

IDENTIFICACIÓN DE UNA LEVADURA PARA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR PARA CONSUMO HUMANO Y DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS A NIVEL DE MATRACES AGITADOS

DULCE MARÍA
PALMERÍN CARREÑO

LORENZO
GUEVARA OLVERA

FRANCISCO
VILLASEÑOR ORTEGA

CRISTINA
PÉREZ PÉREZ*

Departamento de Ingeniería
Bioquímica
Instituto Tecnológico de Celaya,
Correo para correspondencia:
*cristina.perez@itcelaya.edu.mx

Antecedentes

Los métodos convencionales para producir alimentos ricos en proteínas no son suficientes para cubrir la alta demanda de éstos a nivel mundial. Por consiguiente, la exploración de fuentes no convencionales como la proteína unicelular o microbiana (SCP o Single Cell Protein), representa una alternativa de importancia fundamental para complementar dietas en alimentación animal y humana (Church y Pond, 1992). La SCP se obtiene a partir 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 económicos, enriquecidos con carbono, nitrógeno y fósforo (Jaimez, 1996; Molk *et al.*, 2002; FAO, 2003; Bustamante *et al.*, 2003; Israelidis, 2003; Pelizer *et al.*, 2003).

Los sustratos utilizados para la producción de proteína microbiana incluyen fuentes de carbono fósil (hidrocarburos líquidos y gaseosos)

Resumen

El uso de etanol como fuente de carbono para producir biomasa, podría ser una alternativa ante el aumento de la población mundial y la escasez de alimentos. Los objetivos de esta investigación fueron la producción e identificación de una levadura, la determinación de parámetros cinéticos y la cuantificación de proteínas de la biomasa. Se determinó la concentración óptima de sustrato para obtener la velocidad máxima de crecimiento específico. Las cinéticas de crecimiento se realizaron en matraces agitados a 200 rpm y 30 °C. La concentración óptima de etanol se determinó mediante la cinética de crecimiento a diversas concentraciones de etanol, de 1 g/L a 40 g/L. Los modelos Logístico, Levenspiel y Pirt se ajustaron a los datos experimentales y se determinaron los parámetros cinéticos. La concentración de proteína en la levadura *Candida utilis* es 52.5% del total de proteínas, lo cual sugiere que el etanol es una fuente prometedora de alta calidad de proteína unicelular. **Palabras clave:** *Candida utilis*, proteína unicelular, cinéticas de crecimiento, etanol.

Abstract

The use of ethanol as carbon source to produce biomass could be an alternative facing the increase in world population and food shortages. The objectives of this research were the production and identification of single cell protein, the determination of kinetic parameters and also the biomass protein content. The optimal concentration of ethanol as carbon source was studied, in order to obtain the maximum specific growth rate. Growth kinetics were performed in shake flasks at 200 rpm and 30 °C. The optimal concentration of ethanol was determined by growth kinetics at various concentrations of ethanol, 1 g/L to 40 g/L. Models Logistic, Levenspiel and Pirt adjusted to the experimental data and kinetic parameters were determined. The concentration of protein in *Candida utilis* was 52.5% of total protein. These results suggest that ethanol is a promising source of high quality single cell protein. **Key words:** *Candida utilis*, single cell protein, growth kinetics, ethanol.

y fuentes de carbono renovables como melaza, suero e hidrolizados de polisacáridos (Bui y Galzy, 1990; Leveau y Bouix, 2000).

Candida utilis se utiliza principalmente en la producción de proteína unicelular, debido a su capacidad de utilizar una variedad de fuentes de carbono, como la paja de arroz (Rajoka *et al.*, 2006), almidón de papa en aguas residuales (Gélinas y Barrette, 2007), aceite de aguas residuales (Zheng *et al.*, 2005) y melaza (Nigam y Vogel, 1991). Ensayos con *Candida utilis* sobre extractos ácidos de paja de arroz, produjeron 3.5 g/L de biomasa en base seca (Zamora, 1996). También se ha usado como soporte para producir varios productos químicos, tales como el glutatión (Liang *et al.*, 2008), monelina (Kondo *et al.*, 1997) y el acetato de etilo (Christen *et al.*, 1999).

El uso de etanol como sustrato tiene varias ventajas, tales como la pureza, aceptabilidad, facilidad de almacenamiento y manipulación, no toxicidad, versatilidad como sustrato, miscibilidad con el agua, demanda de oxígeno baja, bajo contenido calórico y rendimiento celular alto (Laskin, 1977; Watteeuw *et al.*, 1979). La razón principal para orientar la investigación hacia estas fuentes proteicas, es que se logra una alta producción de masa microbiana por hora, debido a que su tiempo de duplicación es mayor al compararlo con otras fuentes animales o vegetales de proteína (Meyer *et al.*, 1992; Nigam, 2000; Chacón, 2004). Dependiendo de su origen, las levaduras son ricas en proteína y vitaminas (Martínez *et al.*, 2001), además poseen la propiedad de no ser tóxicas, presentan alta digestibilidad, elevado contenido en proteínas, grasas, carbohidratos y buen sabor (Enebo, 1990).

Los valores promedios de proteínas, expresados en porcentajes de materia seca, para *Candida utilis*, *Candida lipolytica*, *Candida rugosa*, *Schawaniomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* varía entre 33 y 45 % (Bui y Galzy, 1990), con un 7 al 9 % de lisina y un bajo porcentaje de

aminoácidos azufrados (de 0,7 a 1,7 % de cisteína y de 1 a 2 % de metionina).

Candida 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 debido a su capacidad de utilizar una variedad de fuentes de carbono rápidamente; es rica en proteína y vitaminas del complejo B, apropiada para la alimentación animal y humana (Göhl, 1991; Lucca *et al.*, 1995; Nigam, 1998; Choi y Park, 2003).

En el crecimiento microbiano, las variables que son de gran importancia para la evaluación económica de tales procesos biotecnológicos son el rendimiento de biomasa sobre sustrato ($Y_{x/s}$), la velocidad específica de crecimiento (μ), la constante de saturación de sustrato (K_s), la constante de inhibición (K_i), velocidad de consumo de oxígeno (Q_{O_2}). Todos estos parámetros tienen importancia tecnológica importante en los procesos de escalamiento (Tobajas y García-Calvo, 1999).

La cinética de crecimiento microbiano constituye una de las operaciones más utilizadas por la ingeniería alimentaria y la biotecnología, por lo tanto, es importante conocer los diferentes mecanismos de crecimiento, así como, la forma de cuantificación de los mismos, sus formas de aplicación, las ventajas y desventajas de los diferentes métodos (Blackwel, 1975; Hernández, 1998; Conn *et al.*, 1998). La descripción cinética de un sistema biológico es compleja porque depende de un gran número de reacciones químicas de la célula con el entorno y del propio metabolismo (Arellano *et al.*, 2007). Los modelos cinéticos permiten la descripción de la evolución de la biomasa, el oxígeno disuelto, consumo de oxígeno, rendimiento de biomasa sobre sustrato, para la resolución de los balances de materia, calor y cantidad de movimiento, así como de los parámetros cinéticos completos (Almudena, 2003; Cabanes *et al.*, 1989).

IDENTIFICACIÓN DE UNA LEVADURA PARA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR PARA CONSUMO HUMANO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS A NIVEL DE MATRACES AGITADOS

Varios modelos matemáticos se han desarrollado para cuantificar el efecto inhibitorio por sustrato sobre la velocidad de crecimiento. El modelar un proceso bioquímico conociendo los parámetros cinéticos permite obtener algunas ventajas en la simulación del proceso y disminución de costos en la experimentación industrial para la optimización del proceso (Volesky y Votruba, 1992).

Objetivo general

Identificar una levadura para producción de proteína unicelular para consumo humano y determinar los parámetros cinéticos a nivel de matraces agitados.

Materiales y métodos

Aislado de la levadura. La muestra se tomó del residuo de la elaboración de jugo de caña de azúcar, se sembró en cajas petri con agar Sabouraud a 30 °C y pH de 4.5 durante 5 días. La cepa de *C. utilis* que creció en el agar, se enriqueció nuevamente en caldo Sabouraud a 30 °C y 200 rpm, durante 48 hrs.

Medio de mantenimiento y de propagación. Agar Sabouraud (BD-Bioxon, 210700) y caldo Sabouraud (BD-Bioxon, 222400), para preservar y propagar la levadura a una temperatura de 28° C y 200 rpm por 48 h.

Medio de cultivo mínimo formulado. Se utilizó un medio de cultivo mínimo de composición definida, consistente en un medio básico: sulfato de amonio 5 g/L (Fermont, 63052), fosfato diácido de potasio 1 g/L (Fermont, 35861), sulfato de magnesio heptahidratado 0.5 g/L (Fermont, 63621), cloruro de calcio 0.1 g/L (Fermont, 24321); factores de crecimiento: biotina 2 µg/L (Sigma, B4639), ácido pantoténico 400 µg/L (Sigma, P5155), ácido fólico 2 µg/L (Sigma, F8758), ino-

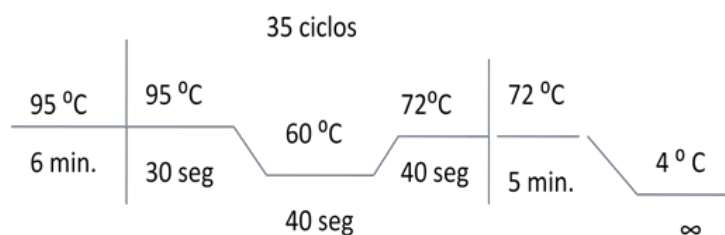
sitol 2000 µg/L (Sigma, I5125), niacina 400 µg/L (Sigma, N0761), ácido para amino benzoico 200 µg/L (Sigma, A9878), piridoxina 400 µg/L (Sigma, P6280), riboflavina 200 µg/L (Sigma, R7649) y tiamina 400 µg/L (Sigma, T3902) y oligoelementos: ácido bórico 500 µg/L (Fermont, 05101), yoduro de potasio 100 µg/L (Fermont, 83841), molibdato de sodio 200 µg/L (Fermont, 40901), sulfato de cobre 40 µg/L (Fermont, 63341), cloruro férrico 200 µg/L (Fermont, 24561), sulfato de manganeso 400 µg/L (Fermont, 63651), sulfato de zinc 400 µg/L (Fermont, 63961), cloruro de sodio 0.1 g/L (Meyer, 2363-500); al igual que etanol al 96 % para consumo humano, como fuente de carbono.

Identificación de la levadura. La levadura fue caracterizada mediante la Técnica de los Espaciadores Internos Transcritos (ITS's), con el fin de identificar el género y especie.

Amplificación por PCR de los ITS's. El material empleado fue el siguiente: ADN genómico del aislado de levadura, células químicamente competentes de *Escherichia coli* TOP 10 (INVITROGEN), enzima de restricción *Eco* RI, oligonucleótidos: Sentido NsiF, 5' GAT TGA ATG GCT TAG TGA GG 3'; Antisentido Nlb4R, 5' GGA TTC TCA CCC TCT ATG AC 3', Plásmido pCR 4-TOPO Invitrogen, Medio LB, Antibióticos: Kanamicina y ampicilina a una concentración de 50 mg/mL.

Extracción de ADN Genómico. El ADN genómico del microorganismo aislado de bagazo de caña fue obtenido mediante el método de Dellaporta (1983).

Amplificación de las ITS's por medio de PCR utilizando oligonucleótidos específicos. Se utilizó como templado el ADN genómico obtenido de la extracción del aislado. Para el par de oligonucleótidos sentido NsiF y antisentido Nlb4R se manejaron las temperaturas siguientes:



Electroforesis del producto PCR. Para comprobar el producto de la amplificación, se empleó un gel de agarosa al 1.2 % teñido con Bromuro de Etidio (EtBr) al 0.001 % y regulador de corrida TAE 1X, la electroforesis se llevó a cabo durante 35 min a 95 V.

Purificación de los Fragmentos Amplificados. Se utilizó el protocolo descrito en el manual The Silica Bead DNA Gel Extraction Kit de Fermentas. Para verificar la calidad de la purificación se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa 1.2 % EtBr, empleando 2 μ L de los fragmentos de ADN purificados.

Ligación de los Productos de la Purificación al Vector 4-TOPO. Los fragmentos que se amplificaron y purificaron fueron utilizados directamente para la ligación de cada uno de ellos dentro del vector pCR®4-TOPO de INVITROGEN. La mezcla de ligación se incubó a 25 °C durante 5 min en un termociclador, se emplearon 2 μ L para la transformación y el resto se almacenó a -20 °C.

Transformación de Células Químicamente Competentes de E.coli TOP10 con el Vector pCR4-TOPO. La transformación de células de *Escherichia coli* (Multishot™ Strimwell TOP10 de Invitrogen) se llevó a cabo bajo el protocolo de transformación para la clonación de insertos (TOPO TA Cloning®, Invitrogen, 2004) usando el vector pCR®4-TOPO. Las células fueron sembradas en placas con medio Luria Bertani + Kanamicina a una concentración final de 50 μ g/mL. Las placas

se incubaron a 37 °C. Se observó el crecimiento de colonias, sugiriendo que deberían contener el plásmido más el inserto.

Extracción de ADN Plasmídico por Columna. Se realizó de acuerdo con el manual Qiaprep Mini-prep (Qiagen, 2006). Posteriormente, se hizo con cada muestra una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % teñido con EtBr.

Digestión del ADN plasmídico con la enzima de restricción Eco RI. Después de extraer el ADN plasmídico de las clonas que contienen el vector, se realizó una digestión con la enzima Eco RI para corroborar la presencia del inserto. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 1 h, posteriormente se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % teñido con EtBr.

Obtención de las Secuencias y Comparación con la Base de Datos del NCBI. Los vectores que contenían los fragmentos de interés fueron enviados para su secuenciación al Laboratorio Nacional de Genómica y de Biodiversidad (LANGEBIO) del CINVESTAV Guanajuato. Las secuencias fueron analizadas con el programa DNASTar y comparadas con la base de datos del NCBI.

Preparación del inóculo. Para llevar a cabo la preparación del inóculo, se tomaron células de *Candida utilis* en su fase exponencial (en las primeras 4 h del cultivo) y se activaron en caldo Saboraud incubándolas a 30°C en matraces de 250 mL, que contenían 50 mL de caldo manteniendo una agitación de 200 rpm (Lab-Line, model

IC400) durante 24 horas.

Cinética de crecimiento en matraces. A 100 mL de medio mínimo formulado, se adicionó un volumen de inóculo para obtener una concentración celular de 1×10^6 células/mL más la concentración de etanol que osciló entre 0 g/L y 40 g/L para cada cinética, el etanol fue esterilizado por ultrafiltración con membranas de Nylon (Millipore).

Posteriormente, los matraces se mantuvieron en agitación a 200 rpm a una temperatura de 30 °C. Durante el desarrollo de la cinética, se tomaron muestras que se usaron en la determinación de la concentración celular midiendo la absorbancia (densidad óptica) en un espectrofotómetro (UNICO, Z800 UV-VIS), a una longitud de onda de 473 nm.

Ajuste de datos. Los modelos Logístico, Levenspiel y de Pirt se ajustaron a los datos experimentales, mediante la herramienta Solver de Microsoft Excel. Estos ajustes permitieron determinar los parámetros cinéticos: velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}), concentración máxima de crecimiento X_{max} , constante de saturación de sustrato K_S , constante de Inhibición K_I y rendimiento de biomasa sobre sustrato $Y_{X/S}$.

Cuantificación de la concentración de proteína total. Para la determinación de proteína se utilizó el método de Bradford empleando como patrón albúmina de suero bovino (Bio-RAD®). Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro a 595 nm.

Cuantificación de etanol por cromatografía de gases. Después de medir biomasa por absorbancia a 473 nm, las muestras se centrifugaron a 4000 rpm por 15 minutos para separar las células del medio de cultivo, posteriormente el sobrenadante fue sometido a una destilación para la posterior cuantificación de etanol mediante cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC/FID) modelo Perkin Elmer Clarus 500. La temperatura del horno fue de 40°C con un incremento de 5°C/min hasta 220°C, manteniéndose hasta un tiempo final de corrida de 30 minutos, la temperatura utilizada en el inyector fue de 220°C.

toografía de gases con detector de ionización de flama (GC/FID) modelo Perkin Elmer Clarus 500. La temperatura del horno fue de 40°C con un incremento de 5°C/min hasta 220°C, manteniéndose hasta un tiempo final de corrida de 30 minutos, la temperatura utilizada en el inyector fue de 220°C.

Resultados y discusión

Identificación de la levadura por medio de los Espaciadores Internos Transcritos (ITS).

En esta investigación se identificó la levadura mediante la técnica de amplificación por PCR de los ITS que se encuentra entre los genes que codifican para las subunidades de ARNr 5.8S y 28S, para tener la certeza de poderse emplear para consumo humano.

Amplificación de las ITS's por Medio de PCR utilizando Oligonucleótidos Específicos.

Se realizaron PCR's con el par de oligonucleótidos sentido NsiF y antisentido Nlb4R, empleando el ADN del aislado como templado bajo las condiciones descritas anteriormente.

Extracción de ADN Plasmídico por Columna y Digestión con Eco RI

Después de haber realizado tanto la ligación al vector de clonación como la transformación de células químicamente competentes, se procedió a la extracción de ADN plasmídico por medio de columna con el propósito de obtener un producto purificado que nos sirviera para la secuenciación de los fragmentos de interés. Se realizó además la digestión de los fragmentos con la enzima de restricción Eco RI (Figura 1). Posteriormente, se prosiguió con la parte de la secuenciación.

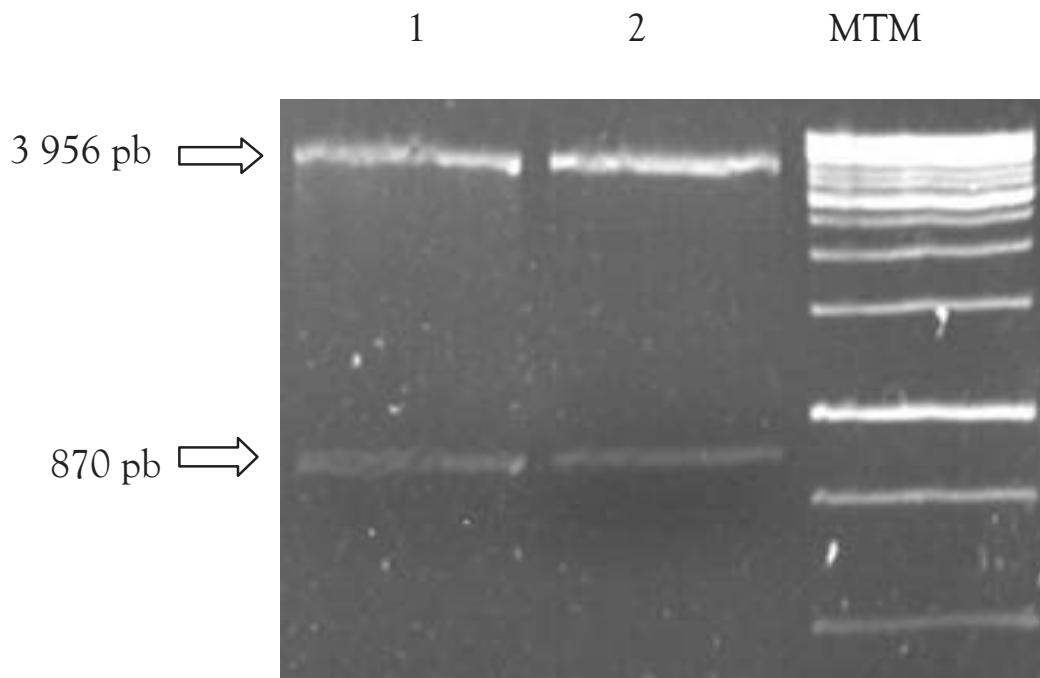


Figura 1. Gel de agarosa al 1,2%. Carril 1 y 2 ADN plasmídico digerido con Eco RI; Carril 3 MTM (Marcador de tamaño molecular).

Cuantificación y Secuenciación de las Muestras

Cada una de las extracciones de ADN plasmídico fueron cuantificadas para su secuenciación utilizando el programa Quantity One. Las muestras fueron enviadas al LANGEBIO para la obtención de sus secuencias, las cuales, fueron analizadas con el programa DNASTar y comparadas con la base de datos del NCBI.

A continuación se presenta el análisis de las secuencias obtenidas de las bandas amplificadas de los ITS's.

Clona DPC1-3

AF218990.1 Espaciador Interno Transcrito 1, gen del ARNr 5.8S y Espaciador Interno Transcrito 2, secuencia completa; y secuencia parcial del gen ARNr 28S, *Candida utilis* strain ATCC 22023T. La clona denominada DPC1-3 que con-

tiene un fragmento de 870 pb obtenida con los oligonucleótidos sentido NsiF y antisentido Nl-b4R para el aislado, presentó un valor esperado E=0.0 y una identidad=667/667 (99 %) con *Candida utilis* cepa ATCC 22023T como se observa en la Tabla 1. Los datos obtenidos en este trabajo demuestran que la PCR es una alternativa rápida, confiable, específica y sensible para detectar e identificar microorganismos.

Posteriormente se procedió a realizar las cinéticas de crecimiento de la levadura *Candida utilis* confirmando que es una levadura GRAS (Generalmente reconocida como segura).

IDENTIFICACIÓN DE UNA LEVADURA PARA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR PARA CONSUMO HUMANO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS A NIVEL DE MATRACES AGITADOS

Tabla 1. Resumen del análisis de la secuencia para la clona DPC1-3

Acceso	Descripción	E	I	Referencia
<u>AF218990.1</u>	Espaciador Interno Transcrito 1, gen del ARNr 5.8S y Espaciador Interno Transcrito 2, secuencia completa; y secuencia parcial del gen ARNr 28S, <i>Candida utilis</i> cepa ATCC 22023T	0.0	99 %	(Chen <i>et al.</i> , 2000).

E, valor esperado obtenido; I, porcentaje de identidad.

Determinación de los parámetros cinéticos de la levadura *Candida utilis* ATCC 9950 en caldo Sabouraud.

Para la determinación de los parámetros cinéticos de la levadura *Candida utilis*, se realizaron cinéticas de crecimiento, en caldo Sabouraud a una temperatura de 30 °C en matraces agitados a 200 rpm. El modelo logístico se ajustó a los datos experimentales para producción de biomasa como se muestra en la Figura 2, los círculos vacíos corresponden a los datos experimentales y la

línea continua corresponde al ajuste de los datos al modelo, se observa la cinética de crecimiento de *Candida utilis* en un lapso de 8 horas.

Se puede observar en la Tabla 2 los resultados obtenidos mediante el ajuste de datos experimentales al modelo logístico, donde se presenta una concentración máxima de 4.33 g/L de biomasa y una velocidad máxima de crecimiento de 0.87 h⁻¹, mucho menor a la encontrada con el medio mínimo formulado teniendo como fuente de carbono el etanol.

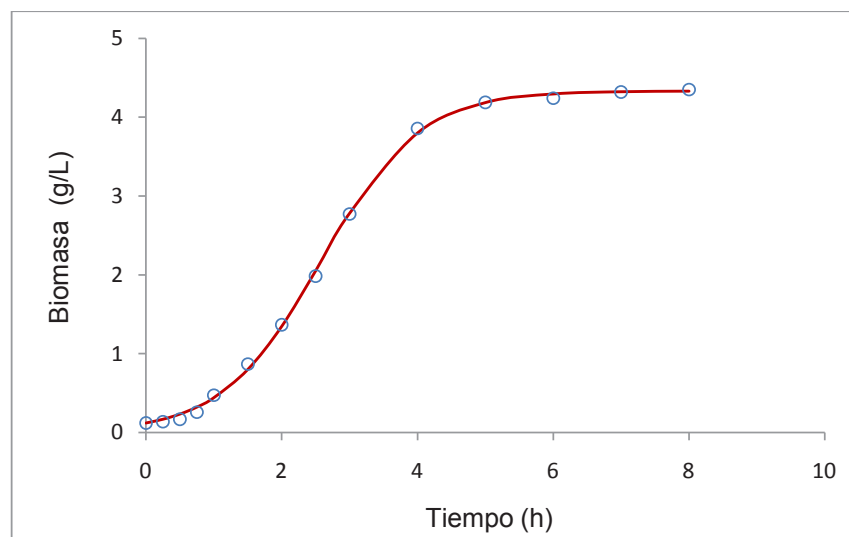


Figura 2. Cinética de crecimiento de la levadura *Candida utilis*, en caldo Sabouraud. La cinética se realizó en matraces agitados a 200 rpm y 30 °C. Los círculos (o) representan los datos experimentales obtenidos y la línea continua (-) corresponde al ajuste del modelo logístico.

Tabla 2. El modelo logístico se ajustó a los datos experimentales de concentración celular versus tiempo de la levadura *Candida utilis* en caldo Sabouraud.

Parámetros cinéticos	Valor obtenido
μ_{\max}	0.87 h ⁻¹
X_{\max}	4.33 g/L
X_0	0.12 g/L

Estos parámetros cinéticos se obtuvieron con ayuda de la herramienta Solver de Microsoft Excel.

Determinación de la concentración óptima de etanol en la levadura Candida utilis en matraces agitados.

Para determinar la concentración óptima de etanol se realizaron varias cinéticas de la levadura *Candida utilis* en medio mínimo definido utilizando etanol como única fuente de carbono, los matraces se mantuvieron a una temperatura de 30°C, y en agitación a 200 rpm bajo diversas

concentraciones de etanol (1 g/L a 40 g/L). La concentración celular en las cinéticas se determinó mediante la lectura de absorbancia a 473 nm, interpolando dentro de una curva estándar de absorbancia vs (número de células/ mL). El modelo logístico se ajustó a los datos experimentales. En la Figura 3, se muestran las cinéticas de crecimiento de *Candida utilis* de 1 g/L – 16 g/L de etanol. En la Tabla 3 se muestran las velocidades específicas de crecimiento de *C. utilis*.

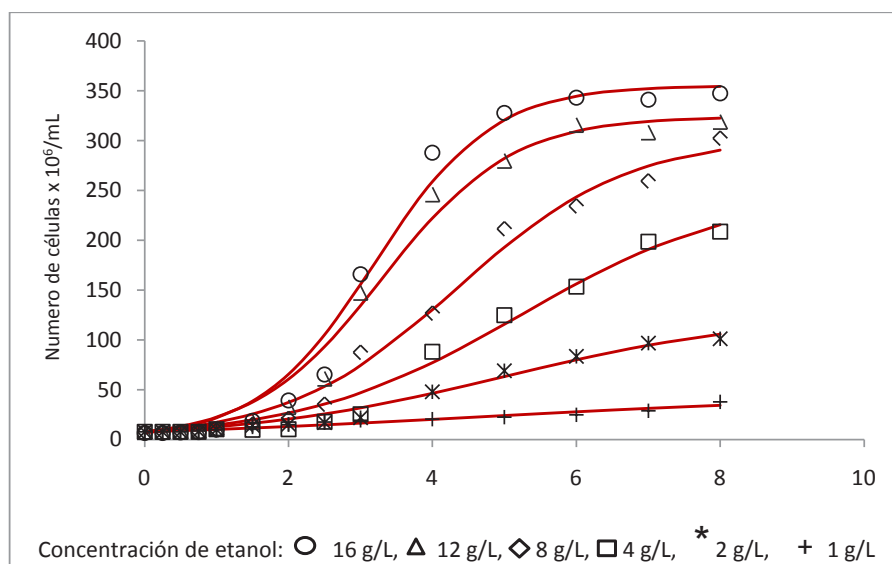


Figura 3. Cinéticas de crecimiento y concentración celular máxima de la levadura *Candida utilis* a diferentes concentraciones de etanol desde 20 – 40 g/L.

Tabla 3. Velocidades específicas de crecimiento obtenidas de las cinéticas realizadas a diferentes concentraciones de etanol.

Concentración de etanol [S], g/L	μ (h^{-1})
0	0
1	0.23
2	0.34
4	0.52
8	0.72
12	0.89
16	0.99
20	0.84
24	0.71
28	0.63
32	0.48
36	0.36
40	0.22

Cuando la concentración de sustrato se incrementa por arriba de la concentración determinada como óptima, existe una inhibición al crecimiento por parte de la levadura. A bajas concentraciones del sustrato óptimo existe limitación por sustrato.

En la Figura 4 se observan las cinéticas de crecimiento de 20 g/L - 40 g/L de etanol.

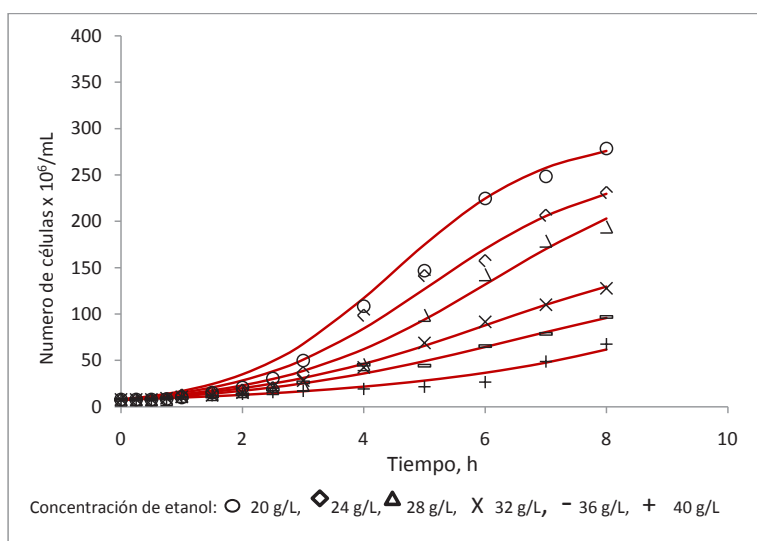


Figura 4. Cinéticas de crecimiento y concentración celular máxima de la levadura *Candida utilis* a diferentes concentraciones de etanol desde 20 - 40 g/L.

Conclusiones

La clona denominada DPC1-3 presentó una identidad de 99.9% con *Candida utilis* cepa ATCC 22023T. La velocidad máxima de crecimiento se obtuvo a una concentración de 16 g/L de etanol determinada como óptima. A concentraciones inferiores se muestra un crecimiento limitado de sustrato debido a que μ es menor a μ_{\max} , y a concentraciones superiores se observó una inhibición al crecimiento celular. Los ajustes de los modelos permitieron la determinación de parámetros cinéticos: μ_{\max} (0.99 h^{-1}), K_s (5.46 g/L), K_i (51.81 g/L), $Y_{x/s}$ (0.61 g cel/g etanol) y m (0.03 g etanol/g cel*h). El porcentaje de proteína en la biomasa en peso seco fue de 52.5%. Todo lo anterior es parte de un proyecto para realizar la producción de proteína unicelular en cultivo por lote alimentado, que es el recomendado cuando hay inhibición por sustrato y en un reactor tipo air lift que es el adecuado para cultivos de alta densidad celular por los valores altos de K_La (coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno)

Referencias bibliográficas

- Almudena Alcón M., 2003. Desarrollo de modelos cinéticos para bioprocesos: aplicación a la producción de xantano. Tesis Doctoral.
- Arellano, M, E. Herrera, D. Díaz, A. Moran, y J. Ramírez, 2007. Unstructured kinetic model for tequila batch fermentation. International Journal of Mathematics and computers in simulation. 1(1):1-6.
- Blackwel, S.J. Pirt. 1975. Principles of Microbe and Cell Cultivation. Scientific Publications.
- Bui, K. y P. Galzy, 1990. Food yeast, In: Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M., Yeast Technology. 1st edition. Springer Verlag, Berlin. 241p.
- Bustamante, Z., E. Galindo, M. Huanta, y F. Ballesteros, 2003. Obtención de bioproteína a partir de bagazo de naranja (*Citrus sinensis*) con *Aspergillus niger*.
- Cabanes A., G. Vllora Cano, A. Bódalo Santoyo, 1989. Pirólisis de hidrocarburos: El proceso de pirólisis con vapor, modelos cinéticos. Universidad de Murcia, 152 páginas.
- Chacón, A. 2004. Perspectivas actuales de la proteína unicelular (SCP) en la agricultura y en la industria. Agronomía Mesoamericana, 15 (001), 93-106.
- Christen, P., R. Auria, C. Vega, E. Villegas y S. Revah., 1999. Growth of *Candida utilis* in solid state fermentation. Biotech. Adv. 11, pp. 549-557.
- Choi, M.H., Y.H. Park, 2003. Production of yeast biomass using waste Chinese cabbage. Biomass Bioenergy 25, 221–226.
- Church, D. C. y W.G. Pond, 1992. Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales. 3ra Reimpresión. Limusa. México. pp. 309-383.
- Conn, E., P. Stumpf, G. Bruening, R. Doi, 1998. Bioquímica Fundamental. Editorial Limusa. Cuarta Edición. México. Pág. 131-156.
- Dellaporta SL, J. Wood, and JB. Hicks, 1983. A plant DNA miniprep: version II. Plant Mol Biol Rep 1: 19-21.
- Enebo, L. 1990. Single Cell Protein Evaluation of Novel Products. Pergamon-Press, New York, N. Y pp. 93-103.
- F.A.O. 2003. Single Cell Protein. <http://www.fao.org/ag/ag/agap/frg/AFRIS/Data/734.htm>

IDENTIFICACIÓN DE UNA LEVADURA PARA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR PARA CONSUMO HUMANO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS A NIVEL DE MATRACES AGITADOS

- Gélinas, P., J. Barrette, 2007. Protein enrichment of potato processing waste through yeast fermentation. *Bioresource Technology* 98, 1138-1143.
- Göhl, B. 1991. Tropical feeds. FAO/Oxford Computer Journals LTD, Ver 1.7.
- Hernández Muñoz A. 1998. Microbiología, Editorial Paraninfo, cuarta edición, Madrid España, p.576.
- Israelidis, C. 2003. Nutrition - Single cell protein, twenty years later. <http://www.biopolitics.gr/HTML/PUBS/VOL1/isreali.htm>
- Jaimez, J. A. 1996. Enriquecimiento proteico de la cascara y bagazo de naranja por *Candida utilis* para la alimentación de Ganado lechero. Tesis de licenciatura Universidad de las Américas-Puebla. México.
- Kondo, K., Y. Miura, H. Sone, K. Kobayashi, H. Iijima, 1997. High level expression of a sweet protein, monellin, in the food yeast *Candida utilis*. *Nature Biotechnol.* 15, 453-457.
- Laskin, A. L. 1997. Single-cell protein. D. Perlman (Editor). *Annual Reports on Fermentation Process.* I (7):151-175.
- Leveau, J., Bovix. M. 2000. Los microorganismos de interés industrial. Acribia Zaragoza. España. 608 pp.
- Liang, G., X. Liao, G. Du, J. Chen, 2008. A new strategy to enhance glutathione production by multiple H₂O₂-induced oxidative stresses in *Candida utilis*. *Bioresour. Technol.* 100, 350-355.
- Lucca, M. E., M. E. Romero, D. Callieri, 1995. Continuous culture of *Candida utilis*: Influence of medium nitrogen concentration. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*: 11, 515-519.
- Martínez, P. C., S. M. Chávez, Olvera, y M. Abdo, 2001. Fuentes alternativas de proteínas vegetales como substitutos de la harina de pescado para la alimentación en acuicultura. Recuperado el 30 de Mayo de 2005, de <http://w3.dsi.uanl.mx/publicaciones/maricultura/acuicolaIII/pdfs/5.pdf>
- Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Acuicultura y Manejo Ambiental del CIAD, A.C.
- Meyer, P.S., J.C. Preez, y S.G. Kilian, 1992. Cultivation of *Candida blunkii* in simulated bagasse hemicellulose hydrolysate. *J. Microbial.* 9, 109- 113.
- Molk, J.N., S.C. Schuyler, J.Y. Liu, J.G. Evans, E.D. Salmon, D. Pellman, y K. Bloom. 2002. The differential roles of budding yeast Tem1p, Cdc15p, and Bub2p protein dynamics in mitotic exit. *Mol. Biol. Cell.* 15:1519-1532.
- Nigam, J. N. 1998. Single cell protein from pineapple cannery effluent, *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 14, 693-696.
- Nigam, J. N. 2000. Cultivation of *Candida laggeronii* in sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate for the production of single cell protein. *Journal of Biochemistry.*
- Nigam, P., M. Vogel, 1991. Bioconversion of sugar industry by-products-molasses and sugar beet pulp for single cell protein production by yeasts. *Biomass Bioenergy* 1, 339-345.
- Pelizer, L. H. 2003. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. *Journal of food engineering.* 56(4), p. 371-375.

- Rajoka, M. I., H. K. Sohail, M. A. Jabbar, M. S. Awan y A. S. Hashmi, 2006. Kinetics of batch single cell protein production from rice polishing with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors. *Bioresource Technology* 97: 1934-1941.
- Tobajas, M. y García-Calvo, E. 1999. Determination of biomass yield for growth of *Candida utilis* on glucose: Black box metabolic descriptions. *W. J. Microbiol. & Biotechnol.* 15: 431-438.
- Volesky B. y H. Votruba, 1992. Chapter 1. Modeling and Optimization of Fermentation Processes. Elsevier, Amsterdam.
- Watteuw C.M., W.B. Armiger, D.L. Ristroph, A.E. Humphrey, 1979. *Biotechnol Bioeng*; 21: 1221.
- Zamora, R. 1996. Producción de proteínas unicelulares de *Candida utilis* a partir de extractos de paja de arroz. *Acta Científica Venezolana* 47: 147-153. ULA. Mérida, Venezuela.
- Zheng, S., M. Yang, Z. Yang, 2005. Biomass production of yeast isolate from salad oil manufacturing wastewater. *Bioresour. Technol.* 96, 1183–1187.