



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA

**PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR A PARTIR DE
LEVADURAS (*Saccharomyces cerevisiae* Y *Candida utilis*)
UTILIZANDO EL AGUA RESIDUAL DEL PROCESO DE
NIXTAMALIZACIÓN (nejayote)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERA BIOTECNÓLOGA

P R E S E N T A

ELVIA ROSAURA SOTO MEZA

CD. OBREGÓN, SONORA.

FEBRERO DE 2002

El presente trabajo “ Producción de Proteína Unicelular a partir de levaduras (***Saccharomyces cerevisiae*** y ***Candida utilis***) utilizando el agua residual del proceso de nixtamalización (nejayote) “ se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Dirección de Investigación y Estudios de Posgrado (DIEP) asesorado por la M.C. Olga Nydia Campa Baypoli.

DEDICATORIAS

A Dios: *Por darme la maravillosa experiencia de vivir, por caminar siempre a mi lado y permitirme llegar a esta etapa de mi vida.*

A mis Padres José y Elvia:

A ti papá: *Por tú incansable apoyo y cariño que me han hecho llegar a ser una mujer fuerte, capaz de alcanzar cualquier meta.*

A ti mamá: *Por ser una mujer entusiasta y darme el mejor ejemplo a seguir y sobre todo por el amor que me da que ha sido la clave para llegar a ser lo que soy.*

Y a ambos: *Por la confianza que siempre han puesto en mí, porque Sin ustedes hubiera sido imposible lograr esta meta ¡ Los Amo !!*

A mis Hermanos:

Enrique: *Por que siempre estas ahí cuando te necesito y el cariño que me das Gracias hermanito.....*

Gabby: *Por ponerle chispa a mí vida y por ser la hermanita mas buena onda que tengo, Te quiero mucho gordita.....*

A la familia Cortez Frias: *Por estas siempre a mi lado y compartir su cariño conmigo, Gracias por todo, Los Quiero Mucho!!!!!!*

A mis tías y sus familia:

Beatriz Huerta: *Por contar con su apoyo y darme siempre un espacio en su corazón y sus pensamientos.....*

Socorro Huerta: *Por contar con su ayuda y formar parte de mis metas....*

AGRADECIMIENTO

A mi asesora: M.C. Olga Nydia Campa Baypoli: *Por confiar en mí y motivarme a salir a delante cuando más lo necesite, Gracias Maestra y espero que en esta nueva etapa de su vida le vaya muy bien.....*

A mis revisores:

M.C Guadalupe Aguilar, M.C Anacleto Félix, Ing. Gabriela Ulloa: *Por sus buenos consejos para la realización de este trabajo.*

A Lorenia y Alba: *Por brindarme su amistad y su entusiasmo en cada momento. ¡ Por fin muchachas !!!*

A Raúl Holguín y Rafael Angulo: *Por el apoyo incondicional que me ofrecieron y por su valiosa amistad, Gracias por todo....*

Al Personal de la DIEP:

Don Ramón y Don Armando: *Por su compañía y su ayuda*

Don Chava: *Por contagiarme su alegría y su animo para seguir adelante a pesar de los pequeños tropiezos..... ah y por disfrutar la hora de la comida juntos, Gracias!!!!!!.....*

A los chicos del Servicio:

Karla, Chikis, Rosa, Jacqueline, Jorge, J. Manuel: *Por su apoyo y principalmente su compañía que es lo mas importante, sigan adelante!!!!!!*

A mis compañeros tesistas:

Patty, Guillermo, Rafael, Ricardo: *Por darme la oportunidad de trabajar juntos y así lograr cada uno nuestras metas.*

A mi nueva Amiga Verónica Castro: *Por su compañía y estar apoyándome en todos los tramites para sacar adelante este trabajo, hechale ganas ya casi lo logramos!!!!*

A mis inseparables Amigas y Amigos:

Lizeth, Brisa, Maricruz, Karen, Laura , Baltasar, Eduardo A.: *Por todos los momentos que disfrutamos juntos (principalmente las desveladas) haciendo que disfrutara al máximo cada día y a pesar de que cada quien ya eligió su camino confió que siempre vamos estar unidos... Gracias, que Dios los bendiga.*

A mis amigos:

Gloria, Yadhira, Neftalí: *Por su cariño y amistad que a pesar de la distancia y de no llevar la misma dirección siempre los tengo presente en mis pensamientos, Gracias por su todo.....*

Luly, Victor, Jechu, Karla, Issa, Agustín: *Por brindarme su amistad y hacer que todos los fines de semana me olvide un poco del estrés y me la pase super con sus divertidas ideas, OK, Bye.*

Martín, Arturo, Raymundo, José Ramón: *Por su ayuda, consejos y regaños y por demostrarme que siempre me apoyan en cada decisión que tome a pesar de que no sea la mejor en algunas ocasiones, sigan así.*

A todos mis Amigos: *Por forman una parte muy especial en mi vida, los quiero mucho.*

ÍNDICE

	Página
DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE	iv
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 JUSTIFICACIÓN	3
1.2 OBJETIVOS	
1.2.1 Objetivo General	4
1.2.2 Objetivo Especifico	4
1.3 HIPÓTESIS	5

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 Maíz	6
2.1.1 Origen	6
2.1.2 Uso del maíz	9
2.1.3 Nixtamalización	11
2.1.4 Nejayote	13
2.2 Proteína Unicelular	14
2.3 Levaduras	16
2.3.1 Caracteres Generales	17
2.3.1.1 Caracteres morfológicos	17
2.3.1.2 Reproducción	17
2.3.1.3 Caracteres de cultivo	18
2.3.1.4 Propiedades fisiológicas	19
2.3.2 Importancia de las levaduras	19
2.3.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
2.3.4 <i>Candida utilis</i> (Levadura Forrajera).....	22

III. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1 Análisis para la caracterización del Nejayote	25
3.2 Obtención del inóculo inicial	26
3.3 Obtención del medio de cultivo en base al nejayote.....	27
3.3.1 Determinación de azúcares reductores	
por el método de Folín-Wu	28
3.3.1.1 Ácido Fosfomolibdico	28
3.3.1.2 Solución cúprica alcalina	28
3.3.1.3 Técnica	29
3.4 Obtención de la proteína unicelular	29
3.4.1 Obtención de biomasa por peso seco	30
3.5 Análisis para la caracterización de la proteína unicelular	30
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1 Caracterización del nejayote	31
4.2 Obtención del medio de cultivo en base al nejayote	32
4.3 Obtención de biomasa	34

4.3.1 Crecimiento de <i>Candida utilis</i>	34
4.3.2 Crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
4.3.3 Comportamiento del pH	38
4.4 Análisis bromatológicos de la proteína unicelular	38
CONCLUSIONES	41
RECOMENDACIONES	42
BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA	43

LISTA DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Composición del grano de maíz en porcentaje de materia seca	9
2	Composición del nejayote	13
3	Métodos Oficiales de la A.O.A.C	30
4	Análisis proximal del agua residual de la nixtamalización (nejayote)	32
5	Medio de cultivo óptimo	33
6	Azúcares reductores en los diferentes medios	34
7	Biomasa y pH de <i>Candida utilis</i>	34
8	Biomasa y pH de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
9	Análisis bromatológico de la proteína unicelular	39

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Cámara de Neubauer	27
2	Curva de crecimiento de <i>Candida utilis</i> Y comportamiento del pH.....	35
3	Curva de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y comportamiento del pH	37

RESUMEN

En nuestra región como en la mayoría de la población mexicana el maíz es el cereal más utilizado como materia prima para la obtención de varios productos, uno de los principales es la tortilla y sus derivados, para obtener estos alimentos es necesario que el maíz sea sometido a un proceso llamado nixtamalización, el cual requiere de una gran cantidad de agua que al ser desechada provoca una gran contaminación al ambiente, llamado nejayote, basándose en esa problemática el objetivo de este estudio fue utilizar el agua residual del proceso de nixtamalización llamado nejayote como medio de cultivo para la obtención de proteína unicelular, a partir de cepas de ***Candida utilis*** y ***Saccharomyces cerevisiae***, para ser utilizada como suplemento alimenticio para ganado por su alto contenido proteico.

Para este estudio las levaduras se obtuvieron del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Dirección de Investigación y Estudios de Posgrado del Instituto Tecnológico de Sonora; sembrándose para su propagación en el medio Agar Dextrosa de Papa. Se realizó un conteo de levaduras por medio de la cámara de Neubauer para obtener un inóculo inicial de 10^6 cel/ml, adaptándose al medio, nejayote hidrolizado, en matraz Erlenmeyer de 2500 ml, incubado a temperatura ambiente, con agitación de 1500 rpm y aireación, con un tiempo de proceso de 22 horas. Durante su desarrollo se monitoreó pH y se realizó una curva de crecimiento en base a la biomasa seca obtenida.

Los resultados obtenidos manifiestan que el porcentaje de biomasa seca mayor fue registrado por la cepa ***Candida utilis*** 0.1253 g/40 ml al contrario de ***Saccharomyces cerevisiae*** que fue de 0.0750 g/40 ml. Aportando cada cepa 18.97 % y 26.35 % de proteína respectivamente.

Con este estudio se demuestra que el medio utilizado no inhibe el crecimiento de las dos cepas utilizadas, sin embargo se recomienda que se desarrollen estudios posteriores para mejorar la producción, controlando las posibles variables de crecimiento como temperatura, sustrato, aireación y el proceso de hidrólisis que sufre el medio; todo esto para obtener mejores rendimientos.

I. INTRODUCCIÓN

Cada día el hombre busca alternativas para dar una respuesta a las diferentes necesidades que tiene para lograr su progreso y una de ellas es la obtención de alimentos ricos en proteína, buscando técnicas diferentes en los procesos biotecnológicos que ayuden a incrementar la cantidad proteica de los alimentos, pero estas prácticas solo han tenido buenos resultados en la elaboración de alimentos para ganado.

Uno de estos procesos es la producción de proteína unicelular, la cual ha tomado importancia en los últimos años debido a la escasez de alimentos a nivel mundial, siendo obtenida a partir del crecimiento masivo de los diferentes microorganismos como lo son las bacterias, hongos y principalmente las levaduras, partiendo principalmente de residuos industriales como melazas, pulpas de cítricos y distintas aguas residuales (Gerhard,1991).

En Costa Rica se hicieron estudios para la obtención de proteína unicelular utilizando la levadura ***Saccharomyces cerevisiae*** con un medio elaborado con banano, ya que los desechos de esta fruta alcanzan volúmenes muy elevados, en estudios realizados se da conocer que la cáscara aporta un 7% de proteína y 21% azúcares reductores siendo estos parámetros satisfactorios para el desarrollo de este microorganismo (Chicas *et al.*,1991).

En México la comunidad tiene como alimento principal la tortilla y otros productos elaborados a partir del maíz, siendo uno de los principales cereales de consumo mundial, la elaboración de estos alimentos se realizan por medio de un proceso de cocimiento llamado nixtamalización donde se utilizan grandes cantidades de agua dando como resultado volúmenes altos de efluentes llamado nejayote.

Para dar una respuesta a esta problemática se han derivado algunas investigaciones tal es el caso el aprovechamiento del nejayote por métodos microbiológicos para el crecimiento de hongos capaces de desarrollarse y así obtener un bien partiendo de un desecho industrial (Duran,1981).

El presente trabajo tiene como objetivo final dar a conocer que el nejayote es un medio favorable para el crecimiento de levaduras, ***Saccharomyces cerevisiae*** y ***Candida utilis***, para la obtención de proteína unicelular para ser utilizado como suplemento proteico en los piensos dando con esto una respuesta para el mejoramiento del medio ambiente y el enriquecimiento de los alimentos para ganado.

1.1 JUSTIFICACIÓN

Debido a que uno de los principales alimentos de nuestra región es la tortilla, esta investigación se basó en dar una alternativa para la disminución de la contaminación provocada por las industrias que realizan el proceso de nixtamalización, utilizando el nejayote, con el fin de obtener proteína unicelular para que pudiera ser utilizada como suplemento en alimentación para ganado.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

Obtener proteína unicelular a partir de levaduras (***Saccharomyces cerevisiae*** y ***Candida utilis***) utilizando el agua residual del proceso de nixtamalización (nejayote).

1.2.2 Objetivo Específicos

- Establecer el medio de cultivo óptimo para ***S. cerevisiae*** y ***C. utilis*** utilizando nejayote como sustrato.
- Obtención de biomasa.
- Caracterización de la proteína unicelular.

1.3 HIPÓTESIS

Las agua residuales del proceso de nixtamalización (nejayote) es un buen medio para el crecimiento de ***Saccharomyces cerevisiae*** y ***Candida utilis*** obteniendo biomasa microbiana, debido a su alto contenido de nutrientes.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 MAÍZ

2.1.1 Origen

Los cereales son un grupo de plantas cultivadas pertenecientes a la familia de las gramíneas, cuyos granos, objetivo esencial de su producción, son ricos en almidón, tienen propiedades farináceas y contienen proteína. De fácil recolección por la estructura y disposición de su inflorescencia, una vez maduros se conservan durante largo tiempo sus cualidades y valor alimenticios y uno de estos cereales de mayor importancia es el Maíz (López,1991).

Se considera al maíz como una de las plantas más domesticada y evolucionada del reino vegetal, el origen y la evolución de este cereal han sido un misterio porque ha llegado a nosotros altamente evolucionado, sin conocer las formas intermedias. A pesar de extensivas búsquedas de las formas silvestres de esta planta, no ha sido encontrada alguna, a diferencia de los cereales del Viejo Mundo que tienen variedades silvestres que se preservan en la naturaleza, el maíz es conocido solamente por la especie cultivada ***Zea mays*** (López,1991).

El cultivo del maíz (***Zea mays***) se inició probablemente con la aparición de la agricultura. El proceso de domesticación llevado a cabo por el hombre primitivo americano hasta llegar al maíz actual ha sido realmente espectacular, su transformación se ha dado en un período de tiempo respectivamente corto, por lo que respecta a la conversión de energía solar, dióxido de carbono, agua y minerales del suelo en alimento. La planta magníficamente adaptada para la producción de granos no podría sobrevivir en condiciones naturales al no disponer de un mecanismo adecuado para la difusión de la semilla y es por eso que necesita condiciones específicas para su desarrollo (López,1991).

Ya que los granos de maíz se encuentran encerrados en capas de hojas tenaces y son incapaces de reengendrarse por sí mismo; es por eso que al llegar a la madurez, la vaina se abre para permitir la dispersión de las semillas (Desrosier,1987).

Para que el maíz se desarrolle mejor es necesario que se cultive en suelos bien aireados y fértiles, en regiones con temperaturas de verano moderadamente elevadas. El cultivo se da mejor en terrenos arcillosos rojizos profundos que contengan abundante materia orgánica, Nitrógeno, Fósforo y Potasio (Jugenhermer,1981).

El maíz palabra de origen indio caribeño, significa literalmente «lo que sustenta la vida» pertenece a la familia de las gramíneas, junto con el trigo y el arroz los cuales son los cereales más importantes del mundo que suministran elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales siendo también una materia prima básica de la industria de transformación (Desrosier,1987).

El valor nutritivo del maíz es muy similar al de otros cereales, siendo algo superior al de la harina de trigo y sólo ligeramente inferior la del arroz. El problema del maíz radica en la dieta de la que forma parte, que es muy deficiente en el tipo de alimentos complementarios necesarios para mejorar los elementos nutritivos ingeridos con cantidades relativamente grandes de maíz. Los consumidores de maíz tendrían un mejor estado nutricional si el maíz que ingieren tuviera los genes de lisina y triptofano, o si lo consumiesen junto con una cantidad suficiente de alimentos proteicos como legumbres, leche, soja, semillas y hojas de amaranto (<http://www.fao.org/docrep/T0395S/T0395S0c.htm>)

Este cereal constituye el alimento básico de mayor importancia en México, y en casi todos los países de América. En nuestro país se calcula que esta especie cubre alrededor del 51 por ciento del área total que se encuentra bajo cultivo y esto se debe principalmente a que es una especie vegetal con gran área de adaptación bajo condiciones climáticas muy extremas. En sus distintas modalidades de elaboración, el maíz es un importante alimento, como ya se mencionó, para numerosísimos habitantes del mundo en desarrollo ya que suministra cantidades significativas de nutrientes como lo muestra la Tabla 1 (Jugenhermer,1981).

Tabla 1. Composición del grano de maíz en porcentaje de materia seca.

Carbohidratos	80 %
Proteína	10 %
Aceite	4.5 %
Fibra	3.5 %
Minerales	2.0 %
Cenizas	2.3 %

Fuente: (Jugenhermer,1981).

2.1.2 Usos del maíz

Debido a sus características el maíz aporta más productos industriales que cualquier otro grano. El elevado contenido de carbohidratos, la producción abundante a un costo razonable, su relativa calidad de imperecedero y la facilidad de almacenamiento, hacen que el maíz sea particularmente adecuado para varios usos industriales tales como alimento, forraje y materia prima para la industria (Jugenhermer,1981).

Como alimento, se puede utilizar todo el grano, maduro o no, o bien se puede elaborar con técnicas de molienda en seco, que consiste en la separación física de las distintas partes anatómicas del grano, el cual tiene como objetivo principal obtener el endospermo entero, parcialmente quebrado o en forma de harina. A los productos terminados de estos procesos se les considera como intermedios ya que son la principal materia prima utilizada en otras industrias alimentarias (Serna,1996).

Los gránulos grandes de maíz generalmente se utilizan para la producción de hojuelas de maíz, mientras que los gránulos pequeños son utilizados como adjuntos cerveceros o para la elaboración de productos extraídos, pastas y cereales de desayuno. Por último las harinas finas, se utilizan para la manufactura de diferentes productos de panadería. Los productos resultantes de esta industria tienen

generalmente una vida prolongada de almacén porque contienen un bajo porcentaje de humedad y aceite (Serna,1996).

Los subproductos de la molienda en seco son el germen y la cubierta seminal, el primero se utiliza para obtener aceite comestible de elevada calidad mientras que la cubierta seminal, o pericarpio, se emplea fundamentalmente como alimento, aunque en los últimos años ha despertado interés como fuente de fibra dietética. Este hecho ha beneficiado económicamente a la industria por la fuerte demanda y competencia que actualmente existe entre las industrias alimentarias de humanos y animales (Serna,1996).

En lo que respecta a su aplicación como forraje, en los países desarrollados más del 60 por ciento de la producción se emplea para elaborar piensos compuestos para aves de corral, cerdos y rumiantes; en los últimos años, aun en los países en desarrollo en los que el maíz es un alimento fundamental, se utiliza un porcentaje más elevado de la producción como ingrediente para la fabricación de piensos. Desde hace relativamente poco, el maíz «de elevada humedad» ha despertado gran interés como alimento para animales, debido a su menor costo y a su capacidad de mejorar la eficiencia de la transformación de los alimentos (www.fao.org/docrep/TO395SO2.HTM#Tipos).

Uno de los usos más importantes del maíz es como materia prima para la obtención del almidón. La industria refinadora de este carbohidrato, también llamada de molienda húmeda, tienen como objetivo primordial obtener el máximo rendimiento de gránulos de almidón nativo o sin dañar, es decir, estos molinos extraen del granos los componentes químicos: almidón, proteína (gluten), fibra (pericarpio) y aceite, este último compuesto mediante procesamiento del germen (Serna,1996).

La utilización del grano de maíz, se debe principalmente a que la semilla contiene una alta proporción de almidón (mayor de 70%) y principalmente un alto valor económico-comercial de los subproductos del proceso que son el gluten y el germen (Serna,1996).

Como ya se mencionó la molienda húmeda es un procedimiento que se utiliza fundamentalmente en la aplicación industrial del maíz, y uno de los procedimientos, también importante, es el de la cocción en solución alcalina, empleado para elaborar las tortillas, llamado nixtamalización siendo este uno de los componentes mas importantes de la dieta de la población mexicana (Paredes, 2000).

2.1.3 Nixtamalización

La tortilla de maíz es el principal alimento en la dieta del mexicano y se elabora a partir de masa nixtamalizada. El consumo de tortillas en México es de aproximadamente 50 toneladas por día ; desde luego que para satisfacer una demanda de esta magnitud, existen máquinas que las elaboran en grandes cantidades. Pero en muchas partes del país, especialmente en zonas rurales, hacer las tortillas es el deber cotidiano de las mujeres (Arévalo,1998).

La producción de la masa nixtamalizada casera o industrial se obtienen a partir del nixtamal, cuyo proceso de elaboración es muy antiguo, desde las culturas prehispánicas, a pesar de los grandes avances tecnológicos en casi todas las áreas del saber humano, las etapas fundamentales y esta tecnología poco o nada han cambiado, a pesar de que se han propuesto diversos procesos de nixtamalización, pero no han tenido éxito debido a que la calidad de las tortillas obtenidas no es satisfactoria en algunos casos (Serna,1996).

Las variaciones de este proceso son rígidas por factores geográficos y socioeconómicos, es decir la variedad del maíz, la cual esta determinada por la localización geográfica, su precio y disponibilidad; la proporción de agua del maíz, la concentración de cal que varía de 90 a 170 mg/100 g.; el tiempo de cocimiento que se encuentra reportado en un rango de 30 a 75 minutos y la temperatura, los cuales son parámetros rígidos de acuerdo a los hábitos familiares o específicos del proceso. Se considera que un maíz con mayor humedad, dureza y densidad produce mejores tortillas (Duran,1981).

En varios estudios realizados se encuentra reportado que la pérdida total de nutrientes del grano, deshechado en el nejayote durante el tratamiento térmico alcalino, no depende tanto del método de preparación del nixtamal sino más bien del tipo empleado, encontrando una pérdida mayor en maíz blanco que el maíz amarillo (Duran,1981).

El proceso de nixtamalización se inicia con la adición de dos partes de solución de cal al 1 %, aproximadamente a una parte del maíz, esta preparación se cuece por 50-90 minutos, después el maíz se remoja en agua de cocción por 14-18 horas. Posterior al remojo, el agua de cocción conocido como Nejayote, se desecha y el maíz se lava dos o tres veces con agua sin retirar el pericarpio ni el germen del maíz. El nixtamal es posteriormente molido para producir la pasta conocida como masa y esta a su vez se cuece permitiendo el producto final, que es la tortilla (Paredes,2000).

El proceso de nixtamalización utiliza grandes cantidades de agua para la cocción, remojo y lavado que dan origen a desechos residuales que son fuente de contaminación al ambiente. Se ha calculado que por cada tonelada de maíz se emplean de 3,000 a 10,000 litros de agua para lavar y enjuagar el nixtamal y también es importante mencionar que a lo largo de este proceso existen pérdida de nutrientes, que es lo que permite que el agua de residuo, es decir el nejayote, pueda ser un buen sustrato para los microorganismos (Paredes,2000).

2.1.4 Nejayote

El nejayote una palabra náhuatl que significa caldo de cenizas de cal, tiene residuos del propio maíz, así como restos de la cal (suspendida y disuelta) que fue usada durante la cocción. Por lo tanto este licor de cocción que se genera, contiene altas cantidades de materia orgánica y una Demanda Química de Oxígeno (DQO) promedio de 28000 ppm, estas características hacen que el efluente de molinos de nixtamal y de fábricas de harina de maíz nixtamalizado sean considerados como altamente contaminantes por el hecho de que la producción de nejayote asciende a miles de millones de litros por año (Serna,1996).

El nejayote es un efluente industrial muy contaminante por que contiene materiales tóxicos debido a su pH alto de 11-12, también posee alta demanda de oxígeno por los sólidos que están constituidos principalmente en su mayor parte por carbohidratos (Paredes,2000).

A partir de una investigación realizada en la Universidad Autónoma de México se pudo obtener información de la composición del nejayote como se muestra en la Tabla 2 (Duran,1981).

Tabla 2. Composición del nejayote

Humedad	98.5 %
Proteína	3.87 BS
Extracto etéreo	0.27
Fibra Cruda	13.52
Cenizas	15.37
Carbohidratos	66.97
Calcio	0.46 %
Sólidos totales	1.5 %

Fuente: (Duran,1981).

El efecto de los efluentes contaminantes repercuten directamente sobre la flora y fauna de los lugares a donde llegan, impidiendo el desarrollo adecuado del bioma, debido al alto contenido de nutrientes que poseen esos efluentes se desarrollan con más facilidad los microorganismos logrando con esto una disminución de oxígeno necesario para el crecimiento de los seres vivos presentes (Duran,1981).

2.2 PROTEÍNA UNICELULAR

La biotecnología, en términos generales, permiten aumentar la calidad, variedad y cantidad de los productos, utilizar productos que tradicionalmente se desperdician o subutilizan y reducir los costos de producción en numerosos procesos. El impacto principal es en el incremento de los niveles de eficiencia, productividad, diversificación de las cadenas productivas, la consolidación y apertura de mercados. Por lo tanto la biotecnologías es un apoyo real al proceso de desarrollo económico de los países. Es por eso que uno de los desarrollos tecnológicos que desde la Segunda Guerra Mundial ha despertado el interés para llevarse a cabo es la producción de proteínas unicelular (PUC) a partir de los microorganismos (Levaduras, Hongos, Algas y Bacterias) principalmente en partes del mundo donde hay un suministro deficiente de las fuentes convencionales de alimento (Brock,1993).

La utilización de la PUC es utilizada como alimento y forraje. Posiblemente el uso potencial de esta proteína no sea como una dieta completa, sino como un complemento proteínico. Se han realizado varios experimentos e investigaciones para la producción de PUC utilizando principalmente la levadura ***Candida utilis*** y la levadura desecada ***Saccharomyces cerevisiae*** (García *et al.*,1999).

La principal demanda se da en la industria de los piensos; ya que para cubrir las necesidades alimenticias humana es necesario incrementar la producción de vegetales y carne. La proteína microbiana iguala a la harina del pescado como alimento proteico óptimo, debido a que posee una composición de aminoácidos

bastante adecuada, es decir, los esenciales para todo ser vivo. Es por eso su importancia a nivel económico e industrial, ya que el producto seco contiene alrededor del 50 % de proteína (Ward,1991).

Unas de las principales características por la cual la proteína unicelular es importante es debido a la rápida velocidad de propagación de los microorganismos, a la diversidad de sustratos que se pueden emplear siendo estos medios sencillos y baratos, que su producción no depende de las condiciones climáticas y a los mínimos requerimientos de terreno (García *et al.*,1999).

Como ya se mencionó el contenido de proteínas de la levadura es el elemento nutricional más importante ya que al ingerirse éstas se liberan a nivel intestinal las envolturas celulares por acción de las enzimas digestivas, siendo hidrolizadas a aminoácidos, que luego son reconstituidos para formar enzimas y otros compuestos nitrogenados necesarios para la vida (Gerhard,1991).

Se observa que las levaduras contienen todos los aminoácidos considerados esenciales por la OMS y la FAO. Las proteínas de la levadura presentan elevado contenido de lisina, de ahí su utilidad para combinarla con las proteínas de los cereales que generalmente carecen de ella; además son abundantes en isoleucina y treonina. Debe destacarse que contiene niveles menores de metionina y cisteína, aminoácidos azufrados que se hallan en mayor cantidad en las proteínas de origen animal. Las diferencias comparativas observadas son fácilmente compensadas con una dieta mixta (Brock, 1993).

A pesar de todos estos beneficios que aporta la proteína unicelular el principal obstáculo para el progreso de esta práctica es la "renuencia del consumidor" a los alimentos de origen microbiano. Pese a esto, varios microorganismos ya están actualmente en la etapa de producción comercial o pre-comercial de PUC; uno de ellos es en el "proceso Pekilo" en Finlandia, donde se cultiva el hongo como alimento para ganado en una solución de sulfito que por lo general se utiliza en la

industria de la pulpa de madera, así como varias levaduras (<http://www.prodigyweb.net.mx/rever05/virtual/hongos/usos.htm>).

Uno de los problemas que presenta la proteína unicelular, principalmente levaduras, es que contiene demasiada cantidad de Ácidos Nucleicos (A.N.), característica que provoca ciertos padecimientos en los seres que la consumen. Existen ya procedimientos de separación de los A. N. pero los productos obtenidos presentan muchas desventajas (Gómez *et al.*,1989).

Es por eso que los productos obtenidos deben de estar bien controlados como lo es el hecho de que los organismos que se utilizan para la obtención de proteína unicelular deben ser seguros y aptos para el consumo alimenticio; no deben formar toxinas y deben mantenerse estables genéticamente de forma que se mantengan las cepas con características fisiológicas y bioquímicas óptimas durante el proceso a través de cientos de generaciones (Ward,1991).

Para tener un buen rendimiento en la producción de biomasa, es necesario controlar todas las variables como lo son la temperatura (rango de 20 a 30 °C), el pH (rango de 4.5-5), la intensidad de aireación, ya que los buenos resultados siempre se dan cuando la oxidación es completa debido a que por medio de este factor los microorganismos degradan completamente las moléculas nutritivas y extraen el máximo de energía, siendo también importante la concentración de sustrato y la presencia de las sustancias inhibitoras de crecimiento (Gerhard, 1991).

2.3 LEVADURAS

Los microbios útiles para el hombre constituyen solamente una proporción muy pequeña de la amplia variedad de especies que existe en la naturaleza. El papel que desempeñan algunos de ellos en la fabricación de la cerveza, el pan y el vino fue descubierto en forma accidental hace mucho tiempo. Existe un buen número de

microorganismos que está siendo utilizado en la industria. Esto se debe a que producen un compuesto de alto valor que no puede ser obtenido de una manera tan sencilla o tan económica por las técnicas químicas usuales. En algunos otros casos, los microorganismos son cultivados por su valor intrínseco, como es el caso de la levadura de panadería. Sin embargo, en la mayoría de los casos la sustancia buscada es un producto de su metabolismo, como es el caso del alcohol o algún antibiótico (Dreyfus,1996).

2.3.1 Caracteres Generales

2.3.1.1 Caracteres morfológicos

En el caso de las levaduras las cuales son microorganismos unicelulares que forman un grupo de hongos cuyas actividades han sido siempre de gran importancia práctica en las actividades del hombre, que poseen características que ayudan a identificarlas y así poder utilizarlas como mejor convenga (Burdon,1982).

Las características morfológicas se determinan mediante la observación microscópica, la célula de la levadura típica puede ser desde esférica a ovoide, alimonada, periforme, cilíndrica e incluso alargada, constituyendo un verdadero micelio o un falso micelio, es incolora, con un diámetro de 10 a 15 micras, aproximadamente. Tienen paredes gruesas, que le dan a las células un entorno doble. Cada célula tienen un núcleo, el citoplasma comúnmente contiene gránulos y vacuolas, no realizan la fotosíntesis, no poseen flagelos ni otro tipo de locomoción (Burdon,1982).

2.3.1.2 Reproducción

Generalmente se reproducen asexualmente por gemación, siendo mas aptos para efectuar cambios químicos porque tienen mayor área superficial en relación a su

volumen en comparación con los protozoos; y existen aproximadamente 350 especies separadas en 39 géneros (Pelczar,1993).

Las levaduras se reproducen asexualmente por gemación, es polar o multilateral, proceso durante el cual una porción de protoplasma sobresale de la pared de la célula de la levadura y forma una protuberancia; esta protuberancia, o yema, aumenta de tamaño y finalmente se desprende como célula nueva neoformada. El material nuclear replicado se reparte entre la célula madre y la célula hija. Mediante estudios realizados se conoce que la levadura produce durante su vida un promedio de 24 células hijas (Frazier,1993).

2.3.1.3 Caracteres de Cultivo

En la mayoría de los casos, el crecimiento en masa de las levaduras no resulta apropiado para identificar estos microorganismos, si bien el crecimiento en forma de velo en la superficie de los medios líquidos indica que se trata de una levadura oxidativa. En los cultivos en placas de agar, es difícil diferenciar las colonias de levaduras de las colonias bacterianas, la observación microscópica es la única forma segura que existe para poderlas diferenciarlas (Frazier,1993).

La mayoría de las colonias jóvenes de levaduras son húmedas y algo mucosas, aunque es imposible que tengan aspecto harinoso; la mayoría de las colonias son blancuzcas, aunque algunas tienen un color cremoso o rosada, algunas cambian poco de aspecto cuando envejecen, aunque otras se secan y se arrugan (Frazier,1993).

Las levaduras pueden ser oxidativas, fermentativas o bien su actividad metabólica es a la vez de ambos tipos y dependiendo principalmente de estas características son utilizadas para diferentes procesos industriales (Gerhard,1991).

2.3.1.4 Propiedades fisiológicas

A pesar que las distintas especies de levaduras pueden ser muy diferentes en cuanto a su fisiologismo, las que tienen importancia industrial comparten un número suficiente de actividades fisiológicas como para poder estudiarlas desde el punto de vista general, la mayoría de estos microorganismos crecen mejor con un copioso aporte de humedad disponible (Frazier,1993).

El intervalo de temperatura de crecimiento de la mayoría de las levaduras es, en general, parecido a los mohos, con una temperatura óptima en torno a los 25 a 30 °C y una temperatura máxima en torno a los 35 a 47 °C. Algunas especies son capaces de crecer a temperaturas de 0 °C o inferiores (Frazier,1993).

En general se sostiene que las levaduras se desarrollan mejor en medio con reacciones ácidas del medio con pH ajustado entre 4 a 4.5, estimulando el desarrollo de estos microorganismos, mientras que en los medios básicos no crecen bien a no ser que se hayan adaptado a los mismos (Pelczar,1993).

Las levaduras utilizan en general, como fuente de energía a los azúcares, aunque las oxidativas utilizan ácidos orgánicos y el alcohol. Los medios utilizados comúnmente se componen de 5 % de extracto de malta, los preparados con fuente natural son hechos con frutas y vegetales que permiten el buen crecimiento de las levaduras (Frazier,1993).

2.3.2 Importancia de las levaduras

Estos microorganismos son muy importantes ya que contienen en diferentes cantidades las biomoléculas indispensables para todo ser vivo, por ejemplo contienen importante cantidad de vitaminas hidrosolubles del complejo B, fuente indispensable para el hombre pues muchas veces deben ser incorporadas para

lograr el normal desarrollo de las funciones celulares durante el crecimiento y la reproducción (Dreyfus,1996).

En el caso de los minerales predominan en la levadura de cerveza los fosfatos y el potasio, que cubren una parte importante de los requerimientos en el hombre, 34% y 21% respectivamente con la ingesta de 20 gr. de levadura. El contenido en elementos bioquímicamente importantes como azufre, magnesio y calcio es relativamente alto (Dreyfus,1996).

El contenido en lípidos de las levaduras puede variar entre 4% y 7 % en base seca según las condiciones de propagación impuestas y las especies o cepas utilizadas. La especie **Saccharomyces cerevisiae** empleada en la producción de levadura alimenticia contiene una cantidad considerable de ácidos grasos insaturados que ayudan a controlar el colesterol. El contenido en ácidos oleico y linoleico es importante desde el punto de vista nutricional. La levadura contiene además esteroides de distintos tipos moleculares y compuestos como la lecitina (Dreyfus,1996).

La cantidad total de carbohidratos está en el orden del 30% a 35 % de sustancia seca. Son principalmente carbohidratos de reserva tales como glicógeno y trealosa; el material estructural de la pared celular son polímeros de glucosa y manosa siendo muy poco asimilables por el hombre; estos microorganismos son utilizados además como agentes espesantes de alimentos pues poseen los mananos, los cuales no alteran sus propiedades por el calor y mejoran la viscosidad de ciertas preparaciones como salsas, comidas para niños, pastas, etc. Pueden además ser utilizadas como agentes ligantes en productos que contienen almidón para mejorar su comportamiento al ser sometidos a altas temperaturas (secados) o a altas presiones (extrusión). Otra utilidad industrial sería su empleo como ligantes de agua y grasas en productos cárnicos triturados. Además la inclusión de levaduras en ciertos tipos de alimentos contribuye a disminuir la actividad del agua y mejorar su preservación (Dreyfus,1996)

2.3.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras se clasifican en dos grupos basándose en su capacidad de reproducir ascosporas, aquellos microorganismos que forman ascosporas se incluyen en la clase ascomicetos llamadas “Levaduras verdaderas”, siendo la mas conocida la levadura ***Saccharomyces cerevisiae***, ya que ha sido la mas estudiada por su importancia industrial. Las levaduras que no pueden producir ascosporas sino que se reproducen principalmente por gemación se clasifican en hongos imperfectos a veces denominadas como “levaduras falsas” (Burdon,1982).

Es posible también clasificar a las levaduras en base a determinadas propiedades fisiológicas, y es posible que muten a formas nuevas. A la mayoría de las levaduras se les puede adaptar a crecer en condiciones bajo las cuales no hubiesen crecido bien antes de haber conseguido la adaptación. A este aspecto, constituye de nuevo un claro ejemplo las propiedades fisiológicas que se dan dentro de una misma especie el gran número de cepas de ***Saccharomyces cerevisiae*** adaptadas a usos diferentes, como son las cepas utilizadas en la elaboración de pan, cerveza y vino, cepas o variedades que producen alcohol en elevadas concentraciones (Frazier,1993).

Las levadura ***S. cerevisiae*** es un microorganismo quimosintético unicelular, puede ser redonda, ovalada o alargada, que se asemejan entre si morfológicamente, mas aún todas fermentan la glucosa, fructosa, manosa y galactosa produciendo grandes cantidades de CO₂, pero no fermenta lactosa ni melibiosa, se reproduce vegetativamente o por gemación, son monopolares y únicas, no forman micelios y se pueden desarrollar en medios aeróbicos o anaerobios (Serna,1996).

Las levadura ***S. cerevisiae*** tienen una pared celular que contienen de 6 a 8 % de proteínas, algunas de las cuales es muy probable que sean enzimas, el promedio de lípidos es de 8.5 a 13.5 %; la cantidad de quitina varía con los diferentes géneros de levaduras, en el caso de *S. cerevisiae* tienen 1.0 a 2.0 % (Pelczar,1982).

Esta levadura puede alterar su metabolismo de una ruta fermentativa a una oxidativa, la última dando un rendimiento mayor de energía para el crecimiento masivo de la célula y es por eso que es utilizada para la producción de PUC (Barragán,1991).

2.3.4 *Candida utilis* (Levadura Forrajera)

La levadura ***Candida utilis*** desecada es valiosa como fuente de proteína la cual contiene un alto valor nutritivo, sabor agradable, buena apariencia y suele tener mayor valor biológico. La levadura forrajera tiene abundantes minerales y vitaminas B, si se irradia aporta también vitamina D (Smith,1963).

Puede aportar un 39 por ciento de proteína , por lo que se considera como un concentrado proteico, el contenido de lípidos es de 1.95 por ciento totales, aunque es bajo, debe tomarse en cuenta, el total de cenizas es de 18.20 por ciento, implicando cantidades apreciables de minerales (Rochín,1993).

Esta levadura puede estar presente en piensos mixtos para toda clase de ganado. Normalmente, el costo elevado limita su empleo y la inclusión de levadura en las raciones se basa principalmente en su valor como suplemento para suplir las deficiencias de aminoácidos y vitaminas de los cereales (Smith,1963).

Una de las características mas importantes de esta levadura es que crece rápidamente y puede cultivarse sobre una gran diversidad de materiales. Entre los materiales que se emplean como sustrato para la producción de levadura forrajera figuran el licor de prensa, obtenido de la fabricación de la pulpa de cítricos , melazas,

licor residual de sulfito de la industria papelera; madera sacarificada (tanto hexosas como pentosas), y residuos de frutos (Gerhard,1991).

Esta levadura utiliza como azúcares tanto pentosas como hexosas, no requiere la adición al medio de factores de crecimiento, puede utilizar NH_4^+ o NO_3^- (o ambos) como fuente de nitrógeno y es nutricionalmente aceptable (reducción en purinas) crece en condiciones favorables con un pH de 4 (Brown, 1989).

Una de las características de ***Candida utilis*** es que forma hifas verdaderas o falsas con abundantes células en gemación o blastosporas, algunas de estas levaduras forman películas, creciendo rápidamente. a pesar de alterar los alimentos salados y muy ácidos (Frazier,1993).

Posee tiempos de duplicación cortos entre 2 a 6 horas. Tiene concentración de proteína razonable, son de mayor tamaño que las bacterias por lo que se recuperan mas fácilmente del medio de fermentación, tienen la ventaja de disponibilidad en el mercado (Gómez,1995).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Apoyo Sistema suelo-agua-planta y en el de Microbiología de la Dirección de Investigación y Estudios de Posgrado del Instituto Tecnológico de Sonora, durante el período de agosto de 2001 a diciembre de 2002.

3.1 Análisis para caracterización del nejayote

Los Análisis realizados en el agua residual del proceso de nixtamalización (nejayote), se llevaron a cabo de acuerdo a Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.) en la sección para cereales.

- ❖ **Humedad:** El agua es una sustancia que siempre se encuentra en los alimentos, es el componente de más alta concentración, para determinar el contenido de humedad en un alimento, existen varios métodos entre los más utilizados por su sencillez y reproducibilidad son los de secado. Estos pueden llevarse a cabo por la aplicación de calor en hornos a presión atmosférica y por medio de una diferencia de peso es obtenida la humedad de la muestra.

- ❖ **Proteína:** Se basa en el método Kjeldahl, el cual consiste en la oxidación de los compuestos orgánicos por calentamiento con ácido sulfúrico usando como catalizador el óxido rojo de mercurio. El carbono e hidrógeno del material es oxidado a CO_2 y H_2O ; una parte del ácido sulfúrico se reduce en dióxido de azufre, el cual a su vez reduce el material nitrogenado a amoníaco, sustancia de alto punto de ebullición, la cual es liberado por la adición de grandes cantidades de álcalis, destilado y atrapado en cantidades conocidas de ácido estandarizado. El ácido entonces es titulado con una solución básica de concentración conocida a su punto original para determinar cuánto amoníaco se destiló.

- ❖ **Extracto etéreo:** La determinación de lípidos se hace por medio del método Soxhlet, donde el amplio rango de polaridad que tienen los diferentes lípidos hace imposible la utilización de solventes universales, en este caso es utilizado el éter de etílico para que sea cuantificada las sustancias extraídas por este solvente.

- ❖ Cenizas: El método se basa en la oxidación del material orgánico hasta CO_2 y H_2O para dejar un residuo inorgánico que es pesado. La forma en que se encuentran los elementos en el alimento original difiere mucho de la forma en que se encuentre en el residuo de cenizas. Para esta determinación se utilizan altas temperaturas (550-600 °C) para oxidar la materia orgánica .

- ❖ Calcio: Este método se basa en la determinación de oxalato de calcio que se forma de la reacción del calcio con el oxalato de amonio. Determinando el contenido de calcio que reaccionó con el ácido sulfúrico caliente para formar el ácido oxálico que posteriormente es valorado con el permanganato de potasio.

3.2 Obtención del Inóculo inicial

Las cepas utilizadas fueron: ***Saccharomyces cerevisiae*** y ***Candida utilis*** obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Dirección de Investigación y Estudios de Posgrado del Instituto Tecnológico de Sonora. Las cuales se sembraron en Agar Dextrosa de Papa, incubándose a 30 °C durante 24 horas. Para obtener el inóculo adecuado de 10^6 cel/ml (León,1997), fue necesario hacer un conteo de levaduras en la cámara de Neubauer como se explica a continuación:

- ✓ Colocar un mililitro de muestra en un matraz aforado a 100 mililitros.
- ✓ Agregar agua destilada hasta el aforo.
- ✓ Leer en la cámara de Neubauer, en este caso, como son levaduras se contaron solo en los recuadros grandes, identificados por la letra L de la Figura 1.

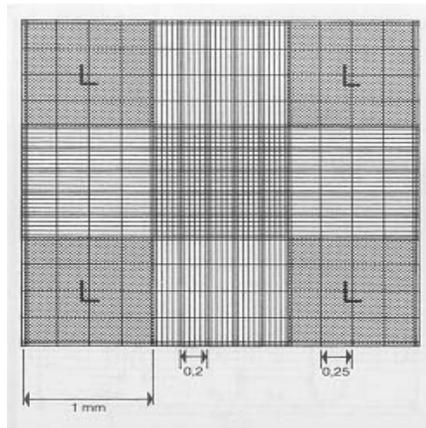


Figura 1. Cámara de Neubauer

- ✓ Para obtener el número aproximado de levaduras presentes en la muestra es necesario realizar la siguiente fórmula:

(Número de levaduras / 4) (10,000) (dilución) = Número de levaduras.

3.3 Obtención del medio de cultivo en base al nejayote

Para encontrar el medio óptimo de crecimiento de las levaduras, se analizaron cuatro medios diferentes:

- A) Nejayote Puro
- B) Nejayote enriquecido con 0.6 % de sulfato de amonio y 0.3 % de fosfato de potasio alcanzando un pH de 8.2 con la adición de estas sales.
- C) Nejayote enriquecido con 0.6 % de sulfato de amonio y 0.3 % de fosfato de potasio, llevando a un pH de 4 el cual era obtenido con la adición de ácido sulfúrico.

D) Nejayote Hidrolizado se obtiene adicionando 1.5 por ciento de ácido sulfúrico concentrado hasta obtener un pH alrededor de 1. Se deja enfriar, se adiciona 0.6 % de sulfato de amonio y 0.3 % de fosfato de potasio, se ajusta el pH a 4, el cual se obtiene con la adición de hidróxido de sodio, enseguida se pone a calentar en una parrilla eléctrica y se espera hasta el inicio de la ebullición. Partiendo de este momento se cuenta un tiempo de 45 minutos, evitando las perdidas por medio de la evaporación.

3.3.1 Determinación de azúcares reductores por el método de Folín-Wu

Para la determinación de los azúcares reductores que poseen los diferentes medios es necesario preparar las siguientes soluciones:

3.3.1.1 Ácido Fosfomolibdico

A 35 gramos de Ácido molibdico y 5 gramos de Tungstato sódico se añade 200 mililitros de Hidróxido sódico al 10 por ciento y 200 mililitros de agua destilada. Se hierve intensamente durante 20 a 40 minutos. Se enfría, se diluye hasta 350 mililitros y se agrega 125 mililitros de ácido fosfórico concentrado al 85 por ciento. Se diluye hasta 500 mililitros.

Nótese que el volumen inicial de la mezcla es 400 mililitros, por lo que el tiempo de evaporación deberá bajar tal volumen a menos de 350 mililitros para así poder hacer la dilución posterior.

3.3.1.2 Solución cúprica alcalina

Se disuelven 40 gramos de carbonato sódico puro y anhidro en 400 mililitros de agua y se trasladan a un matraz de 1 litro. Se Añaden 7.5 gramos de ácido tartárico y cuando éste se ha disuelto, se agregan 4.5 gramos de sulfato de cobre pentahidratado, se mezcla y completa el volumen hasta 1 litro. Si los productos

químicos no son bastante puros, pueden formarse un sedimento de óxido cuproso en el transcurso de 1 ó 2 semanas. En este caso se extrae con un sifón el reactivo transparente que sobrenada o bien se filtra con un papel de buena calidad. Para comprobar la ausencia de cobre cuproso en la solución, se pone 2 mililitros en un tubo de ensaye y se añaden 2 mililitros de ácido Fosfomolibdico, el color azul intenso del cobre debe desaparecer casi por completo.

3.3.1.3 Técnica

A 1 mililitro de muestra se agrega de 80 a 85 mililitros de agua destilada. Se ajusta el pH a 7 (rango de 6.8 a 7.2). Se afora a 100 mililitros con agua destilada. Se toma una alícuota de 2 mililitros y se pasa a un tubo de Folín. Mientras tanto ya se tiene preparado el baño maría.

Se agrega al tubo Folín 2 mililitros de solución cúprico alcalina. Se deja 7 a 8 minutos en baño maría en ebullición. Se deja enfriar. Se agrega 2 mililitros de solución de ácido fosfomolibdico y se afora a 25 mililitros. Se agita vigorosamente para obtener una mezcla homogénea. Leer a 530 nanómetros en espectrofotómetro (Barragán, 1991).

Para obtener el porcentaje de azúcares reductores de la muestra es necesario realizar una curva estándar utilizando c-xilosa, graficando absorbancia contra gramos de c-xilosa.

3.4 Obtención de la proteína unicelular

Los medios ya preparados se filtran para eliminar los sólidos presentes. En forma aséptica se agrega el inóculo inicial presente en las cajas con agar dextrosa de papa por medio de 1 ó 2 lavados con agua peptonada al 0.1 por ciento. Se mantiene el medio con una temperatura de 29-30 °C y una agitación de 1200 rpm durante 22 horas.

3.4.1 Obtención de biomasa por peso seco

A 40 mililitros de medio de cultivo, los cuales se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos. El líquido supernadante se desechó y el sólido se resuspendió en agua. Luego se filtró con un papel filtro Whatman # 20, que se pesó con anterioridad. El residuo con el papel se sometió a secado por 2 horas a 65 °C, se pesó y por diferencia se obtuvieron en gramos los sólidos secos por mililitros.

Se realizó el mismo procedimiento para los medios de cultivo pero sin inóculo; para eliminar el residuo aportado por los sólidos suspendidos en el medio de cultivo y así determinar el peso seco inicial.

3.5 Análisis para la caracterización de la proteína unicelular

La caracterización de la proteína unicelular se realizó por medio de los Análisis basados en los métodos especificados en A.O.A.C. para cereales los cuales se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Métodos Oficiales de la A.O.A.C.

PARÁMETRO	MÉTODO A.O.A.C.
Humedad	925.10
Proteína	979.09
Extracto etéreo	939.05
Cenizas	923.03

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización del nejayote

Los resultados que se muestran en la Tabla 4 son los componentes que aporta el agua residual (nejayote).

Tabla 4. Análisis proximal del agua residual de la nixtamalización (nejayote)

PARAMETRO	CANTIDAD
Proteína	0.01 %
Humedad	98.6 %
Grasas	0.7 %
Cenizas	1.4 %
Calcio	0.0028 %
Sólidos totales	1.4 %
Carbohidratos (diferencia)	48.5 %

Comparando los resultados obtenidos con lo reportado por Duran, 1981, se observa una mínima diferencia en cuanto al contenido de humedad (98.5 %) y el total de Sólidos totales (1.5 %), en el caso de los carbohidratos (66 %) son mayores los valores que se dan a conocer comparándolos con los que se muestran en la Tabla 4 siendo este factor uno de los principales para el crecimiento de las levaduras ya que estos microorganismos obtienen la energía necesaria para la producción de biomasa y con eso contribuyen a minimizar la contaminación provocada por este tipo de residuos.

4.2 Obtención del medio de cultivo en base al nejayote

Para obtener un mayor rendimiento en el crecimiento de las levaduras fue necesario identificar el medio óptimo para su desarrollo, en la Tabla 5 se muestran los distintos medio de cultivos utilizados y se da a conocer el mejor basándose en análisis estadísticos.

Tabla 5. Medio de cultivo óptimo

MEDIO DE CULTIVO	BIOMASA SECA (gr /40 ML)
A) Nejayote Puro	0.1 a
B) Nejayote enriquecido, pH 8.2.	0.0875 a
C) Nejayote enriquecido, pH 4.	0.475 a
D) Nejayote Hidrolizado.	0.3275 b

- Promedio de 4 repeticiones
- Letras iguales: No existe diferencia significativa (α 0.05)

Por medio del análisis de varianza y realizando un prueba de comparación de medias (DUNCAN) donde las variables fueron los medio de cultivo utilizados y la variable de respuesta la biomasa seca, se encontró que entre los primeros medios A, B y C no existe diferencia significativa (α 0.05) y el medio D se observa que si tiene diferencia significativa siendo este el medio más adecuado para el desarrollo de las levaduras por tener la mayor cantidad de biomasa seca.

Los resultados anteriores se pueden complementar basándose en la medición del porcentaje de azúcares reductores que contienen los distintos medios, siendo sometidos a un tratamiento químico ya que proceden de un residuo del maíz, el cual sin tratamiento químico no puede ser utilizado por las levaduras, los valores obtenidos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Azúcares Reductores en los diferentes medios.

MEDIO A	MEDIO B	MEDIO C	MEDIO D
0	0	0.09 g/ml	0.3 g/ml
0	0	0.01 g/ml	0.2 g/ml

Los valores obtenidos de azúcares reductores de los medios A, B y C son muy bajos a comparación del medio D siendo este el mejor por aportar la mayor cantidad de nutrientes para el desarrollo de levaduras.

Para la obtención de estos resultados en azúcares reductores fue necesario realizar una curva estándar graficando concentración de c-xilosa contra absorbancia, obteniéndose la siguiente ecuación $y = 0.8298x + 0.0591$.

4.3 Obtención de biomasa

4.3.1 Crecimiento de *Candida utilis*

La biomasa seca obtenida en la corrida de *Candida utilis* se da a conocer en la Tabla 7 y en la Figura 2 se muestra el comportamiento de su crecimiento y los niveles de pH.

Tabla 7. Biomasa y pH de *Candida utilis*

Tiempo (horas)	Biomasa seca (gr/ 40 ml)	pH
14:00	0.0829	3.99
16:00	0.0859	3.97
18:00	0.1065	3.93
20:00	0.1245	3.78
22:00	0.1253	3.59

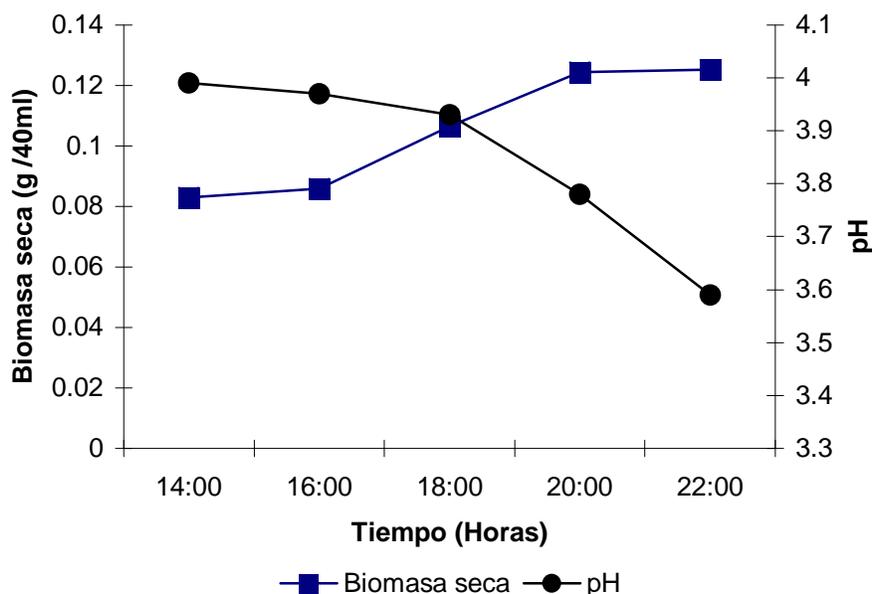


Figura 2. Curva de crecimiento de *Candida utilis* y comportamiento del pH

Basándose en bibliografía se conoce que *Candida utilis*, posee tiempos cortos de duplicación entre dos a seis horas y tiene una concentración de proteína razonable, estas características se conocen ya que es uno de los microorganismos más utilizados en los últimos años para la obtención de biomasa a partir de varios residuos como hidrolizados de almidón de cereales como el maíz, residuos de caña de azúcar, agua residual de lechería y pulpa de cítricos entre otros, siendo capaz de metabolizar fuentes de carbono semejantes a las pentosas y hexosas (Gerhard, 1991).

En la Figura 2. se observa la curva de crecimiento de la levadura *Candida utilis* teniendo un tiempo de adaptación al medio de 14 horas y 22 horas para el proceso

en general, teniendo como biomasa seca mínima de 0.0829 g/40 ml y un máximo de 0.1253 g/40 ml.

Gómez,1995 obtuvo valores mas altos que los mencionados anteriormente, esto se debe a que el sustrato utilizado contiene 20 g/L de azúcares reductores, cantidad mayor a la que se esta trabajando en esta investigación, razón por la cual los resultados obtenidos son de 1.28 g/L/hora de biomasa seca, utilizando como medio hidrolizado ácido de paja de trigo.

Lo favorable de este estudio es que existió crecimiento en un medio que no es óptimo para el desarrollo de las levaduras y esto se observa en los valores tan pequeños de biomasa seca, por tanto es necesario recurrir a estrategias para aumentar la producción de biomasa como modificar las condiciones del proceso, controlar temperatura, velocidad de aireación, mejorar las variables de hidrolizado tiempo de ebullición y adición del ácido.

4.3.2 Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*

La biomasa seca obtenida en la corrida de *Saccharomyces cerevisiae* se da a conocer en la Tabla 8 y en la Figura 3 se muestra el comportamiento de su crecimiento y las variables de pH.

Tabla 8. Biomasa y pH de *Saccharomyces cerevisiae*

Tiempo (horas)	Biomasa seca (gr/ 40 ml)	pH
14:00	0.0460	3.97
16:00	0.0484	3.96
18:00	0.0580	3.92
20:00	0.0700	3.77
22:00	0.0750	3.67

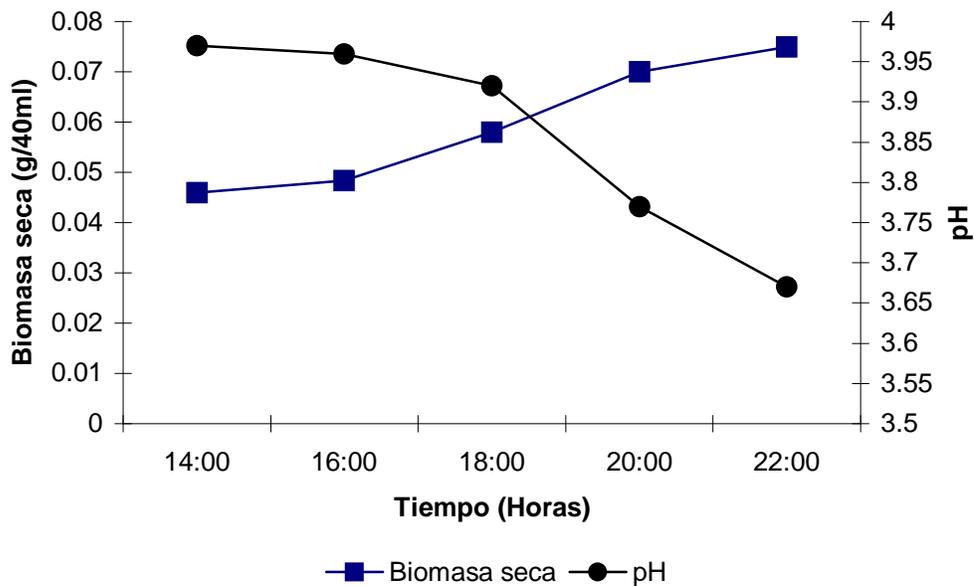


Figura 3. Curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y comportamiento del pH

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* es la más utilizada para los procesos fermentativos aeróbicos y anaeróbicos, ya que son microorganismos esencialmente heterogéneos que se presentan en gran variedad de condiciones y su nutrición es relativamente sencilla. Le favorecen sustratos con altas concentraciones de azúcar como glucosa, fructosa, manosa, sacarosa al ser fáciles de asimilar por las levaduras (Chicas *et al.* 1991).

Chicas y Col. 1991, obtuvieron valores altos de biomasa seca en un rango de (0.4776 g/ml a 0.4918 g/ml) utilizando diferentes medios partiendo del banano y la adición de nutriente, en esta investigación también se reporta que solo la cáscara de esta fruta madura aporta un 21 % de azúcares reductores, comparando los valores obtenidos partiendo del nejayote como medio, se observa que es mínima la biomasa seca obtenida (0.0460 g/40ml a 0.0750 g/40ml) y es necesario implementar

ensayos con variación en los parámetros de hidrólisis del medio y de crecimiento para la levadura.

El comportamiento de la cepa en el medio con banano fue similar a la del nejayote ya que no existió evidencia de un crecimiento exponencial durante un periodo corto hasta llegar a las 16 a 20 horas de proceso, a pesar de los resultados obtenidos se demuestra que no existe inhibición de crecimiento a causa del medio utilizado.

4.3.3 Comportamiento del pH

En general se sostiene que las levaduras se desarrollan mejor en medios con reacción ácida, los parámetros establecidos bibliográficamente van de 3.5 a 4.5 , dando las características óptimas al medio para un buen desarrollo de las levaduras, en la grafica 1 y 2 se muestra el pH de operación para ***Candida utilis*** y ***Saccharomyces cerevisiae*** (Gerhard, 1991).

Según los resultados anteriores el comportamiento del pH de operación tienen un comportamiento en forma descendente de 3.9 a 3.6 observándose que las dos cepas utilizadas tienen una diferencia mínima en su comportamiento al paso del tiempo de operación; es importante mencionar que este factor también contribuye a eliminar el posible desarrollo de microorganismos indeseables, que pudieran competir por los nutrientes afectando directamente al desarrollo de las levaduras, como podría ser el caso de las bacterias.

4.4 Análisis bromatológicos de la proteína unicelular

En la Tabla 9 se muestran los resultados de los análisis bromatológicos realizados para cada cepa .

Tabla 9. Análisis bromatológico de la proteína unicelular

PARAMETRO	<i>Candida utilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Humedad	7.3 %	22.05 %
Proteína	18.97 %	26.35 %
Grasas	2.8 %	1.3 %
Cenizas	47.8 %	27.14 %

Los microorganismos no son utilizados para una dieta completa, sino como un suplemento alimenticio, al ser la proteína el suministro más escaso en los alimentos, en general se conoce que la célula microbiana contiene el 50 % de proteína y al menos en algunas especies contiene todos los aminoácidos esenciales (Brock,1993).

En el caso de la cepa de *Candida utilis* siendo la más utilizada para la obtención de proteína unicelular por su fácil adaptación a los medios, se conoce que tiene un total de 39 % de proteína, el contenido de lípidos es de 1.95 % totales y un 18.20 % de cenizas implicando cantidades apreciables de minerales (Rochín,1993).

Rochín,1993 dio a conocer en su investigación que el porcentaje de proteína de la biomasa seca de *Candida utilis* es de 36.96 %, utilizando como sustrato hidrolizado ácido de paja, el porcentaje de proteína obtenido en esta investigación es menor, esto se debe que el tratamiento que se le da al nejayote no es el adecuado para la obtención de los azúcares reductores, siendo este parámetro indispensable para el crecimiento de la levadura.

En el caso de la humedad es muy similar a los estudios mencionados anteriormente (6.21 %); los valores obtenidos de cenizas (18.34 %) son significativamente menores ya que esta levadura no está purificada y contiene residuos del sustrato utilizado (Rochín,1993).

Comparando las dos cepas utilizadas en esta investigación, los datos arrojados dan a conocer que la levadura con mayor aportación de proteína es **Saccharomyces cerevisiae** (26.35 %) al ser un microorganismo que suele tener mayor valor biológico definido y por poseer buenas características de supervivencia, como se menciona bibliográficamente (Ward,1991)

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA

1. Arévalo, Raymundo A. 1998. "Population dynamics of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera: Brachionidae) in waste water from food-processing industry in Mexico" Carrera de Biología, UNAM. México.
<http://www.ots.duke.edu/tropibiojnl/claris/46-3/AREVALO>
2. Barragán P., Perfecto. 1991. " Adaptación de la Levadura Panificadora al medio Hidrolizado de Paja de Cebada en fermentación sumergida aerobia ". Tesis de Ingeniero Bioquímico en Alimentos. Instituto Tecnológico de los Mochis.
3. Brock, Thomas D. 1993. Microbiología. Ed. Printice may Hispano América S.A. México, D.F. 6ta. Edición, pp.407-410.
4. Brown, C.M. 1989. Introducción a la Biotecnología. Ed. Acribia, S.A. España pp. 105-107.
5. Burdon, Kenneth; William Robert. 1982. Microbiología. Ed. Publicaciones Cultural S.A. México, D.F. pp. 262-263.
6. Chicas, Mauricio. *et al.*, 1991. " Producción de proteína unicelular a partir de *Saccharomyces cerevisiae*". Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Biología.
7. Desrosier, Norman W., 1987. Elementos de Tecnología de los Alimentos. Editorial Continental, S.A. de C.V. México. pp. 155-164.

8. Dreyfus C., Georges. 1987. El Mundo de los Microbios. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
<http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/43/htm/SEC8.HTM>
9. Duran A., Patricia. 1981. “ Aprovechamiento de nejayote de nixtamal por métodos microbiológicos”. Tesis Químico Fármaco Biólogo. Universidad Autónoma de México. pp. 1-6,13-15,22.
10. Frazier, W.C; Westhoff, D.C. 1993. Microbiología de los Alimentos. Ed. Acribia, S.A. España. pp. 35-43.
11. García G., Mariano. *et al.*, 1999. Biotecnología de Alimentos. Ed. LIMUSA. México. pp. 383-389.
12. Gerhard, Jagnow. 1991. Biotecnología. Ed. Acribia, S.A. España. pp. 57-65.
13. Gómez H., G. J., *et al.*, 1989. “ Proceso para extraer Ácido Nucleico de levaduras en condiciones alcalinas suaves “. México, D.F.
<http://www.iztapalapa.uam.mx/iztapala.www/patentes/patent16.htm>
14. Gómez A. Martha. 1995. “ Aumento de la productividad del proceso de obtención de proteína unicelular a partir del hidrolizado ácido de paja de trigo”. Tesis de Ingeniero Biotecnólogo. Instituto Tecnológico de Sonora.
15. Jugenhermer, Robert W. 1981. Maíz (Variedad Mejoradas, Métodos de Cultivo y Producción de Semillas). Ed. LIMUSA. México. pp. 290-299.

16. León T., Amleto y Col. 1997. " Sistema semicontinuo en dos etapas: Hidrólisis-Fermentación para la producción de Etanol a partir de almidón de papa usando simultáneamente *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* ". **Revista Colombiana de Química**. Vol. 26. No.2.
17. López B., Luis. 1991. Cultivos Herbáceos. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 1-4.
18. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.). 1995. Edición 16. Tomo II.
19. Paredes L., Octavio y Col. 2000. Los alimentos Mágicos de las Culturas Indígenas de México – El caso de la Tortilla-. INIFAP. México. pp. 25-68.
20. Pelczar, Michael. 1993. Microbiología. Ed. Mc Graw-Hill. México, D.F. pp. 271-287.
21. Rochín G., Dulce M. 1993. " Utilización de proteína unicelular de *Candida utilis* en la elaboración de dietas para bagre de canal (*Lctalurus punctatus*)". Tesis de Ingeniero Biotecnólogo. Instituto Tecnológico de Sonora.
22. Serna S., Sergio. 1996. Química , Almacenamiento e Industrialización de los Cereales. A.G.T Editor, S.A. México, D.F. pp. 232-235.
23. Smith, George. 1963. Introducción a la Micología Industrial. Ed. Acribia, España. Pp.87,95.
24. Ward, Owen. 1991. Biotecnología de la fermentación. Ed. Acribia, S.A. España. pp. 111-117.

25. <http://www.fao.org/docrep/TO395SO2.HTM3Tipos.htm>
26. <http://www.fao.org/docrep/TO395S/TO395SOc.htm>
27. <http://www.prodigyweb.net.mx/rever05/virtual/hongos/usos.htm>

CONCLUSIONES

Basándose en los datos obtenidos en el presente estudio, se llegaron a las siguientes conclusiones:

- ❖ El agua residual del proceso de nixtamalización (nejayote), no inhibe el desarrollo de las levaduras ***Candida utilis*** y ***Saccharomyces cerevisiae***.
- ❖ La biomasa seca obtenida de ***Candida utilis*** fue de 0.1253 g/40 ml.
- ❖ La biomasa seca obtenida de ***Saccharomyces cerevisiae*** fue de 0.0750 g/40 ml.
- ❖ El rango de pH utilizado para el crecimiento de las dos cepas fue de 3.59 a 3.99.
- ❖ La cepa con mayor porcentaje proteínico fue ***Saccharomyces cerevisiae*** con 26.35 % y ***Candida utilis*** con 18.97 %.

RECOMENDACIONES

Después de haber realizado esta investigación y analizando los resultados obtenidos utilizando el nejayote como medio para el desarrollo de las levaduras se extiende estas recomendaciones:

- ❖ Es necesario implementar los parámetros de hidrólisis del medio para obtener mayor cantidad de azúcares reductores variando los tiempos de ebullición y concentraciones de ácido sulfúrico agregados.
- ❖ Controlar las variables de crecimiento: Temperatura, Aireación y Concentración del sustrato.
- ❖ Utilizar cal comercial para controlar el pH del medio.
- ❖ Ampliar el estudio a pequeña escala con un biorreactor para controlar el crecimiento celular y que este no se vea afectado por la contaminación bacteriana.