



UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN



NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGÍA



“Obtención de Proteína Unicelular a Partir de Desechos”

Tesina

Presentada por

P.Q.F.B. YAZMIN MORENO RODRIGUEZ

Para obtener el título de

QUÍMICA FARMACOBIOLOGA

Director de tesina

RAÚL CORTÉS MARTÍNEZ

Febrero de 2017, Morelia, Michoacán, México

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a todas las personas que hicieron posible que realizara la tesina para poder cumplir con mi deseo de titularme:

A mis padres Juan Moreno Maya y Blanca Estela Rodríguez Álvarez por apoyarme y darme los mejores consejos que me ayudaron a terminar con mis estudios que es la mejor herencia que pudieron darme ya que me durará toda la vida.

A mi esposo Arturo Márquez Espinosa por la paciencia y apoyo en la realización de una de mis metas.

A mis hermanos Jarintzi Moreno Rodríguez y Juan Moreno Rodríguez que me apoyaron y me dieron su cariño de manera incondicional cuando más lo necesitaba.

Al profesor Raúl Cortés por apoyarme y guiarme de la mejor manera para la realización de esta tesina.

A todos los profesores que a lo largo de la carrera me ayudaron y me guiaron por el mejor camino.

A todas las personas que pusieron su granito de arena para que yo pudiera lograr terminar mi carrera gracias.

CONTENIDO

RESUMEN.....	10
Abstract.....	10
1. OBJETIVOS.....	12
1.1. Objetivo General.....	12
1.2. Objetivos Específicos.....	12
2. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN.....	13
2.1. Hipótesis.....	13
2.2. Justificación.....	13
3. INTRODUCCIÓN.....	14
4. RESEÑA HISTÓRICA.....	16
5. IMPORTANCIA DE LA PROTEÍNA UNICELULAR.....	17
6. USOS DE LA BIOMASA Y LA PROTEÍNA UNICELULAR.....	19
6.1. Las aplicaciones de la proteína unicelular en la salud.....	20
7. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL USO DE PROTEÍNA UNICELULAR EN PROCESOS PRODUCTIVOS.....	21
8. PRINCIPALES MICROORGANISMOS EMPLEADOS COMO FUENTE DE PROTEÍNA UNICELULAR.....	23
8.1. CO ₂	25
8.1.1. Microalgas	25
8.1.1.1. <i>Chlorella sp.</i>	25
8.1.1.2. <i>Scenedesmus</i>	26
8.1.2. Cianobacterias.....	27

8.1.2.1. <i>Spirulina sp.</i>	27
8.2. Hongos filamentosos.....	28
8.2.1 <i>Pleurotus</i>	28
8.2.1. <i>Phaerochaete chrysosporium</i> o <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Tichoderma reesei</i>	29
8.3. Levaduras.....	29
8.3.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
8.3.2. <i>Saccharomyces exigguis</i>	31
8.3.3. <i>Candida utilis</i>	32
8.3.4. <i>Fusarium</i>	33
9. SUBSTRATOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA	
UNICELULAR (SCP).....	34
9.1. Hidrocarburos y combustibles.....	34
9.1.1. Petroquímicos (n-alcanos).....	34
9.1.2. Metano.....	35
9.1.3. Metanol.....	36
9.1.4. Etanol.....	37
9.2. Desechos industriales.....	38
9.3. Substratos de origen vegetal no considerados como desechos.....	42
10.ASPECTOS NUTRICIONALES DE LA PROTEÍNA UNICELULAR.....	43
10.1. Composición general y valor nutricional de la Proteína unicelular.....	44
10.2. Limitaciones nutricionales asociadas con los ácidos nucleicos..	48

11. PROCESO DE OBTENCIÓN DE SCP.....	50
12. OBTENCIÓN DE SCP A PARTIR DE DESECHOS.....	52
12.1. Obtención de SCP a partir del suero de derivados lácteos.....	52
12.2. Obtención de SCP a partir de bagazo de naranja.....	55
12.3. Obtención de SCP a partir de harina de maíz precocido.....	60
12.4. Obtención de SCP a partir de plumas de aves de corral.....	71
12.5. Obtención de SCP a partir de pomasa de manzana.....	80
12.6. Obtención de SCP a partir de bagazo de caña de azúcar.....	81
12.7. Obtención de SCP a partir de porquinaza.....	84
13. CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS DE LA SCP.....	87
14. CONCLUSIONES.....	88
15. RECOMENDACIONES.....	89
LITERATURA CITADA.....	90

INDICE DE FIGURAS

FIG. 1: Hongos utilizados para la producción de SCP.....	17
FIG. 2: <i>Chlorella</i> sp. al microscopio.....	25
FIG. 3: <i>Scenedesmus</i> al microscopio.....	26
FIG. 4: <i>Spirulina</i> al microscopio.....	27
FIG. 5: <i>Spirulina</i> en cápsulas.....	28
FIG. 6: Vista macroscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio YPG.....	30
FIG. 7: Vista microscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
FIG. 8: Reacción general para la producción de biomasa microbiana (SCP).....	50
FIG. 9: Estimación de la degradación de las plumas por la cepa de <i>Bacillus</i> <i>LPB-2</i> mediante la determinación de la concentración de GAL (▪) y cantidad de plumas digeridas expresadas en porcentaje (□) en el medio de cultivo.....	77
FIG. 10: Proceso de obtención de la melaza.....	82

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Derivados posibles a partir del aprovechamiento industrial de los posibles componentes de la biomasa bacteriana.....	17
Tabla 2. Microorganismos más importantes en la producción de Proteína unicelular.....	24
Tabla 3. Diferencias entre el costo de la producción de la proteína unicelular a partir de acetato en relación a otras fuentes de carbono.....	26
Tabla 4. Composición porcentual promedio en base seca de los principales Microorganismos empleados como.....	43
Tabla 5. Perfil de aminoácidos esenciales promedio en g/100g de proteína de los principales grupos de microorganismos empleados como SCP.....	44
Tabla 6. Ahorros en piensos animales por sustitución parcial con SCP.....	45
Tabla 7. Parámetros nutricionales de la SCP.....	46
Tabla 8. Contenido aproximado de vitaminas en mg/100g (base seca) de algunos microorganismos empleados como fuente de SCP.....	47
Tabla 9. Concentración de nitrógeno y proteína del bagazo de naranja con <i>Aspergillus niger</i>	57
Tabla 10. Formulación para el grupo de referencia.....	58
Tabla 11. Formulación para el grupo de prueba.....	59
Tabla 12. Incremento de peso de los pollos en 30 días grupo de referencia.....	59
Tabla 13. Incremento de peso de los pollos en 30 días grupo prueba con bioproteína.....	59
Tabla 14. Efecto de la hidrólisis ácida del desecho para la producción de	

azúcares fermentescibles.....	65
Tabla 15. Efecto de la concentración del desecho en la velocidad de crecimiento de <i>C. utilis</i> , <i>S. cerevisiae</i> y <i>Sch. Castellii</i>	66
Tabla 16. Efecto de la concentración de los nutrientes sobre las velocidades de crecimiento celular (m) de las levaduras.....	67
Tabla 17. Efecto de la hidrólisis sobre la producción de biomasa en el desecho de harina de maíz precocida en fermentador de 2.5 litros.....	68
Tabla 18. Características de la biomasa obtenida por tratamiento enzimático con el consorcio formado por <i>Sch. Castellii</i> y <i>S. cerevisiae</i> crecidas en medio de harina de maíz precocida Fermentador Proyetsan de 250 litros.....	69
Tabla 19. Caracterización bromatológica y microbiológica del desecho y la biomasa de levaduras obtenida en el fermentador de 250 litros.....	70
Tabla 20. Composición de la melaza.....	83
Tabla 21. Producción de materia fecal y orina como proporción del peso vivo semillero de investigación en Gestión y Medio Ambiente SIGMA.....	85

RESUMEN

El término “proteína unicelular”, significa o identifica a alimentos proteicos derivados de microorganismos unicelulares o pluricelulares crecidos por procesos fermentativos en cultivos sumergidos, de diversas fuentes y en desechos orgánicos. También se le conoce como proteína microbiana, biomasa o SCP (*Single cell protein*). Suelen ser producidas por métodos no tradicionales y están asociadas al reciclaje de una gran variedad de desechos biodegradables de bajo valor económico. Se recopiló información de diversas investigaciones que se han realizado de distintos desechos como por ejemplo de maíz precocido, pomasa de manzana, bagazo de naranja, por mencionar algunos; a su vez se detallan los aspectos nutricionales asociados a la SCP tales como composición, valor nutricional y limitaciones asociadas a la ingesta por parte de seres humanos, por extensión se abarca también a los microorganismos muertos y desecados que se emplean directamente en alimentación animal (cerdos, aves, rumiantes) sin que medie ningún proceso de extracción o purificación de la proteína, toda esta investigación tiene como principal objetivo dar solución a un problema que ya sea presentado en algunos de nuestros estados de la República Mexicana, debido a la situación económica que está atravesando nuestro País, además en el área de la salud puede utilizarse para desarrollar muchos productos derivados como lípidos, proteínas ácidos nucleicos, carbohidratos, vitaminas, etc., y con esto tener un mayor control sobre nuestro organismo. Aunque en este tiempo no es muy económico obtener la proteína para el consumo humano se espera que se realicen estudios que nos ayuden a mejorar el costo de esta, ya que para el caso de algunos animales ya se está utilizando y con resultados muy positivos.

Palabras clave: Proteína, Desechos, Alimento, Microorganismos.

Abstract

The term "unicellular protein" means or identifies protein foods derived from unicellular or multicellular microorganisms grown by fermentation processes in submerged crops, from various sources and from organic wastes. It is also known as microbial protein, biomass or SCP (Single cell protein). They are often produced by non-traditional methods and are associated with the recycling of a large variety of biodegradable wastes of low economic value. Information was collected on various investigations that have been carried out on different wastes such as precooked maize, apple pomasa, orange bagasse, to name a few; In turn, details the nutritional aspects associated with SCP such as composition, nutritional value and limitations associated with human intake, by extension also covering dead and dried microorganisms that are used directly in animal feed (pigs , Poultry, ruminants) without any process of extraction or purification of the protein, all this research has as main objective to solve a problem that is already presented in some of our states of the Mexican Republic, due to the economic situation that is going through our country, also in the area of health can be used to develop many products such as lipids, nucleic acid proteins, carbohydrates, vitamins, etc., and thereby have greater control over our body. Although at this time it is not very economical to obtain the protein for human consumption it is expected that studies will be carried out to help us improve the cost of this, since for the case of some animals is already being used and with very positive results.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo general

Llevar a cabo una revisión actualizada acerca de la obtención de proteína unicelular a partir de sustratos de desechos, ya que representa una solución a sus problemas de disposición y se obtiene bioproteína de calidad para su aplicación.

1.2. Objetivos específicos

- Conocer la definición de la proteína unicelular.
- Mostrar la obtención de la proteína unicelular a partir de diferentes tipos de residuos.
- Examinar las aportaciones de la proteína unicelular.
- Identificar a los microorganismos más importantes para la producción de proteína unicelular.
- Informar los avances que se han hecho sobre la producción de proteína unicelular a partir de residuos.
- Considerar las ventajas y desventajas que tiene el uso de proteína unicelular.
- Reconocer cuales son los principales sustratos que se utilizan para la producción de proteína unicelular.
- Identificar cuáles son las aportaciones nutricionales de la proteína unicelular e ilustrar cuales son las aportaciones de la proteína unicelular en la salud.
- Analizar algunos procesos de obtención de proteína unicelular.
- Describir las expectativas futuras que se tienen sobre la proteína unicelular.

2. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

2.1. Hipótesis

La biomasa obtenida a partir de desechos representa una gran alternativa para remplazar o reforzar algunas de las fuentes de proteínas convencionales como harina de pescado, soya, suero descremado de leche, etc., incluso en animales y humanos, si se les da el correcto refinamiento. Por esto la importancia de la implementación y el desarrollo de técnicas de producción industrial de proteína unicelular ayudan a amortiguar el problema de la ingesta y la limitada disponibilidad de proteínas.

2.2. Justificación

Está bien conocido que ha aumentado la problemática de la obtención de proteína vegetal y animal a nivel mundial, debido al incremento excesivo de la población; por lo cual, el ser humano debe buscar otras alternativas para abastecer sus necesidades. En este trabajo se expondrá una de esas alternativas, la cual es la utilización de residuos para la obtención de biomasa microbiana que puede utilizarse principalmente como fuente de proteína, así como para desarrollar muchos productos derivados como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, vitaminas, etc. Esta biomasa puede obtenerse de distintos tipos de residuos, ya sean de la industria o de la agricultura. La biomasa microbiana puede utilizarse tanto en seres humanos como en animales pero el uso de la proteína unicelular en animales es el menos tecnificado y el más inmediato de todos. Por lo general implica un secado previamente de la biomasa antes de la ingesta o consumo. Para los humanos es diferente debido a que el proceso es mucho más elaborado, implicando no sólo eliminación de riesgos nutricionales, como los ácidos nucleicos, sino también el garantizar la seguridad y calidad del producto.

3. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el aumento acelerado de la población no es proporcional a la cantidad y calidad de la proteína disponible de origen vegetal y animal por lo que se buscan soluciones tanto precisas como económicas por las que se obtengan productos que nos ayuden a solucionar este problema y una de ellas es la obtención de proteína unicelular a partir de sustratos derivados de desechos es por ello que se busca demostrar que la proteína se puede utilizar para la alimentación humana e incluso animal. El término proteína unicelular deriva de la contracción de “proteína de organismos unicelulares”, que sería el término más adecuado. La literatura científica se refiere a la proteína unicelular empleando el término SCP, el cual deriva del término anglosajón “Single Cell Protein”. La producción de proteína unicelular también conocida como “biomasa” ha representado desde principios del siglo XX una opción biotecnológica de discutida viabilidad en el manejo y aprovechamiento de grandes cantidades de desechos orgánicos de origen agrícola, constituyendo una alternativa recurrente para convertir estas fuentes de polución en materiales útiles desde el punto de vista económico, nutricional e industrial. Este trabajo abordó la evolución histórica de la SCP; su importancia y aplicaciones; las ventajas y desventajas de su uso en procesos productivos; los principales microorganismos fuente de SCP; los sustratos agroindustriales empleados para su crecimiento; la bioquímica y secuencia de operaciones del proceso y los aspectos económicos generales. También se detallan los aspectos nutricionales asociados a la SCP tales como composición, valor nutricional y limitaciones asociadas a la ingesta por parte de seres humanos. Perspectivas futuras de la SCP fueron también evaluadas.

La biotecnología, es una rama interdisciplinaria y aplicada de la ciencia que aglutina a la Química, Biología, Bioquímica, Ingeniería y Microbiología con el objetivo de solucionar problemas prácticos, implicando una optimización de costos y rendimientos (Durán 1989). Uno de los objetivos primarios de la biotecnología es mejorar el manejo y aprovechamiento de grandes cantidades de desechos orgánicos de origen agrícola, tratando de buscar alternativas para convertir estas

fuentes de polución en materiales derivados útiles desde un punto de vista económico industrial. Una de las tangentes más importantes de la biotecnología enfocada a abordar este problema, es el empleo de microorganismos como parte de los procesos industriales, donde substratos baratos o de desecho industrial se aprovechan como fuente energética para que microorganismos seleccionados sinteticen nuevos compuestos de valor comercial (Goel 1994).

Muchos son los compuestos orgánicos derivados obtenidos por medio de un aprovechamiento biotecnológico de substratos de desecho (EDV 2003). Algunos se obtienen en la forma de productos finales ó intermedios de la actividad metabólica microbiana que son excretados al medio o extraídos industrialmente después de la célula (metanol, metano, etanol, vitaminas del complejo B, ácido láctico y glutámico, carotenoides, Xilitol, etc.). Es factible también que el producto en si sea la biomasa microbiana como tal (Rojas 1995), y que constituya una fuente alimenticia de elevado contenido proteico.

Se denomina proteína unicelular o bioproteína (Molk et al. 2002), aquella obtenida de la biomasa microbiana de algas, bacterias, levaduras y hongos filamentosos, cultivados en condiciones fermentativas apropiadas y controladas que garanticen una adecuada tasa de crecimiento, por medio del aprovechamiento de sustratos baratos compuestos por o enriquecidos con carbono, nitrógeno y fósforo (Israelidis, 2003; Rojas, 1995; Keil 1995; FAO, 2003). Por extensión se abarca también a los microorganismos muertos y desecados que se emplean directamente en alimentación animal (cerdos, aves, rumiantes) sin que medie ningún proceso de extracción o purificación de la proteína (Crueger y Crueger 1989, Israelidis 2003, Bustamante et al. 2003).

En el estado de Michoacán hay una gran cantidad de desechos que pueden ser tratados y utilizados como proteína unicelular. Este estado se caracteriza por ser uno de los mayores agricultores de todo el país. La producción de SCP puede ser una solución para aprovechamiento de los productos de desecho, ya que esto ayudará a nuestra población a crecer, la mayoría de estos desechos son desperdiciados y tirados a la basura, además podemos ahorrar mucho dinero

porque ya no se utilizaría el alimento para animales y sería mucho más natural, como lo veremos más adelante un ejemplo importante es la engorda de aves de corral con bagazo de naranja que se obtiene el mismo resultado que con el alimento o la engorda de ganado con la pomasa de caña de azúcar, etc.

Por lo tanto en esta revisión la obtención de la proteína unicelular a partir de desechos se mostrará algunas posibles soluciones que se pueden lograr con el uso de algunos desechos para el beneficio humano de buena calidad.

4. RESEÑA HISTÓRICA

La biomasa microbiana ha sido utilizada como fuente de alimentación desde tiempos remotos en regiones como México y África, especialmente utilizando *Spirulina sp.* (Pelizer et al. 2003).

Ya en tiempos modernos, el primer gran auge de la SCP se da en Berlín, Alemania, durante la primera guerra mundial, dada la escasez de alimento provocada por este funesto conflicto bélico. La producción se enfocó en el *S. cerevisiae*, que llegó a remplazar hasta el 60% de la proteína importada antes de la guerra. Terminada la conflagración, el interés en la SCP decrece (Israelidis 2003).

Iniciada la segunda guerra mundial, y por las mismas razones, se reactiva el interés en la biomasa microbiana como fuente de alimentación. Solo en los Estados Unidos se produjeron 15.000 toneladas anuales de SCP, la cual fue incorporada en la dieta de civiles y militares en forma de sopas y salchichas. Para esa época se ensaya con levaduras *Candida arborea* y *Candida utilis* (Israelidis 2003).

Dadas las experiencias de los años de guerra, en los años 1950, muchas empresas petroleras mostraron interés en proyectar soluciones para el desalentador panorama nutricional generado por la incipiente explosión demográfica planificando la producción de biomasa partiendo de alcanos.

Destacaron países como Japón, Reino Unido, Estados Unidos y la antigua Unión Soviética, que llegó a instalar 86 plantas productoras (Israelidis 2003).

La primera conferencia sobre proteína unicelular se efectuó en 1967 en el Instituto Tecnológico de Massachusetts (M.I.T). Se acuña aquí el término SCP como estándar internacional para la bioproteína (Crueger y Crueger 1989). Solo la British Petroleum presentó procesos industriales de peso en esta primera conferencia, lo cual contrasta con la segunda llevada a cabo en el M.I.T en 1973, donde muchos países habían ya iniciado producciones a gran escala.

Desde los años 1980, y dada la competencia de otras fuentes de proteína como la soya, la producción de SCP no se ubica entre las más rentables. Actualmente solo Rusia, debido a la remarcada escasez de carne y otras fuentes de proteína, es una productora importante de proteína unicelular (Keil 1995).

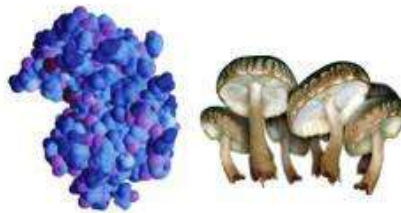


FIG. 1. Hongos utilizados para la producción de SCP.

5. IMPORTANCIA DE LA PROTEÍNA UNICELULAR

El crecimiento de la población, especialmente en las naciones en vías de desarrollo es abrumador esperándose en la primera década del siglo XXI que la población mundial alcance entre cinco y seis billones de personas (Goel, 1994; Chicas 1999; Hernández et al. 2003). La agricultura y ganadería convencional probablemente no sean capaces de suplir la demanda proteica de esta emergente población (Goel, 1994), proyectándose que el planeta necesitará producir entre los

años 1980-2015 una cantidad de productos agrícolas igual a los generados a través de la historia antes de esa fecha.

El problema no involucra solo a los seres humanos; sino en especial a sus animales. El alimento animal puede presentar una marcada escasez futura dado que se necesitará más ganado para suplir la abrumadora demanda. Además, la adecuada alimentación animal es ítem de elevado costo, algo muy determinante en la producción (Suharto y Redyowati 1999). Solucionar el problema de la alimentación humana implica en primer lugar solucionar mucho el problema de las fuentes de proteína para alimentación animal. Se está pues ante una demanda en constante incremento de fuentes proteínicas de alto valor nutritivo (De Mulder et al. 1989), la cual empieza a ser insuficiente (Crueger y Crueger 1989).

La biomasa puede ofrecer una gran alternativa para reemplazar algunas de las fuentes tradicionales de proteína (soya, harina de pescado, suero descremado de leche) en piensos para el consumo animal (Suharto y Redyowati 1999); e incluso en porciones para humanos después de ser tratada adecuadamente. Por ello el desarrollo e implementación de técnicas de producción industrial de SCP ayudarían a solventar el problema de la cada vez más limitada disponibilidad e ingesta de proteína (Phetteplace *et al.* 2003).

Las características geográficas de México lo hacen climáticamente una región particularmente favorable para el desarrollo de un sinnúmero de productos naturales. Un caso que ha tomado un gran interés es el desarrollo en regiones áridas y semiáridas que representan un conjunto importante y un sector rezagado de la población (SIAP, 2002). Desde casi una década se han buscado alternativas, y una de ellas es la explotación agrícola de especies xerófitas, de creciente demanda en el mercado internacional como son el caso de la sábila (*Aloe vera*) y tuna (*Opuntia sp.*).

La gran demanda de proteína para consumo humano y animal, ha forzado a recurrir a fuentes no convencionales mediante el desarrollo de nuevas tecnologías.

La proteína unicelular es la fuente de proteína no convencional más importante para distintos sectores como por ejemplo el pecuario, ganadero, etc.

6. USOS DE LA BIOMASA Y LA PROTEÍNA UNICELULAR

A partir de la biomasa microbiana pueden desarrollarse muchos productos derivados dada su riqueza composicional: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, etc. (Rojas 1995).

El uso de la proteína unicelular en piensos es el más inmediato y menos tecnificado de todos. Generalmente implica un secado de la biomasa previamente a la ingesta. En el caso del consumo por parte de humanos el proceso es más elaborado no sólo la remoción de riesgos nutricionales como los ácidos nucleicos, sino también el garantizar la calidad y seguridad del producto.

Productos más elaborados que la biomasa cruda pueden obtenerse industrialmente como detalla en la Tabla 1, y ser utilizados como proteína suplemental en alimento humano y animal, ingrediente funcional en alimentos, o sustrato para procesos químicos o biotecnológicos (Durán 1989).

Tabla 1. Derivados posibles a partir del aprovechamiento industrial de los componentes de la biomasa bacteriana.

COMPONENTE	PROCESO	DERIVADOS	USOS
Proteína	Digestión, purificación Y degradación	1. Enzimas	1. Biotransformación
		2. Proteína nutricional	2. Alimentos
		3. Proteína Funcional	3. Geles, espesantes, Emulsificantes.
Carbohidratos	Químicos y enzimáticos	1. Sacáridos	1. Substratos de fermentación
		2. Conversiones	2. Emulsiones

Lípidos	Extracciones	1. Glicéridos	1. Alimentos, cosméticos
	Hidrólisis	2. Grasas	2. Alimentos, química.
		3. Fosfolípidos	3. Alimentos
		4. Carotenoides	4. Alimentos
Ácidos nucleicos	Químicos y enzimáticos	1. Nucleótidos	1. Saborizantes, gelificantes
		2. ADN	2. Precursores síntesis de
		3. ARN	drogas.

Fuentes: Crueger y Crueger 1989, Rojas 1995.

Muchos de los procesos que generan los productos antes citados no se encuentran ampliamente difundidos, a la espera quizás de condiciones económicas más competitivas.

La proteína unicelular encuentra además aplicaciones aún experimentales en el campo de la salud. Recientes investigaciones evalúan el papel de la SCP como un nutriente de control inmunitario en pacientes quirúrgicos con hipoproteïnemia, hiperglucemia, anemia, hipercolesterolemia, entre otros (EDV 2003).

6.1. Las aplicaciones de la proteína unicelular en la salud

La proteína unicelular puede dar una gran alternativa para reemplazar o reforzar algunas de las fuentes de proteínas como harina de pescado, soya, suero descremado de leche, etc., e incluso en animales y humanos si se les da el correcto refinamiento. Por esto la importancia de la implementación y el desarrollo de técnicas de producción industrial de proteína unicelular nos ayudarían a amortiguar el problema de la ingesta y la limitada disponibilidad de proteínas. La SCP puede utilizarse para desarrollar muchos productos derivados como lípidos, proteínas ácidos nucleicos, carbohidratos, vitaminas, etc. El uso de la proteína unicelular es el menos tecnificado y el más inmediato de todos. Por lo general implica un secado previamente de la biomasa antes de la ingesta o consumo. Para los humanos es diferente debido a que el proceso es mucho más elaborado,

implicando no solo eliminación de riesgos nutricionales como los ácidos nucleicos, también el garantizar la seguridad y calidad del producto.

La proteína unicelular encuentra, por otro lado, aplicaciones que todavía son experimentales en el campo de la salud. Recientes investigaciones están evaluando el efecto de la SCP como un nutriente de control inmunitario en pacientes con hipoproteïnemia, anemia, hipercolesterolemia, etc. La proteína unicelular que proviene de células microbianas, se emplea como alimento ó suplemento alimentario.

Finalmente debemos mencionar la importancia de informarnos acerca de este tema, ya que la nutrición es muy importante para mantener nuestro organismo equilibrado, especialmente para poder cuidar nuestra salud.

7. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL USO DE PROTEÍNA UNICELULAR EN PROCESOS PRODUCTIVOS

Entre las ventajas que ofrece la proteína unicelular pueden mencionarse:

- a) Requerimientos de crecimiento fáciles de implementar (University of Indiana 2003) y que originan rápidas tasas de crecimiento y alta productividad (Goel 1994, Keil 1995): el tiempo de duplicación puede ser de 0,3 a 2 h en bacteria, 1-3 h en levaduras, 2-6 h en algas y 4-12 horas para hongos filamentosos celulolíticos (FAO 2003). Es posible producir y seleccionar fácilmente cepas con alta productividad y buena composición (Biocity 2003).
- b) Las bacterias presentan una eficiencia de alimentación (gramos de proteína producida por kilogramo de alimento consumido) un millón de veces más alta que aquella de cerdos o reses (Keil 1995). Para obtener 1 kg de células de levadura se emplean alrededor de 2 kg de glucosa contra los 18 kg de cereales necesarios para obtener un kg de carne de res.

- c) La SCP puede hacerse crecer en substratos baratos, muchos incluso objeto de desecho agroindustrial (Keil 1995), para lo cual se pueden emplear muy variadas metodologías. Prácticamente cualquier substrato que sea fuente de carbono orgánico puede ser utilizado (Goel 1994, Israelidis 2003, FAO 2003).
- d) Los microorganismos son más fáciles de manipular genéticamente que los animales y plantas superiores, lo cual hace más susceptibles al mejoramiento y transferencia genética (Goel 1994, Israelidis 2003, FAO 2003).
- e) Independencia de la producción de factores estacionales o climáticos, dado el sistema de producción continuo y poco contaminante (Israelidis 2003) en fermentadores y quimostatos (Goel 1994, Israelidis 2003, Biocity 2003).
- f) Las instalaciones de producción suelen tener áreas reducidas y son muy eficientes (Goel 1994, Biocity 2003, FAO 2003).
- g) Elevado contenido vitamínico (University of Indiana 2003), y especialmente proteico de apreciable valor nutricional (Goel 1994): entre 44 % a 88% proteína en peso seco (Anónimo 2003, FAO 2003) y hasta un 15% de ácidos nucleicos, también en base seca (Biocity 2003).
- h) Estudios demuestran que la eficiencia en la producción de leche aumentó significativamente cuando la dieta de animales como las cabras fue suplementada con SCP (Berquist & Jurgenson 2003).

No obstante la gran cantidad de ventajas que presenta la SCP, hay desventajas inherentes a las mismas:

- a. Culturalmente en occidente, muchas personas rechazan la idea de emplear microorganismos como fuente de alimento (Goel 1994).
- b. Muchas veces la SCP no presenta las características de color, textura, olor y sabor necesarias para garantizar una buena aceptación (Israelidis 2003). Las algas suelen ser las más problemáticas en color y sabor. El mejoramiento sensorial puede implicar procesos de transformación

posteriores de complejidad y costos tales que representan un verdadero desafío (Goel 1994).

- c. Presencia en la SCP de sustancias tóxicas o carcinogénicas que fuesen adsorbidas previamente en los sustratos utilizados como fuente de carbono (Crueger y Crueger 1989), importante para asegurar la seguridad y hasta la pureza del medio de cultivo (University of Indiana 2003).
- d. El alto contenido de ácidos nucleicos (4-6 % en algas; 10-16% en bacteria; 6-10% en levadura y 2,5-6% en hongos), podría eventualmente representar un riesgo para la salud de algunos monogástricos (Crueger y Crueger 1989, Israelidis 2003, FAO 2003, Berquist & Jurgenson 2003).
- e. El alto contenido de ácidos nucleicos (4-6% en algas; 10-16% en bacteria; 6-10% en levadura y 2,5-6% en hongos), puede ser un riesgo para la salud de los animales monogástricos y para el hombre (Crueger y Crueger 1989, Israelidis 2003, FAO 2003, Berquist & Jurgenson 2003).
- f. La digestión lenta ó nula de la pared celular en el tracto digestivo del ser humano y otros animales, especialmente en cuanto a las algas (Israelidis 2003), puede ser causa de indigestión y reacciones alérgicas (Crueger y Crueger 1989, University of Indiana 2003).
- g. A pesar de la alta productividad, en un proceso de producción de SCP efectuado en un medio de fermentación líquido, la proteína se obtiene en concentraciones muy diluidas (menos del 5% de sólidos), por lo que se requiere de procesos de concentración (Berquist & Jurgenson 2003).

8. PRINCIPALES MICROORGANISMOS EMPLEADOS COMO FUENTE DE PROTEÍNA UNICELULAR (SCP)

Los primeros microorganismos empleados como fuente de proteína fueron las levaduras, especialmente *Saccharomyces cerevisiae*, que aún hoy en día es la principal fuente de SCP con una producción de 200.000 toneladas anuales en peso seco (Biocity 2003, Chicas 2003, Biocity 2003). Son también de uso amplio

Spirulina máxima (Pedraza 2003), *Aspergillus niger* (Arias 2001), *Kluyveromyces fragilis* (Hernández *et al.* 1979) y *Candida utilis* (Phettplace *et al.* 2003).

La utilización de determinado microorganismo depende del sustrato, el proceso y la misma calidad deseada de la biomasa (Rojas 1995). La bioseguridad, la disponibilidad técnica y la estabilidad biológica son aspectos a tener en cuenta para la selección de determinada cepa como fuente de SCP.

Es importante sopesar otros aspectos para la selección del microorganismo adecuado (Rojas 1995), tales como su estabilidad genética, la capacidad de crecer en un proceso continuo, la especificidad al sustrato que se le ofrece, su demanda de nutrientes, la facilidad con la cual la biomasa obtenida puede separarse del medio de cultivo, y la calidad final deseada en el producto. En la Tabla 2 se enlistan muchos de los organismos de interés en la obtención de biomasa.

Tabla 2. Microorganismos más importantes en la producción de proteína unicelular.

SUSTRATO	GÉNEROS
Co ₂	<i>Spirulina, Scenedesmus, Chlorella.</i>
Celulósicos	<i>Actynomucor, Aspergillus, Bacilos, Brevibacterium, Cellulosomas, Chaetomium, Dactylomyces, Gliociadium, Myrothecium, Penicillum, Pleurotus, Phanerochaete, Polyporus, Pseudomonas, Rhizoctonia, Ruminococcu, Sporotrichum, Thermococcus, Trichoderma, Endomycopsis.</i>
Azúcares	<i>Aureobasidium, Candida, Fusarium, Geotrichum, Pachysolen, Paecilomyces, Pichia, Rhodotorula, Torula, Torulopsis, Saccharomyces, Kluyveromyces fragilis, Scytadilium, Endomycopsis.</i>

A continuación se muestran algunos ejemplos del uso que se les da a cada microorganismo que se mencionaron en el cuadro anterior:

8.1. CO₂

8.1.1 Microalgas

Las microalgas constituyen un grupo de microorganismos fotosintéticos caracterizados por una gran diversidad metabólica y capaz de producir diferentes compuestos de importancia nutricional, farmacéutica e industrial, bajo adecuadas condiciones de cultivo. Las microalgas son microorganismos de importancia ecológica que producen sustancias de gran valor económico como pigmentos y proteínas. La producción de biomasa puede variar en función de la fuente carbonada utilizada en cultivos mixotróficos.

8.1.1.1 *Chlorella sp.*

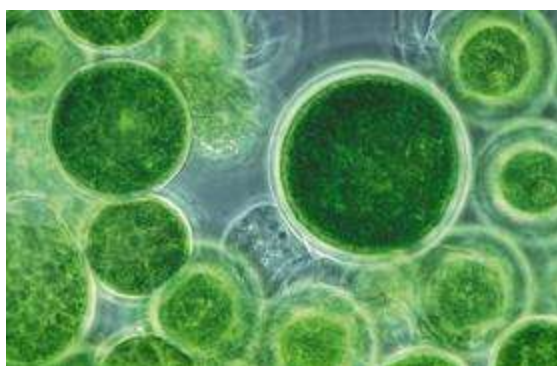


FIG. 2. *Chlorella sp.*, Microscopía de barrida al 20X

Chlorella (nombre común: ***Chlorella sp.***) es un género de algas verdes unicelulares del filo *Chlorophyta*. Tiene forma esférica, midiendo de 2 a 10 µm de

diámetro, y no posee flagelo. La *Chlorella* contiene los pigmentos verdes fotosintetizadores clorofila-a y -b en su cloroplasto. A través de la fotosíntesis se multiplica rápidamente, requiriendo sólo dióxido de carbono, agua, luz solar y pequeñas cantidades de minerales. El nombre *Chlorella* proviene del griego *chloros*: verde; y del sufijo diminutivo latino *-ella*: "pequeño". El bioquímico alemán Otto Heinrich Warburg recibió el Premio Nobel en Fisiología, de Medicina en 1931 por su estudio de la fotosíntesis en la *Chlorella*.

8.1.1.2. *Scenedesmus*.



FIG. 3. *Scenedes musal* al microscopio con la técnica de contraste de interferencia

El género *Scenedesmus* está constituido por algas verdes que se alinean en filas cortas de 4, 8 ó 16 células, a veces formando una hilera como ésta, otras veces alternando construyendo un diminuto zigzag. Se trata de un grupo representado por más de cien especies, todas ellas bastante comunes en el plancton de las aguas dulces. Muchas de ellas son extremadamente variables por lo que su identificación suele ser, más que complicada, imposible.

Las células centrales de las colonias de *Scenedesmus* suelen ser de lados rectos mientras que, con frecuencia, las situadas en los extremos, se curvan ligeramente para adoptar una forma de media luna, que muchas veces remata en dos apéndices largos como una espina.

Scenedesmus resiste muy bien la contaminación y por este motivo se emplea en algunas plantas depuradoras, si se desarrolla masivamente puede proporcionar el

oxígeno que necesitan las bacterias descomponedoras que viven en el agua y así acelerar el proceso de depuración.

8.1.2. Cianobacterias:

Las Cianobacterias fueron de los primeros organismos fotosintéticos en poblar la Tierra hace millones de años. Estos organismos fotosintéticos fijaban el CO₂ presente en la atmósfera y producían O₂.

Las Cianobacterias no son algas propiamente dichas, sino organismos procariontas más cercanos a las bacterias que el reino vegetal.

8.1.2.1. *Spirulina* sp.

La más conocida de las cianobacterias es la *Spirulina*. En concreto el nombre “*Spirulina*” proviene de la configuración de este organismo, en forma de hélice como se muestra en la figura 2.

La *Spirulina* es una microalga con un alto contenido en proteínas y cuyos efectos beneficiosos sobre la salud están científicamente demostrados.

El consumo de *Spirulina* se encuentra ligado a lugares distantes como el lago Chad en África y el lago Texcoco en México. Se trata de una microalga con un contenido en proteínas muy elevado, y que posee unos efectos muy beneficiosos para la salud en la figura 3 se observa un ejemplo de la *Spirulina* en capsulas.

La *Spirulina* es una cianobacteria o alga verdeazul, llamadas así por el color característico que poseen.



FIG. 4. *Spirulina* al microscopio



FIG. 5. *Spirulina en capsulas*

Se ha demostrado que el consumo de Spirulina tiene un efecto beneficioso en la salud. Entre otras cosas, se usa como complemento dietético en personas desnutridas. Además actúa sobre el Interferón, que es el encargado de regular el sistema inmunológico, estimula el funcionamiento del Tiroides, acelera la cicatrización de las heridas, y se han obtenido buenos resultados en el tratamiento de la artritis, obesidad, enfermedades del corazón, eczemas, alcoholismo, depresión y esquizofrenia. También ayuda a regular los niveles de colesterol y se sabe que es eficaz en la prevención del cáncer, por su contenido en β -caroteno.

Por otro lado, el estudio con animales ha demostrado que incluir pequeñas cantidades de Spirulina en el pienso mejora la fertilidad, aumenta la supervivencia de las crías y fortalece la piel, el pelo y las uñas.

8.2. Hongos filamentosos

8.2.1. *Pleurotus*

Las especies del género *Pleurotus* presentan una serie de propiedades organolépticas y nutritivas, así como una reconocida capacidad biodegradativa. Es un hongo descomponedor primario de madera y residuos vegetales; se puede encontrar ampliamente distribuido en la naturaleza en los bosques tropicales y subtropicales, e igualmente puede ser cultivado artificialmente. Este hongo es apreciado por su delicioso sabor, adicionalmente tiene alto contenido de proteínas, carbohidratos, minerales (calcio, fósforo y hierro), vitaminas (tiamina, riboflavina y niacina) y bajo contenido en grasa (Yildiz

et al., 1998). Tienen capacidad de secretar diversas oxidasas y fenoloxidasas, lo que le permite crecer en sustratos que contienen lignina y compuestos fenólicos.

8.2.2. *Phanerochaete chrysosporium* o *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma reesei*

Los hongos de la pudrición blanca como *Phanerochaete chrysosporium* o *Pleurotus ostreatus*, pertenecientes a los basidiomicetes son los más eficientes degradadores de lignina (Gold y Alic, 1993). La ruptura de lignina se produce a través del uso de una familia de enzimas extracelulares llamadas colectivamente “ligninasas”. Dos familias de enzimas ligninolíticas juegan un rol clave en la degradación enzimática: fenol oxidasa (lacasa) y peroxidasa (Lignina peroxidasa) (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP) (Krause, 2003; Malherbe y Cloete, 2003). Estos hongos también producen enzimas extracelulares capaces de hidrolizar la celulosa. El complejo celulolítico incluye tres tipos de enzimas: la endo- α -1,4-glucanasa, la exo- β -1,4-glucanasa y la α -1,4-glucosidasa. El hongo más estudiado a nivel piloto es *Trichoderma reesei*. Las celulasas y las hemicelulasas tienen numerosas aplicaciones y potencial biotecnológico para la industria química, de combustibles, de alimentos, de bebidas, textil, pulpa y papel (Bhat, 2000; Sun y Cheng, 2002).

Se utiliza vinaza para la Producción de proteína unicelular, mediante *Phanerochaete chrysosporium*. Produce una proteína rica en lisina y pobre en metionina.

8.3. Levaduras

8.3.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Representa una de las levaduras de primera elección para la producción industrial de biomasa y etanol, y que careciendo de actividad β -galactosidasa, amilasa y glucoamilasa, las levaduras en gemación son incapaces para fermentar el almidón (Compagno, 1995).



FIG. 6. Vista macroscópica de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPG.

El nombre de *Saccharomyces cerevisiae* significa azúcar de hongos. Producen una fermentación vigorosa y es conocida como la levadura de la cerveza, sirve como fuente de enzimas (invertasa), como extracto de levadura autolisado para sustituir los sabores naturales del extracto de carne, hace fermentar masa de pan, interviene en la fabricación del vino y como fuente de proteína, vacunas, ácidos grasos y aceites. En la figura 5 se puede observar una vista microscópica de *Saccharomyces cerevisiae*.



FIG. 7. Vista microscópica de *Saccharomyces cerevisiae*.

Requerimientos nutricionales: *Saccharomyces cerevisiae* requiere ciertos nutrientes y condiciones ambientales para su apropiado crecimiento y reproducción. Algunos elementos son básicamente necesarios como por ejemplo carbono, hidrogeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo.

Requerimientos fisicoquímicos. El crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* ve favorecido por un pH aproximado de 4.0 a 5.0 y no se desarrollan bien en medio alcalino a menos que se hayan adaptado al mismo.

Composición Química. Las levaduras contienen un 75% de agua y un 25 % de materia seca aproximadamente.

8.3.2. *Saccharomyces exiguus*

En esta investigación que realizó el Instituto de investigación Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo se cultivo levadura en ácido acético (AA), sales minerales y extracto de malta, su crecimiento se escaló en un reactor de 14L. Los resultados indican que el AA es una excelente fuente de carbono para la producción de biomasa microbiana de *S. exiguus* como fuente de proteína si se usa extracto de malta como factor de crecimiento. *S. exiguus* posee excelentes características fisiológicas para desarrollarse en AA, la que incluye su tolerancia al pH ácido, y que además responde rápidamente a la adición de tiamina, niacina, botina y ácido pantoténico de las melazas lo cual incrementó al rendimiento de su SCP así como el tiempo de duplicación, la velocidad de crecimiento.

El principal problema para la producción de SCP a partir de AA fue el pH, la levadura mostró tendencia a elevarlo a un valor tan alto que causó un evidente olor a amonio, lo que facilitó su contaminación por bacterias. La espuma no controlada también ocasionó pérdidas, así que se recomienda evitarla con un buen antiespumante. Estos resultados sugieren un estudio bioquímico de los productos de fermentación y de la fisiología de la levadura cuando crece en AA para reducir el problema de la alcalización del pH.

Por lo anterior, se concluye que a ninguna concentración de AA, a nivel de matraz se inhibió el crecimiento de *S. exiguus*. El extracto de malta fue esencial para la producción de biomasa pues al suprimirse, el rendimiento disminuyó notablemente, lo que indica que es incapaz de sintetizar vitaminas del complejo B.

Durante la cinética de fermentación el pH se elevó lo que provoca la contaminación del medio del cultivo, por ello se recomienda observar máximas medidas de asepsia al trabajar con esta levadura y fuente de carbono.

8.3.3. *Candida utilis*

En la producción de proteína unicelular a partir de *Candida utilis*. Es necesaria la adición de sustancias nitrogenadas y carbonadas al medio de cultivo que puedan ser asimiladas y transformadas en nutrientes esenciales para el crecimiento (Estévez, 1998). Por otro lado hay que considerar que la cantidad de fuente carbonada presente en el medio fermentativo, es un factor influyente en el rendimiento de proteína unicelular (biomasa) de *C. utilis*.

La disponibilidad de oxígeno en el medio limita el crecimiento ya que al no estar en cantidades suficientes puede actuar como sustrato limitante (Dorán, 1995), y tratándose de un proceso aeróbico el problema de la transferencia de oxígeno es muy importante.

Uno de los principales ejemplos en la utilización de *Candida utilis* es cuando se utilizan desechos agroindustriales de sábila y tuna para la producción de proteína unicelular, como única fuente de carbono para la elaboración de piensos alimenticios como en el Centro de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional se estudió el empleo de la proteína unicelular a partir de *Candida utilis* producida en escala piloto para la dieta en aves. Se realizaron dos experimentos usando melaza de caña de azúcar, en ambos experimentos, realizados en el Campo Experimental “Valle de México” en Chapingo, Edo. De México.

Candida utilis es una levadura importante en la industria alimentaria y ampliamente estudiada desde que se concibió el uso de biomasa microbiana para la alimentación. Tiene la gran característica de degradar diferentes sustratos orgánicos, en particular ha llamado la atención el que utilice compuestos celulósicos como única fuente de carbono. Otra de sus propiedades es la

producción extracelular de enzimas importantes para la industria, así como el alto contenido de grasas, proteínas y vitaminas, en especial el complejo B.

8.3.4. *Fusarium*

El Quorn está hecho de micoproteína, que es definido por la Administración de Drogas y Alimentos estadounidense como una masa celular procesada que se obtiene del hongo filamentoso *Fusarium venenatum*, variedad PTA-2684.

La micoproteína fue descubierta en Marlow, Inglaterra, en el año de 1960, donde es producido industrialmente mediante un proceso de fermentación.

Se ha creado por un proceso continuo de fermentación del hongo *Fusarium gramineurum*. (NOTA: no es que sea una incoherencia en los datos, este hongo se ha clasificado primeramente como *gramineurum* y posteriormente como *venenatum*, sigue siendo la misma especie). Este hongo crece en una gran torre de fermentación a la que se le añaden continuamente oxígeno, nitrógeno, glucosa, minerales y vitaminas. Tras su cosecha, y antes de filtrarse y colarse, el hongo se calienta para reducir el nivel de ARN hasta los niveles recomendados por la Organización Mundial de la Salud. La lámina resultante de micelios fúngicos se mezcla con albúmina de huevo que actúa como sustancia aglutinante. En algunos casos también se añade sabores y colorantes. Después de esto, la textura de la micoproteína se manipula para que se asemeje a la de la carne antes de ser cortada en rodajas o dados. La micoproteína es una buena fuente de proteína, fibra, biotina, hierro y zinc, y contiene muy poca grasa saturada.

El 'creador' de la micoproteína fue Rank Hovis McDougall y se insertó en el mercado bajo el nombre de Quorn de la compañía Marlow Foods (siendo su dueño Astra Zeneca). Existe una gran variedad de comidas precocinadas Quorn tales como currys, tartas de frutas, potajes, etc. Y también puede comprarse en bloques congelados, que pueden luego ser asados, salteados, horneados o guisados.

Fue a principios del año 2000 que la gama deli y de ingredientes de Quorn fueron aprobadas por la 'Vegetarian Society' ya que la albúmina que se utilizaba como sustancia aglutinante se cambió de huevos convencionales a huevos de gallinas criadas en libertad. Sin embargo, en la actualidad las gamas de comidas precocinadas, hamburguesas, salchichas, etc. todavía usan huevos no orgánicos (de gallinas en cautiverio).

9. SUBSTRATOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR (SCP)

9.1. Hidrocarburos y Combustibles

9.1.1. Petroquímicos (n- alcanos)

En un principio los substratos principales fueron de naturaleza fósil, es decir hidrocarburos siendo este campo el de mayores inversiones en investigación y desarrollo (Biocity 2003). El principal problema de los hidrocarburos como sustrato es su naturaleza no renovable, lo cual se suma un costo económico a veces mayor.

Muchos de los hidrocarburos que se destinan a la producción de SCP son alcanos de cadena carbonada de 12 a 20 átomos de carbono fácilmente utilizables como sustituto de carbohidratos como fuente nutricional de la biomasa (Biocity 2003). Productos derivados de la actividad petrolera son también metabolizables, empleándose incluso la parafina como sustrato (Butolo *et al.* 2003).

Los n-alcanos pueden obtenerse a partir del mismo petróleo crudo (Hernández 1979, Keil 1995) y constituyen la fracción de ceras del gasoil que debe ser removida pues aumenta la viscosidad y tiende a causar precipitaciones a baja temperatura.

La principal desventaja de los n-alcanos es su baja solubilidad lo cual dificulta el proceso de suspensión que muchas veces requiere de forzamiento mecánico. De hecho las especies seleccionadas para el crecimiento en estos medios probablemente tienen la capacidad de secretar sustancias emulsificantes que conviertan los n-alcanos insolubles en gotas de 0,01 – 0,5 mm de diámetro, de modo que las mismas puedan difundirse pasivamente a través de la membrana lipídica (Crueger y Crueger 1989).

La proteína unicelular derivada de los n-alcanos se denomina genéricamente “Tropina” (Keil 1995, Israelidis 2003), y se obtiene principalmente por crecimiento de *Candidor lipolytica*, *C. tropicalis*, *Candida oleophila* y *Saccharomycopsis lipolytica* (Crueger y Crueger 1989), así como de bacterias oxidativas. El medio suele ser enriquecido con NH₃ como fuente de nitrógeno y Mg como suplemento mineral.

La “Tropina” cuenta con una baja popularidad debido a los cuestionamientos generados en los años setenta por los japoneses, en cuanto a que hidrocarburos aromáticos pudiesen ser transportados por la SCP que crece en sustratos derivados del petróleo, y que por consiguiente existe un riesgo carcinógeno en la ingesta. Investigadores posteriores del gobierno Italiano parecen demostrar que el temor es infundado (Israelidis 2003). No obstante el estigma resultante de la controversia, en conjunción con los siempre inestables precios del petróleo, han hecho que los hidrocarburos caigan en un segundo plano como sustratos para la SCP.

9.1.2. Metano

Los estudios con metano para uso como sustratos para la SCP inician en los años 1970 en Inglaterra por iniciativa de la compañía Shell.

El metano es un sustrato barato y abundante, el cual de hecho existe en exceso en muchas partes del mundo, donde es fácil de conseguir con muy alto grado de pureza (Crueger y Crueger 1989). Quizás, su mayor ventaja es que no presenta los cuestionamientos de toxicidad que se argumentan en contra de los n-alcanos

(Israelidis 2003). Dada su estructura química (CH₄), el metano presenta la forma carbonílica más reducida, lo cual permite a las células microbianas obtener el mayor rendimiento por volumen de gas consumido.

El principal problema que presenta el metano es que este no se licúa con facilidad, por lo cual se pueden implicar muy altos costos por concepto de licuado y posterior transporte al lugar de proceso (Crueger y Crueger 1989).

Las bacterias que oxidan el metano son denominadas metilóforos obligados y solo metabolizan sustratos de un solo carbono. Entre ellas están *Methylomonas methanica*, *Methylococcus capsulatus*, *Methylovibrio soehngeni*, *Methanomonas margaritae* así como los géneros *Acinetobacter* y *Flavobacterium*.

Puesto que el metanol es de manejo más simple y de más fácil transporte, y el metano puede ser transformado en metanol, se prefiere utilizar este último como sustrato para los sistemas que utilizan materiales de un solo carbono.

9.1.3. Metanol

El metanol fue en determinado momento el sustrato más importante y barato para la producción de SCP (Crueger y Crueger 1989, Biocity 2003).

Entre las principales ventajas del metanol, está el hecho de que puede ser obtenido a partir de una amplia gama de fuentes como el gas natural, la gasolina, la hulla y hasta desechos agroindustriales.

En la fermentación del metanol se emplean más las bacterias como por ejemplo *Methylphilus methylotropha*, dado su más rápido crecimiento, su mayor contenido de proteína, su mayor rendimiento y requerimientos más sencillos de cultivo (Crueger y Crueger 1989). Generalmente estos requerimientos implican la suplementación con amonio del medio (Biocity 2003).

La proteína obtenida a partir del metanol se conoce genéricamente como "Pruteen" (Israelidis 2003).

Actualmente la producción de Pruteen no es económicamente rentable debido a las condiciones de mercadeo (Crueger y Crueger 1989, Israelidis 2003).

9.1.4. Etanol

En comparación con el metano y el metanol, el etanol cae en un tercer lugar dado su costo comparativamente más elevado como se observa en la tabla 3.

Tabla 3. Diferencias entre el costo de la producción de la proteína unicelular a partir de acetato en relación a otras fuentes de carbono.

COSTO	PARAFINAS	METANOL	ETANOL	MELAZAS	ACETATO
RENDIMIENTO Kg/L	1.2	0.4	0.8	0.5	0.4
PRODUCTIVIDAD (Kg/m ³ /h)	3.0	2.0	4.5	5.2	4.5
REQUERIMIENTO DE O ₂	1.48	2.37	1.23	0.64	1.28
PRODUCCIÓN DE CALOR (Kcal/Kg DE CÉLULAS)	4.800	8.800	4.200	2.800	4.000
TEMPERATURA (°C)	33.0	40.0	35.0	35.0	33.0
PUREZA DEL SUSTRATO (%)	98.0	99.0	95.0	55.0	99.99
COSTO DEL SUSTRATO	25.0	8.7	16.1	5.9	8.7

FUENTE: Crueger y Crueger 1989, Israelidis 2003

Generalmente el proceso fermentativo se hace por medio de levaduras grado alimenticio ó "torula". La SCP obtenida por este medio se denomina pues

genéricamente como “Torutein” (Israelidis 2003) y suele caracterizarse por su bajo contenido de metionina. La Torutein suele presentar valores de PER cercanos a 1,7. El PER (Protein Efficiency Ratio) es una forma de medir la calidad de una proteína y corresponde al peso que gana una rata en crecimiento dividido entre la ingesta de proteína necesaria para generar ese aumento de peso en el período de estudio (SOLAE 2003, Whey Protein Institute 2003). A medida que el valor del PER se incrementa, así aumenta también la calidad dietaria de la proteína (Whey Protein Institute 2003). El valor biológico es otra unidad alternativa de medición para la calidad de proteína que corresponde a la fracción del nitrógeno en la dieta que permanece en el organismo después de la digestión, a diferencia del nitrógeno que se pierde en las heces (Whey Protein Institute 2003).

9.2. Desechos Industriales

Una de las más prometedoras vías para incrementar la disponibilidad de proteínas en el mundo es la producción de proteínas microbianas o unicelulares mediante fermentación de residuos industriales y agrícolas (Scragg, 1996).

El sector agroindustrial es un renglón muy importante en la economía, así como las agroindustrias como la forestal, industrialización hortofrutícola, y transformadoras de cereales están en crecimiento, lo que ha provocado incrementos de sus subproductos agrícolas y agroindustriales, materiales como las cáscaras de frutas, residuos forestales y de cereales saturan los rellenos sanitarios sin darle soluciones definitivas que generen empleo en las comunidades y disminuyan el impacto ambiental.

La mayoría de residuos agroindustriales tienen un gran potencial ya que pueden servir como fuente de nutrientes para los procesos de la biotecnología industrial, en la producción de una amplia gama de productos principalmente la producción de proteína unicelular. Finalmente, la utilización de diversos residuos agroindustriales es una propuesta lo suficientemente importante para obtener productos de importancia industrial, generando con ello valor agregado y

permitiendo el desarrollo social de las comunidades comprometidas con el uso racional de materias primas y los residuos (Morris, 2006; Vandamme, 2009).

La producción de SCP alcanza sus niveles más rentables en este apartado (Keil 1995), puesto que los desechos industriales son las materias primas más baratas y diversas, especialmente si los mismos donde son producidos, con lo cual se elimina en gran parte el costo de transporte.

La lista de posibles residuos involucra técnicamente cualquier fuente de carbono, y los autores enumeran las más diversas é imaginativas fuentes de las que se mencionan las más representativas tales como:

- a) Aguas residuales de las industrias de la celulosa, del café, almidón, procesamiento de alimentos y del papel (aguas sulfíticas) empleando *Candida utilis*, *C. tropicalis*, *Chaetomium cellulolyticum* y *Paecilomyces varioti*(Crueger y Crueger 1989). Sin embargo la que mayormente se utiliza en la producción de proteína unicelular es *C. utilis* conocida como “torula” y cuya composición química es aproximadamente 9.0% de nitrógeno, 55% de proteína, 7% de grasas, 5% de fibra y 8% de cenizas, además contiene elevada cantidad de lisina y vitaminas de complejo B (Marchand, 1997; Farmland Industries, 1999). El etanol es un sustrato relativamente costoso, por ello en los últimos años se han dado diversas propuestas para obtener por acción de *C. utilis* productos derivados del mismo, tales como los denominados bioaromas, lo cual hace más rentable el proceso. Los bioaromas son una importante alternativa tecnológica en la bioconversión del etanol, para darle un mayor valor agregado en acetato de etilo por *C. utilis* (Domenech *et al.*, 1995). La bioconversión del etanol a acetato de etilo por *C. utilis* es una importante alternativa biotecnológica para darle mayor valor agregado al proceso. Estudios realizados muestran una producción de 0.80 g de acetato de etilo/L usando etanol rectificado como sustrato a una concentración de 32 g/L (Domenech *et al.*, 2002), también presentan una producción de 0.44g de acetato de etilo a partir de una concentración de

22.43g de etanol rectificado por litro (Vejarano, 2005). Así, *C. utilis* es la vía más prometedora en la producción de acetato de etilo (Lee, 2000), en donde se debe poner especial énfasis en los efectos que tiene la concentración del sustrato etanol rectificado sobre los rendimientos finales. Este factor es un punto crítico a tener en cuenta al inicio del proceso (Domenech *et al.*, 1995).

- b) Gases de desecho industrial (Gaddy 2002).
- c) Melasas derivadas de la industria azucarera empleando *Saccharomyces cerevisiae* o *Fusarium graminearum* (Qiao 2003, Israelidis 2003, Biocity 2003, Suharto 2003), siendo la proteína de este último muy exitosa y denominada genéricamente micoproteína. (Crueger y Crueger 1989, Israelidis 2003).
- d) Residuos de la industria vinícola o vinazas con *Chaetomium cellulolyticum* (Rojas 1995).
- e) Desechos de la industria láctea con *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis* (Hernández *et al.* 1979, Okos y Dale 1994).
- f) Residuos de cáscaras de cítricos con *Fusarium culmorum*, *Geotrichum candidum* y *Trichoderma viride* (Durán 1989, de Gregorio *et al.* 2002). Bagazo de naranja utilizando *Aspergillus niger* (Arias 2003, Bustamante *et al.* 2003).
- g) Hidrolizados de cuernos y pezuñas sobrantes de la industria cárnica con *Bacillus subtilis* (Kurbanoglu y Algur 2002).
- h) Bagazo de banano y caña empleando *Saccharomyces cerevisiae* (Chicas *et al.* 1999), *Aspergillus foetidus* (Bergquist y Jurgenson 2003): La cáscara de banana ha dado excelentes resultados cuando se emplea como sustrato para la producción de SCP.
- i) Excretas animales de granja con *Spirulina máxima* (Pedraza 2003).
- j) Algarrobo y uva pasa, tuza de maíz, gabazo de coco, aserrín de roble, cáscaras de plátano.

k) Existe una considerable documentación acerca del empleo del petróleo o alguna de sus fracciones de hidrocarburos como sustrato en la fermentación de microorganismos y, de hecho, han funcionado varias plantas comerciales en el mundo que producían miles de toneladas por año de proteínas unicelulares utilizadas en alimentación. Pero hace unos años esas instalaciones cayeron en desuso por varias razones: unas a consecuencia del alto precio alcanzado por el petróleo y otras debidas a que no todos los hidrocarburos contenidos en el mismo son metabolizados por los microorganismos con igual facilidad. Como es lógico suponer cada residuo requiere de un tratamiento de pasteurización, y de unas condiciones de incubación posteriores favorables al microorganismo específico que en ellos se hace prosperar.

Procedimiento para la utilización de plásticos de desecho como fuente nutritiva carbonada de microorganismos de interés biotecnológico industrial que incluye las siguientes etapas:

- Eliminación manual de impurezas del plástico de desecho.
- Trituración del plástico de desecho.
- Eliminación de humedad y de minerales finos del plástico de desecho
- Fusión del plástico de desecho a una temperatura comprendida entre 250°C y 350°C
- Pirólisis del plástico fundido a una temperatura comprendida entre 400 y 550°C, utilizando metal fundido, en particular plomo líquido, a una temperatura comprendida entre 500 y 600°C como fluido de transferencia de calor
- Condensación en dos etapas de los vapores procedentes de la etapa anterior caracterizada porque el aceite condensado se utiliza para el cultivo de microorganismos, en particular bacterias, hongos y levaduras capaces de metabolizar hidrocarburos.

9.3. Substratos de origen vegetal no considerados como desechos

Los substratos de origen vegetal como la madera y carbohidratos han estado muy en boga desde 1970 en la producción de SCP.

Estos materiales vegetales, fuente de celulosa, lignocelulosa y de lignina, se tratan preliminarmente hidrolizando en medio ácido (H_2SO_4) o por medios enzimáticos (Crueger y Crueger 1989). Esta última hidrólisis se logra con un complejo de celulasas extracelulares (endo- β -1,4-glucanasa y β -1,4-glucosidasa) que son excretadas por bacterias (Cellulomonas) o por hongos (*Trichoderma*, *Penicillium*, *Thermoascus*, *Sporotrichum*, *Humicola*). Otros autores (Israelidis 2003), reportan que la hidrólisis previa puede lograrse por métodos alcalinos y hasta por exposición a rayos X. La hidrólisis garantiza que todos los polisacáridos complejos existentes en la matriz pasen a formar azúcares simples fermentables más asimilables metabólicamente para los microorganismos. Los hidrolizados de madera se han ensayado con *Candida utilis*, mientras que los de paja con *Trichosporon sp.*, obteniendo rendimientos de 42% y 30%, respectivamente. Hidrolizados del grano de sorgo también ha sido objeto de estudio empleando *Candida crusei* y *Saccharomyces sp.*

Los rendimientos a partir de materiales con celulosa, lignocelulosa y lignina aun no son lo suficientemente buenos como para lograr procesos industriales de alta escala que sean rentables. Esto no tanto por el crecimiento de la SCP, si no por lo poco eficientes que pueden resultar los procesos previos de hidrólisis (Crueger y Crueger 1989).

El almidón de sagú en Malasia es abundante, barato y común como materia prima para la producción de SCP almidón de sagú se disuelve en NaOH. La mezcla se calienta hasta que se disuelva en agua desionizada con NaOH, luego se ajusta el pH a 7. Se añaden nutrientes suplementarios: KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 y de extracto de levadura; la autoclave es la medida, y se utiliza como fermentador para un alimento. Se preparan las semillas de cultivo con un día de anticipación para la inoculación de la fermentación. *Saccharomycopsis fibuligera* ATCC 9947 y ATCC

9266 se cultiva en un medio que comprende de KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , extracto de levadura y glucosa en agua destilada. El cultivo de siembra se cosecha después incubado a 32°C . El microorganismo se adquiere de la ATCC, y después de la hidratación se mantiene en el cultivo madre los valores medidos de YM (Difco, EE.UU.). El inóculo es el organismo transferido por las semillas del cultivo en los medios de inclinación preparados. El medio de cultivo utiliza para el crecimiento *Penicillium javanicum*.

10. ASPECTOS NUTRICIONALES DE LA PROTEÍNA UNICELULAR

10.1. Composición general y valor nutricional de la proteína unicelular

La proteína unicelular como ya se estudió, puede generarse a través del crecimiento de diferentes especies de hongos, algas, levaduras y bacterias. Caracterizar la composición particular de cada uno de estos microorganismos resultaría una tarea muy amplia. No obstante, dadas las similitudes es posible expresar en términos más generales la composición de estos microorganismos según su tipo (Tabla 4).

Puede denotarse que el principal valor de la biomasa microbiana es su aporte de proteína. Según la tabla 4, los contenidos de proteína alcanzan un máximo para las bacterias y un mínimo para hongos filamentosos, quedando las levaduras y algas en una posición intermedia. Esta proteína bacteriana es nutricionalmente similar a la proteína del pescado, mientras que la levadura mantiene similitudes con la de soya (Israelidis 2003).

Tabla 4. Composición porcentual promedio en base seca de los principales microorganismos empleados

COMPONENTE	HONGOS FILAMENTOSOS	ALGAS	LEVADURAS	BACTERIAS
Proteína	30-50%	40-63%	45-56%	50-83%
Grasa	2-8%	7-20%	2-6%	1,5-3%

Cenizas	9-14%	8-10%	5-9,5%	3-7%
Acidos nucleicos	7-10%	3-8%	6-12%	8-16%
Aminoácidos	-----	-----	54%	65%
Humedad	13,0	6%	4,5%	2,8%

Fuentes: Crueger & Crueger 1989, Israelidis 2003, EDV 2003.

En cuanto a minerales, la SCP destaca como fuente de fósforo, aunque suelen ser pobre en calcio, así como no es buena fuente tampoco de lípidos dietarios (FAO 2003).

Es posible establecer un perfil general y aproximado de aminoácidos para la proteína unicelular, el cual se denota en la tabla 5.

Tabla 5. Perfil de aminoácidos esenciales promedio en g/100g de proteína de los principales grupos de microorganismos empleados como SCP.

AMINOÁCIDO	HONGOS FILAMENTOSOS	ALGAS	LEVADURAS	BACTERIAS	FAO ¹
Lisina	3,9	4,6	7,7	7,6	4,20
Treonina	----	4,6	4,8	5,4	2,80
Metionina	1	1,4	1,7	2,0	2,20
Cisteína	-----	0,4	----	----	-----
Triptofano	1,25	1,4	1,0	----	-----
Isoleucina	3,2	6,0	4,6	5,3	4,20
Leucina	5,5	8,0	7,0	7,3	4,80
Valina	3,9	6,5	5,3	7,1	4,20
Fenilalanina	2,8	5,0	4,1	4,6	2,80
Histidina	-----	----	2,7	7,8	-----
Arginina	-----	----	2,4	6,4	-----

¹Recomendaciones de la FAO para aminoácidos esenciales.

Fuentes: Crueger & Crueger 1989, Durán 1989, Israelidis 2003, EDV 2003.

El perfil de aminoácidos esenciales es uno de los factores básicos a la hora de evaluar la calidad de un substrato proteico como alimento. Por lo general, los aminoácidos limitantes son la lisina, metionina y el triptófano. A partir de la Tabla 6, puede observarse que la proteína microbiana, anteriormente citada como la de mayor rendimiento, es deficiente en aminoácidos sulfurados como la cisteína y la metionina mientras que exhibe mejores niveles de lisina. Este problema hace necesaria la suplementación de aminoácidos esenciales, manteniéndose eso si las

bajas proporciones de aminoácidos sulfurados como factor limitante y alcanzándose de hecho niveles críticos en la metionina.

Las deficiencias en determinados aminoácidos esenciales no descalifican en lo más mínimo a la SCP. Alimentos tan comunes como la leche o las leguminosas son también deficitarios, así como varios cereales bajos en lisina. El secreto está en la suplementación y en la incorporación dentro de dietas balanceadas.

Tabla 6. Ahorros en piensos animales por sustitución parcial con SCP.

ANIMAL	CANTIDAD DE SPC (kg/tiempo)	CANTIDAD DE FUENTE DE PROTEÍNA REPLAZADA		% DE LA PROTEÍNA TOTAL CONTRIBUIDA POR SCP
		FUENTE	Kg/tiempo	
Ganado carne	100	Soya	182	36
Pollos	80	Soya	145	38
Pavos	50	Pescado	62	18
Cerdos	100	Soya	182	50
Terneritas (os)	50	Leche en polvo	114	17
Peces	250	Pescado	308	44

Fuente: Suharto y Redyowati 2003.

Dejando de lado los déficits y considerando los cuadros antes expuestos, las SCP pueden considerarse como un excelente suplemento de dietas para animales, donde se han obtenido excelentes resultados en rumiantes (Phetteplace *et al.* 2003, Berquist & Jurgenson 2003).

En la Tabla 6 muestra como la SCP puede ser utilizada en la sustitución de varias fuentes tradicionales de proteína para dietas animales.

La calidad nutricional de la SCP no sólo depende del perfil de aminoácidos. Aspectos tan importantes como la digestibilidad, el valor biológico, la utilización neta de proteína y el PER deben tomarse en cuenta (Israelidis 2003).

La digestibilidad es uno de los problemas que eventualmente puede presentar la SCP, especialmente con levaduras. Esto se da pues ciertas especies presentan paredes celulares indigestibles para el ser humano y hasta para ciertos animales, lo cual puede ser causa de alergias (Israelidis 2003, Butolo *et al.* 2003). No obstante esta limitante, la digestibilidad no deja en muchos casos de considerarse como buena.

La palatabilidad y la aceptabilidad son otro problema de interés, pues muchos de los resultados sensoriales obtenidos en los estudios no suelen ser muy halagüeños tanto en humanos como animales (Israelidis 2003).

En términos muy generales se ha estimado que la proteína unicelular cuenta con un PER que ronda valores 2,02 en comparación con el 2,5 para la caseína (Berquist & Jurgenson 2003) y una digestibilidad mayor o igual a 82% (EDV 2003). En la Tabla 7 se muestran los valores de digestibilidad y utilización neta de proteína unicelular.

La SCP se caracteriza por ser una fuente alimenticia de bajas calorías (388 c/100 g en promedio). No se han detectado pruebas contundentes que denoten problemas toxicológicos causados por la ingesta de SCP. Estudios efectuados con ratas alimentadas con dietas de 30% de SCP pura no reportan efectos sobre el crecimiento.

Tabla 7. Parámetros nutricionales de la SCP.

ASPECTO NUTRICIONAL	HONGOS FILAMENTOSOS	ALGAS	LEVADURAS	BACTERIAS
Valor biológico(BV)	70-75	54-72	32-88	70-78
Utilización Neta de Proteína (NTU)	-----	35-60	64-82	47-64
Digestibilidad (D)	-----	65-84	71-90	67-84

Fuente: Durán 1989.

Sobre la ingesta de otros alimentos, o sobre valores hemáticos (Anónimo 2003). La biomasa microbiana contiene también toda una serie de compuestos nutricionales tales como vitaminas, enzimas, carotenos, tocoferoles y demás. Algunas de las vitaminas más importantes presentes en algunos microorganismos empleados como fuente de SCP se citan en la Tabla 8.

En la SCP, las vitaminas presentes son primordialmente del complejo B. La vitamina B12 se encuentra primordialmente en bacterias mientras que la vitamina A se encuentra generalmente en algas.

Tabla 8. Contenido aproximado de vitaminas en mg/100g (base seca) de algunos microorganismos empleados como fuente de SCP.

VITAMINA	MORCHELLA HORTENSIS	CANDIDA UTILIS	S. CEREVICIAE	MATHYLOMONA METHANICA
TIAMINA	0,52	0,53	5-36	1,81
RIVOFILAVINA	1,31	4,50	3,6-4,2	4,82
NIACINA	12,4	41,73	80-100	15,9
PIRIDOXINA	2,62	3,34	2,5-10	14,3
ÁCIDO PANTOTÉNICO	12,6	3,72	10	2,42
ÁCIDO FÓLICO	1,09	2,15	1,5-8,0	-
INOSITOL	1,78	-	-	-
COLINA	4,61	-	-	968
VITAMINA B12	0	0	0	0,95
BIOTINA	0,015	0,23	0,5-1,8	-
ACIDO AMINOBENZOICO	P- -----	1,7	0,9-1,0	-

FUENTE: Israelidis 2003.

La SCP suele encontrarse significativamente desprovista de colesterol y grasas. Así mismo, la SCP en su forma íntegra podría cumplir funciones similares a la fibra

dietética contribuyendo a bajar la incidencia de la diabetes y arteriosclerosis (EDV 2003). Actualmente se estudia el papel de ciertos antígenos rectificadores de la actividad de los linfocitos T presentes en las SCP y que son promotores de una mejor respuesta inmune en las enfermedades (EDV, 2003).

10.2 Limitaciones nutricionales asociadas con los ácidos nucleicos

La fracción más importante del nitrógeno no proteico de la SCP, alrededor de un 30% o 20% de la proteína total, se encuentra en forma de ácidos nucleicos altamente polimerizados y de sus productos de descomposición (Israelidis 2003, FAO 2003). El alto contenido de ácidos nucleicos es normal y característico de todo organismo que presente altas tasas de crecimiento, como el caso de la proteína unicelular, y puede ser serio inconveniente si esta se piensa destinar para el consumo de seres humanos.

Si añadimos SCP a la dieta de una vaca lechera aumenta la producción de leche y eficiencia de la producción en un 15%. Los microorganismos tales como bacterias y levaduras crecen rápidamente y contienen más ácido úrico ya que es más lento crecimiento de plantas y animales. Aunque el ácido úrico limita el consumo diario de SCP para los seres humanos y animales monogástricos como los cerdos y los pollos, los rumiantes tales como vacas, ovejas y cabras pueden tolerar niveles más altos de ácido úrico o descomponen la urea y excreta el amoniaco. Alrededor del 80% total de las células de nitrógeno son aminoácidos, mientras que el restante 20% es posiblemente, grasas, cenizas y ácidos nucleicos. La concentración de los ácidos nucleicos en el SCP es mayor que en las proteínas convencionales. El problema ocurre con el consumo de proteínas, aproximadamente el 10% son ácidos nucleicos. El alto contenido de ácido nucleico en el SCP da como resultado un aumento de ácido úrico en suero y orina. El ácido úrico es el producto final de la degradación de las purinas en el hombre.

La mayoría de los mamíferos, reptiles y moluscos poseen la enzima uricasa, ya que son capaces de oxidar el ácido úrico en ácido alantoideo. Una elevación del ácido úrico en los humanos causa 'gota'. Esa enfermedad es el resultado de la elevación del líquido de ácido úrico en el cuerpo. Su manifestación es la inflamación dolorosa de las articulaciones artríticas. En los animales con la ureasa y allantoicase, la biodegradación de ácido úrico se acelera, y el producto final es amoníaco.

En el cuerpo humano la falta de estas enzimas provoca que el catabolismo del ácido úrico sea finalizado, y el ácido úrico tiene que ser excretado en la orina por medio de los riñones.

La eliminación y la reducción del contenido de ácido nucleico en SCP se logran mediante diversos tratamientos químicos con una solución de hidróxido de sodio o una solución de sal (10%). Como resultado de ello, se forman cristales de urato de sodio y se eliminan de la solución de SCP. La calidad de la SCP puede ser mejorada por la destrucción de las paredes celulares.

¿Qué puede mejorar la digestibilidad de la SCP?

Una forma de controlar el contenido de ácidos nucleicos es no manejando tasas de crecimiento demasiado aceleradas. Otra forma es tratando la SCP de modo que el contenido de ácidos nucleicos (AN) baje por debajo de 2% tal y como recomienda la FAO.

Al momento de calcular una dieta mixta es muy importante no dejar de tomar en cuenta que además del contenido de AN propios de la fuente de SCP, la matriz donde se incluirá esta también puede tener AN.

11. PROCESO DE OBTENCIÓN DE SCP

El proceso de obtención de proteína unicelular puede involucrar una gran variedad de procesos bioquímicos, en concordancia con la amplia gama de microorganismos que pueden ser utilizados.

Genéricamente, la producción de biomasa (SCP) puede expresarse a través de la siguiente ecuación (Rojas 1995, Suharto y Redyowati 2003).

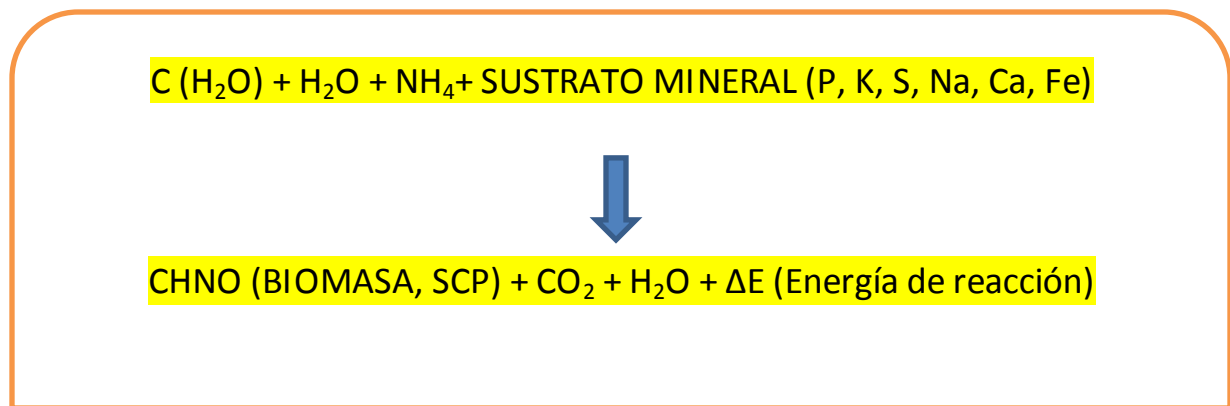


FIG. 8. Reacción general para la producción de biomasa microbiana (SCP).

El proceso bioquímico anterior como es lógico requiere de una fuente de carbono a fermentar, la cual puede ser cualquiera de los substratos descritos en secciones anteriores de este documento. Algunas de estas fuentes suelen ser pobres en nitrógeno y minerales, por lo cual es necesaria una suplementación con sales de amonio ó otras fuentes de nitrógeno (Raimbault 1998). Como productos de la fermentación se obtiene la biomasa, y se libera energía y gases como el CO₂.

Los microorganismos deben además ser inoculados en un medio particularmente favorable tanto en condiciones de competencia (medio previamente “esterilizado”), como en condiciones nutricionales. Por ello es requerido un pretratamiento inicial que no altere indeseablemente al substrato y que garantice que el mismo favorezca el desarrollo de la SCP. Este pretratamiento generalmente implica

(Crueger y Crueger 1989, Durán 1989, Rojas 1995, Raimbault 1998, Pollard *et al.* 2001):

- a. Reducción del tamaño y homogeneizado mecánico de modo que sea más accesible al microorganismo y más fácil de manipular en la fermentación.
- b. Eliminación de agente inhibidores del crecimiento microbiano tales como toxinas y trazas de residuos químicos. Así mismo debe garantizarse la inexistencia de sustancias que puedan causar efectos tóxicos en la SCP obtenida posteriormente.
- c. En algunos casos, cuando el microorganismo a emplear necesita metabolizar formas orgánicas más simples, debe hidrolizarse enzimática o químicamente al sustrato empleando ácidos, álcalis ó enzimas como amilasas ó diastasas.
- d. Suplementación del medio con nutrientes como fósforo y sales nitrogenadas que sirvan de fuente mineral a la SCP.
- e. Ajuste del pH y de la humedad del sustrato de modo que favorezcan el crecimiento de los microorganismos involucrados. Generalmente se requiere regular constantemente las condiciones de pH empleando soluciones amortiguadoras (Chicas 2003). El ajuste del pH se mantiene a lo largo del proceso fermentativo y no solo durante el pretratamiento del sustrato. En la mayoría de los casos el pH suele ser ácido y ronda valores de 4 ó 5 a lo largo del proceso.
- f. Tratamiento térmico del sustrato para eliminar la flora bacteriana patógena y/o competitiva de la matriz. El tratamiento puede ser de pasteurizado en matrices destinadas a fermentación en sustrato líquido o esterilización en sustrato sólidos. En general los parámetros del proceso térmico rondan los 122-123°C por un tiempo de 30-45 minutos (Pollard *et al* 2001)

12. OBTENCIÓN DE SCP A PARTIR DE DESECHOS

La variedad de procesos para obtener SCP es tan grande como la cantidad misma de microorganismos que puede ser empleada. Por ello lo que a continuación se expondrá no debe considerarse como un proceso generalizado, sino más bien como casos particulares ilustrativos.

12.1. Obtención de SCP a partir del suero de derivados lácteos

En la descripción de este proceso se detallan las pautas evaluadas por (Hernández *et al.* 1979), en su estudio de obtención de SCP a partir de suero de leche desproteínizado, y (Trujillo *et al.* 2002), en su estudio de fermentación láctica en continuo a partir de suero dulce de leche desproteínizado.

Los productores de derivados lácteos generalmente producen grandes cantidades de aguas de desecho, principalmente en lo que se refiere a suero de la leche (Okos y Dale 1994). El tratamiento de estos desechos generalmente involucra altos costos y no deja de tener un fuerte impacto ambiental. Es por ello que el aprovechamiento es una mejor opción.

En el caso del suero de la leche, la tendencia mundial es de usarlo cada vez menos como alimento animal directamente, lo cual sumado a las leyes cada vez más ingeniosas, como la producción de SCP utilizando la lactosa del suero (Hernández *et al.* 1979, Durán 1989).

Para el tratamiento de suero en específico se recomienda emplear el microorganismo *Kluyveromyces fragilis*, el cual puede ser cultivado inicialmente en medio papa-dextrosa-agar nutritivo a 72 °C durante 3-5 días (García *et al.* 1994). Como es común a todos los procesos de obtención de SCP, se prepara primero un inóculo que después se agrega al substrato ya pretratado.

Es necesario desproteínizar la matriz del suero. Se eliminan así interferencias proteicas y se garantiza la máxima disponibilidad de la lactosa. Una opción podría ser emplear ácido tricloroacético al 30% como agente clarificante de uso típico en

alimentos (Hart y Fisher 1971) que se agregará al volumen de suero en un porcentaje de 7%. El volumen de suero ya con el ácido tricloroacético puede verterse en la marmita (fermentador), y calentarse con agitación hasta hervirlo, por unos 20 minutos para clarificar, y para matar bacterias que puedan causar competencia (Anónimo 2002). El suero así tratado se enfría, ojalá con choque térmico y se pasa a través de una manta previamente esterilizada de manera que se filtre el precipitado de proteína.

Antes de inocular se diluye el suero en una proporción de 1 en 10 con agua (Hernández et al. 1979, Durán 1989). El mismo será suplido después de la dilución con sales para garantizar la nutrición de la levadura (Crueger y Crueger 1989). Las sales podrían ser de sulfato de amonio 0.4% p/v y 0,1% p/v de sulfato ácido de potasio. Otras sales de magnesio (0,232 g/l), calcio (0,011 g/l), hierro (0,007 g/l), zinc (0,002 g/l) y manganeso (0,002 g/l) podrían experimentarse también (Hernández et al. 1979).

Con el fin de regular el pH inicial óptimo al 4,5 característico del medio acidificado (García et al. 1994, Okos et al. 1994), puede emplearse hidróxido de sodio para disminuir el pH que inicialmente está por encima de 4,5.

Del suero ya acondicionado pueden tomarse 100 ml en un matraz esmerilado el cual puede inocularse con *Kluyveromyces fragilis* por medio de un asa que se frotaría en la placa previamente preparada de agar y luego se introduciría en este volumen de suero. Luego el matraz puede ponerse en rotavapor y calentarlo con rotación lenta moderada (quizás unos 300 rpm) a la temperatura ideal para la levadura de unos 72°C, y mantener este estado controlado por unas 72 horas. Así se estaría preparando el cultivo madre. En principio podría emplearse 100 ml de cultivo madre por cada kilogramo de suero a procesar (Hernández et al. 1979). Habrá que definir la frecuencia de procesamiento en planta para definir así la cantidad de inóculo madre a preparar, y hacer pruebas para calibrar la cantidad de inóculo necesario.

El cultivo madre así preparado, se agregará el fermentador con el resto del suero ya suplementado. Este fermentador será en forma de tanque de acero inoxidable agitado (capaz de desarrollar unos 800 rpm), de por lo menos 300 kg de capacidad y que será llenado hasta su capacidad máxima (Hernández et al. 1979), con tapa y con chaqueta para circular fluidos reguladores de temperatura. Este tanque sería un fermentador denominado “reactor mezclado homogéneamente” o quimiostato, en el cual se puede alcanzar un estado estacionario de equilibrio que se controla ajustando la concentración del sustrato (Crueger y Crueger 1989).

Se calibra el termostato de modo que la temperatura pueda ajustarse a 30 °C (Hernández et al. 1979), y se tapa el fermentador. Es importante poner una manguera que alimente y purgué aire dentro del fermentador. Es recomendable unos 4,8 l/min de aire (Hernández et al 1979).

El proceso llega al estado de equilibrio en 16-24 horas y puede empezarse a drenar el contenido del reactor a medida que se inyecta más cultivo madre, suero y nutrientes hasta alcanzar un estado estacionario.

El líquido fermentado (medio exhausto) se puede separar de la SCP que contiene empleando decantación y centrifugación. Es factible aplicar después algún lavado que permita eliminar residuos adheridos a la pasta de biomasa obtenida. Posteriormente puede hacerse un secado, quizás empleando un secador de tambor rotatorio, los cuales son muy adecuados para el procesamiento de suspensiones o pastas de sólidos (Geankoplis 1993). La pasta seca puede pulverizarse para obtener la proteína en polvo, que puede emplearse ahora como sustituto proteico en fórmulas de alimento para animales como serían las cabras (Durán, 1989). El proceso propuesto puede llegar a generar porcentajes de rendimiento del 30%.

Si se desea emplear como alimento humano cabe estudiar la posibilidad de reducir el contenido de AN por alguno de los métodos ya descritos.

Como mecanismos de control y para evaluar la eficiencia del proceso, pueden emplearse algunos de los siguientes (Hernández, et al. 1979; Durán, 1989, Crueger y Crueger, 1989):

- a) Para determinar el progreso de la fermentación podría tomarse muestras por medio de una sonda en diferentes periodos de tiempo y determinar a partir de esta muestra por refractometría el contenido de lactosa remanente, o bien emplear algún método espectrofotométrico con un spectronic 20.
- b) El contenido de proteína unicelular en la pasta puede evaluarse por el método de kjendahl.
- c) Se requiere un preciso monitoreo de tiempos, flujos de aire, revoluciones de agitación y temperaturas en todo momento.
- d) Implementar un análisis proximal de los sueros antes de iniciar el proceso de modo tal que se pueda estandarizar la calidad del mismo.
- e) Emplear un cultivo fresco con cierta frecuencia para garantizar que no proliferen otros microorganismos que violenten la parametrización del proceso.
- f) Evaluar el PER de la proteína obtenida en términos del peso ganado por el animal por unidad de peso de proteína en la ingesta.

12.2. Obtención de SCP a partir de bagazo de naranja

En las diferentes industrias frutales y como productos domésticos, se tiene una gran cantidad de residuos de frutas, que no tienen ninguna utilidad y son desechos que se encuentran en los basurales, siguiendo un proceso normal de descomposición. Ante esta situación la biotecnología ha desarrollado una serie de procedimientos que permiten realizar un tratamiento biológico a los desechos de frutas, con microorganismos adecuados, con el fin de producir la denominada bioproteína o enriquecer los alimentos, incrementando el nivel de proteína con los mismos.

Se entiende por bioproteína o proteína unicelular a los microorganismos tales como bacterias, levaduras, algas u hongos filamentosos que son utilizados como alimentos de alto valor proteico, como complemento en la alimentación de aves, cerdos y otros animales (Jagnoww y Dawis, 1991).

En base a estos antecedentes, en el presente estudio se utilizó por su composición química y el bajo pH, el bagazo de la naranja (*Citrus sinensis*) (Caceres, 1996), como sustrato para el crecimiento de *Aspergillusniger*, hongo filamentoso rico en aminoácidos como la Isoleucina, Fenilalanina, Leucina, Tirosina, Cisteína, Treonina, Valina, Triptófano y Lisina. (Servicio de Normas Alimentarias y Bromatología, FAO).

Materiales y Métodos

La materia prima utilizada fue el residuo que quedó después de la expresión del jugo, en la misma se realizaron los análisis previos, encontrando un porcentaje de 78,1% de humedad, ceniza total 3,485%; fibra total 13,37%; nitrógeno total 0,817, nitrógeno amoniacal 0,104 y nitrógeno orgánico 0,713%, proteína total 4,45%, el pH inicial fue de 4,3.

La materia seca se determinó por desecación de la muestra a 105 °C, la ceniza por calcinación, la fibra cruda por digestión ácida y alcalina, el pH se midió en una suspensión de 1:1 en agua destilada, el nitrógeno total por el método microkjeldahl (A.O.A.C, 1975) y el nitrógeno mineral por el método del óxido de magnesio (A.O.A.C, 1975). El material vegetal fue desamargado en agua de sal, triturado y tratado previamente, agregando nutrientes: 60 gramos de nitrato amónico, 4 gramos de fosfato potásico y 4 gramos de sulfato de magnesio por kilogramo de materia seca (Lequerica, 1980, Hernandez, 1975).

El inóculo fue preparado utilizando *Aspergillus niger* desarrollado en un medio líquido de dextrosa saboraud, incubando a 28° C, por 48 horas. Se utilizó para la

inoculación una cantidad de 20 ml de la suspensión por cada kilogramo de materia seca.

La materia prima más el inóculo de *Aspergillus niger*, fue colocada en bandejas de plástico, rociando diariamente con aproximadamente 20 ml de agua por bandeja, para mantener una alta humedad y removiendo la mezcla. Los análisis de determinación de nitrógeno total y nitrógeno amoniacal, se realizaron cada 7 días durante 28 días, para conocer el incremento o el descenso de los mismos. Así mismo se midió el pH cada 2 días.

Resultados

Los resultados del incremento de nitrógeno orgánico y el descenso del nitrógeno amoniacal se encuentran en la Tabla 9.

Tabla 9. Concentración de nitrógeno y proteína del bagazo de naranja con *Aspergillus niger*.

DIA	N TOTAL %	N AMONICAL %	N ORGÁNICO %	PROTEINA TOTAL %
1	0.817	0,104	0.713	4.450
7	2.740	1,560	1.180	7.375
14	3.560	1,510	2.050	12.810
21	3.740	1.250	2.490	15.560
28	3.940	1,050	2.890	18.060

FUENTE: LEQUERICA, 1980, HERNÁNDEZ, 1975

Cómo se puede observar en la tabla 9, la concentración de nitrógeno orgánico inicial de 0.7130 %, aumentó a los 7 días a 1.180, a los 14 días a 2.050%, a los 21 días a 2.490, alcanzando a los 28 días un valor de 2,890 %. En base a estos resultados, se observa que la proteína aumenta desde 4,45% hasta un 18,06, existiendo un incremento del 305% en 28 días de crecimiento del *Aspergillus niger* sobre el bagazo de naranja.

En el trabajo realizado por (Lequerica 1980) utilizando también *Aspergillus niger* como fuente de bioproteína logró un incremento de proteína total en la materia prima de 6,7 a 20% que representa un porcentaje de incremento de 298%. Así mismo analizando los resultados, el nitrógeno amoniacal disminuye de 1,56 a 1,05% en los 28 días, lo que representa la conversión del nitrógeno mineral en nitrógeno orgánico.

Los resultados del incremento de proteína son muy importantes ya que el bagazo de naranja enriquecido por *Aspergillus niger* se convierte en un alimento altamente nutritivo para el uso como alimento balanceado. Por otra parte respecto al pH, se observó que a medida que el microorganismo aumenta su masa el pH desciende de 4,3 hasta un pH de 3,5, que es el óptimo para el crecimiento del hongo, no permitiendo el crecimiento de bacterias y levaduras. El bagazo enriquecido con el microorganismo fue utilizado para la valoración biológica; en la misma se trabajó con pollos de granja, 1 grupo de referencia y otro grupo de prueba. El grupo de referencia fue alimentado con una formulación adecuada de acuerdo a sus requerimientos nutricionales y el grupo prueba fue alimentado con una formulación que incluye la bioproteína. La mezcla para el grupo de referencia se expresa en la tabla 10 y la mezcla para el grupo control en la Tabla 11.

Tabla 10. Formulación para el grupo de referencia

ALIMENTO	CANTIDAD gramos
Maíz	560
Soya	300
Afrechillo	118
Hueso	24
Sal	1.0
Vitaminas	1.0
Metionina	1.3

FUENTE: LEQUERICA, 1980, HERNÁNDEZ, 1975

Tabla 11. Formulación para el grupo de prueba.

ALIMENTO	CANTIDAD gramos
Maíz	410
Bioproteína	80
Soya	370
Afrechillo	118
Hueso	25
Sal	1.0
Vitaminas	1.0
Metionina	1.3

FUENTE: LEQUERICA, 1980, HERNÁNDEZ, 1975

A partir del primer día los animales fueron pesados diariamente durante treinta días, los pesos del grupo de referencia y del grupo prueba se encuentran en las tablas 12 y 13.

Tabla 12. Incremento de peso de los pollos en 30 días grupo de referencia.

NUM	PESO INICIAL GRAMOS	PESO EN 30 DIAS GRAMOS	INCREMENTO TOTAL GRAMOS
1	92.6	478.0	385.4
2	104.8	528.0	423.2
3	86.9	407.0	320.1
4	86.8	462.0	375.2
5	103.1	565.0	461.9

FUENTE: LEQUERICA, 1980, HERNÁNDEZ, 1975

Tabla 13. Incremento de peso de los pollos en 30 días grupo prueba con bioproteína.

NUMERO	PESO INICIAL GRAMOS	PESO EN 30 DIAS GRAMOS	INCREMENTO TOTAL GRAMOS
1	88.8	408.0	319.2
2	96.7	419.0	322.3
3	96.4	484.5	388.1
4	95.0	538.0	443.0
5	85.9	518.0	432.1
6	89.0	468.0	379.0

FUENTE: LEQUERICA, 1980, HERNÁNDEZ, 1975

Realizando un análisis estadístico por comparación de medias del incremento de peso entre el grupo de referencia y el grupo de prueba alimentado con bioproteína, se determinó que no existe diferencia entre ambos grupos, lo cual permite concluir

que el bagazo de naranja enriquecido con *Aspergillus niger* es un alimento que puede remplazar a la proteína del maíz o la soya. Una vez concluida la prueba, los animales fueron sacrificados para observar las características macroscópicas y microscópicas de los órganos animales, no encontrando ningún signo de toxicidad. En resumen, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- a. La proteína inicial del bagazo de naranja se incrementó en 28 días de 4,45% a 18%, que representa un aumento de un 305%
- b. El bagazo de naranja enriquecido con *Aspergillus niger* representa un alimento altamente nutritivo porque contiene diversos aminoácidos esenciales.
- c. Para un buen crecimiento del *Aspergillus* es necesario mantener un pH entre 4 y 5.
- d. El bagazo de naranja enriquecido con *Aspergillus niger*, puede remplazar a la proteína proveniente de la soya o el maíz, en el alimento balanceado para pollos.

12.3. Obtención de SCP a partir de harina de maíz precocido

En este estudio, se pretende realizar fermentaciones aeróbicas con levaduras empleando los desechos de harina de maíz precocida para enriquecerlos en proteína unicelular.

El procesamiento industrial de la harina de maíz precocida, genera aproximadamente 6 toneladas por día de desechos sólidos orgánicos, volumen que la empresa deposita en rellenos sanitarios, con el objetivo de promover una putrefacción rápida, mezclando los desechos con lodos provenientes de la Planta

de Tratamiento de Aguas Residuales. La enorme cantidad del desecho produce problemas de costosa deposición y difícil solución.

En un estudio preliminar que se realizó sobre la composición bioquímica de esos desechos (Gualtieri, 1998), se determinó que poseen un alto contenido de materia orgánica (79.45%), formada principalmente por almidón. Esta circunstancia nos condujo a proponer una solución biotecnológica, aprovechando la capacidad de las levaduras para metabolizar, mediante procesos fermentativos, materia orgánica y generar proteína unicelular con alto valor proteico similar a la de origen vegetal. El término “proteína unicelular”, significa o identifica a alimentos proteicos derivados de microorganismos unicelulares o pluricelulares crecidos por procesos fermentativos en cultivos sumergidos, de diversas fuentes y en desechos orgánicos.

Saccharomyces cerevisiae representa una de las levaduras de primera elección para la producción industrial de biomasa y etanol, y que careciendo de actividad b-galactosidasa, amilasa y glucoamilasa, las levaduras en gemación son incapaces para fermentar el almidón (Compagno, 1995). *Schwanniomyces Castellii* es una levadura amilolítica, capaz de degradar el almidón por dos amilasas secretadas, una α -amilasa y una glucoamilasa, la producción de estas enzimas, es inducida por la ausencia de glucosa, por la presencia de maltosa o almidón (Piontek, 1998). *Cándida utilis* es una levadura que tiene una alta tasa de crecimiento, que ninguna especie ha logrado superar, y que requiere de un sustrato rico en azúcares o fuentes de carbono, para su crecimiento o cultivo (Lucca, 1995; Gaspar 1996), realizó ensayos con el hongo *Pleurotus ostreatus* en desechos de plátanos (tallos y hojas), alcanzando un incremento proteico de 6,12 a 29% (Zamora 1996), realizó ensayos con *Candida utilis* en extractos ácidos de paja de arroz, en donde se consumieron en 10 horas el 82% de los azúcares reductores y se produjeron 3,5 g de biomasa seca/litro de medio, con un rendimiento de 0,76 g de peso seco/gramo de azúcar consumido.

El desecho fue sometido a hidrólisis por tratamientos químicos y enzimáticos. En la hidrólisis química, se utilizaron valores de 1:10 (p/v) para la relación desecho/ácido sulfúrico al 2%, en la hidrólisis enzimática, se realizó con una levadura productora de α -amilasas y con una enzima comercial. Se determinaron, a nivel de fiolas y de fermentadores de 2.5 litros, las condiciones óptimas de crecimiento de *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Schwannomyces castelli*. Las condiciones experimentales: pH 4.5; 30°C, 1v/v; 20 g/L del desecho, 1.25 g/L de (urea, sulfato de amonio, extracto de levadura y extracto de malta diastásico líquido). La fermentación de 250 litros se realizó en un fermentador PROYETSAN, la hidrólisis enzimática se realizó con *Sch. castelli*, y el consumo de azúcares con *S. cerevisiae*, obteniéndose 9 g de biomasa de peso seco/litro, y un incremento proteico de 7.8 a 41.13%. Se puede concluir que los desechos de harina de maíz precocida constituyen un substrato adecuado para obtener biomasa o proteína unicelular, que podría ser destinada como suplemento en formulaciones para alimentación animal.

Materiales y métodos

Microorganismos: *Candida utilis* ATCC 9226, *Saccharomyces cerevisiae* Pampero 103 y *Schwanniomyces Castelli* CBS 2863, crecidas en cuñas de agar papa dextrosa e incubadas a 30°C, se guardaron en frío a 5 °C. Fue sometido a diferentes tratamientos con el objetivo de hidrolizar el almidón presente y así obtener azúcares fermentables por las levaduras.

Hidrólisis ácida

Se preparó una solución del desecho en 10 g/L, en una relación desecho/ácido: 1/10; empleando ácido sulfúrico al 1, 2, 3%; tiempo de hidrólisis de 20, 30, 45 minutos y temperatura de hidrólisis de 50, 75, 98°C. Las muestras se colocaron en fiolas, provistas con tapón de algodón y gasa para evitar la evaporación durante la experiencia. El tratamiento térmico se realizó en un baño de María. Los

hidrolizados fueron diluidos en 1/500, 1/1000 y 1/2000 para determinar azúcares totales (Gaspar, 1996). Los hidrolizados obtenidos se enriquecieron con 0.25, 0.50, 1.0 y 1.25 g/L, de urea, sulfato de amonio, extracto de levadura y extracto de malta diastásico líquido, e inoculados con las cepas de las levaduras con el objeto de determinar las condiciones óptimas de crecimiento en 100 mL de cultivo, a un pH 4.5, 30°C de incubación de y 150 rpm agitación rotatoria.

Así, mismo se realizó un control, sin nutrientes. El crecimiento celular se cuantificó por densidad óptica a 540 nm, utilizándose agua como blanco, cada 2 horas se retiraron del cultivo 5 mL de muestra, se centrifugaron durante 10 minutos a 6.000 r.p.m. El sedimento fue suspendido y lavado dos veces con 5 mL de agua destilada. Los distintos sobrenadantes se utilizaron para determinar los azúcares totales por el método de antrona (Chinappi, 1996).

Hidrólisis enzimática

Se realizó con *Sch. castelli*, levadura productora de α -amilasa y glucoamilasa, enzimas que degradan el almidón hasta maltosa o glucosa. Así mismo se realizó la hidrólisis con una enzima comercial "Termamy", una α -amilasa, estable al calor producida por *Bacillus licheniformis*, que hidroliza los enlaces 1,4 α -glucosídicos del almidón a dextrinas solubles y oligosacáridos (Compagno, 1995). Se emplearon 10 g/L del desecho y 0.07 mL del enzima por litros de substrato, la mezcla se calentó a 100°C por 10 minutos, pH 4.5, para inducir la gelatinización, seguidamente la temperatura se disminuyó a 85°C hasta completar los 30 minutos de calentamiento.

Incremento de escala

La fermentación aeróbica se realizó en procesos a escala en el cual crecieron células en matraces de 250 mL provistas con tapón de gasa, con un volumen de

90 mL de medio de cultivo hidrolizado por los métodos antes indicados y 10 mL de inóculo; en fermentador de vidrio de 2.5 litros y en fermentador de acero inoxidable de 250 litros (Albornoz, 1992). Las condiciones del proceso: Temperatura de pasteurización 90°C durante 2 horas, pH 4,5, flujo de aire de 1 vvm (v=volumen de aire, v= unidad de medio, m= unidad de tiempo). Cuando la mezcla alcanzó 30°C, se inóculo con 16 litros de un cultivo mixto de *Sch. castelli* y *S cerevisiae* de 48 horas. Cada 2 horas se retiraron 100 ml de muestra para los análisis correspondientes y a las 32 horas se detuvo el proceso. La biomasa o proteína unicelular se concentró en un reactor de acero inoxidable con vapor de agua a 95°C y secada por atomización a 100°C. El crecimiento de células viables se cuantificó por los métodos de recuento estándar en placas de Petri en medio agar papa dextrosa y por el método de conteo total, utilizando la cámara de Neubauer (Anido, 1943).

Se realizaron cinéticas de crecimiento y se determinó la velocidad de crecimiento de las células de levaduras (Lee, 1996). Los análisis físicos-químicos y microbiológicos se realizaron de acuerdo a las normas COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales). La actividad de la amilasa se realizó por el método de Caraway modificado (Bioscience, 2002).

Resultados y discusión

Hidrólisis Química

Luego de realizadas las hidrólisis ácidas, se observa (Tabla 14) que al incrementar la temperatura de hidrólisis de 50 a 75°C y las concentraciones de ácido de 1 a 2%, el rendimiento de azúcares totales también aumenta. El efecto combinado de elevada temperatura (75 a 98°C) y elevada concentración de ácido (2 a 3%), transforma los azúcares en furfurales, los cuales, son inhibidores de la actividad microbiana, y no son detectados por el método utilizado. Estos resultados sugieren que para obtener azúcares solubles a partir del almidón

existente en el desecho, se deben aplicar las siguientes condiciones de hidrólisis, empleando una temperatura media de 75°C; un tiempo de 20 minutos y una solución de ácido sulfúrico al 2% con producción de 17,2 g/L de azúcares fermentable.

Tabla 14. Efecto de la hidrólisis ácida del desecho para la producción de azúcares fermentables.

TEMPERATURA °C	TIEMPO DE HIDRÓLISIS (MIN)	CONCENTRACIÓN DE H ₂ SO ₄	
		1 AZÚCARES (g/L)	2 3
50	20	6.0	12.0
	30	10.0	
	45	9.0	12.0
		10.0	
		10.0	14.3
		12.0	
75	20	10.0	17.2
	30	14.0	
	45	11.2	17.0
		14.0	
		11.3	18.3
		15.0	
98	20	12.5	8.0
	30	7.0	
	45	13.0	10.3
		8.4	
		13.3	13.0
		10.4	

FUENTE: BIOSCIENCE, 2002

Efecto de la concentración de almidón sobre el crecimiento

Este experimento se realizó creciendo las levaduras sobre el desecho hidrolizado a diferentes concentraciones de almidón. A medida en que la concentración del desecho fue mayor, se observó mayor velocidad de crecimiento. En la Tabla 15, muestra que las mayores velocidades de crecimiento 0.93 h⁻¹, 0.50 h⁻¹ y 0.78 h⁻¹

C. utilis, *S. cerevisiae* y *Sch. castelli*, respectivamente se obtuvieron cuando la concentración del desecho fue de 20 g/L.

Tabla 15. Efecto de la concentración del desecho en la velocidad de crecimiento de *C. utilis*, *S. cerevisiae* y *Sch. castelli*.

VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (μ)	10	15	20
C. Utilis (h^{-1})	0.25	0.35	0.93
S. Cerevisiae (h^{-1})	0.43	0.23	0.50
Sch. Castelli (h^{-1})	0.40	0.43	0.78

FUENTE: BIOSCIENCE, 2002

Efecto de la concentración de urea, sulfato de amonio, extracto de levadura y extracto de malta diastásico

Se utilizaron concentraciones de urea, sulfato de amonio, extracto de levadura y extracto de malta de 0.25, 0.50, 1.0 y 1.25 g/L. En la Tabla 16 se pueden observar los resultados obtenidos. Las mayores velocidades de crecimiento (0.33 h⁻¹, 0.53 h⁻¹ y 0.73 h⁻¹) para *C. utilis*, *S. cerevisiae* y *Sch. Castelli* respectivamente, se obtuvieron cuando la concentración de urea fue de 1.25 g/L. De igual forma, las mayores velocidades de crecimiento (0.40 h⁻¹, 0.61 h⁻¹ y 0.43 h⁻¹). Para *C. utilis*, *S. cerevisiae* y *Sch. castelli* respectivamente, se obtuvieron cuando la concentración de sulfato de amonio fue de 1.25 g/L. Así mismo, las mayores velocidades de crecimiento (0.53 h⁻¹, 0.33 h⁻¹ y 0.33 h⁻¹) fue para *C. utilis*, *S. cerevisiae* y *Sch. castelli* respectivamente, se obtuvieron cuando la concentración de extracto de levadura fue de 1.25 g/L.

De igual manera las mayores velocidades de crecimiento (0.50 h⁻¹, 0.43 h⁻¹ y 0.60 h⁻¹) para *C. utilis*, *S. cerevisiae* y *Sch. Castelli* respectivamente, se

obtuvieron cuando la concentración de extracto de malta fue de 1.25 g/L. Estos resultados nos permiten afirmar que el desecho de harina de maíz precocida es un medio que debe ser enriquecido con elementos nutritivos, los cuales son necesarios para incrementar el crecimiento celular de las levaduras.

Tabla 16. Efecto de la concentración de los nutrientes sobre las velocidades de crecimiento celular (μ) de las levaduras.

(g/l)	<i>C. utilis</i> Velocidad de crecimiento (h ⁻¹)					<i>S. cerevisiae</i> Velocidad de crecimiento (h ⁻¹)					<i>Sch. Castellii</i> Velocidad de crecimiento (h ⁻¹)			
	0	0.25	0.50	1.0	1.25	0	0.25	0.50	1.0	1.25	0	0.25	0.50	1.0
Urea	0.03	0.10	0.11	0.23	0.33	0.20	0.30	0.32	0.40	0.53	0.15	0.26	0.30	0.43
Sulfato de amonio	0.06	0.10	0.13	0.36	0.40	0.23	0.26	0.30	0.53	0.61	0.26	0.30	0.36	0.40
Extracto de levadura	0.15	0.17	0.23	0.27	0.53	0.15	0.17	0.20	0.30	0.33	0.16	0.18	0.20	0.26
Extracto de malta	0.25	0.37	0.44	0.46	0.50	0.16	0.17	0.30	0.36	0.43	0.26	0.43	0.46	0.53

FUENTE: BIOSCIENCE, 2002

El objetivo fue estudiar en los medios de cultivo tratados, el comportamiento de las levaduras sobre el desecho de harina de maíz precocida al incrementar la escala de fermentación e introducir aire en el medio de cultivo en lugar de la agitación; para ello se realizaron ensayos incrementado desde 100 mL a fermentadores de 2.5 litros y 250 litros.

Las condiciones óptimas de temperatura, pH, macro y micronutrientes fueron tomadas de los resultados obtenidos de los matraces de 100 mL. En la Tabla 17, se puede observar que el desecho de harina de maíz precocida tratada mediante hidrólisis química con H₂SO₄ al 2% (relación 1:10), 75°C y 20 minutos, la biomasa con mayor porcentaje en proteínas (29.82% en peso), fue obtenida con la levadura *S. cerevisiae* (Cepa 523), y con la mezcla de *C. utilis* y *S. cerevisiae* (505+523), se alcanzó igual concentración (29.79%). Con *S. cerevisiae*, se produjo la mayor cantidad de biomasa (8x10⁷ UFC/ml), que el obtenido por cada una de las

levaduras individualmente pero no sobrepasó la suma de producción de las otras dos levaduras.

En el tratamiento con hidrólisis enzimática con *Sch. Castellii* (cepa 538), la cual provee las enzimas α -amilasas y amiloglicosidasas para degradar el almidón, la biomasa con mayor concentración de proteínas (39.66% en peso), fue con la levadura *S. cerevisiae* y el recuento de células también fue mayor cuando *Sch. castelli* y *S.cerevisiae* actuaron simultáneamente (80×10^7 UFC/ml), aunque no se logró un incremento cuando estas dos levaduras crecen juntas con *C. utilis* (16×10^7 UFC/ml). Lo interesante de estos resultados es que el aporte enzimático al medio causado por *Sch. castelli*, hace posible que la producción de biomasa sea 5 veces mayor cuando está presente *S. cerevisiae*, levadura con mayor capacidad de dividirse y asimilar sacáridos simples.

En el tratamiento de hidrólisis del desecho con la enzima comercial (Termamyl), la biomasa con mayor concentración de proteínas (37.69% en peso), fue con la levadura *S. cerevisiae*, con un crecimiento celular de 15×10^7 UFC/ml. Los resultados obtenidos en estas fermentaciones nos permiten seleccionar, el tratamiento enzimático con la levadura *Sch. Castellii* como el tratamiento previo de hidrólisis del desecho orgánico de harina de maíz precocida, el cual está constituido principalmente por almidón, para ser degradado a moléculas más sencillas con la finalidad de obtener azúcares fermentables por la levadura *S. Cerevisiae*.

Tabla 17. Efecto de la hidrólisis sobre la producción de biomasa en el desecho de harina de maíz precocida en fermentador de 2.5 litros.

Hidrólisis	Cepa	%Pc	D.S	%Pc- Control	%Cn	D.S	% Az	D.S	Lev UFC/ml $\times 10^7$
Acida	505	32.81	± 0.081	24.35	5.29	± 0.012	69.36	± 0.008	4.8
	523	38.20	± 0.033	29.82	5.56	± 0.081	63.62	± 0.016	8.0
	505-523	38.25	± 0.089	29.79	5.51	± 0.016	63,70	± 0.016	6.4

Sch. Castelli	505	29.53	±0.024	21.07	5.59	±0.032	72.34	±0.081	6.0
	523	48.12	±0.016	39.66	5.77	±0.048	53.57	±0.016	80.0
	505-523	38.72	±0.024	30.26	5.63	±0.055	63.11	±0.008	16.0
Termanyl	505	29.53	±0.024	21.07	5.27	±0.020	72.66	±0.016	5.4
	523	46.25	±0.081	37.69	5.57	±0.024	55.74	±0.009	15.0
	505-523	39.12	±0.020	30.66	5.53	±0.024	62.81	±0.016	10.0
Control	-	8.46	±0.012	0	4.61	±0.008	86.93	±0.014	--

Ps: Peso seco; **Pc:** Proteína cruda; **Cn:** Cenizas; **Az:** Azúcares totales; **Lev:** Levaduras; **D.S:** Desviación Standard. El medio de cultivo constituido por: Desechos de harina de maíz precocida, 20 g/l, urea (1.25 g/l); sulfato de amonio (1.25 g/l); extracto de levadura (1.25 g/l) y extracto de malta diastásico líquido (1.25 g/l), pH 4.5, 30°C; con un flujo de aire de 1 vvm y tiempo de fermentación, 48 horas. El control se realizó bajo las mismas condiciones pero sin agregar ninguna levadura. Cepa **505** (*C. utilis*). Cepa **523** (*S. cerevisiae*). Cepa **538** (*Sch. castelli*). Cada valor representa la media de tres ensayos. Los resultados están calculados sobre base seca.

Finalmente se realizó una producción de proteína unicelular en un fermentador PROYETSAN de 250 litros, con las levaduras seleccionadas. En la Tabla 18, se muestran las características de la producción de proteína con el consorcio de *Sch. castelli* y *S. cerevisiae*. El consumo de almidón durante el crecimiento celular, se inició con 20 g/L y a las 32 horas de fermentación descendió hasta 5.57 g/L

Tabla 18. Características de la biomasa obtenida por tratamiento enzimático con el consorcio formado por *Sch. castelli* y *S. cerevisiae* crecidas en medio con harina de maíz precocida. Fermentador Proyetsan de 250 litros.

HORA	ALMIDON g/L	PESO SECO %	CENIZAS %	PROTEINAS %		CÉLULAS/ ml ($\times 10^7$)	ACT. AMILASA (UA/ml)
				SOBRE- NADANTE MENTO	SEDI-		
0	20.00	17.0	17.1	2.18	6.56	0.4	0
4	19.40	15.9	15.4	3.72	7.22	0.5	0
8	17.90	10.95	10.6	12.25	8.53	0.6	0
12	15.86	9.05	9.05	15.31	9.63	0.8	0
16	11.44	8.0	8.0	13.34	10.28	1.0	0
20	10.12	5.8	5.8	7.88	17.5	1.12	0.45
24	8.64	5.0	5.0	4.15	22.56	7.76	0.66
28	7.46	4.6	4.6	2.63	24.93	12.6	2.66
32	5.57	4.2	4.2	1.96	25.15	15.4	4.0

FUENTE: BIOSCIENCE, 2002

El medio de cultivo contiene (almidón) desecho de harina de maíz precocida, 20 g/L; urea, 1.25 g/L; extracto de malta diastásico, 1.25 g/L. El volumen de producción, 150 litros. A tiempo cero se inocularon 16 litros de un cultivo mixto de 24 horas con *Sch. castelli* y *S. cerevisiae*.

Muestras de 100 mL se retiraron del fermentador cada 4 horas para los análisis. Las condiciones de fermentación fueron: pH 4.5, 30°C y 1 vvm de aireación. Los valores de los parámetros se calcularon sobre base húmeda.

En la Tabla 19, se muestra la caracterización bromatológica y microbiológica del desecho de harina de maíz precocida empleado en el proceso fermentativo y la biomasa de levaduras obtenida por fermentación aeróbica en el fermentador de 250 litros.

Tabla 19. Caracterización bromatológica y microbiológica del desecho y la biomasa de levaduras obtenida en el fermentador de 250 litros.

PARÁMETROS	DESECHO DE HARINA DE MAÍZ PRECOCIDA	BIOMASA
HUMEDAD %	10.65	5.32
PROTEINAS %	7.8	41.13
NITRÓGENO NO PROTEICO %	-	5.1
GRASA %	1.6	0.51
FIBRA CRUDA %	0.9	0.48
ALMIDÓN %	79.45	52.35
CENIZAS %	0.5	5.53
MATERIA SECA %	89.35	94.68
AEROBIOS MESOFILOS UFC7g	26×10 ³	8×10 ³
MOHOS UFC/g	≤10 ³	≤10 ²
LEVADURAS	≤10 ³	≤10 ²
COLIFORMES NPM/ml	40×10 ²	≤10 ²

FUENTE: BIOSCIENCE, 2002

Se aplicaron tratamientos químicos y enzimáticos al desecho con la finalidad de obtener azúcares fermentables por las levaduras a partir del desecho de harina de maíz precocida. De las tres levaduras empleadas, *Sch. Castellii* CBS 2863 aporta iguales resultados que con la utilización de enzimas comerciales, datos no mostrados. Esto nos permitió obtener biomasa de levaduras, con rendimientos y productividades comparables con valores reportados en la literatura, útil en principio como aporte proteico para dietas de animales. Los resultados obtenidos, permiten ofrecer una tecnología para disponer de un desecho agroindustrial contaminante y proporcionar una solución ecológica con un beneficio económico.

12.4. Obtención de proteína unicelular a partir de plumas de aves de corral

Las plumas representan un alto porcentaje de los desechos generados en las plantas productoras de aves de corral. En su mayoría, éstas son destinadas a la elaboración de harinas para ser utilizadas como suplemento de los alimentos concentrados para aves, debido al alto contenido proteico (95 % de peso seco), principalmente de queratina (88%). Sin embargo, los procesos tradicionales a los que son sometidos mediante cocción a altas presiones, no mejoran la digestibilidad de estas harinas ya que el alto contenido de enlaces disulfuro en la queratina la convierten en una proteína muy resistente a la degradación por las enzimas digestivas de las aves. Por otro lado, existe un desbalance de aminoácidos e incluso algunos de ellos son destruidos durante el proceso que combina los tratamientos térmicos con los químicos (ácidos o alcalinos). Se han planteado otras alternativas para el aprovechamiento de las plumas, mediante tratamientos fermentativos con microorganismos queratinolíticos capaces de degradarlas, mejorando así su digestibilidad y calidad nutricional debido a su enriquecimiento con proteína microbiana.

Dadas las tendencias actuales hacia la búsqueda de procesos biotecnológicos aplicables al tratamiento de los residuos agroindustriales y la existencia de un alto potencial microbiano en la naturaleza, capaces de utilizar una amplia variedad de sustratos orgánicos, se ha dirigido el objetivo de este trabajo al aislamiento y caracterización de bacterias capaces de degradar las plumas de aves de corral como fuente de carbono, nitrógeno y energía.

Materiales y métodos

Aislamiento y selección de microorganismos degradadores de plumas

Se tomaron muestras de suelo de diferentes áreas de los depósitos de cría de pollos de engorda y se inocularon en tubos de ensayo que contenían caldo nutritivo Difco® como medio de transporte. Después de 24 h de inoculación, se sometieron a un proceso de pasteurización a 80 °C durante 15 min a fin de

seleccionar los microorganismos esporulados. Alícuotas de estos medios se utilizaron para inocular tubos contentivos de una pluma entera y el medio basal (MBS) salino descrito por (Williams y Shih 1991), el cual contiene por litro de agua: 0,5 g NH₄Cl, 0,5 g NaCl, 0,3 g K₂PO₄, 0,4 g KH₂PO₄, 0,1 g MgCl₂, 6H₂O, y 0,1 g de extracto de levadura. A esta solución salina se ajustó el pH a 7,5 con KOH al 10%. Estos tubos se incubaron a 45 °C por 72 h. Para el enriquecimiento de los microorganismos queratinolíticos y los ensayos cinéticos, se utilizó el MBS descrito y la presentación de las plumas varió dependiendo del tipo de ensayo a ser realizado (enteras o troceadas con tijeras). Los medios se esterilizaron por autoclave (15 min, 15 lbf/pulg² de presión y 120 °C). Para la preparación de los medios se emplearon plumas blancas de pollo, lavadas con abundante agua corriente, esterilizadas en el autoclave (15 min), secadas en la estufa y almacenadas a temperatura ambiente hasta su utilización.

Las sales NH₄Cl, NaCl, K₂HPO₄, MgCl₂, 6H₂O, utilizadas para la preparación de los medios se obtuvieron de la casa comercial Riedel-de-Haën y el extracto de levadura de la casa Difco®.

Durante el enriquecimiento con los microorganismos queratinolíticos, se utilizaron plumas enteras para visualizar el proceso de degradación. Para ello, se introdujeron las plumas en tubos que contenían 5 ml del medio ya descrito. En los medios precultivo y los ensayos cinéticos, se emplearon plumas troceadas con la finalidad de ofrecer un sustrato más homogéneo. En los precultivos se usó una concentración de 5 g/L de plumas troceadas y 20 g/L para los ensayos cinéticos.

La selección de los microorganismos se llevó a cabo en base a su capacidad degradadora de plumas en medios de cultivo contenido este sustrato como fuente de carbono, nitrógeno y energía. En aquellos tubos donde se observó degradación de las plumas, se siguieron transfiriendo alícuotas a otros tubos con medio de plumas hasta lograr un enriquecimiento. Por último, se realizaron aislamientos en agar nutritivo Difco® y se seleccionaron siete colonias morfológicamente diferentes. Cada una de ellas fue inoculada en tubos que contenían MBS fresco

con plumas enteras e incubadas a 40 °C para evaluar su capacidad queratinolítica. Observaciones periódicas del estado de las plumas permitió conocer el grado de desintegración en el tiempo más corto. Al mismo tiempo, en estos ensayos se realizó un control, consistente en un tubo con MBS y pluma entera que no era inoculado.

Conservación de las cepas microbianas.

La conservación de las cepas aisladas se realizó a 40 °C en estrías (cuñas) de medio sólido compuesto por las sales del MBS suplementando con 20 g/L de agar Difco® y 20 g/L de harina de plumas, previamente inoculadas e incubadas a 40 °C. La harina de plumas, obtenida mediante tratamiento fisicoquímico, fue producida en la Planta Proagro de Protinal.

Propagación y cultivo de la cepa LPB-2

Para la propagación de la cepa LPB-2, a partir de las cepas preservadas en estrías a 4 °C, se inoculó un medio precultivo en matraces Erlenmeyer con 30 mL de medio de plumas troceadas (5 g/L) y se incubó a 40 °C por 48 horas en un agitador rotatorio climatizado LAB-LINE, con una velocidad de agitación de 75 rpm. En los ensayos de fermentación, este precultivo permitió estandarizar la cantidad de células iniciales en los cultivos al ser utilizadas en una proporción de 7 % como inóculo inicial. Los ensayos de fermentación se realizaron en matraces Erlenmeyer con baffles que contenían 40 mL de medio con plumas troceadas (20 g/L) y se incubaron a 40 °C y 75 rpm por varios días.

En los ensayos cinéticos, los cultivos se realizaron durante 48 h con una concentración de plumas de 20 g/L y una agitación de 75 rpm, que mostraron ser las condiciones ópticas para lograr una mejor homogeneidad y baja viscosidad del medio. Los valores de temperatura ensayados corresponden a 30, 35, 40 y 45 °C. Se realizó un control en cada condición probada, consiste en un medio no inoculado.

Se realizaron observaciones periódicas al microscopio de frotis teñidos con coloración de Gram y siembra en placas de Petri con agar nutritivo (Oxoid®) para verificar el estado de pureza de los cultivos en el curso de los experimentos.

Toma y tratamiento de las muestras.

A partir de alícuotas de 2 mL de los caldos de fermentación se realizaron las estimaciones de biomasa producida, concentración de GAL, actividad caseinolítica y concentración de ácidos orgánicos. Para ello, la muestra extraída se filtró a través de un disco de papel whatman N° 4 para retener restos de plumas no degradadas. Una fracción de 0,5 mL del filtrado se utilizó para determinar la biomasa producida y el remanente se centrifugó en tubos Eppendorf (12.000 rpm) durante 10 min. Una fracción del sobrenadante recuperado se empleó en forma inmediata para la determinación de la actividad caseinolítica y el resto se congeló a -20 °C hasta ser analizado en su contenido de grupos amino-libres y ácidos orgánicos. De igual modo, el volumen total de un Erlenmeyer contentivo de 40 ml de caldo de fermentación del microorganismo con plumas troceadas en MBS, se utilizó para la estimación del porcentaje de plumas digeridas.

Determinación de la biomasa microbiana.

La evaluación del crecimiento no es fácil cuando se están utilizando sustratos complejos e insolubles como las plumas, ya que éstas se mantienen en suspensión en el caldo de fermentación afectando las estimaciones de la biomasa bacteriana. Es por esta razón, que el presente trabajo se hizo necesario diseñar una metodología que permitiera eliminar la interferencia producida por el sustrato mediante la elaboración de una curva patrón en la que se relacionó la absorbancia de los medios de cultivo con el peso seco de las células bacterianas. Todo el contenido de un cultivo en Erlenmeyer con medio de plumas troceadas, se filtró a través de papel whatman N°4 y con la suspensión celular obtenida, se prepararon diluciones seriadas de 30 ml en tubos con agua destilada. Una fracción de 25 ml de cada una de estas diluciones se colocó en tubos de propileno (prepesados) y

se centrifugó a 6000 rpm por 20 min. El sobrenadante obtenido se descartó y el sedimento celular se resuspendió con 25 ml de agua destilada (este procedimiento se repitió dos veces). Finalmente, los tubos con el pellet celular se colocaron a 100 °C por 12 h y, transcurrido este tiempo, se dejaron a temperatura ambiente por 1 h antes de ser pesados nuevamente. Con los 5 ml restantes del filtrado, se determinó la densidad óptica a 600nm. Estos valores se correlacionaron con la diferencia de peso obtenida en cada caso para construir la curva de calibración.

Determinación del porcentaje de plumas digeridas (PPD)

La evaluación del PPD se llevó a cabo mediante un método gravimétrico. Para el fin, se filtraba todo el contenido de un erlenmeyer con medio de plumas a través de un disco de papel whatman N°4 prepesado, de manera de retener las plumas no digeridas. Luego, del papel con el material retenido se secó a 100 °C por 24 h y se dejó a temperatura ambiente por 2 h antes de pesarlo nuevamente. La diferencia de peso obtenida correspondía a la cantidad de plumas no digeridas en un tiempo cualquiera de la fermentación. La diferencia entre este valor y el obtenido experimentalmente en el tiempo cero de curso de una fermentación, permitió calcular en términos de porcentaje la cantidad de plumas digeridas (PPD).

Determinación de grupos amino libres (GAL)

La determinación de la capacidad de degradación de las plumas por la cepa LPB-2 se estimó cuantificando la concentración de GAL presente en el medio de fermentación mediante el método colorimétrico de ninhidrina 6.

Actividad caseinolítica

La actividad caseinolítica fue determinada por el método de Kunitz 2 modificado, basado en la determinación del incremento en absorbancia a 280 nm como consecuencia de la liberación de aminoácidos por la acción de proteasas sobre la caseína. Una unidad (U) de actividad caseinolítica se definió como la cantidad de enzima requerida que produjo un incremento de una unidad de absorbancia a 280 nm en 1 min.

Determinación de la producción de ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos en el caldo de fermentación fueron analizados por cromatografía líquida de alta eficiencia WATERS 600, previa desproteinización y clarificación de los caldos de fermentación, empleando una columna SHODEX (RSPACK) K-811 y una fase móvil de ácido fosfórico 0,8% a una temperatura de 45 °C.

Resultados

Aislamiento e identificación de los microorganismos queratinolíticos

Durante el aislamiento en agar nutritivo, se seleccionaron siete colonias morfológicamente diferentes que tenían la capacidad de degradar las plumas, sin embargo, se eligió aquella que en medio líquido con plumas mostró mayor degradación de este sustrato en el menor tiempo posible, aislando una cepa bacteriana que degradó las plumas enteras en tres días de incubación la cual fue designada como LPB-2.

Cinética de degradación del sustrato

La figura 8 muestra que tanto la concentración de GAL como el PPD, siguen la misma tendencia en relación a la magnitud de la degradación de las plumas. La cepa LPB-2 logra en 32 h de incubación, una degradación del sustrato de 35% correspondiente a 22 mmol/L de GAL, tiempo a partir del cual disminuye la velocidad de degradación del sustrato y no se modifican significativamente los resultados.

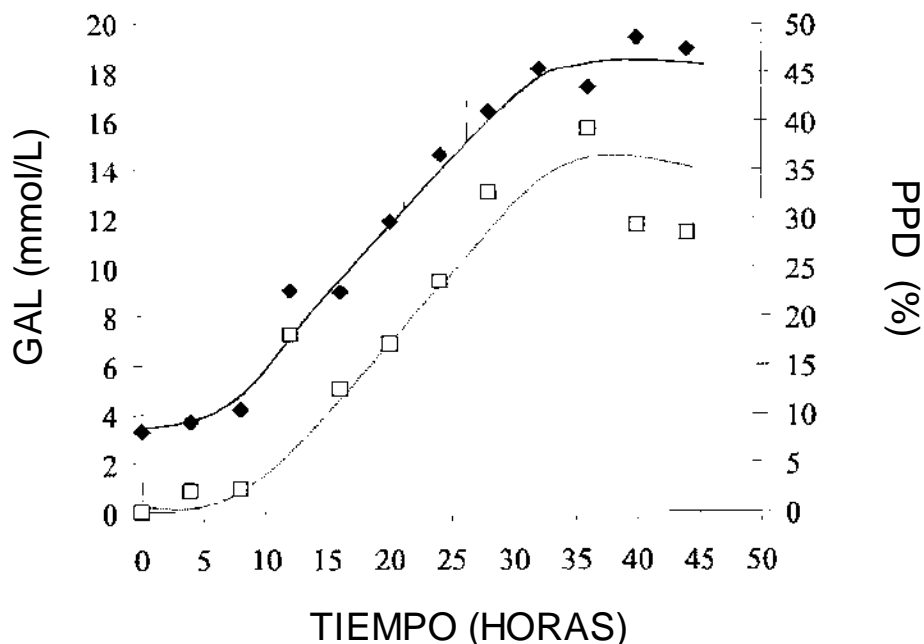


FIG. 9. Estimación de la degradación de las plumas por la cepa de *Bacillus* LPB-2 mediante la determinación de la concentración de GAL (▪) y cantidad de plumas digeridas expresadas en porcentaje (□) en el medio de cultivo.

Producción de ácidos orgánicos

La evaluación de la capacidad de producción de ácidos orgánicos como subproductos de fermentación por la cepa LPB-2 a partir de la degradación de las plumas señala que bajo las condiciones establecidas, esta cepa no produjo a las 36 h de cultivo, cantidades significativas de los ácidos cítrico, glucónico, málico, láctico, propiónico o butírico y, muy poco de ácido acético (0,05 g/l).

Discusión

Al igual que en otras cepas bacterianas queratinolíticas aisladas, no se ha podido conocer con exactitud si las mismas provienen del tracto gastrointestinal de las aves que llegan al suelo con sus excrementos o son parte de la microflora edáfica

de los sitios de cría de estos animales. En cualquier caso, es evidente que estos microorganismos se ha adaptado utilizar como fuente de carbono y nitrógeno, elementos queratinolíticos, poco convencionales pero abundantes en muchas regiones. Ello brinda la oportunidad de explotar su potencial como alternativa para el aprovechamiento de dichos desechos queratinolíticos, subutilizados hasta ahora por su poco valor nutritivo.

Las observaciones realizadas por microscopía electrónica mostraron que la cepa aislada corresponde a un bacilo Gram positivo que mide $2,4 \times 0,64 \mu\text{m}$, formador de endosporas, cuyas colonias son blandas, grandes y con bordes difusos en agar nutritivo (VIDAL 1999). Por otro lado, las observaciones hechas al microscopio óptico indicaron la adsorción de células a la superficie de los restos de plumas, que puede interpretarse como una ventaja estratégica para concentrar la cantidad de enzimas secretadas en un sitio específico y lograr así un mejor aprovechamiento de la fuente de carbono soluble; tal como se ha sugerido para otros microorganismos que se adsorben sobre sustrato (VIDAL 1999).

En base a los resultados obtenidos, se determinó que en la máxima velocidad específica de crecimiento de la cepa LPB-2 fue $0,21 \text{ h}^{-1}$, alcanzada a las 24 h. En concordancia con lo anterior, se observó que la cinética de la actividad proteolítica muestra un patrón de secreción de estas enzimas, asociado al crecimiento celular, decayendo ambos después de 24 h de incubación. Resultados similares han sido reportados en otra cepa degradadora de plumas (*Kocuria rosea*) (VIDAL, NONUS 1999). Cuando se correlacionan estos resultados con el porcentaje de plumas degradadas (PPD) y la concentración de GAL, se tiene que a las 24 h casi se ha degradado el 24 % de las plumas obteniéndose aproximadamente 15 mmol/l de GAL, indicando este resultado que no existen problemas por agotamiento del sustrato. Sin embargo, la disminución de la biomasa bacteriana y la actividad enzimática puede ser distribuida a efectos inhibitorios por productos formados durante la fermentación o por cambio en el pH del medio. En cultivos de *Aspergillus fumigatus* en medio con harina de plumas se ha observado que la actividad proteolítica es afectada por el pH del medio. Es posible que la inhibición

esté acompañada por descensos en el pH del medio de fermentación que podría producir la inactivación de las enzimas excretadas por esta cepa. El rendimiento obtenido a las 36 h fue de 0,24 g de biomasa bacteriana/g de plumas degradadas.

Las actividades enzimáticas obtenidas pueden ser el resultado de una o varias proteasas presentes en el caldo de fermentación. La bibliografía reporta la presencia de varias proteasas en los caldos de fermentación de cultivos de cepas de *Trichophyton mentagrophytes* y de cepas de *Scopulariopsis brevicaulis* en medios de cultivo que incluían en su formulación sustratos de naturaleza queratinosa. La determinación de número de proteasas presentes en los caldos de fermentación su purificación y caracterización bioquímica proporcionaría más información para profundizar en la fisiología de la cepa aislada y en el adecuado diseño de los procesos industriales conducentes a la obtención de proteasas (queratinasas).

Recomendaciones

La cepa de *Bacillus spp* LPB-2 aislada, exhibe características de especial interés para la degradación de material queratinolítico como el que constituye a las plumas de aves de corral. Las condiciones óptimas para determinar las cinéticas de crecimiento microbiano y degradación del sustrato fueron 20g/L de plumas, 75 rpm y 40 °C. Bajo estas condiciones, se observó que la actividad proteolítica está asociada al crecimiento bacteriano, alcanzando el máximo valor a las 24 h (0,28 U/mL y 1,6 g/L respectivamente). La concentración de GAL y el PPD siguen la misma tendencia en la magnitud de la degradación de las plumas; la cepa LPB-2 degradó el 35 % del sustrato en 32 h de incubación correspondiente a 22 mmol/L de GAL.

Los ensayos en fermentadores con semicontinuos (“Feed-batch”) o continua permitiría dosificar la entrada del sustrato y la salida del hidrolizado y regular parámetros como el pH, controlando así, la inhibición de ciertos componentes del medio sobre la síntesis de proteasas o la reproducción bacteriana. Además, debe

determinarse el valor nutricional de los hidrolizados obtenidos mediante el análisis de los perfiles aminoacídicos y las pruebas de digestibilidad.

Su uso potencial, no sólo para la obtención de hidrolizados de mejor calidad nutritiva sino para el posible enriquecimiento proteico, se podrá demostrar mediante estudios posteriores, en los que se determine la composición de aminoácidos del hidrolizado proteico y su digestibilidad a través de ensayos con aves alimentadas con raciones que contienen este suplemento proteico.

Por otro lado, la posibilidad de utilizar este microorganismo como productor de queratinas abre nuevas alternativas para el tratamiento no sólo de las plumas sino de otros materiales queratinolíticos

12.5. Obtención de SCP a partir de pomasa de manzana

El objetivo de este estudio es el emplear manzana de desecho o pomasa de manzana que es el residuo generado en el proceso de extracción de jugo de manzana y representa entre 15 y 20% de la fruta procesada (Becerra, 2006; Rodríguez-Muela *et al.*, 2010), para la obtención de manzarina.

Manzarina es un producto fermentado obtenido a partir de manzana o de subproductos de manzana (*Malus domestica*), este producto fermentado tiene un valor proteico mayor que el que tienen los productos de los que se obtiene bagazo de manzana o manzana de desecho, (Díaz, 2006; Rodríguez-Muela *et al.*, 2007; Becerra *et al.*, 2008; Rodríguez, 2009; Rodríguez-Muela *et al.*, 2010).

Metodología

Para la realización de este estudio se preparó:

- 300 ml de Manzana molida (MA) más 1 g de levadura.
- Adición de 1% de Urea.
- 0.2% de sulfato de amonio.
- 0.5% de premezcla de vitaminas y minerales traza.
- Se aforo a 1,000 mL con agua destilada.

- Se le adaptó un oxigenador con la finalidad de inyectar el oxígeno necesario para la producción de las levaduras ya que es una fermentación aeróbica, solida sumergida.

En el conteo de levaduras se observó un efecto ($P < 0.01$) de interacción de tratamiento con levaduras y tiempo, esto indica que hubo diferencias en la cantidad de levaduras en el sustrato utilizado.

Díaz-Plascencia *et al.*, (2010) en otro estudio similar utilizaron la técnica fermentación solida sumergida (FSS) y reportaron la mayor producción de levaduras de 2.2×10^9 cel*/ml/L en la hora 96 al utilizar la melaza como medio de sustrato y la levadura *Kluyveromices Lactis* obtenida de la manzana (*Malus domestica*) utilizando 1g de levadura, 1.2 g de urea, 0.2 g de sulfato de amonio, 0.5 g de premezcla de vitaminas y minerales traza, en las diferentes horas de fermentación (0, 12, 24, 48 y 96 h). El incremento en la calidad nutritiva de algunos sustratos fermentados, se puede atribuir en gran parte al incremento de la población de levaduras, es conocido desde hace décadas que su valor proteico es alto y debido a esto, como concentrado, las levaduras pueden ser comparables a la pasta de soya, aun y cuando su contenido de metionina es bajo.

12.6. Obtención de SCP a partir de bagazo de caña de azúcar (melaza)

La melaza es el subproducto de la fabricación o refinación del azúcar crudo. Nutricionalmente presenta un altísimo contenido en carbohidratos además de vitaminas del grupo B y abundantes minerales, entre los que destacan el hierro, cobre y magnesio. Su contenido de agua es bajo.

La NMX (NORMA OFICIAL MEXICANA) F-036 de 1997, define como miel fina o melaza (no cristalizable) al jarabe liquido denso o viscoso, separado de la misma masa cocida final y de la cual no es posible cristalizar más azúcar por métodos usuales (Fajardo y Sarmiento ,2007).

Su principal uso es como suplemento energético para la alimentación de ganado por su alto contenido de azúcares y su bajo costo en algunas regiones, aunque el precio de la melaza se ha incrementado en los últimos años, en más del 122% debido a su utilización como sustrato en la producción de etanol (Mancheno, 2004). No obstante, una pequeña porción de la producción se destina al consumo humano, empleándola como endulzante culinario, producción de bebidas como el ron, producción de ácido butírico y acetona y elaboración de levadura de melaza (Meade, 1986).

Obtención de la melaza

La melaza se obtiene como subproducto final de la elaboración del azúcar de caña en la figura 9 se muestra un cuadro resumido de su obtención.

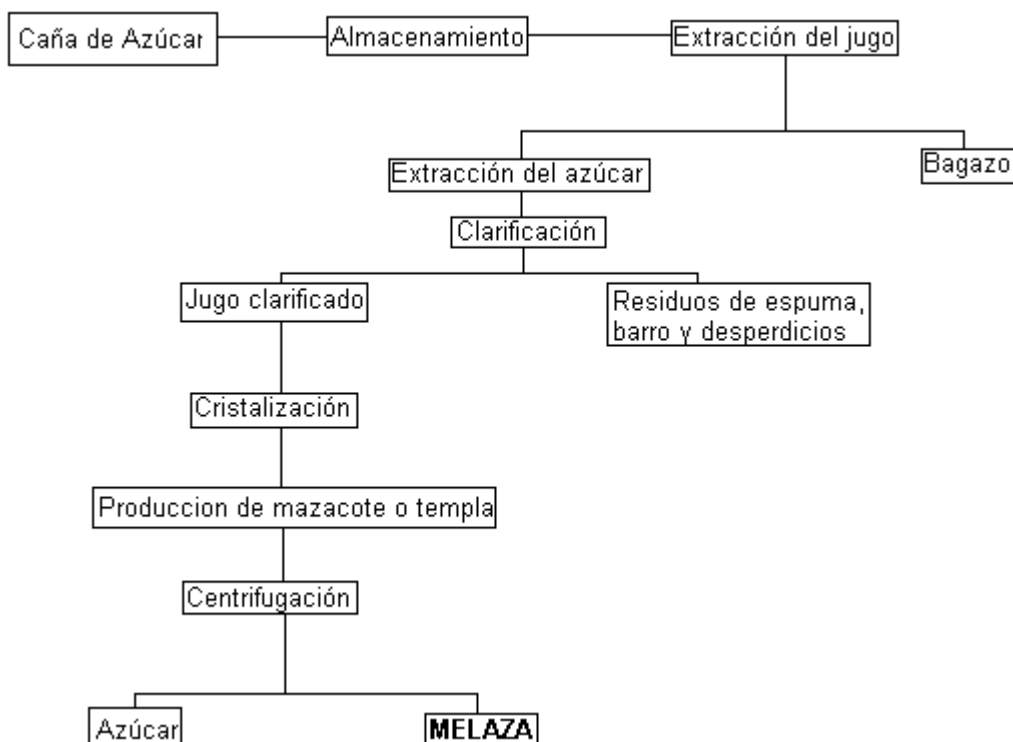


FIG. 10. Proceso de obtención de la melaza.

Tratamiento previo de la melaza antes de la fermentación

Antes de realizar el proceso de fermentación alcohólica, es necesario someter la melaza a tratamientos previos para acondicionarla.

Esterilización

Las melazas pueden contener microorganismos que pueden ser nocivos para la fermentación. El más común es la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, el cual polimeriza las moléculas de sacarosa en dextranos no fermentables (Biocombustibles, 2007).

Dilución

La altísima concentración de azúcares y sales presentes en las melazas impiden que los microorganismos puedan fermentarlas, debido a la gran presión osmótica que generan sobre sus paredes celulares; asimismo, las melazas son altamente viscosas, y su manipulación es difícil en estas condiciones. Por estas razones, es necesario diluir las melazas; para ello, se les agrega agua, hasta obtener diluciones de 25° Brix o menores; a valores mayores se tiene el riesgo de inicios lentos de fermentación y contaminación bacteriana (Biocombustibles, 2007).

Tabla 20. Composición de la melaza.

CONSTITUYENTES PRINCIPALES	COMPONENTES	PORCENTAJES EN PESO (% p/p)
Agua	Agua	17 – 25
Azúcares	Sacarosa	30 – 40
	Glucosa	4 – 9
	Fructuosa	5 – 12
	Otras sustancias reductoras	1 - 4
Otros Carbohidratos	Gomas, almidón, pentosanos, Ácidos urónicos, D-manitol y otros.	2 - 5
Cenizas	Carbonatos bases:	
	K ₂ O	7 -15
	CaO	30 – 50
	MgO	7 – 15

	Na ₂ O	2 – 14
	Ácidos:	0.3 – 9
	SO ₃	7 – 27
	Cl	12 – 20
	P ₂ O ₅	0.5 – 2.5
	SiO ₂	1 – 7
Compuestos nitrogenados	Proteína bruta, Proteína verdadera, Aminoácidos: Ácido aspártico y glutámico	2.5 -4.5 0.5 – 1.5 0.3 -0.5
Ácidos no nitrogenados	Ácido aconítico, Cítrico, Málico, Oxalico, Glicólico, Mesaconico, Succínico, Fumarico, Tartarico	1.5 – 6 0.5 – 1.5
Ceras, esteroides y lípidos	-----	0.1 – 1
Vitaminas	Vitamina A, Biotina, Niacina, Ácido pantoténico, Rivo flavina, Tiamina.	Cantidades variables

FUENTE: BIOCOMBUSTIBLES, 2007

12.7 Obtención de SCP a partir de porquinaza.

A nivel mundial, el mayor problema que enfrentan las explotaciones porcinas es la generación de excretas, que al tener un gran potencial de nutrientes, contaminan el ambiente y pueden llegar a constituirse en el principal obstáculo para el futuro desarrollo de la industria animal. Las excretas de cerdo se han manejado tradicionalmente en un sistema cerdos-pasto-leche, aprovechando el mejoramiento de los suelos para pastos con la fertilización de materia orgánica para lograr una mayor producción de leche.

Para utilizar los contenidos de nutrientes que contiene en especial la porquinaza, se puede pensar como alternativa la conversión a proteína unicelular, en un proceso de fermentación en estado sólido con microorganismos.

Bajo la presión de producir alimentos en sistemas que mantengan estables su producción y rentabilidad a largo plazo, sin generar inequidad social y preservando todos los recursos naturales, ha cobrado especial importancia el uso de las excretas porcinas como ingrediente alimenticio en la dieta de otras especies y

como fertilizante para las praderas, ya que ofrecen un gran potencial para generar recursos adicionales al productor.

Así mismo, su reincorporación como un ingrediente alimenticio y como parte importante en la calidad suelo-planta, representa una alternativa importante dentro de un programa pecuario, constituyéndose entonces en una propuesta tecnológica viable desde el punto de vista ecológico, biológico y económico.

Problemática ambiental del manejo de la porquinaza

Los países en desarrollo a pesar de ser fundamentalmente agrícolas, no disponen de las condiciones climáticas ni del avance tecnológico que les permitan obtener cosechas productivas de cereales y granos con el fin de sustentar una producción pecuaria intensiva tradicional en gran escala.

Los costos de alimentación en cualquier sistema de producción animal representan entre el 67 y el 83% de los costos totales, dependiendo de la intensidad de la producción y del costo relativo de los alimentos.

Lo primero que se requiere para el uso adecuado de un ingrediente en la ración de los animales es su presencia en el mercado, luego que su calidad y precio permitan su inserción en un programa de alimentación y, finalmente que la inclusión del alimento sea posible física y técnicamente.

Composición química de la porquinaza

La porquinaza está formada por heces fecales y orina mezclados con el material utilizado como cama, residuos de alimento, polvo, otras partículas y una cantidad variable de agua proveniente de las labores de lavado y pérdidas desde los bebederos.

Tabla 21. Producción de materia fecal y orina como proporción del peso vivo semillero de investigación en Gestión y Medio Ambiente SIGMA

Estado	Promedio	Rango
Hembra vacía	4.61	3.3-6.4

Hembra gestante	3.00	2.7-3.2
Hembra lactante	7.72.	6.0-8.9
Macho reproductor	2.81	2.0-3.3
Lechón lactante	8.02	6.8-10.9
Precebos	7.64	6.6-10.6
Levante	6.26	5.9-6.5
Finalización	6.26	5.7-6.5

FUENTE: PEREZ, MIGUEL 2004

La orina representa aproximadamente el 45% de la porquinaza, y las heces, el 55%. El contenido de humedad de la porquinaza está alrededor del 88%, y el contenido de materia seca es del 12%. La excreción de sólidos es del 90% en heces y 10% en orina.

La densidad de la porquinaza fresca es ligeramente menor de 1.0 Km/l, aunque son comunes las referencias de valores ligeramente superiores a esta cifra. El total de los sólidos tiene una densidad baja, de 0.84 Kg/l. La porquinaza porcina tiene sólidos que flotan, otros que se sedimentan y algunos están en suspensión.

Diariamente se producen 0,25 Kg. de demanda biológica de oxígeno (DBO), y 0.75 Kg. de demanda química de oxígeno (DQO) por cada 100 Kg de peso vivo. Por lo general, la DBO es un tercio de la DQO y cerca de un tercio de los sólidos totales en porquinazas porcinas frescas.

El PH varía entre 6.0 y 8.0. Mientras más frescas sean las porquinazas, más neutro será su pH. La alcalinidad y conductividad son propiedades más del agua de lavado y de bebida, que propiamente de la porquinaza. La temperatura de la porquinaza fresca al momento de su expulsión es la misma que la del cuerpo del cerdo. Poco después, la porquinaza alcanza la temperatura del piso y de la instalación que estará fuertemente determinada por la temperatura del agua con la cual se mezcle.

La composición nutricional de la porquinaza es afectada principalmente por estas variables: variaciones en la formulación de las dietas utilizadas, el método de procesamiento y manejo de la porquinaza, la etapa productiva, el ambiente y el manejo de los cerdos.

13. CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS DE LA SCP

La biotecnología nació en el mismo instante en que se inicia la investigación con proteína unicelular (Israelidis, 2003). Antes de esto la fermentación industrial se aboca únicamente a la producción de derivados farmacéuticos, antibióticos, etc.

La SCP trata de buscar un nicho en un mercado sumamente competitivo, donde en este momento económico no encuentra la mejor de las perspectivas. Quizás fue por esta misma dificultad económica que fueron fuertes y consolidadas compañías petroleras las que iniciaron la investigación y no empresas de alimentos. Ellas tenían la tecnología, la infraestructura y hasta el lujo de no esperar ganancias sustanciales en el proceso.

A pesar de que existen plantas industriales en Estados Unidos, Finlandia, la antigua Unión Soviética, Alemania, Cuba, Suiza y Suecia (Arias 2003); estas no ofrecen un bloque consolidado ni reflejan en lo más mínimo una incipiente industria.

La verdad es que los esfuerzos que se han hecho para emplear la SCP como suplemento seco en dietas animales y humanas con la finalidad de combatir el hambre y aumentar la productividad no han dado los resultados esperados (Israelidis, 2003).

El problema está en mucho en el hecho de que un nuevo alimento no solo debe ser nutricionalmente valioso, sino que además debe ser organolépticamente satisfactorio y económicamente rentable. Estos dos apartados son el “talón de Aquiles” de la SCP y a la vez el reto del profesional en alimentos.

Es un hecho que en el comercio y la industria, donde las fuerzas de mercado operan, la proteína unicelular no encuentra aún un nicho competitivo. Bajo las condiciones actuales sustanciales mejoras en todos los sentidos deben ejecutarse

para que la SCP pueda llegar a ser competitiva con otras fuentes de proteína más atractivas como la soja, la alfalfa o la harina de pescado.

Actualmente solo la producción de hongos filamentosos a partir de materiales lignocelulósicos pareciera aspectarse como una posibilidad rentable (Israelidis, 2003).

Solo existe un camino para que la SCP tenga un suceso futuro: los problemas correspondientes al campo organoléptico deben ser solucionados por el tecnólogo de alimentos, y el proceso debe llegar a ser competitivo en comparación con las otras ofertas existentes. Así mismo deben contemplarse posibilidades donde la SCP se produzca a un bajo costo en procesos donde se experimente con combinaciones simultáneas de muchos microorganismos, o bien, recoger la SCP cuando esta sea un subproducto de otras actividades más rentables (Durán 1989).

14. CONCLUSIONES

A modo de concluir con el tema proteína unicelular se dice que el término ha sido utilizado en las últimas décadas para hacer referencia al desarrollo de diferentes procesos que involucra la nutrición de los distintos microorganismos que se encuentran presentes en los distintos alimentos como lo son por ejemplo las bacterias que se hayan en los quesos o yogurt, estos contienen un alto porcentaje de proteínas en su contenido.

El proceso de la producción de proteína unicelular puede llevarse a cabo mediante varias etapas, teniendo en cuenta distintos métodos o principios. La producción se puede ver afectada por restricciones del tipo económico más que tecnológico.

En el estado de Michoacán tenemos gran variedad de desechos que se puede utilizar como medio de crecimiento, pero en nuestra región hay una gran producción de maíz por lo que se pueden obtener las levaduras que crecen en

este medio y son *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces castelli*.

En la actualidad se presentan serios problemas respecto con la alimentación, ya que nuestro País se encuentra dentro de los primeros lugares de obesidad esto debido a la ingesta de comida rápida o chatarra, con este estudio se pretende mostrar que hay maneras fáciles de obtener un cuerpo sano y saludable, el ser humano puede usar una alternativa más para tratar de mejorar la alimentación y por lo tanto alargar su vida.

Aunque en este tiempo no es muy económico obtener la proteína para el consumo humano se espera que se realicen estudios que nos ayuden a mejorar el costo de esta, ya que para el caso de algunos animales ya se está utilizando y con resultados muy positivos.

15. RECOMENDACIONES

No puede haber mejor recomendación que exigir un método por el cual se obtenga proteína unicelular que cumpla absolutamente con todos los requisitos que se necesitan para el consumo humano y que además sea económico, esto es difícil yo lo sé pero si se llega a encontrar este método imagínense la cantidad de hambre que se va a combatir, además ayudarían a las generaciones venideras para que tengan una mejor calidad de vida y a un bajo costo.

Dar orientación a las personas que se dedican a la crianza de animales que también hay otra manera de alimentarlos sin la necesidad del alimento de engorda, que es mucho más natural y además económico, que sepan que pueden utilizar muchos desechos agrícolas o industriales para su beneficio.

Buscar un método que nos ayude a obtener la proteína unicelular a un menor costo para que muchas personas puedan tener acceso a ella sin la necesidad de perder grandes cantidades de dinero que bien pueden utilizar en otras de sus necesidades.

LITERATURA CITADA

A.O.A.C. 1975. Official methods of Analysis. Ed. Wahington D.C: 47021. Pag. 927
CACERES, A. 1996. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria Guatemala.

ALBORNOZ, I y SÁNCHEZ CRISPÍN, J. 1992. Producción de biomasa enriquecida en metionina intracelular por un mutante de *Saccharomyces cerevisiae*. Acta Científica Venezolana. ULA. Mérida.

ANIDO, V. 1943. Técnicas clínicas e interpretaciones. Fraguio Cultural, S.A. La Habana, Cuba.

ARIAS, L. 2001. Para sacarle más jugo a la naranja (en línea). Consultado 6 de noviembre 2012. Disponible <http://www.dnic.unal.edu/unperiodico/abril2001/textos/ciencia.htm>

BECERRA B., A. 2006. Aprovechamiento de Subproductos de Manzana Mediante la Producción de Proteína Microbiana con Fermentación en Estado Sólido para la Alimentación Animal. Disertación Doctoral. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. México.

BECERRA, A., RODRÍGUEZ, C., JIMÉNEZ, J., RUIZ, O., ELÍAS A. & RAMÍREZ, A. 2008. Urea y maíz en la fermentación aeróbica de bagazo de manzana para la producción de proteína. Tecno ciencia Chihuahua 2:7.

BERGQUIST, B.; JURGENSON, J. 2003. Utilisation of polyvinyl alcohols for the production of single cell protein by microbial fermentation in enclosed systems (en línea). Consultado 22 de noviembre 2013. Disponible <http://www.uni.edu/~rrttc/POLY/>

BIOCITY. 2003. Levaduras (en línea). Consultado 24 de noviembre del 2013. Disponible <http://biocity.iespana.es/biocity/micro/leva.htm>

BUSTAMANTE, Z; GALINDO, E.; HUANTA, M&BALLESTEROS, F. 2003. Obtención de bioproteína a partir de bagazo de naranja (*Citrus sinensis*) con *Aspergillus Niger* (en línea). Consultado 18 de diciembre 2012. Disponible <http://www.umss.edu.bo/epubs/earts/htmls/49.html>

BUTOLO, E.A.F; NOBRE, P.T.C.; BUTOLO, J.E & SERAFINI, F.V. 2003. Utilização da levedura de cana-deaçúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) Em Dietas Para Frangos De Corte. Brazil (en línea). Consultado el día 23 de noviembre 2013. Disponible <http://www.supremais-.com.br/03.htm>.

CACERES, A. 1996. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria Guatemala

CHICAS, M; PORRAS, A & SOTO, S. 1999. Producción de proteína unicelular a partir de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando un medio elaborado con banano (en línea). Consultado 19 febrero 2013. Disponible http://www.itcr.ac.cr/carreras/biotecnologia/trabajos_de_investigacion/produccion_proteina_unicelular.htm.

CHINAPPI, Italia. 1996. Producción de biomasa para alimentación animal por *Kluyveromyces fragilis* crecida en suero de leche. Tesis de grado para optar al título de Magister Scientiae en Biotecnología de Microorganismos. ULA, Mérida-Venezuela.

COMPAGNO, C., PORRO, D., SMERALDI, C., RANZI, M. 1995. Fermentation of whey and starch by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl Microbiol. Biotechnol*, 43: 822-825.

CRUEGER, W & CRUEGER, A. 1989. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Zaragoza España. Ed. Acribia. 413 p.

DE GREGORIO, A *et al.* 2002. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. *Bioresource technology* 83(2): 89-94.

DE MULDER, E, VAN DAMME, P & VRIERS, L. 1989. Incorporation of brewery activated sludge single cells proteins in diets for *Clarias gariepinus* (en línea). Consultado 15 abril 2013. Disponible <http://www.geocities.com/rainforest/canopy/5280/bscp.htm>

DÍAZ P., D. 2006. Producción de proteína microbiana a partir de Manzana de Desecho Adicionada con Urea y Pasta de Soya. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua. México.

DOMENECH, P.; CHRISTEN, F.; REVAH, S. 1995. Evaluación de diferentes cepas de *Candida utilis* sobre la bioconversión de etanol en medio líquido y estudio de la bioconversión de etanol en medio sólido. UAM – Iztapalapa. México.

DORÁN, P. 1995. Principios de Ingeniería de Bioprocesos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España.

DURAN, N. 1989. Bioconversion to single cell protein: recovery of lignocellulosic materials to produce human food as an integrated process. *Alimentos*. 14 (4): 39-50

EDV, 2003. Nutriente de control inmunitario (en línea). Consultado 15 de diciembre 2012. Disponible <http://www.edv.com.ar/nut-inmu.htm>

ESTÉVEZ, R. 1998. Influencia de la concentración de azúcares sobre la producción de levadura torula. *Rev. ICIDCA* 7(3): 61-63. La Habana. Cuba.

F.A.O. 2003. Single Cell Protein (en línea). Consultado 20 marzo 2003. Disponible <http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/AFRIS/Data/734.htm>

FAJARDO C., Erika E., Sarmiento F., Sandra C. 2008. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyce cereviseae*. Pontificia Universidad Javeriana de Colombia. Facultad de ciencias Básicas. Microbiología Industrial. Bogota 2008.

FARMLAND INDUSTRIES. 1999. Torula driest yeast.

FERNANDEZM. 2009. Production and Characterization of xanthan gum by xanthomonas campestris using cheese whey as sole carbon source. Ed. Rev. Volumen 90. N°1. 119-123 p. Journal of Food Engineering. [Consultada el 15 de octubre del 2012]. También disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877408002835>

GADDY, J. 2002. Biological production of products from waste gases. Official Gazette of the United States Patent and Trademark Office Patents. 1254 (4): sp.

GARCÍA, V; ANTILLÓN, F & ARIAS, M. 1994. Manual de Laboratorio de Microbiología de Alimentos. Ed. U.C.R. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San José, Costa Rica. 86 p.

GASPAR, REBECA. 1996. Producción de proteínas unicelulares por fermentación de desechos de plátanos (Musa AAB). Trabajo de grado para optar al título de Magister Scientiae. ULA. Mérida.

GEANKOPLIS, C. 1993. Procesos de transporte y operaciones unitarias. 2da edición. México D.F, México. Ed. CECSA. 759 p.

GOEL, M. K. 1994. Biotechnology: An overview (en línea). Consultado 28 de enero 2012. Disponible <http://www.cape.canterbury.ac.nz/Archive/goel.html>.

HART, L & FISHER, H. 1971. Análisis moderno de los alimentos. Zaragoza, España. Ed Acribia. p. 619.

HERNÁNDEZ, E; MAZA, E, LOZANO, N. 1979. Producción de proteína unicelular mediante cultivo continuo de levadura en suero de leche desproteinizado. Revista de la Facultad de Agronomía. 5 (2): 468-477

HERNANDEZ, F.; EGORBURO, M; LEQUERICA, J.L.; MARTIN, I. Y LA FUENTE B. 1975. Aprovechamiento de subproductos cítricos. Enriquecimiento en proteínas de pienso de corteza de naranja mediante desarrollo de levaduras. Rev. Agroquímica Tecnología Alimentaria 15(8):415-422.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS, Ed B-1, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo., CP. 58030 Morelia, Michoacán.

ISRAELIDIS, C. 2003. Single cell protein nutrition, twenty years later (en línea). Consultado el día 20 de octubre 2012. Disponible <http://business.hol.gr/~bio/HTML/PUBS/VOL1/isreali.htm>

JAGNOW, G. Y DAWID, W. 1991. Biotecnología. Introducción con experimentos modelo.

KEIL, H. 1995. Single Cell Protein (en línea). Consultado 19 de febrero 2012. Disponible <http://www.brunel.ac.uk/depts/bl/project/microbio/envmic/methbac/single.ce.htm>.

KURBANOGLU, E.B & ALGUR, O.F. 2002. Single cell protein production from ram horn hydrolysate by bacteria. Bioresource technology. 85(2):125-129.

Lee, B. 2000. Fundamentos de Biotecnología de los Alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España.

LEE, KI-YOUNG y LEE, SUNG-TAIK. 1996. Continuous process for yeasts biomass production from sugar beet stillage by a novel strain of *Candida rugosa* and protein profile of the yeasts. J. Chem. Tech. Biotechnol.66: 349-354.

LEQUERICA, J.L.. Y LA FUENTE, B. 1977. Aprovechamiento de subproductos cítricos. Fermentación en medio de suspensión de corteza de naranja por *Candida utilis*. Rev. Agroquímica. Tecnología Alimentaria 17 (1) 71-77.

LONDOÑO, M. 2009. Bebida fermentada de suero de queso fresco inoculada con *Lactobacillus casei*. Revista Facultad Ed. Rev. Volumen 61. N°1. Colombia: Medellín. Revista Facultad Nacional de Agronomía. ISSN: 03042847. [Consultada el 15 de octubre del 2013]. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=179914077017>

LUCCA, M.E., ROMERO, M.E., CALLIERI, D. 1995. Continuous culture of *Candida utilis*: Influence of medium nitrogen concentration. World Journal of Microbiology & Biotechnology: 11, 515-519.

MANCHENO GNECCO, JOSÉ. 2004. El precio de la melaza continua creciendo. Nota técnica Sucromiles S.A.

MARCHAND, G. 1997. Inorganic: Spray torula yeast.

MEADE P., GEORGE. 1986. Manual del Azúcar de Caña. Montaner y Simón S.A Barcelona. p: 305-325.

MENDOZA, M. 2006. Obtención y caracterización de dos concentrados proteicos a partir de biomasa de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* cultivada en suero lácteo desproteínizado. Ed. Rev. Venezuela Revista Científica, Universidad de Zulia. ISSN: 07982259 [Consultado el 14 de Octubre del 2012]. Formato web. Disponible <http://www.redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=95911641014>.

MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL Y DEL SUELO. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Nuevo León, AP. 414, CP. 64000. San Nicolás de los Garzas, N.L. México.

OKOS, M.; DALE M. 1994. Conversion of waste carbohydrates to fuels, chemicals and single cell protein (en línea). Consultado 22 marzo 2012. Disponible http://abe.www.ecn.purdue.edu/ABE/Research/research94/REPORT.94.Book_62.html.

PEDRAZA, G.X. 2003. Aplicación de la biotecnología apropiada para la producción de proteína unicelular a partir de spirulina máxima (en línea). Consultado 1 de febrero 2012. Disponible <http://www.colciencias.gov.co/simbiosis/proyectos/spirulina.htm>.

PELIZER, L.H. 2003. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. Journal of food engineering. 56(4), p. 371-375.

PEREZ MIGUEL. Política Cubana de recuperación de todo tipo de desperdicios y subproductos para la producción porcina y saneamiento ambiental. Instituto de investigaciones porcinas. Ciudad de la Habana. [2 de abril de 2012] URL. Disponible http://www.fao.org/ag/frg/APH134/cap_10.htm

PHETTEPLACE, H; JAROSZ, M; UCTUK, D.; SPORLEDER, R. 2003. Evaluation of single cell protein as a protein supplement for finishing cattle (en línea). Consultado 18 de febrero 2012. Disponible <http://ansci.colostate.edu/documents/renut/2000/hp00.html>.

PIONTEK, M., HAGEDORN, J. y HOLLENBERG, C. 1998. Two novel gene expression systems based on the yeasts *Schwanniomyces castelli* and *Pichia stipitis*. Appl Microbiol Biotechnol, 50: 331-338.

POLLARD, D.J; BUCCINO, R; CONNORS, N.C; KIRSCHNER, T.R; OLEWISNKI, R.C; SAINI, K.; SALMON, P.M. 2001. Real-time monitoring of a fungal fermentation at pilot scale, using in situ mid-infrared spectroscopy (en línea). Consultado 11 abril 2012. Disponible <http://link.springer.de/link/journals/00449/contents/01/00226/paper/s004490100226ch000.html>.

QIAO, S. 2003. Production of single cell protein with waste liquid from beet molasses alcohol fermentation (en línea). Consultado 22 de marzo 2012. Disponible: <http://www.e-foodtech.net/english/abstract/show.asp?id=9>.

RAIMBAULT, M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Process Biotechnology*. 1(3): sp.

RODRÍGUEZ, R., H. E. 2009. Producción y Evaluación de Alimentos Fermentados a Partir de Bagazo y Desecho de Manzana y su Efecto Sobre el Desarrollo Ruminal y Parámetros Sanguíneos. Disertación Doctoral. Facultad de Zootecnia y Ecología Universidad Autónoma de Chihuahua.

RODRÍGUEZ, Z., A. ELÍAS, R. BOCOURT y O. NÚÑEZ. 2001a. Efectos de los Niveles de Nitrógeno Ureico en la Síntesis Proteica Durante la Fermentación de Mezclas de Caña (*Saccharum officinarum*) y Boniato (*Ipomea batata Lam.*). *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 35(1):29-36.

RODRÍGUEZ-MUELA, C., A. BECERRA, O. RUIZ, A. RAMÍREZ, A. FLORES AND A. ELÍAS. 2007. Use of Solid State fermentation to increase nutritious value of apple byproducts. *J. Anim. Sci.* 85:284.

SCRAGG, A. 1996. *Biología para Ingenieros*. Editorial Acribia. Zaragoza. España.

SHARMA V.K. et al. "Disposal of waste tyres for energy recovery 1,4 and safe environmentreview". *Energy Conversion and Management*, Marzo 1998, Vol. 39, páginas 511-528. ISSN 0196-8904.

SOLAE. 2003. Soy protein, a high quality protein (en línea). Consultado 20 de marzo 2012. Disponible <http://www.solaeliving.com/perfomancenutrition/highqualityprotein/per.jsp?printer=true>

SUHARTO, I.; REDYOWATI, S. 1999. Mini-fermentation technology to produce single-cell protein from molasses (en línea). Consultado 12 de abril 2012. Disponible http://www.unu.edu/unupress/food/UNU06/cap_8.htm

SUHARTO, I.; REDYOWATY, I. 2003. Mini-fermentation technology to produce single cell protein from molasses. Yogyakarta, Indonesia. University of Gadjah. p. 7.

TRUJILLO, M.; SUAREZ, F.; GALLEGOS D. 2002. Fermentación láctica en continuo a partir de suero dulce de leche desproteinizado (en línea). Consultado 17 de abril 2012. Disponible <http://www.ibun.unal.edu.co/rr4e.html>.

UNIVERSITY OF INDIANA. 2003. Single cell protein (en línea). Consultado 17 de abril 2012. Disponible: <http://www.mama.indstate.edu/users/stuart/rdna/reclec/mbch13/tsld015.htm>.

VANDAMME E.J. (2009). *Agro-Industrial Residue Utilization for Industrial Biotechnology Products* En: *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. Pandey P.S.n.N.a.A. Editor. Springer Netherlands: Netherlands. p. 3-11.

VEJARANO, R. 2005. Estudio comparativo de la producción de biomasa con acetato de etilo por *Candida utilis* CECT 10704 a partir de melaza de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), etanol rectificado y etanol sin rectificar como fuentes de carbono. Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agroindustrial. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

WILLIAMS, C.M.; SHIH, J. C. H. Enumeration of some microbial groups in thermophili C poultry waste digesters and enrichment of a feather-degrading culture. J. Appl. Bacteriol. 67: 25-35, 1991.

WHEY PROTEIN INSTITUTE. 2003. Whey protein facts(en línea). Consultado 20 de marzo 2012. Disponible <http://www.wheyproteininstitute.org/facts.cfm>

ZAMORA, R. 1996. Producción de proteínas unicelulares de *Candida utilis* a partir de extractos ácidos de paja de arroz. Acta Científica Venezolana 47:147-153. ULA. Mérida.