculado el peso seco (g/lto.) y cuantificado la cantidad de etanol residual, se procedió a utilizar la siguiente ecuación: $Y = X/s$ donde "x" representa g - peso seco celular/litro y la "s" g. de etanol/litro para obtener finalmente los g. de peso seco celular/g de etanol usado.

f) Cálculo de tiempo de Generación y Velocidad de --
Crecimiento:

De los datos obtenidos de peso seco celular/litro graficados contra tiempo en papel semilogarítmico, se ----- desarrolló un análisis estadístico por medio de una regresión exponencial (48) utilizando la siguiente ecuación; usando una calculadora TI-58 Texas Instruments Corp.

$$X = X_0 e^{\mu t}$$

X = g. de peso celular/litro (g/lto) a un tiempo determinado.

X₀ = g. de celular por litro (g/lto) inicial.

e = Representa una constante.

μ = Velocidad de crecimiento.

t = Tiempo dado.

VIII. Análisis Químico Proximal de la Biomasa:

La levadura obtenida de los caldos de fermentación por separada por centrifugación (41) a 3000 r.p.m., --

por 30 minutos y lavada con solución salina al 0.85% la --- cual se secó a 100° por 18 horas; de aquí se procedió deter^u minar de la biomasa proteínas, lípidos, cenizas y fibra cru^u da (2, 57).

IX.- Análisis de Aminoácidos de la proteína de *Saccha-romyces exiguus*:

Se efectuó de la manera siguiente:

a) Rompimiento celular: Se efectuó por medio de perlas de vidrio en tubo de ensayo usando 0.5 g. de células se^u cas de *Saccharomyces exiguus* adicionando con 5 ml de H₂O -- destilada empleando un agitador "Vortex" ajustado a la máxi^u ma velocidad por 15 minutos a 4° C. Se preparó un frotis pa^u ra observar al microscopio la eficiencia del rompimiento ce^u lular.

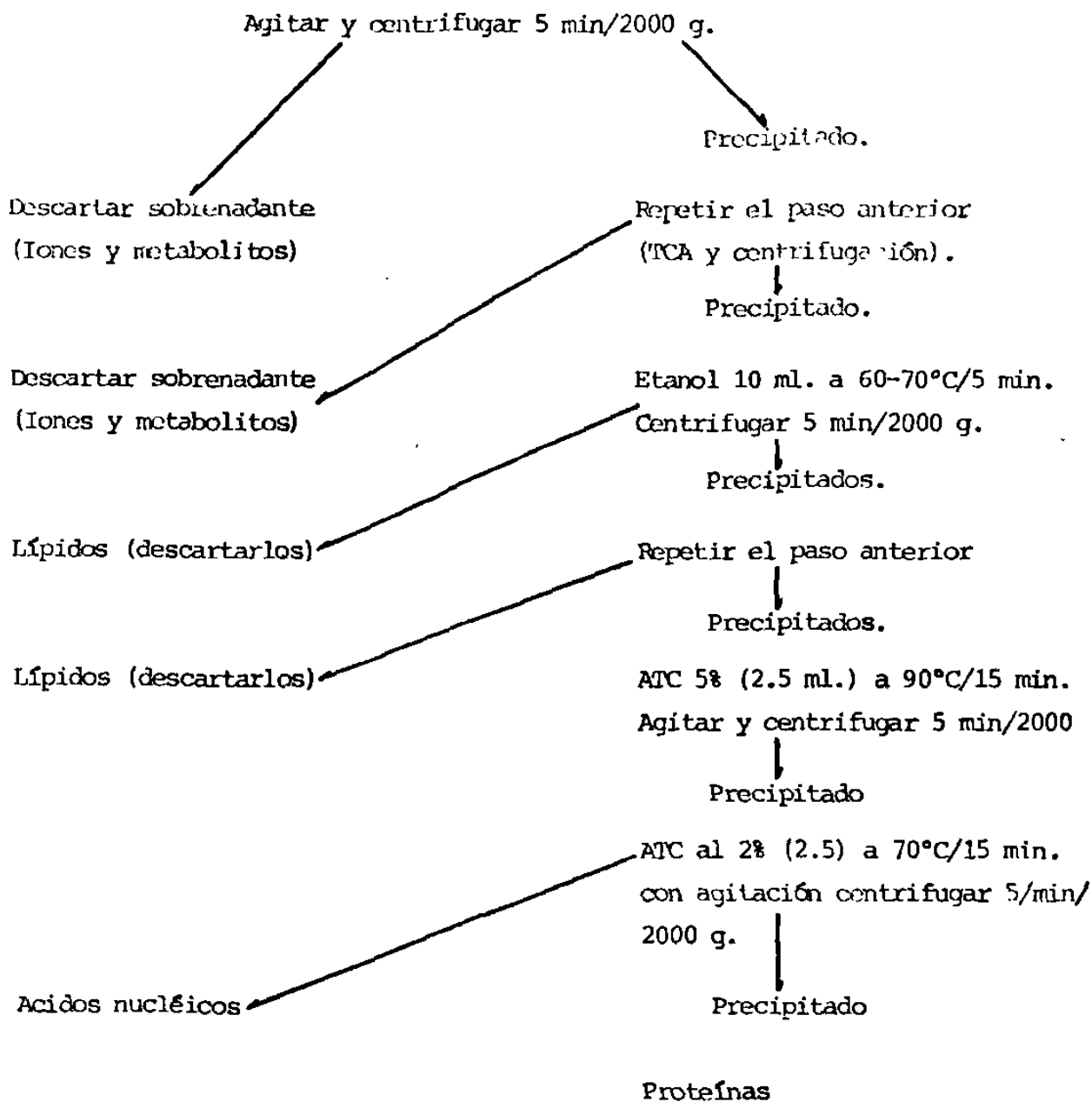
b) Obtención de Concentrados Protéicos: Se usaron 2 ml. de la fracción subcelular obtenida anteriormente y se -- procesó para obtener un concentrado protéico. (Ver cuadro - III).

c) Cuantificación de proteínas: Se efectuó por fluo- metría. Al concentrado protéico obtenido anteriormente se le agregó 2 ml. de NaOH 0.1N y se hizo una dilución 1:40; de aquí se tomaron 50 ml. a los cuales se le adicionaron 2.5 ml. de un "buffer" de boratos pH 8.9 y se agitaron en un -- "vortex". Se le agregó el reactivo de FLURAM* (Fisher) 15 -

CUADRO III

OBTENCIÓN DE CONCENTRADO PROTEICO

Fracción subcelular (2 ml.) y TCA al 10% (5 ml.)



* En frío a 4°C.

ATC = Acido tricloroacético

APC = Acido perclórico.

mg. % y se siguió agitando durante 30 seg. La fluorescencia se leyó entre 5 minutos y 3 horas utilizando para la longitud de onda de excitación 390 nm. (filtro azul) y para la longitud de onda de emisión 470 nm. (filtro amarillo) en un fluorómetro Turner III. El blanco usado fué 50 μ l de agua destilada. La fluorescencia de la muestra se relacionó con estándares de albúmina sérica bovina en concentraciones de 5, 10, 25 y 50 μ g. ya que la linealidad se pierde por arriba de 100 mg. de proteína.

d) Hidrolisis de Proteínas: Se utilizó la técnica -- descrita por Simpson y Newberg (61).

e) Cuantificación de Aminoácidos: El hidrolizado se neutralizó con NaOH 3.5N y se secó en un rotavapor. Se --- agregó 0.5 ml. de H₂O destilada más 0.5 ml. de Norleucina - standard interno con ácido sulfanílico al 60%; se ajustó el pH a 2 y se centrifugó a 3000 r.p.m. por 5 min. y se inyec- taron 100 ml. a un autoanalizador de aminoácidos Beckman -- 121 provisto con una columna de intercambio catiónico tipo Durrum (poliestireno-divinilbenceno) (6), integrando los re- sultados computarizados de acuerdo a un tiempo de retención y absorbancia determinados.

(*)FLUORAM:- Reactivo desarrollado de fluorescencia para proteínas de marca registrada de Fisher, Co. St. Louis. Mo. U.S.A.

R E S U L T A D O S

Se muestran los resultados obtenidos con *Saccharomyces exiguus* creciendo en etanol como principal fuente de carbono y energía en las gráficas (1, 2 y 3). Todos estos experimentos fueron efectuados bajo las siguientes condiciones: Temperatura 30° C., agitación 400 r.p.m., aereación IVVM, tiempo de fermentación 30 horas. Inóculo 10% variando los factores de enriquecimiento (A.C.L., L.R.M. y Extracto de Levadura).

En la fig. 1 se observa la cinética de crecimiento de *Saccharomyces exiguus* creciendo en etanol al 1% (v/v) añadiendo intermitentemente, medio con sales, más parte por millón de Extracto de Levadura. El crecimiento siguió en forma lineal durante las 10 primeras horas y el etanol fué agotado casi en su totalidad a las 22 horas de fermentación. el pH descendió de 3.7 inicial hasta 2.2, presentando la levadura una velocidad de crecimiento de 0.165 hras.⁻¹ y un tiempo de duplicación de 4.2 hrs. El rendimiento final fué de 5.64 g. de levadura seca/l de medio cultivo y un $Y_Y (x/s)$ de 0.75. Ecuación de regresión exponencial $X = 0.419 e, 0.1652 t$.

Al crecer *Saccharomyces exiguus* en medios conteniendo etanol y L.R.M. como factor de enriquecimiento (fig. 2), se encontró un rendimiento celular de 4.7 g. de

levadura seca/1. de medio y un $Y_{x/s}$ igual 0.62. Es el tiempo de duplicación de 3.85 hrs. y una velocidad de crecimiento de 0.179 hrs.⁻¹. El etanol fué agotado a las 19 horas de fermentación. Ecuación de regresión exponencial $X=0.4200.17972.t$

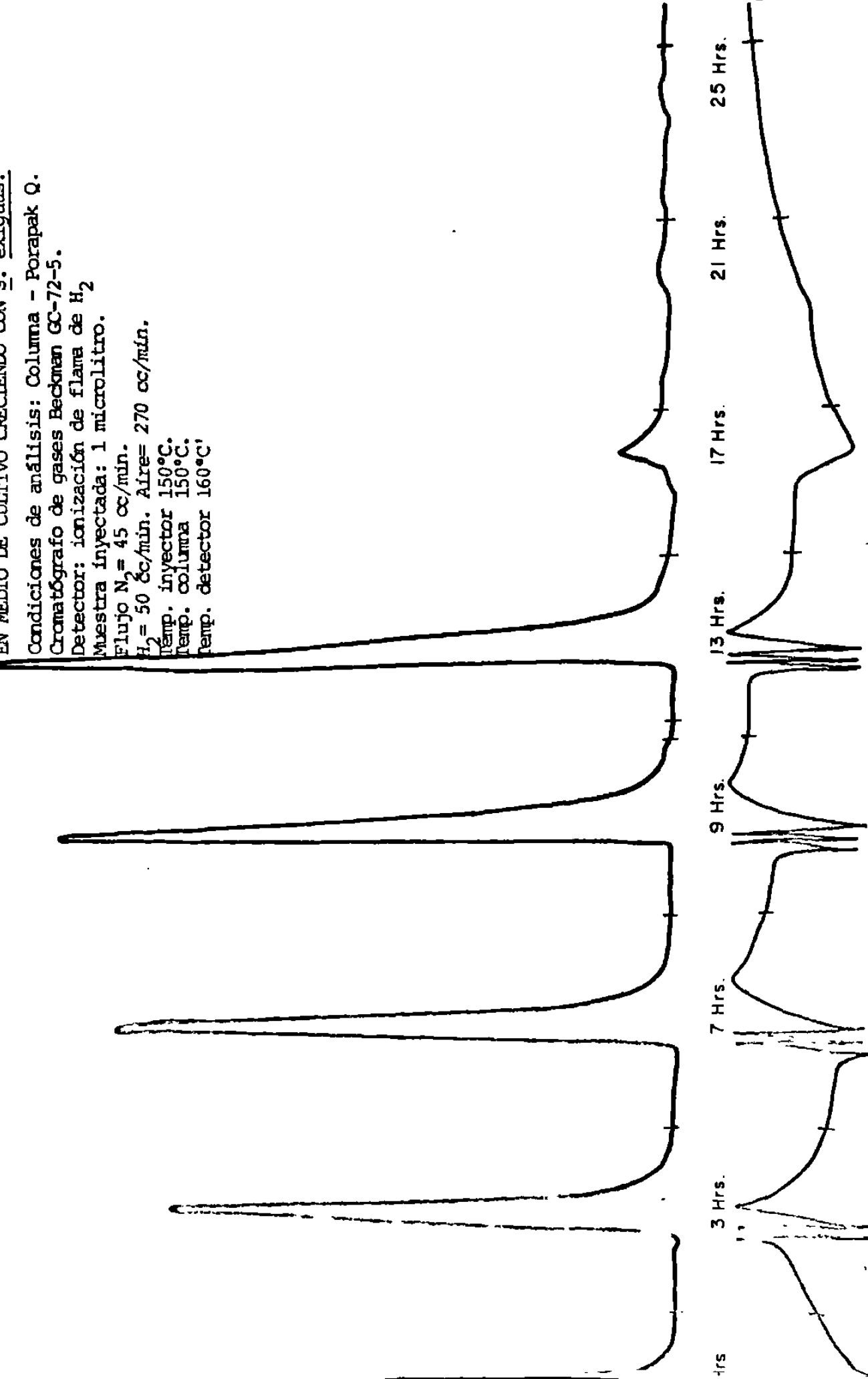
En la fig. 3 se muestran los resultados obtenidos con *Saccharomyces exiguus* al crecer en medios de etanol como principal fuente de carbono y A.C.L. como factor de enriquecimiento en los cuales el etanol fué agotado a las 17 horas de fermentación encontrándose un rendimiento de 5.1 g/lto. y un $T_{x/s}$ igual 0.68, la velocidad de crecimiento fué de 0.184 hrs.⁻¹ y un tiempo de duplicación igual 3.74 hrs. Ecuación de regresión exponencial $X=0.421e0.18492.t$. Se muestra el consumo de etanol durante la fermentación (Cuadro I).

El resumen de los tres experimentos anteriores está representado en el Cuadro No.2. Los resultados encontrados del análisis químico proximal están representados en el cuadro No.3, así como de los concentrados de proteínas de *Saccharomyces exiguus* (ver Cuadro No.4), respectivamente.

En el Cuadro I está representado un análisis cromatográfico de etanol añadido intermitentemente de *Saccharomyces exiguus* creciendo en etanol y A.C.L. como factor de crecimiento.

CUADRO 1.- ANALISIS CROMATOGRAFICO DE ETANOL AÑADIDO INTERMITENTEMENTE EN MEDIO DE CULTIVO CRECIENDO CON S. exiguus.

Condiciones de análisis: Columna - Porapak Q.
Cromatógrafo de gases Beckman GC-72-5.
Detector: ionización de flama de H₂
Muestra inyectada: 1 microlitro.
Flujo N₂ = 45 cc/min.
H₂ = 50 cc/min. Aire = 270 cc/min.
Temp. inyector 150°C.
Temp. columna 150°C.
Temp. detector 160°C.



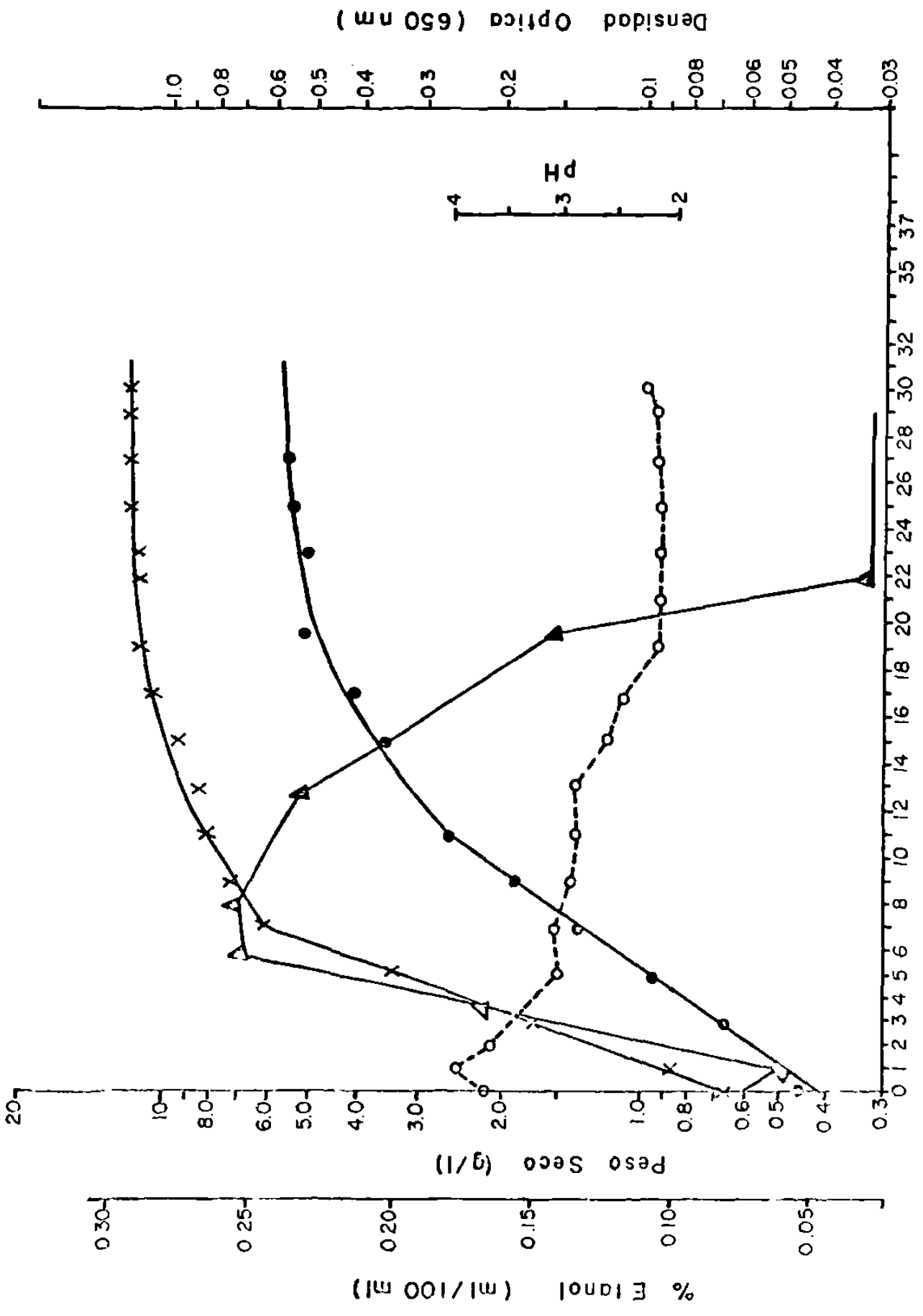


Fig. I. *Saccharomyces exiguus* creciendo en Etanol 1% (v/v) añadido intermitente Sales Minerales y 30 p.p.m. de Ext. de Lev. Agitación 400 r.p.m. Aireación IVVM Temperatura 30°C. Etanol.

D.O. (—x—x—) Peso Seco (—●—●—) pH (—○—○—) Etanol (—▲—▲—)

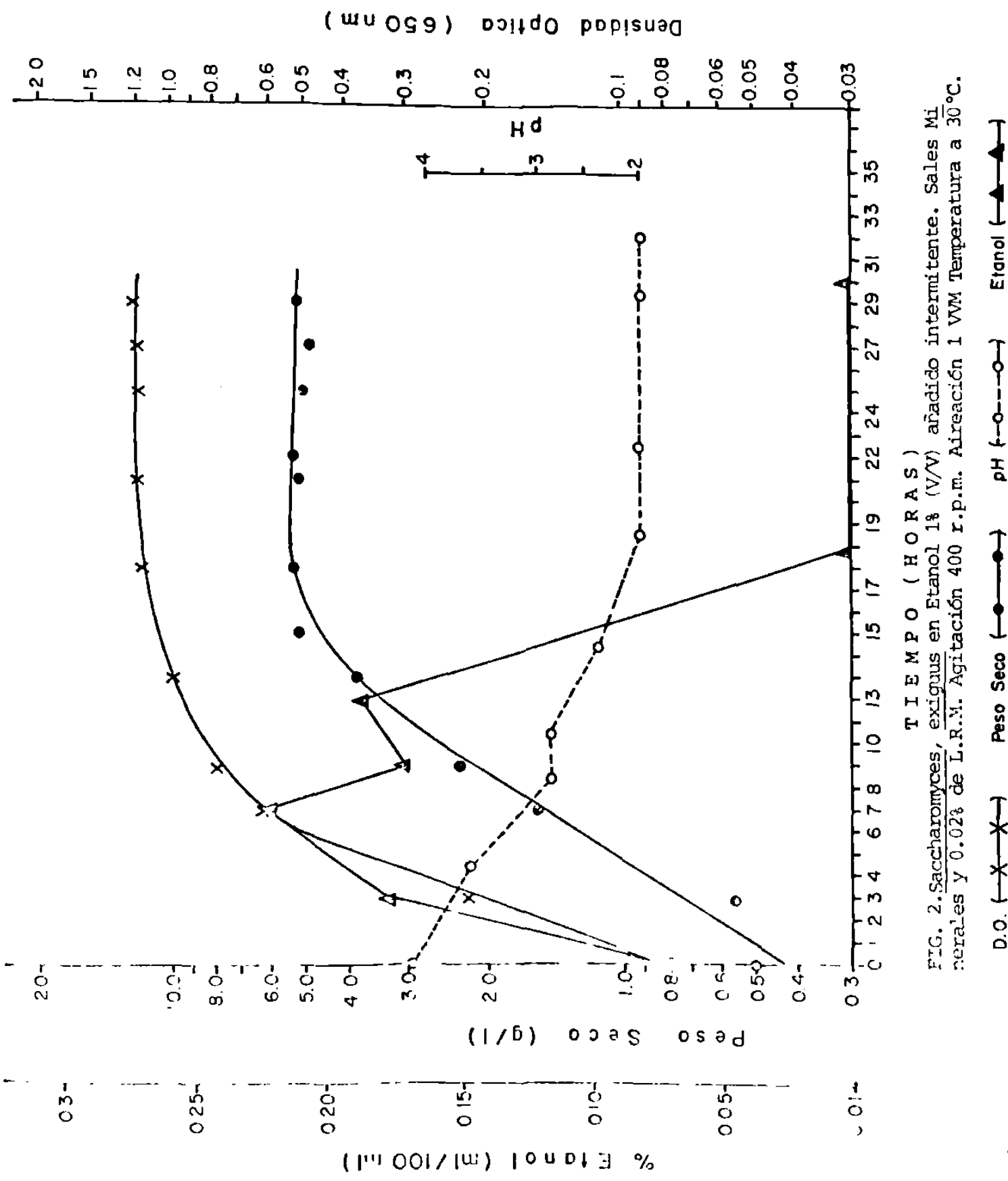


FIG. 2. *Saccharomyces exiguus* en Etanol 1% (V/V) añadido intermitente. Sales Minerales y 0.02% de L.R.V. Agitación 400 r.p.m. Aireación 1 WM Temperatura a 30°C.

D.O. (X-X) Peso Seco (●) pH (○) Etanol (▲)

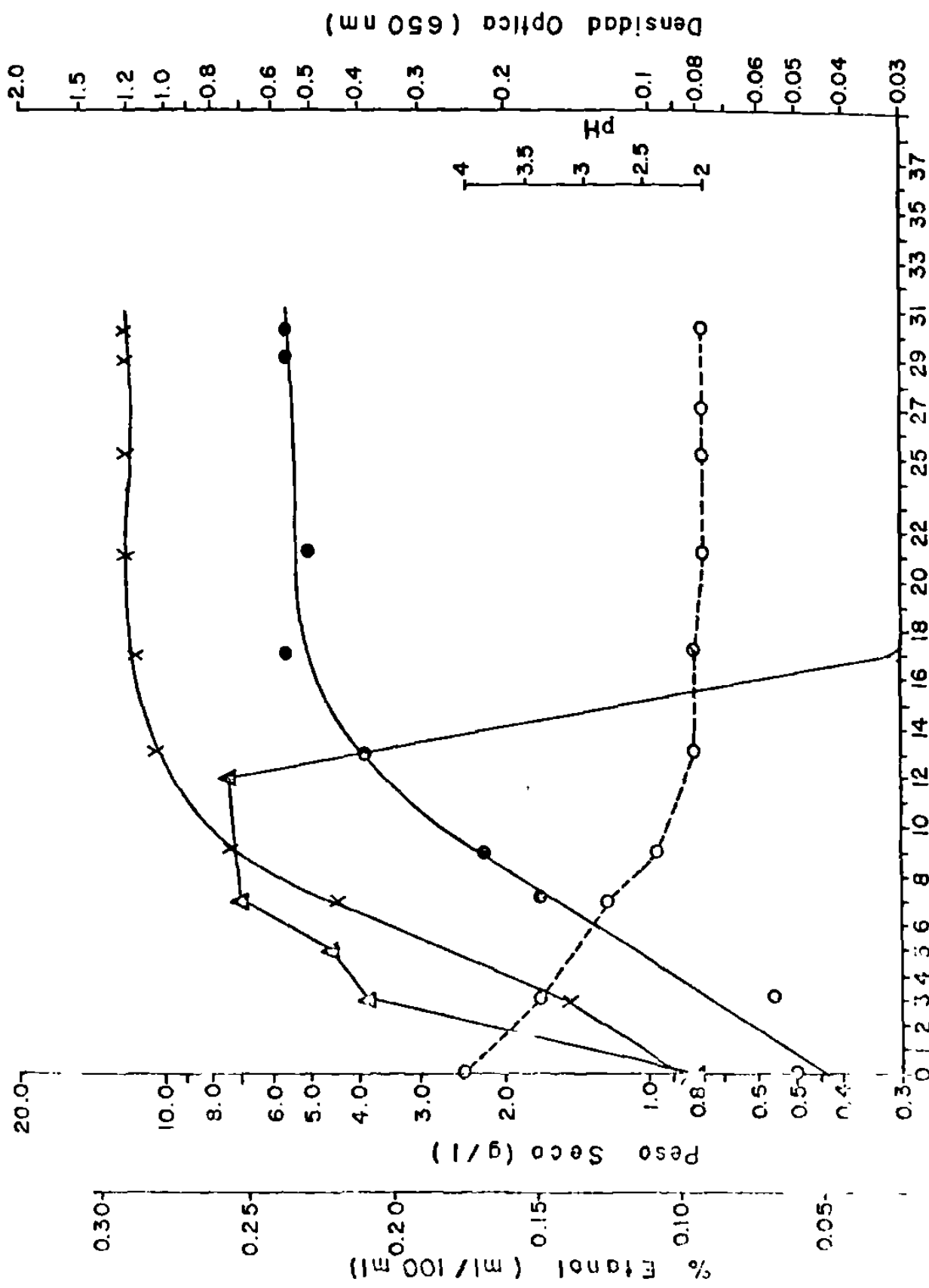


FIG. 3. Saccharomyces, exiguus creciendo en Etanol 1% (v/v). Sales inorgánicas y 0.02 A.L.L. Agitación 400 r.p.m. Aireación IVM Temperatura 30°C.

D.O. (—X—X—) Iso Seco (●—●—●—) pH (—O—O—) Etanol (—▲—▲—)

RESULTADOS DE *Saccharomyces exiguus* CRECIENDO EN ETANOL CON DIVERSOS FACTORES DE CRECIMIENTO.

FACTOR DE ENRIQUECIMIENTO. RENDIMIENTO COEF. RENDIMIENTO VELOCIDAD DE TIEMPO DE PESO SECO INICIAL
 CELULAR X. DE SUBSTRATO ---- CRECIMIENTO DUPLICACION Xo.
 Y (x/s) HRS. -1 (td) Hrs. (g células secas/lto.)

Ext. Lev. 30 ppm	5.64	0.75	0.16	4.2	0.41
L.R.M.	4.7	0.62	0.17	4.8	0.50
A.C.L.	5.1	0.68	0.18	3.7	0.50

CONDICIONES: 30°, 400 r.p.m., etanol intermitente, pH inicial 4, fermentador de 14 lts. de capacidad conteniendo 7.7 lts. de medio, aereación 1 VVM.

ETANOL INTERMITENTE

Tiempo (Hrs.)	ml. etanol añadido	Edad inóculo - 24 horas
0	5	Vol. Inóculo - 10% (v/v)
1	9	30 horas de fermentación
3	8	Antiespumante- Dow-C-Corning FG-10
5	8	L.R.M. - Líquido de Remojo de Maíz
7	8	A.C.L. - Agua de Cocimiento de Levadura
9	16	Ext. Lev. - Extracto de Levadura
11	23	Y (x/s) - g. células secas/g. de etanol
		X - g. células secas/l
		Xo. - g. células secas/lto.

COMPOSICION QUIMICA PROXIMAL DE *Saccharomyces exiguus* CRECIENDO CON TRES DIFERENTES FACTORES DE -

CRECIMIENTO

MATERIA ANALIZADA	EXTRACTO DE LEVADURA.	LIQUIDO DE REMOJO DE MAIZ	AGUA DE COCIMIENTO DE LEVADURA
Materia seca	100.00	100.00	100.00
Proteína cruda	51.81	51.78	52.12
Fibra cruda	1.52	1.17	1.67
Extracto éter-alcohol	1.13	1.06	1.24
Ceniza	3.76	3.97	3.67
E. no nitrogenado	41.70	42.02	41.30

C U A D R O 4

COMPARACION DE AMINOACIDOS ESCENCIALES EN *Saccharomyces exiguus* CRECIENDO EN ETANOL CON TRES DIFE-

-RENTES FACTORES DE CRECIMIENTO.

AMINOACIDO (g/100 - DE PROTEINA).	EXTRACTO DE LEVADURA.	LIQUIDO DE REMOJO DE MAIZ	AGUA DE COCIMIENTO DE LEVADURA
Lisina	2.54	6.51	4.08
Treonina	2.81	6.73	3.72
Cistina	0.25	0.39	0.18
Valina	1.92	4.39	2.72
Metionina	0.23	0.25	0.36
Isoleucina	1.69	3.91	2.56
Leucina	2.82	7.06	4.54
Fenilalanina	2.02	5.52	3.70
Arginina	1.57	4.34	2.76
Tirosina	2.02	4.37	3.04

% Proteína	51.81	51.78	52.12
% Nitrógeno	8.29	8.28	8.34
			36

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Este estudio abre la posibilidad de utilizar - *Saccharomyces exiguus* en otro proceso industrial, además de los ya estudiados (56, 65) el de obtener proteína unicelular a partir de etanol como principal fuente de carbono.

Se encontró que al crecer *Saccharomyces exiguus* en medios conteniendo etanol como principal fuente de energía, un mayor rendimiento $Y (x/s)$ de 0.75 g. de células secas/litro en medios de cultivo enriquecidos con extracto de levadura, en segundo término el A.C.L. y por último al crecer con L.R.M., no estando muy alejado este último del primero.

Otra parte de *Saccharomyces exiguus* presentó - tiempos de duplicación más bajos al crecer en A.C.L. en primer término seguido de L.R.M. y por último extracto de levadura. Con respecto a la composición química proximal se encontró que la cantidad de proteína es igual en los tres factores de crecimiento. Las cenizas, son bajos sus valores pero iguales entre ellos. En el caso de los aminoácidos esenciales se aprecia fácilmente que los aminoácidos azufrados constituyen un factor limitante si se comparan con los reportados por la FAO (Ver Cuadro No.5) y un desbalance considerable es también observado.

En el caso de los aminoácidos aromáticos y ---
treonina al comparar el patrón de aminoácidos de las pro-
teínas de *Saccharomyces exiguus* crecidas en los tres dife-
rentes factores de enriquecimiento, se nota un mayor ba-
lance y una cantidad mayor con L.R.M., que aunado a que -
Saccharomyces exiguus al crecer en etanol con este factor
de enriquecimiento muestra una favorable Y (x/s) y rendi-
miento celular, así como bajo tiempo de duplicación, lo -
sitúa en primer término para usarse con un factor de enri-
quecimiento en este tipo de proceso. Aunque los experimen-
tos se realizaron con etanol de fermentación, ésto servi-
rá como base para estudios futuros usando etanol sintéti-
co, ya que las investigaciones llevadas a cabo demuestran
que no existe diferencia significativa ni en los rendi---
mientos ni en calidad nutritiva de la biomasa obtenida al
utilizar etanol sintético ó de fermentación (31).

Saccharomyces exiguus crecida en etanol y lí--
quido de remojo de maíz comparado en diferentes paráme---
tros con otras levaduras ya estudiadas en otros procesos -
para obtener proteína unicelular a partir de etanol (Ver
Cuadro No.6), son bastante buenos para considerarla a és-
ta levadura como nuevo candidato a usarse para este tipo -
de proceso.

COMPARACION ENTRE LOS NIVELES DE AMINOACIDOS CONTENIDOS EN LEVADURAS DE N-PARAFINAS Y *Saccharomyces exiguus*

CON EL PATRON FAO/WHO (19) (59).

AMINOACIDOS gr/100 p. PROTEINA	LEVADURA (N-PARAFINA)	FAO/WHO2 1973	<i>Saccharomyces exiguus</i> EN ETANOL
Lisina	7.8	5.5	6.5
Treonina	5.4	4.0	6.7
A. azufrados	2.5	3.5	0.64
Triptofano	1.3	1.0	---
Isoleucina	5.3	4.0	3.9
Leucina	7.8	7.0	7.0
A. aromáticos	8.8	6.0	9.9
Valina	5.8	5.0	4.4

--- No determinado.

COMPARACION DE PESO SECO (g/l), Y x/s, td Y VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE ALGUNAS LEVADURAS CPECIEND

LEVADURA	EN ETANOL .			Td. u	(Horas -1)
	X (g/l)	Y x/s (g peso seco/ g etanol).	(Hrs.)		
<i>C. ingenes</i>	26	0.53	4	0.17	(36)
<i>C. utilis</i>	6-7	-	-	-	(44)
<i>C. ethanotermo-</i> <i>philum.</i> (Etanol 20%)		0.84	-	0.45	
<i>C. utilis</i> A-49 (Etanol sintético y pasta levedura como factor de crecimiento).	8.0	0.95	-	-	(44)
<i>S. cerevisiae</i>	10.0	-	-	-	(32)
<i>S. eriguus</i>	-	0.635	-	-	(18)
<i>S. eriguus</i> (Etanol de fermentación y líquido de mofa como factor de crecimiento).	4.7	0.62	0.17	0.17	

R E S U M E N

Saccharomyces exiguus fué estudiada con el objeto de obtener proteína unicelular a partir de etanol, como principal fuente de energía y carbono. Usando tres diferentes factores de enriquecimiento, Agua de Cocimiento de Levadura (A.C.L.), Extracto de Levadura (E.L.) y Líquido de Remojo de Maíz (L.R.M.) la cual presenta un mejor $Y (x/s)$ de 0.75 g. de células secas/litro al crecer en medios de cultivo con (E.L.) como factor de enriquecimiento y un mejor tiempo de duplicación 3.5 hrs. en medios con (A.C.L.). Un mejor balance y cantidad de aminoácidos con L.R.M. que ahunado a que *Saccharomyces exiguus* muestra un favorable $Y (x/s)$ y rendimiento celular, así como bajo tiempo de duplicación sitúa al L.R.M. como el mejor factor de enriquecimiento para usarse con *Saccharomyces exiguus* en este tipo de proceso. Se concluye que esta levadura es un buen candidato para obtener proteína unicelular a partir de etanol y L.R.M. como factor de enriquecimiento, así como abre la posibilidad de usar a *Saccharomyces exiguus* en otro proceso industrial además de los ya estudiados.

- 1.- *Abbot B. J. & Allen Clamen (1973)*
THE RELATIONSHIP OF SUBSTRATE GROWTH AND MAINTENANCE COEFFICIENT TO SINGLE CELL PROTEIN PRODUCTION.
Biotechnology & Bioengineering 15: 117-127
- 2.- *A O A C (1970)*
OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS
11th. edition Association of Analytical Chemists.
Washington, D.C., pp. 80
- 3.- *Asthana H., A.E. Humphrey & V. Moritz (1971)*
GROWTH OF YEAST ON METHANOL AS THE SOLE CARBON ---
SUBSTRATE.
Biotechnology & Bioengineering 13: 923-929
- 4.- *Barnett, J. A. (1977)*
THE NUTRITIONAL TEST IN YEAST SYSTEMATICS.
Journal of General Microbiology 99: 183-190
- 5.- *Batch, H.P., W. Woehrer & M. Roehr (1978)*
CONTINUOUS DETERMINATION OF ETHANOL DURING AEROBIC
CULTIVATION YEASTS.
Biotechnology & Bioengineering, 20: (6) 799-806.
- 6.- *Benson, R.J. (1975)*
INSTRUCTION MANUAL: SINGLE COLUMN AMINOACID -----
ANALYSIS.
Durrum Chemical Corporation.
Palo Alto, California. 1-5
- 7.- *Bhattacharjee, J.K. (1970)*
MICROORGANISMS AS POTENTIAL SOURCE OF FOOD.
Advances in Applied Microbiology
Academic Press, London. 13: 139-145
- 8.- *Bunker, H.J. (1963)*
MICROBIAL FOOD in "BIOCHEMISTRY OF INDUSTRIAL MI--
CROORGANISMS".
(Rainbow & Rose, Editors)
Academic Press. London. pp.34-40

- 9.- *Casida, L.E. (1968)*
INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
John Wiley & Sons.
New York, N.Y. pp. 5-6
- 10.- *Cooney, G.H. L., David W. Levine & Braly Snedecor (1975).*
PRODUCTION OF SINGLE-CELL PROTEIN FROM METHANOL
Food technology, 33-42
- 11.- *Courts, A. (1973).*
RECENT ADVANCES IN PROTEIN PRODUCTION
Process Biochemistry 8 (4): 31-33
- 12.- *Daghir, N.J. & T.K. Abdul - Baki (1977)*
YEAST PROTEIN IN BROILER RATIONS
Poultry Science 56: 1836-1841
- 13.- *Dijken, J.P. V. & Harder (1974)*
OPTIMAL CONDITIONS FOR THE ENRICHMENT AND ISOLA-
TION OF METHANOL ASSIMILATING YEASTS.
Journal of General Microbiology, 84: 409-411.
- 14.- *Dimmling W. & R. Speipenbush (1978)*
RAW MATERIALS FOR THE PRODUCTION OF S.C.P.
Process Biochemistry 13: 9-15
- 15.- *Dwivedi B.K. & D.L. Gibson (1972)*
NUTRITIVE VALUE OF MEAT SUBSTITUTE PREPARED FROM
BREWER'S YEAST AND ISOLATED SOY PROTEIN.
Canadian Institute Food Science Technology.
5. (3): 155-158
- 16.- *Elfas L.G. & R. Bressani (1970)*
VALOR NUTRITIVO DE LA PROTEINA DE LA LEVADURA --
TORULA Y COMO COMPLEMENTO DE CONCENTRADOS PROTEI
COS.
Archivos Latinoamericanos de Nutrición.
20 (2): 135-149.

- 17.- *Enebo, L. (1970)*
SINGLE CELL PROTEIN EVALUATION OF NOVEL PRODUCTS.
Pergamon-Press, New York, N.Y pp. 93-103.
- 18.- *EROSHIN, V.K. & I.S. Utkin (1976)*
YEAST GROWTH ON LOW ALCOHOLS. Abstracts of paper
presented at the Fifth International Fermentation
Symposium Berlin. SESSION II, Microbial Biomass -
Production. pp. 206
- 19.- *FAO / WHO, (1973)*
Technical Report Serie. Num. 52
- 20.- *Gaden, E.L. (1974)*
SUBSTRATES FOR S.C.P. PRODUCTION.
P.D. Davis (Editor) in "Single-Cell Protein"
Academic Press, London. pp. 47-60
- 21.- *Gibbs, B.M. & D.A. Shapton (1968)*
IDENTIFICATION METHODS FOR MICROBIOLOGISTS. PART A
Academic Press, New York, N.Y.
- 22.- *Golberg, I. (1977)*
PRODUCTION OF S.C.P. FROM METHANOL: YIELD FACTORS
Process Biochemistry 12 (9): 12-18
- 23.- *Harrison, J.S. (1968)*
YEAST AS A SOURCE OF BIOCHEMICALS.
Process Biochemistry (8): 59-61
- 24.- *Henry, N.G. (1976)*
GROWTH REQUIREMENTS OF SAN FRANCISCO SOUR DOUGH -
YEAST AND BAKER'S YEAST.
Applied and Environmental Microbiology 31 (3): ---
395-398
- 25.- *Hernández E. & M.J. Johnson (1967)*
ENERGY SUPPLY AND CELL YIELD IN AEROBICALLY GROWN
MICROORGANISMS.
Journal of Bacteriology 94 (4): 996-1001

- 26.- *Hesseltine and W.C. Haynes (1973)*
 SOURCES AND MANAGEMENT OF MICROORGANISMS FOR THE
 DEVELOPMENT OF A FERMENTATION INDUSTRY.
 Progress Industrial Microbiology 12: 3-46
- 27.- *Jian-Shin Chen (1977)*
 TURBIDITY
 A.S.M. News 43: 241.
- 28.- *Johnsons M.J. (1972)*
 TECHNIQUES FOR SELECTION AND EVALUATION OF CULTU
 RES FOR BIOMASS PRODUCTION.
 Process IV. IFS: Fermentation Technology
 Today Society of Fermentation Technology, Japan.
 pp. 473-477.
- 29.- *Kihlberg, R. (1972)*
 THE MICROBE AS A ASOURCE OF FOOD.
 Annual Review Microbiology.
 Palo Alto, California U.S.A. 426-467.
- 30.- *Kline, L. & T.F. Suigbara (1971)*
 MICROORGANISMS OF THE SAN FRANCISCO SOUR DOUGH _
 BREAD PROCESS.
 II Isolation and Characterization of Unidescri--
 bed Bacterial Species Responsible for the -----
 Souring Activity.
 Applied Microbiology. 21: 449-456.
- 31.- *Krumphanzl, V. Gregr., J. Pelechiva & J. Uher --*
(1973)
 BIOMASS AND FAT PRODUCTION IN THODOTORULA GRACI-
 LIS.
 Biotechnology and Bioengineering, Symposium No.4.
 Wiley & Sons, New York, N.Y. (4):245-256.
- 32.- *Machek, F.F. Stros, A.A. Prokop, L. Adamek (1976)*
 PRODUCTION AND ISOLATION OF PROTEIN SYNTHETIC --
 ETHANOL, A.C.R.
 Dean & D.C. Ellwood (editors) in "Continuous --
 Culture 6: Applications and new fields".
 Ellis Harwood Ltd. Publisher London. 135-144.

- 33.- *Mac Lennan, D.C., J.S. Gow & D.A. Stringer (1973)*
METHANOL BACTERIUM PROCESS FOR S.C.P.
Process Biochemistry (6): 22-24
- 34.- *Matsuura, S.A, H. Takahasi & M. Manbe (1973)*
BIOMASS PRODUCTION OF KOJI MOLDS FROM ACETATE AS
A SOLE SOURCE.
Journal Fermentation Technology 5 (11): 783-788
- 35.- *Mayberry, W.R. & G.J. Prochazala (1965)*
POLYETHYLENE GLICOL 606: AN EFFICIENT LIQUID ---
PHASE FOR ALCOHOL AND FREE FATTY ACIDS.
Journal of Gas Chromatography. (7) 232-234
- 36.- *Medrano-Roldán, H. y Casas-Campillo, C.:(1975)*
PROPAGATION OF *Candida ingens* in ETHANOL FOR S.-
C.P. PRODUCTION.
The First Chemical Congress of the North Ameri--
can Continent. Abstract. México City
- 37.- *Medrano-Roldán, H. & Casas-Campillo, C.:(1976)*
CULTIVO CONTINUO DE *Candida ingens* EN ETANOL COMO
UNICA FUENTE DE CARBONO.
Resúmenes del X Congreso Nacional de Microbiolo-
gía.
Monterrey, Nuevo León, México.
- 38.- *Middelhouen, W.J., J. Barends, A.J.M. Van Aert &
J. Bruinsma (1976).*
THE SUBSTRATE CONSTANT FOR DISSOLVED MOLECULAR -
OXIGEN OF METHANOL-ASSIMILATING YEAST.
Journal of General Microbiology 93: 185-188.
- 39.- *Millen, M. & W. Litsky (1976)*
INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
Mc Graw-Hill, New York, N.Y. pp. 400-405
- 40.- *Moo Young, M. (1977)*
ECONOMICS OF S.C.P. PRODUCTION
Process Biochemistry 12 (4): 6-10

- 41.- *Labuza, T.P. (1975)*
CELL COLLECTION: RECOVERY AND DRYING FOR S.C.P.
MANUFACTURE.
S.R. Tannenbaun & D.I.C. Wang (Editors)
Single-Cell Protein II. M.I.T. Press U.S.A. ---
pp. 105-126
- 42.- *Laskin, A.L. (1977)*
ETHANOL AS A SUBSTRATE FOR SINGLE-CELL PROTEIN
PRODUCTION. A.E. Humphrey & E.L. Gaden (Editors).
Biotechnology and Bioengineering Symposium No.7:
Wiley & Sons. New York, N.Y., pp 91-103
- 43.- *Laskin, A.L. (1977)*
SINGLE-CELL PROTEIN
D. Perlman (Editor)
Annual Reports on Fermentation Process. I (7):
151-175.
- 44.- *Litchfield, J.H. (1977)*
COMPARATIVE TECHNICAL AND ECONOMICS ASPECTS OF -
SINGLE-CELL PROTEIN PROCESS.
Advances in Applied Microbiology,
Academic Press. New York, N.Y. 22:167-305
- 45.- *Lodder, J. (1970)*
THE YEAST: A TAXONOMIC STUDY
North Holland Publishing Company. Amsterdam.
- 46.- *Nyiri, L.K. & K.P. Jefferis, III (1975)*
S.C.P. IN SUBMERGED CULTURES.
S.R. Tannenbaum & D.C.I. Wang (Editors)
M.I.T. Press. Cambridge, Mass. U.S.A.
- 47.- *Okafor, N. (1972)*
PALM-WINE YEAST FROM PARTS OF NIGERIA
Journal Science Food Agronomics 23: 1399-1407
- 48.- *Ostel, B. (1979)*
ESTADISTICA APLICADA.
The Iowa State University Press, U.S.A.

- 49.- *Paca, J. & V. Gregr. (1977)*
UTILIZATION OF COAL BY BACTERIA - PART II
Process Biochemistry 12 (3): 25-27
- 50.- *Perlman, D. (1977)*
THE FERMENTATION INDUSTRIES
A.S.M. News 43 (2): 82-89
- 51.- *Phaff, H.J., M.W. Miller & E.M., (1978)*
THE LIFE OF YEAST
2a. Edition. Harvard University Press.
Cambridge, Mass. pp.247
- 52.- *Presscott, S.C. & C.G. Dunn (1962)*
INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
3a. Edition de Mc Graw-Hill, New York, N.Y.
pp. 679. 13-59.
- 53.- *Prokop, A. & O. Vlofoua (1962)*
S.C.P. FROM HYDROCARBONS
Process Biochemistry (5) 31-32.
- 54.- *Reed & Pepler (1973)*
FEED AND FOOD YEAST. YEAST TECHNOLOGY
Avi Publishing Company Inc.
Westport, Conn., U.S.A.
- 55.- *Sahm, H. & F. Wagner (1975)*
ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AN OBLIGATE --
METHANOL-UTILIZING BACTERIUM METHYLOMONAS M-15.
European Journal Applied Microbiology 2: 147-158
- 56.- *Sahm, H., H. Roggenkamp & F. Wagner (1975)*
MICROBODIES IN METHANOL GROWN *Candida boidinii* -
Journal of General Microbiology 88: pp. 218-222
- 57.- *S.A.R.H. (1979)*
MEMORIAS DEL CURSO DE ACTUALIZACION SOBRE ANALI-
SIS DE INGREDIENTES UTILIZADOS EN ALIMENTOS.
Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias
México, D.F.
- 58.- *Sánchez A. Marroquín (1961).* Principios de Micro-
biología Industrial. Editorial Química, México, D.F.
- 59.- *Shacklady C.A. (1970)* Process Nutrition Society
29: 91-95

- 60.- *Shipman, L.T. Fan & I.C. Kao (1977)*
SINGLE-CELL PROTEIN PRODUCTION BY PHOTOSYNTETIC BACTERIA.
Advances in Applied Microbiology
Academic Press, London 21: 161-183
- 61.- *Simpson, R.J. & M.R. Neuberg (1976)*
COMPLETE AMINOACID ANALYSIS OF PROTEINS FROM A - SINGLE HYDROLYSTATE.
The Journal Biological Chemistry. 251 (7):55-58.
- 62.- *Sinclair, C.G., W.R. King, D.N. Ryder & H.H. --- Topiwala. (1971).*
USE OF GAS CHROMATOGRAPHY TO MONITOR SUGAR AND - SUGAR ALCOHOLS IN MICROBIAL MEDIA.
Biotechnology & Bioengineering 13 (3):453-455.
- 63.- *Sinsky, et. al (1980)*
SUMMER COURSE IN "ADVANCES IN FOOD AND APPLIED - MICROBIOLOGY".
M.I.T. Cambridge, Mass., U.S.A. (no publicado)
- 64.- *Solomons, G.L. (1969)*
MATERIALS AND METHODS IN FERMENTATION.
Academic Press. London, pp. 138-139
- 65.- *Stewart, G.G. (1974)*
SOME THOUGHTS ON THE MICROBIAL ASPECTS OF BREWING AND OTHER INDUSTRIES UTILIZING YEAST.
Advances in Applied Microbiology, Academic Press, London. 17: 234-262
- 66.- *Sugihara, T.F., L. Kline & M.W. Miller (1971)*
MICROORGANISMS OF THE SAN FRANCISCO SOUR DOUGH BREAD PROCESS.
A YEAST RESPONSIBLE FOR THE LEAVENING ACTION.
Applied Microbiology 21: 456-458.
- 67.- *Swings, J. & K. Deley, (1977)*
THE BIOLOGY OF SIMONAS
Bacteriological Review, 41 (1): 8-9

- 68.- *Tachibana, S. & Toshio Murakami (1974)*
EFFECTS OF FLAVING ON L-MALATE FERMENTATION UTILIZING ETHANOL BY SCHIZOPHYLLUM COMMUNE.
Journal Fermentation Technology 52 (8)511-516.
- 69.- *Tennenbaum, S.R., & A.J. Sinskey (1975)*
REMOVAL OF NUCLEIC ACIDS IN SINGLE CELL PROTEIN Edited by M.I.T., U.S.A., Chapter 7, pp.159-179
- 70.- *Topiwala, H.H. & G. Hammer (1971)*
GROWTH OF YEAST ON METHANOL AS THE SOLE CARBON - SUBSTRATE.
Biotechnology and Bioengineering 13:923:928
- 71.- *Van Dijken, J.P. & W. Harder (1974)*
OPTIMAL CONDITIONS FOR THE ENRICHMENT AND ISOLATION OF METHANOL-ASSIMILATING YEAST.
Journal of General Microbiology 84:409-411
- 72.- *Varela, G., F.J. Mataix & M. Navarro*
ESTUDIO DEL VALOR NUTRITIVO DE LA PROTEINA DE LE VADURA *Hansenula anomala* CRECIDA SOBRE ETANOL DE SINTESIS. A.T.A. 16:265-272.
- 73.- *Viikari L. & M. Linka (1977)*
REDUCTION OF NUCLEIC ACID CONTENTS OF S.C.P.
Process Biochemistry 12 (4):17-19
- 74.- *Vilenchich, R. & W. Akhtar (1971)*
MICROBIOLOGICAL SYNTHESIS OF PROTEINS
Process Biochemistry, pp. 41-42.
- 75.- *Wang, D.I.C. et. al (1970)*
FERMENTATION AND ENZYME TECHNOLOGY.
John Wiley & Sons, New York, N.Y.
- 76.- *White, W.B. & S.L. Balloun (1977)*
THE VALUE OF METHANOL-DERIVED SINGLE-CELL ----- PROTEIN BROILERS.
Poultry Science 56:266-273

- 77.- *Withworth (1974)*
HYDROCARBON FERMENTATION: PROTEIN AND ENZYME SOLU
BILITATION FROM *C. lipolytica* USING AND INDUSTRIAL
HOMOGENIZED.
Biotechnology & Bioengineering 16:1399-1406
- 78.- *Yamada (1977)*
INDUSTRIAL FERMENTATION IN JAPAN
Biotechnology & Bioengineering 19:1599-1621
- 79.- *Yasyharu, Masahira & Shigeo (1974).*
YEAST UTILIZANG METHANOL AS A SOLE CARBON SOURCE
Journal Fermentation Technology 52 (4):201-209

