



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA

**OBTENCIÓN DE HIDROLIZADO ÁCIDO
DE CÁSCARA DE COCO PARA LA
PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA
UNICELULAR DE *Candida utilis* A NIVEL
LABORATORIO**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTA

JORGE EDUARDO ZAMORA SILVA

CD. OBREGÓN, SONORA

AGOSTO DE 2005

El presente trabajo forma parte del proyecto de investigación Biotecnologías para el aprovechamiento y manejo sustentable de los residuos generados en el Valle del Yaqui y financiado por el programa de apoyo a la investigación del Instituto Tecnológico de Sonora, asesorado por el M.I. Anacleto Félix Fuentes.

ÍNDICE

	Página
DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE.....	v
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ANEXOS.....	x
RESUMEN.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 JUSTIFICACIÓN.....	3
1.2 OBJETIVOS.....	4
1.2.1 Objetivo general.....	4
1.2.2 Objetivos específicos.....	5
1.3 HIPÓTESIS.....	6
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1. El Cocotero.....	7
2.1.1 Generalidades.....	7
2.1.2 Descripción del fruto.....	8
2.1.3 Fibra de coco.....	9
2.1.4 Celulosa.....	10
2.2 Proteína Unicelular.....	11
2.2.1 Definición.....	11
2.2.2 Sustratos utilizados.....	12
2.2.3 Pretratamiento ácido.....	12
2.2.4 Microorganismos utilizados.....	13
2.2.5 Valor nutritivo.....	13

	Página
2.2.6 Importancia industrial.....	15
2.3 Levaduras.....	16
2.3.1 Definición.....	16
2.3.2 Morfología.....	16
2.3.3 Reproducción.....	16
2.3.4 Fisiología.....	17
 III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	 18
3.1 Hidrólisis de la cáscara.....	19
3.1.1 Metodología.....	19
3.1.2 Muestreo.....	19
3.1.2.1 Preparación de la muestra.....	19
3.1.3 Hidrólisis para determinar la concentración peso-volumen (% p/v).....	 21
3.1.4 Hidrólisis para determinar la concentración de ácido y tiempo de hidrólisis.....	 22
3.1.5 Determinación de azúcares reductores (Técnica Folin-wu)	24
3.1.5.1 Ácido fosfomolibdico.....	24
3.1.5.2 Solución cúprico alcalina.....	24
3.1.5.3 Técnica.....	25
3.1.5.4 Cálculos.....	25
3.2 Fermentación para producción de proteína unicelular (PUC).....	26
3.2.1 Preparación del medio de cultivo.....	27
3.2.2 Obtención del inóculo.....	29
3.2.3 Fermentación.....	30
3.2.4 Determinación de biomasa producida.....	31

	Página
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1 Hidrólisis de la cáscara.....	32
4.1.1 Hidrólisis para determinar la concentración peso- volumen de cáscara (% p/v).....	32
4.1.2 Hidrólisis de la cáscara a diferente concentración de ácido sulfúrico y tiempo.....	34
4.2 Fermentación para la producción de proteína unicelular (PUC)...	37
4.2.1 Producción de biomasa.....	37
4.2.2 Monitoreo del pH.....	38
4.2.3 Monitoreo de azúcares reductores.....	39
4.3 Solidificación del hidrolizado para su uso en placa.....	40
 V. CONCLUSIONES.....	 41
 RECOMENDACIONES.....	 42
 BIBLIOGRAFÍA.....	 43
 ANEXOS.....	 45

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Composición de diferentes biomasa lignocelulósicas.....	11
2. Contenido de proteína en base seca de biomasa comparada con alimentos vegetales y animales.....	14
3. Digestibilidad de proteína proveniente de diferentes microorganismos.....	15
4. Resultado de hidrolizado a diferente concentración peso-volumen de cáscara (% p/v).....	32
5. Resultado de la hidrólisis en cáscara con diferentes tiempos.....	35
6. Producción de biomasa en los diferentes tratamientos.....	37
7. Valores de pH al inicio y final de las fermentaciones.....	38
8. Monitoreo de azúcares de los diferentes tratamientos durante la fermentación.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura de una molécula de celulosa.....	11
2. Secado de la cáscara.....	20
3. Molino.....	20
4. Diagrama para determinar la concentración peso-volumen.....	22
5. Diagrama para encontrar tratamiento óptimo de concentración de ácido y tiempo de hidrólisis.....	23
6. Diagrama para cuantificar azúcares reductores (Técnica Folin-wu)..	26
7. Diagrama para preparar el medio de cultivo.....	28
8. Propagación del inóculo para las fermentaciones.....	29
9. Frotis de <i>Candida utilis</i>	30
10. Hidrolizado para obtener la mejor relación peso–volumen de cáscara.....	33
11. Producción de azúcares durante la hidrólisis de cáscara con diferentes tiempos.....	36
12. Placa inoculada con levadura.....	40

LISTA DE ANEXOS

Anexo	Página
Glosario.....	46
1. Resultado de hidrolizado a diferente concentración peso-volumen de cáscara de coco(% p/v) con 4 % de H ₂ SO ₄ y 15 minutos de cocción (primera repetición).....	47
2. Resultado de hidrolizado a diferente concentración peso-volumen de cáscara de coco (% p/v) con 4 % de H ₂ SO ₄ y 15 minutos de cocción (segunda repetición).....	48
3. Resultado de hidrolizado a diferente concentración peso-volumen de cáscara de coco (% p/v) con 4 % de H ₂ SO ₄ y 15 minutos de cocción (tercera repetición).....	49
4. Resultados de hidrólisis a diferente concentración de ácido sulfúrico y 15 minutos de cocción con 7.5 % p/v de cáscara (primer repetición).....	50
5. Resultados de hidrólisis a diferente concentración de ácido sulfúrico y 15 minutos de cocción con 7.5 % p/v de cáscara (segunda repetición).....	51
6. Resultados de hidrólisis a diferente concentración de ácido sulfúrico y 20 minutos de cocción con 7.5 % p/v de cáscara (primer repetición).....	52

Anexo	Página
7. Resultados de hidrólisis a diferente concentración de ácido sulfúrico y 20 minutos de cocción con 7.5 % p/v de cáscara (segunda repetición).....	53
8. Resultados de hidrólisis a diferente concentración de ácido sulfúrico y 25 minutos de cocción con 7.5 % p/v de cáscara (primer repetición).....	54
9. Resultados de hidrólisis a diferente concentración de ácido sulfúrico y 25 minutos de cocción con 7.5 % p/v de cáscara (segunda repetición).....	55
10. Monitoreo de azúcares reductores durante la fermentación a pH 4.5 y 30°C con nutrientes (tratamiento 1).....	56
11. Monitoreo de azúcares reductores durante la fermentación a pH 4.5 y 30°C sin nutrientes (tratamiento 2).....	57
12. Monitoreo de azúcares reductores durante la fermentación del hidrolizado a 30°C (tratamiento 3).....	58
13. Resultados de biomasa producida, pH inicial y pH final en la fermentación tratamiento 1.....	59
14. Resultados de biomasa producida, pH inicial y pH final en la fermentación tratamiento 2.....	59
15. Resultados de biomasa producida, pH inicial y pH final en la fermentación tratamiento 3.....	59

Anexo	Página
16. Cáscara en trozos.....	60
17. Cáscara molida.....	60
18. Reactivos de Follin-Wu.....	61
19. Tinción Güstein al final de la Fermentación.....	61

RESUMEN

El cocotero es una de las plantas más valiosas para el hombre, pues se le aprovecha de muchas formas, como proveedora de alimento de bebida y de abrigo entre otros usos. Podemos utilizar cada parte del cocotero, desde la carne al interior de la fruta que puede comerse cruda o rallada y deshidratada, hasta el tronco de la planta que es utilizado para la construcción pasando por las hojas y la cáscara del fruto que también tiene otros usos. Los principales componentes de la cáscara de este fruto son la celulosa y la lignina por lo cual se le puede considerar como una fuente rica en biomasa lignocelulosica no explotada y poco valorada (<http://www.colatinco.com.mx/cocoterros.htm>).

En la actualidad la cáscara de coco se confina para ser quemada en la producción de ladrillo en nuestra región, produciendo una cantidad considerable de emisiones a la atmósfera dañando con esto a la capa de ozono e impactando al medio ambiente.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de microbiología de la Dirección de Recursos Naturales del Instituto Tecnológico de Sonora, durante el periodo comprendido de noviembre de 2004 a mayo de 2005, cuyo objetivo fue determinar los parámetros óptimos de hidrólisis ácida de cáscara de coco con el fin de obtener azúcares fermentables para la producción de biomasa de *Candida utilis* a nivel laboratorio.

Para la hidrólisis relación peso-volumen (% p/v) se utilizaron los siguientes porcentajes 5, 7.5, 10, 12.5 y 15 % de cáscara molida y en trozos en un volumen de 250 ml al 4 % con H₂SO₄ y 15 minutos de cocimiento. Cuantificando azúcares reductores por la técnica de Folín-Wu para determinar el óptimo tratamiento con la mayor producción de azúcares. En las hidrólisis posteriores se utilizó el parámetro obtenido en el experimento anterior se manejaron concentraciones de 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 y 5 % de ácido sulfúrico con 15, 20 y 25 minutos de cocimiento,

cuantificando azúcares reductores con la técnica ya mencionada para encontrar el de mayor rendimiento en azúcares.

En la fermentación se empleó un volumen de 100 ml de hidrolizado con pH ajustado a 4.5 una serie con nutrientes (0.1 % sulfato de magnesio, 0.3 % fosfato de potasio y 0.6 % sulfato de amonio), se realizó una sin nutrientes sin ajustar pH como blanco. Los tratamientos se inocularon con 1 % v/v (0.0124 g) de *Candida utilis* base húmeda incubándose por 24 horas a 30°C en un baño con agitación, monitoreando los azúcares reductores a las 0, 4, 8 y 24 horas. Después se midió el pH final y se cuantificó la biomasa por medio del peso seco.

Los resultados obtenidos muestran que los parámetros adecuados para la hidrólisis de la cáscara son 7.5 % p/v de cáscara en trozos, 3.5 % H₂SO₄ y 25 minutos de cocción fue el mejor tratamiento con 8.17 g de azúcares reductores. En la fermentación con adición de nutrientes y pH ajustado se obtuvo 0.1857g de biomasa seca en 80 ml, mientras que en la fermentación sin nutrientes con pH ajustado se obtuvo 0.1695 g de biomasa seca en 80 ml.

Por lo antes mencionado es evidente que la cáscara de coco es susceptible a la hidrólisis ácida y obtener un medio rico en azúcares para la producción de proteína unicelular a nivel laboratorio.

I.-INTRODUCCIÓN

Una de las áreas de la investigación que más auge ha tenido en los últimos tiempos es la biotecnología en todas sus ramas y es la biotecnología alimentaria una de las más atractivas, ya que ofrece alternativas a la alimentación tradicional abasteciéndonos de productos novedosos y de buena calidad. Un ejemplo es que esta rama ofrece una tercera fuente de proteína a parte de la de origen vegetal y animal, que es la de origen microbiano, la cual se puede producir a partir de un gran número de sustratos como son desechos industriales, agrícolas y ganaderos, ayudando a reducir la contaminación del medio ambiente(García, 1998).

Durante las últimas dos décadas, se han desarrollado varios procesos para la producción de microorganismos útiles como fuentes de proteína para la alimentación animal y humana, siendo el hombre quien ha consumido desde hace muchos siglos los microorganismos que se encuentran presentes en los alimentos fermentados como por ejemplo quesos, yogurt, pozol, tempe entre otros y más recientemente se ha empleado para la alimentación animal, principalmente, microorganismos que se derivan de la producción de cerveza y destilerías de alcohol (García, 1998).

En la actualidad la alimentación animal se basa en el consumo de piensos, los cuales para satisfacer los requerimientos nutricionales del animal contienen del 10 al 30 % de proteína, que generalmente es proporcionada con la incorporación de harinas de semillas de oleaginosas, como la soya, o de harinas de pescado. La utilización de la proteína unicelular para estos fines podría brindar una alternativa válida para reducir el uso de algunas fuentes tradicionales de proteína en la alimentación animal y hacerlas más disponibles al consumo humano (Bu'lock, 1987).

La idea de producir proteína unicelular no es nueva, pero solo hace algunos años que se reconoció como fuente de proteína independiente del suelo y de las condiciones agrícolas, presentando algunas ventajas sobre las fuentes convencionales:

- La tasa de crecimiento permite obtener altas productividades.
- Los microorganismos no dependen de las condiciones agrícolas o del clima, sino que pueden cultivarse en grandes fermentadores.
- Puede crecer a partir de diversos sustratos.
- La posibilidad de experimentación genética para mejorar el contenido de proteína, entre otras (Bu'lock, 1987).

El término de proteína unicelular (PUC) es el aceptado para el material celular microbiano preparado para uso como alimento o pienso. El término es en cierto modo engañoso, ya que lo que se produce no es normalmente una proteína única, sino células tratadas de distintas formas a partir de una variedad de microorganismos, tanto mono como multicelulares, bacterias, levaduras, hongos filamentosos o algas. (Bu'lock, 1987).

Con el presente trabajo se pretende ofrecer una alternativa para evitar que un residuo que es desechado al medio ambiente contamine nuestra región, utilizándolo para obtener un medio de cultivo para producir biomasa de *Candida utilis* a nivel laboratorio.

1.1 JUSTIFICACIÓN

Hoy en día la cáscara de coco en nuestra región se confina para ser quemada para la producción de ladrillo, produciendo una cantidad considerable de emisiones a la atmósfera dañando con esto a la capa de ozono e impactando al medio ambiente. La cáscara de coco esta constituida por celulosa y lignina, mayormente celulosa, la cual puede ser hidrolizada y obtener azúcares reductores para la producción de proteína unicelular a partir de *Candida utilis* a nivel laboratorio.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

Determinar los parámetros óptimos de hidrólisis ácida de cáscara de coco con el fin de obtener azúcares fermentables para la producción de biomasa de *Candida utilis* a nivel laboratorio.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Establecer los parámetros óptimos de hidrólisis ácida de la cáscara de coco: relación peso en volumen (% p/v), molida o en trozos, concentración de ácido y tiempo de hidrólisis.
- Realizar fermentaciones para la producción de biomasa a partir de *Candida utilis*.
- Monitorear parámetros de control en fermentaciones como consumo de azúcares reductores, pH inicial, pH final y producción de biomasa.
- Evaluar el efecto de las fermentaciones con y sin adición de nutrientes, pH óptimo y pH sin ajustar.

1.3 HIPÓTESIS

La cáscara de coco es susceptible a la hidrólisis ácida dando un medio rico en azúcares en el cual pueden crecer levaduras aprovechando esta fuente de carbono.

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El cocotero

2.1.1 Generalidades

Es propio de las islas de clima tropical y subtropical del océano Pacífico, sin embargo su cultivo se ha extendido también por Centroamérica, el Caribe y el África tropical (<http://www.colatinco.com.mx/cocoterros.htm>).

El cocotero es una de las plantas más valiosas para el hombre, pues se le aprovecha de muchas formas, como proveedora de alimento, de bebida y de abrigo entre otros usos. El cocotero es sin duda el representante mas famoso de todas las plantas palmaceas. Su imagen trae a la mente la playa y el mar y frecuentemente se le asocia con todo lo tropical. Su nombre en Sánscrito "kalpa vriksha" que quiere decir: "el árbol que proporciona todas las necesidades de la vida", describe fielmente al cocotero (<http://www.colatinco.com.mx/cocoterros.htm>).

Podemos utilizar cada parte del cocotero, desde la carne al interior de la fruta que puede comerse cruda o rallada y deshidratada y que es una valiosa fuente de proteínas, hasta el tronco de la planta que es utilizado para la construcción pasando por las hojas y la cáscara del fruto que también tienen otros usos (<http://www.colatinco.com.mx/cocoteross.htm>).

El cocotero es reconocido mundialmente como uno de los cultivos más rentables hoy en día debido a su aprovechamiento integral y la enorme demanda de sus productos. Es de notarse que la amplia y variada utilización de esta planta en los países que la cultivan hace que esta siempre sea de gran importancia en su aspecto económico. La copra cruda era el principal producto de exportación del cocotero pero a medida que el aceite de coco crece en popularidad su exportación se va incrementando. También hay que mencionar que la exportación del fruto en su cáscara y de la carne deshidratada de este también va en incremento. La demanda de estos productos ha creado nuevos empleos beneficiado de esta forma a los países productores (<http://www.colatinco.com.mx/cocoteross.htm>).

Históricamente el cocotero ha sido un éxito desde su descubrimiento, y hoy en día el aprovechamiento integral de esta planta sigue demostrando ampliamente su gran potencial (<http://www.colatinco.com.mx/cocoteross.htm>).

2.1.2 Descripción del fruto

Nombre científico (coco común): *Cocus nucífera*.

Familia: Pertenece a la familia de las palmáceas.

Temporada: Podemos disponer de este fruto durante todo el año.

Características del fruto: de forma redondeada, presenta una cáscara correosa externa de color amarillo o anaranjado, una capa fibrosa intermedia color marrón y un hueso central, en cuyo interior se encuentra la semilla, formada por una pulpa blanca, que es la parte comestible. Puede llegar a pesar más de 2,5 Kg (http://www.consumer.es/web/es/nutricion/aprender_a_comer_bien/guia_alimentos/frutas_y_derivados/2001/12/10/35602.php).

2.1.3 Fibra de coco

Sus principales componentes son la celulosa y lignina (Ver Figura 1). Esta última, provee la resistencia y rigidez a la fibra. Se encuentra dentro de la categoría de fibras fuertes igual que el henequén, pita, agave y abacá. Otra de sus características es ser bajo conductor de calor, así como, ser resistente al impacto de las bacterias y el agua. Estas características, hacen que la fibra de coco sea un material versátil que puede ser utilizado en cuerdas, colchones, alfombras, cepillos, entre otros (<http://www.camagro.com/frutales/docs/BoletínCoco.pdf>).

También es utilizada en obras civiles, tales como la prevención de la erosión, debido a que ayuda a sujetar el suelo y permite el crecimiento de cobertura vegetal, en este caso, se encuentra dentro de la denominación de los “geotextiles”.

Adicionalmente, puede ser utilizada para combustible casero, secado de copra, y otros usos semiindustriales (produce 3600 a 4600 kCal/kg) (<http://www.camagro.com/frutales/docs/BoletínCoco.pdf>).

También se usa como fertilizante, ya que compensa la pérdida de elementos mayores, particularmente potasio, así como materia orgánica. Finalmente, como “agrotexil” es conocido por sus beneficios para el cultivo de hortalizas y otras especies. Se utiliza como sustrato para siembra de plántulas, por su capacidad de retención de humedad y como macetas (<http://www.camagro.com/frutales/docs/BoletínCoco.pdf>).

2.1.4 Celulosa

La celulosa es una fibra vegetal que conforma las paredes celulares de los árboles y otras plantas, y que representa el 50 % de su constitución física (ver Tabla 1). La estructura química de la celulosa está formada por uniones de moléculas de glucosa adheridas entre sí por la lignina, sustancia que refuerza las células, confiriéndoles consistencia y rigidez (<http://www.papelnet.cl/celulosa/celulosa.htm>).

La celulosa es también el nombre genérico para definir un amplio rango de productos compuestos por fibras naturales. Durante siglos, esta fibra se ha constituido en la materia prima para la fabricación de diversos objetos de uso cotidiano, entre los cuales sobresale, por su importancia, la elaboración del papel.

(<http://www.papelnet.cl/celulosa/celulosa.htm>).

La estructura de la celulosa se forma por la unión de moléculas de β -glucosa a través de enlaces β -1,4-glucosídico, lo que hace que sea insoluble en agua. Es una hexosana que por hidrólisis da glucosa. La celulosa es una larga cadena polimérica de peso molecular variable, con fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$, con un valor mínimo de $n = 200$ (<http://es.wikipedia.org/wiki/Celulosa>).

La celulosa tiene una estructura lineal o fibrosa, en la que se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas de glucosa, haciéndolas impenetrables al agua, y originando fibras compactas que constituyen la pared celular de las células vegetales (<http://es.wikipedia.org/wiki/Celulosa>).

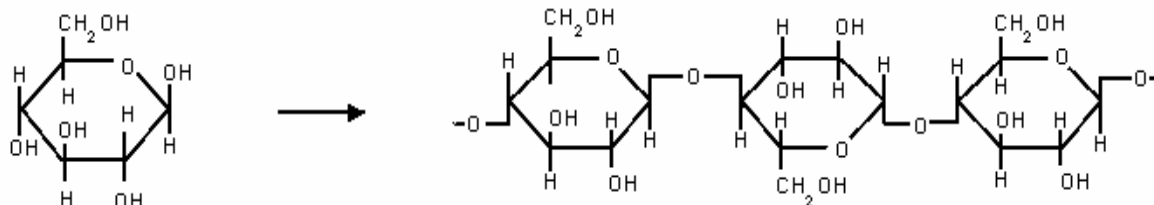


Figura 1. Estructura de una molécula de celulosa (<http://es.wikipedia.org/wiki/Celulosa>, 2005).

Tabla 1. Composición de diferentes biomazas lignocelulósicas.

VEGETAL	CELULOSA %	HEMICELULOSAS %	LIGNININAS %
Pino	42	23.5	27.8
Abedul	38.8	37.3	19.5
Paja de Trigo	34	27.6	18
Pasto Inglés	37	27	5
Caña de Maíz	38	26	11
Bagazo	38	34	11

(Scriban, 1985)

2.2 Proteína unicelular

2.2.1 Definición

El término de proteína unicelular (PUC) se refiere a alimentos proteicos derivados de microorganismos unicelulares crecidos en cultivo sumergido en diversas fuentes y desperdicios. Fue acuñado en 1966 por el Instituto Tecnológico de Massachussets y es usado hoy para describir las proteínas derivadas de bacterias, levaduras, hongos y algas, aunque no describe correctamente a todos estos materiales ya que algunos no son unicelulares; además, como seres vivos no solo contienen proteína sino también carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, vitaminas y minerales (Quintero, 1981).

2.2.2 Sustratos utilizados

Para la producción de proteína unicelular puede utilizarse una amplia gama de materiales, pero desde el punto de vista económico los sustratos más atractivos son aquellos considerados como desperdicios (Wulf, 1989). La bibliografía reporta para estos materiales una clasificación general:

- ❖ Aquellos que poseen alto valor como energético: alcanos, metanol, etanol, parafinas, etc.
- ❖ Los considerados como residuos: licores sulfíticos, esquilmos agrícolas, desperdicios industriales, excretas animales, etc.
- ❖ Algunos carbohidratos.

Para seleccionar entre un sustrato y otro se deben considerar además de la localización, disponibilidad y usos alternativos, la necesidad de un pretratamiento puesto que para algunos materiales esta es una etapa que puede elevar los costos de producción (De la Torre, 1985).

2.2.3 Pretratamiento Ácido

Este tipo de tratamiento se ha propuesto principalmente cuando el objetivo es una valoración de la celulosa en etanol. Se basa en la diferencia de resistencia a la hidrólisis ácida entre hemicelulosas y celulosas. Por lo general se utiliza Acido Sulfúrico en concentraciones entre 1 y 3 %. La temperatura y duración del

tratamiento varían según las tecnologías que se utilicen: de 200°C para un tiempo de contacto inferior a 10 segundos (reactor de flujo intermitente), o de 120-130°C para un tiempo de contacto de 30 minutos (reactor de percolación). A la salida del tratamiento el líquido que fluye contiene los azúcares (principalmente los azúcares de 5 carbonos) que provienen de la hidrólisis de las hemicelulosas (Scriban, 1985).

2.2.4 Microorganismos utilizados

Un microorganismo que es crecido como fuente de proteína para la alimentación; humana o animal debe tener ciertas propiedades básicas. Las más importantes son: no ser patógeno para plantas, animales o humanos; tener buen valor nutricional; su aceptabilidad como alimento o pienso; ausencia de compuestos tóxicos y bajos costos de producción. Los costos de producción a su vez dependen de tales características como la velocidad de crecimiento, la producción, el contenido de proteína, los requerimientos de nutrientes suplementarios, las ventajas selectivas del medio que se utiliza y las buenas propiedades de separación y secado. Entre los microorganismos más utilizados están las levaduras (*Saccharomices*, *Torulopsis* y *Candida*); algas (*Chlorella*, *Scenedesmus* y *Spirulina*); algunas bacterias y hongos (Bu'lock, 1987).

2.2.5 Valor nutritivo

La proteína unicelular ha sido utilizada como concentrado proteico en la formulación de alimentos balanceados principalmente para aves y cerdos y como sustituto de leche para becerros. Existe una gran cantidad de información disponible en relación con la composición de células microbianas, incluyendo proteínas, aminoácidos, vitaminas (especialmente del complejo B) y minerales. Puesto que el valor nutricional y la seguridad desde el punto de vista toxicológico dependen de factores complejos como el tipo de microorganismo empleado, condiciones de cultivo, presencia de contaminantes en las materias primas y otros, la evaluación final de

calidad de estas proteínas debe de establecerse en pruebas de alimentación animal, para determinar su conversión alimentaria, digestibilidad y valor biológico (Ward, 1991).

En general la calidad de PUC es bastante buena en comparación con las fuentes tradicionales (ver Tabla 2). Aunque es deficiente en metionina, en algunas ocasiones se agrega este aminoácido para aumentar el valor nutritivo del alimento. Sin embargo, como ya se menciona también hay que considerar la digestibilidad y tolerancia ante el consumidor. Se sabe que la digestibilidad depende de otros factores, del grosor de la pared celular del microorganismo (ver Tabla 3), mientras que la tolerancia esta en función del contenido de sustancias tóxicas o nocivas para el metabolismo del consumidor (Jagnow y Dawin, 1991).

Tabla 2. Contenido de proteína en base seca de biomasa comparada con alimentos vegetales y animales.

Fuente	% Proteína
Hongos filamentosos	31-50
Algas	47-63
Levaduras	47-53
Bacterias	72-75
Leche	22-25
Carne de res	81-90
Huevo	35
Pasta de soya	44

(Fuente: Cárdenas, 1985)

Tabla 3. Digestibilidad de proteína proveniente de diferentes microorganismos.

Microorganismos	% Digestibilidad
Bacterias <i>Pseudomonas</i> (metanol)	-----
Levaduras <i>Candida utilis</i> (n-alcanos)	85-96
<i>S. cerevisiae</i> (melaza)	80-90
Hongos <i>Paecilomyces varioti</i>	87 87
Algas <i>Chlorella sorokiniana</i> <i>Spirulina máxima</i>	86 84

(Fuente: Garibay, 1988).

2.2.6 Importancia Industrial

La tecnología de producción de levaduras a gran escala ha sido desarrollada durante un periodo de tiempo de más de un siglo y en especies particulares de los géneros *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Candida* ha sido estudiada detalladamente. En general, la velocidad de crecimiento de las levaduras es bastante alta, aunque más lenta que la de las bacterias de crecimiento más rápido. El pH en las fermentaciones de levadura se mantiene generalmente a valores de 3.5 a 5.0 y esto es útil para reducir el riesgo de contaminación bacteriana. Las células de levaduras pueden ser recuperadas fácilmente a partir del medio agotado por centrifugación continua. El contenido de proteína cruda de las levaduras puede ser del 55- 60 % (Bu'lock, 1987).

2.3 Levaduras

2.3.1 Definición

Las levaduras se han definido como hongos cuya forma corriente y dominante de crecimiento es unicelular (Pelczar, 1993).

2.3.2 Morfología

Son esféricas, elípticas y cilíndricas. Su tamaño varía notablemente, pudiendo tener entre 1 a 5 micrómetros de ancho por 5 a 30 micrómetros o más de largo. Cada especie tiene su aspecto característico, pero aun en un cultivo puro existen variaciones considerables de tamaño y forma de células individuales, dependiendo de la edad y del medio. Las levaduras no tienen flagelos u otros organelos de locomoción (Pelczar, 1993).

2.3.3 Reproducción

Las levaduras se reproducen por esporulación, gemación o fisión, siendo la de gemación la más común. En este procedimiento se proyecta un túbulo a partir de la vacuola nuclear adyacente al núcleo de la vacuola madre hacia el punto de la pared celular cercano a la vacuola. Allí se forma una pequeña protuberancia en la superficie externa de la célula producida por debilitamiento local de la pared celular (Pelczar, 1993).

El tubo pasa entonces por la protuberancia, la cual se alarga y se llena con el material nuclear y citoplasmático. Procedente de la célula madre. La pared de la célula recién formada contiene material recientemente sintetizado. Cuando la yema ha crecido casi al tamaño de la célula madre, el aparato nuclear de las dos células se reorienta de tal manera que los centrosomas de cada célula queden distantes del

punto de unión. Ya terminada la división nuclear se forma una pared transversal similar a la de las levaduras en división. En este momento las células madre e hija se separan. Una sola célula de levadura puede producir durante su vida un promedio de 24 células hijas (Pelczar, 1993).

2.3.4 Fisiología

Las levaduras necesitan los mismos elementos químicos que otras formas de vida: Carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, magnesio, hierro, zinc, manganeso, cobre y molibdeno. Los últimos 5 materiales se requieren cantidades ínfimas como componentes o activadores de enzimas. El carbono lo suelen obtener de azúcares, ácidos orgánicos, aldehídos o glicerinas. Parte del carbono se utiliza para la síntesis de constituyentes protoplasmáticos, pero la porción mayor es oxidada con la producción de energía para la síntesis y otros fenómenos vitales. El nitrógeno se obtiene de fuentes como sulfatos, fosfatos y cloruro de amonio. El fósforo es esencial para el crecimiento y participa en forma importante en el metabolismo de los carbohidratos. En cuanto al pH tiene una reacción óptima entre un pH de 4.5 y 5.0, mientras que la temperatura más adecuada está en el rango de 20 a 30°C, aunque la incubación a 30°C suele ser satisfactoria (Carpenter, 1984).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de la Dirección de Recursos Naturales del Instituto Tecnológico de Sonora, durante el periodo de Noviembre de 2004 a Mayo de 2005. Esta investigación consistió en determinar los parámetros óptimos de hidrólisis ácida en cáscara de coco: relación peso-volumen (%p/v), molida o en trozos, la concentración de ácido sulfúrico y tiempo de hidrólisis, para utilizarlos en el cultivo de *Candida utilis* a nivel laboratorio.

3.1 Hidrólisis de la cáscara

Esta parte del experimento se dividió en dos, la primera fue encontrar la relación peso-volumen y la segunda en encontrar la concentración de ácido sulfúrico en la solución hidrolizante y el tiempo de hidrólisis, de las cuales se selecciono la de mayor rendimiento en azúcares reductores.

3.1.1 Muestreo

La cáscara de coco se recolecto en los puestos dedicados a la venta de este fruto, ubicados por la calle Ostimuri alrededor del paseo Laguna del Nainari en Cd. Obregón, Sonora. Seleccionándose de preferencia la cáscara fresca y no muy golpeada para una adecuada manipulación de la materia prima.

3.1.2 Preparación de la muestra

Se separo la cáscara de la nuez ya que solo se utilizó la copra. Después los trozos grandes se rebanaron esto con el fin de hacer el secado más eficiente y en menor tiempo. El secado fue en un horno de calor seco Gallenkamp Size 1, a una temperatura de 70-80°C por 6 horas (ver Figura 2).El secado facilitó que la cáscara se pudiera reducir en tamaño con el objetivo de facilitar la molienda, la cual se realizo en un molino (ver Figura 3).



Figura 2. Secado de la cascara



Figura 3. Molino

3.1.3 Hidrólisis para determinar la concentración peso-volumen (% p/v)

Se realizaron hidrólisis con los siguientes porcentajes de peso en volumen: 5, 7.5, 10, 12.5 y 15 % para cáscara molida y en trozos, con tres repeticiones.

El volumen de la solución hidrolizante, la concentración de ácido y el tiempo de hidrólisis fueron constantes para todas las pruebas: 250 ml al 4 % con Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) por 15 minutos (ver Figura 4).

Después de la hidrólisis se procedió a filtrar con malla con el objeto de eliminar el bagazo, el cual se sometió un lavado con agua de arrastre (agua destilada) con el fin de obtener un mayor rendimiento en azúcares (Marcor, 1979), Mediante la siguiente formula:

$$\text{Agua de Arrastre} = 1.5 * \left(\text{Vol. inicial de la Solución Hidrolizante} - \text{Vol. de la primera Extracción} \right)$$

El líquido se dejó reposar por un tiempo de 24 horas para lograr un asentamiento de partículas que hayan logrado pasar por el filtro y por decantación obtener un líquido mas claro de color caramelo, característico de la presencia de azúcares.

Al hidrolizado obtenido se le cuantificó azúcares por el método de Folin Wu, para determinar cual fue el mejor tratamiento y seleccionarlo.

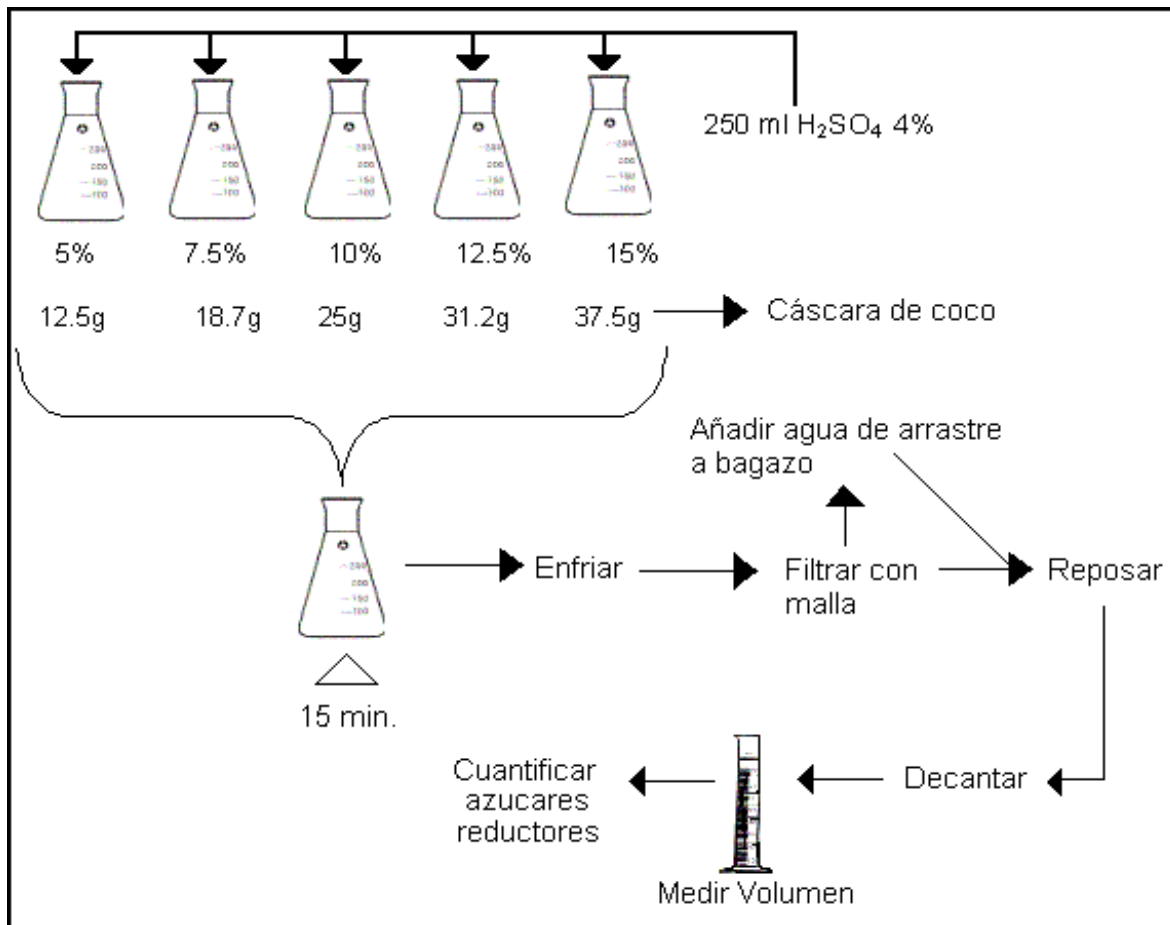


Figura 4. Diagrama para determinar la concentración peso-volumen.

3.1.4 Hidrólisis para determinar la concentración de ácido y tiempo de hidrólisis.

Del resultado de las hidrólisis peso en volumen se trabajó con el óptimo en los siguientes tratamientos:

Se utilizaron concentraciones de ácido de 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 y 5 % con tiempos de 10, 15 y 25 minutos de hidrólisis (el cual contó a partir de que empezó a hervir la solución) con dos repeticiones para cada combinación.

El volumen de ácido fue de 250 ml para todas las pruebas igual que para el primer experimento con el objetivo de tener una uniformidad en todas las pruebas ver Figura 5).

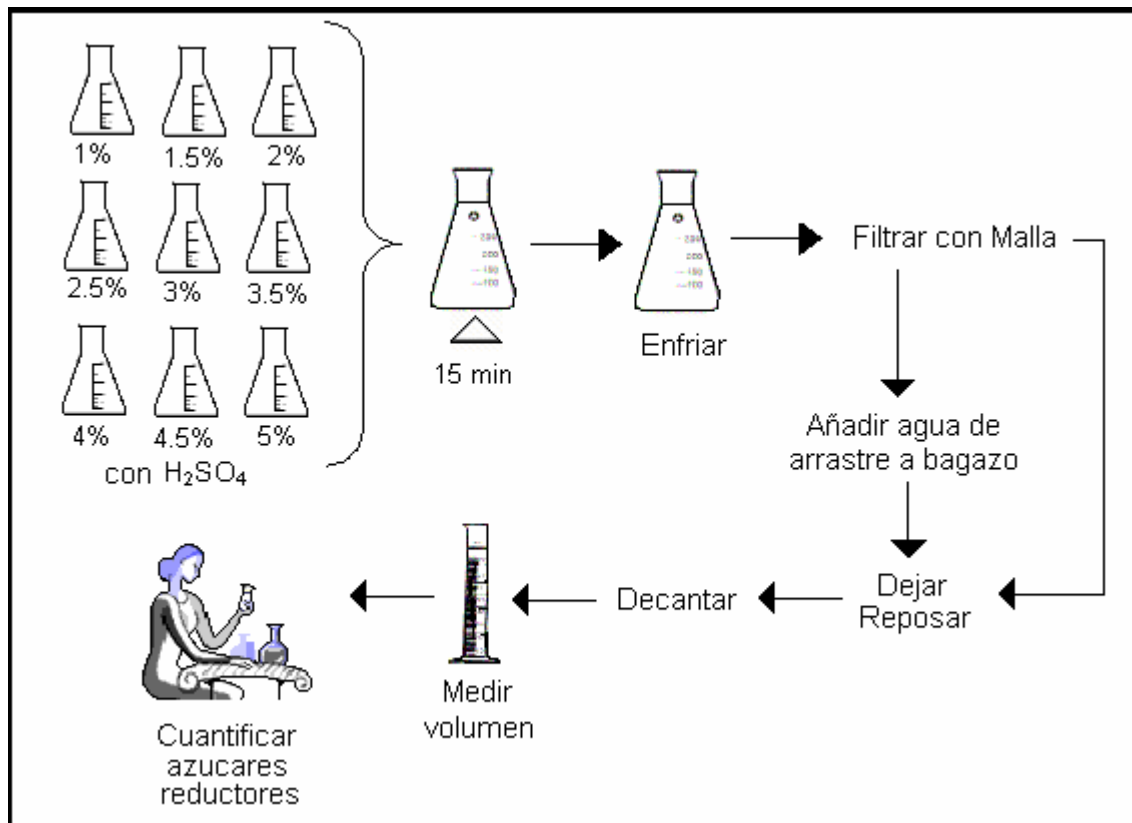


Figura 5. Diagrama para encontrar tratamiento óptimo de concentración de ácido y tiempo de hidrólisis.

NOTA:

Repetir para tiempos de 20 y 25 minutos.

3.1.5 Determinación de azúcares reductores (Método Folín-Wu)

Para desarrollar esta técnica se requirió de preparar las siguientes soluciones:

3.1.5.1 Ácido fosfomolibdico

A 35 g de Ácido molíbdico y 5 g de Tungstato sódico se añaden 200 ml de NaOH al 10 % y 200 ml de agua destilada. Se hierven intensamente durante 20 a 40 minutos, se deja enfriar y se diluye hasta 350 ml, agregar 125 ml de ácido fosfórico concentrado al 85 % y se afora a 500 ml.

Nota: El volumen inicial de la mezcla es de 400 ml, por lo que el tiempo de evaporación deberá bajar el volumen a menos de 350 ml para que se pueda realizar la segunda dilución.

3.1.5.2 Solución Cúprico Alcalina

Disolver 40 g de Carbonato sódico puro y anhidro en 400 ml de agua y se pasan a un matraz de 1 L, añadir 7.5 g de Ácido tartárico y cuando este se ha disuelto, agregar 4.5 g de Sulfato de cobre pentahidratado. Mezclar bien la solución y aforar a 1 L. Si los productos químicos usados no tienen una pureza adecuada, se puede formar un sedimento de óxido cuproso en el transcurso de una a dos semanas. Si este es el caso se puede extraer con un sifón el reactivo transparente trasnparente que sobrenada ó bien se puede filtrar con un papel filtro de buena calidad. Para comprobar la ausencia de cobre cuproso en la solución, se ponen 2 ml de esta solución en un tubo de ensaye y se añaden 2 ml de la solución de Ácido fosfomolíbdico, el color azul intenso del cobre debe desaparecer casi por completo.

3.1.5.3 Técnica

A un mililitro de hidrolizado agregar de 80-85 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7 (o en el rango 6.8-7.2) y se afora a 100 ml con agua destilada. Tomar una alícuota de 2 ml y se pasa a un tubo de Folin Wu, mientras tanto se prepara el baño Maria. Se agrega al tubo de Folin 2 ml de solución cúprico alcalina y se deja en el baño Maria de 7 a 8 minutos, enseguida se enfría y se le agregan 2 ml de ácido fosfomolibdico y se afora a 25 ml. Agitar vigorosamente para obtener una mezcla homogénea y se le toma lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda (λ) de 530 nm. También se le toma lectura a un blanco de reactivos y su longitud de onda se le resta a todas las lecturas que se realicen (ver Figura 6).

Para efecto de cálculos se utiliza una muestra testigo de xilosa al 1 %.

NOTA:

La solución testigo de xilosa debe hacerse lo mas preciso posible, debido a que de esta dependerá la confiabilidad de los cálculos de la muestra problema frente al testigo.

3.1.5.4 Cálculos

$$\% \text{ Azucares Reductores} = \left(\text{Absorbancia de la muestra problema} \right) \left(\text{Factor} \right)$$

El factor se obtiene relacionando la concentración de la solución de xilosa con su lectura en el espectrofotómetro:

F = Concentración de xilosa / Densidad Óptica

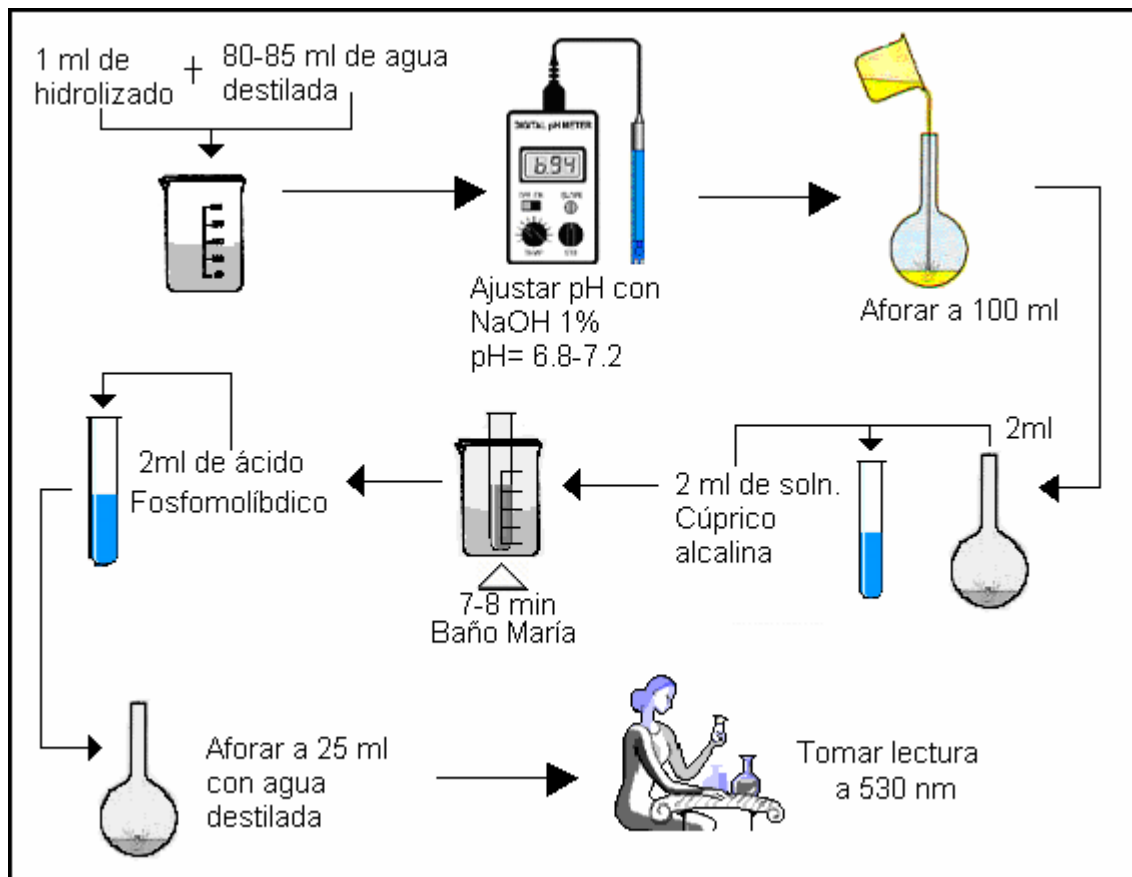


Figura 6. Diagrama para cuantificar azúcares reductores (técnica de Folín-Wu).

3.2 Fermentación para producción de proteína unicelular (PUC)

En la producción de proteína unicelular de *Candida utilis* a nivel laboratorio se utilizó el hidrolizado obtenido con mayor concentración de azúcares reductores. También se evaluó el efecto del pH y la adición de nutrientes, para ver si el medio de cultivo requiere nutrientes, a la misma temperatura de fermentación para todas las pruebas.

3.2.1 Preparación del medio de cultivo

Se hidrolizó cáscara en una relación de peso-volumen de 7.5 % a una concentración de 3.5 % de H_2SO_4 y un tiempo de hidrólisis de 25 minutos hasta alcanzar un volumen de 1085 ml de hidrolizado, el cual se filtró con una malla, se dejó reposar por 24 horas para lograr una sedimentación de partículas que hayan logrado pasar por el filtro y por decantación obtener un líquido transparente.

El sobrenadante se distribuyó en tres matraces de 500 ml con 300 ml de medio c/u, en dos de los matraces, se les ajustó el pH a 4.5 con NaOH al 40 % , a uno de pH ajustado se le adicionó como nutrientes 0.1 % de Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.3 % de Fosfato de potasio (KH_2PO_4) y 0.6 % de Sulfato de amonio ($\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$), de cada matraz se tomarón tres alícuotas de 100 ml y se colocaron en frascos de vidrio previamente esterilizados (ver Figura 7).

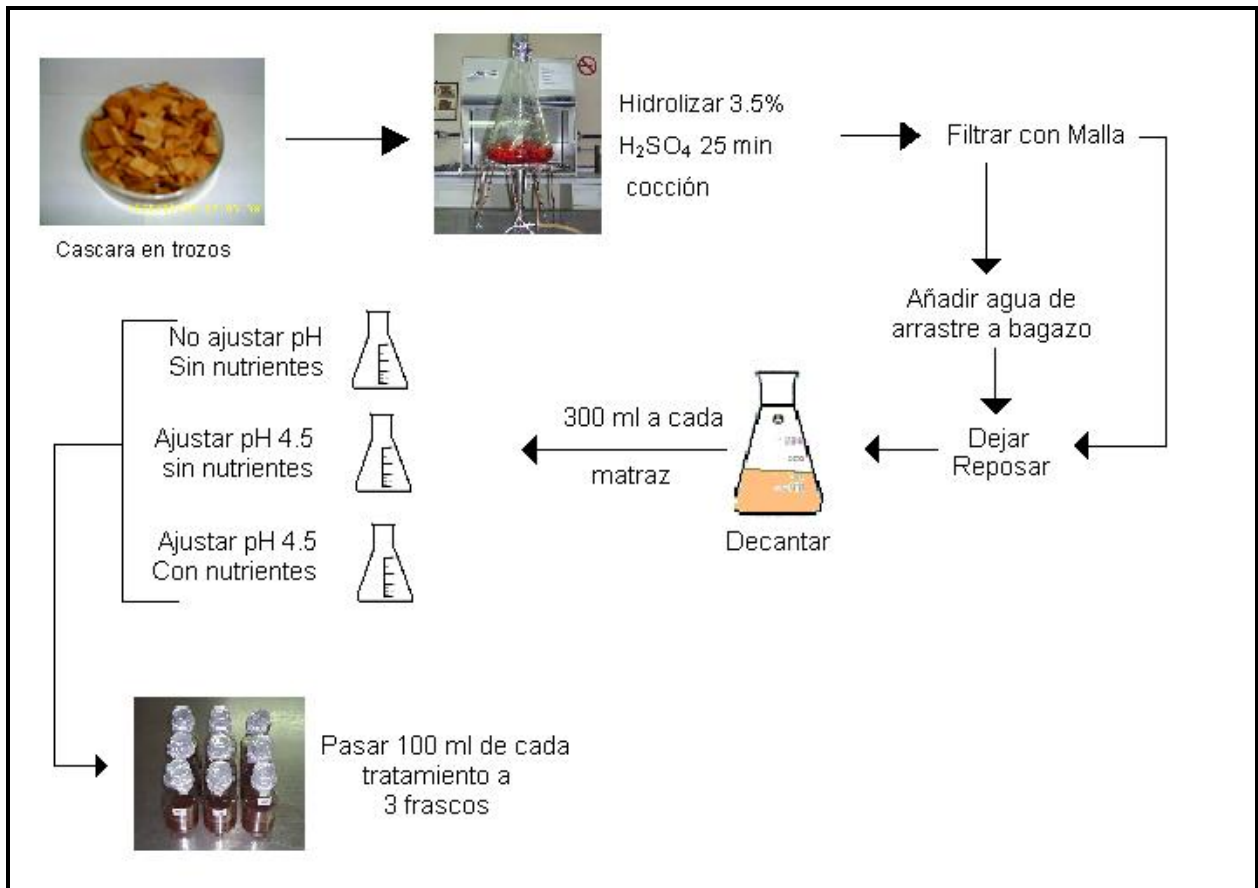


Figura 7. Diagrama para preparar el medio de cultivo.

3.2.2 Obtención del inóculo

La cepa de *Candida utilis* fue adquirida del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Dirección de Recursos Naturales del Instituto Tecnológico de Sonora, unidad obregón-centro. Siguiendo el procedimiento descrito en la Figura 8 para su crecimiento en forma masiva utilizando agar dextrosa de papa e incubándose a 30°C por 48 horas, así mismo se realizaron frotis (ver Figura 9) para ver si había contaminación microbiana y para verificar morfología.

Una vez listo se inocular cada matraz con el 1 % v/v (0.0124 g).

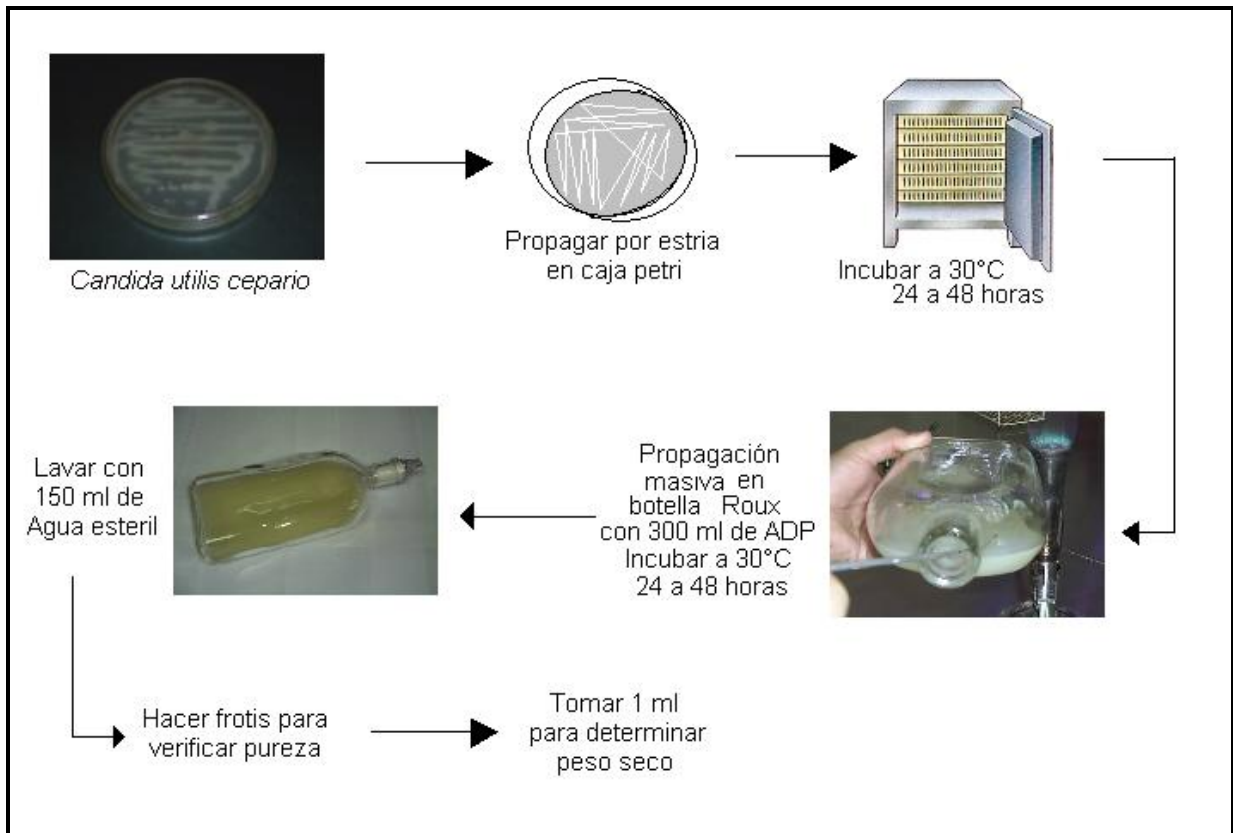


Figura 8. Propagación del inoculo para las fermentaciones

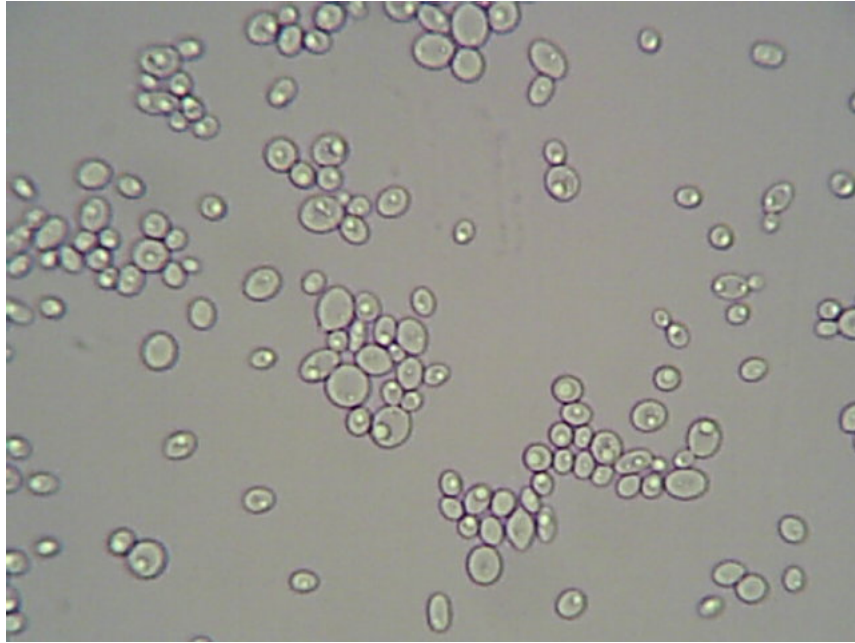


Figura 9. Frotis de *Candida utilis*

3.2.3 Fermentación

Las fermentaciones se incubaron a 30°C en un baño con agitación Orbit Water con una velocidad de agitación de 100 rpm (constante para todos los tratamientos), el tiempo de fermentación fue de 24 horas, monitoreándose los azúcares reductores a las 0 , 4, 8 y 24 horas por la técnica de Folín-Wu para ver su evolución. Pasadas las 24 horas se midió el pH final y se determinó el mejor tratamiento cuantificando la biomasa producida por medio del peso seco.

3.2.4. Determinación de biomasa producida

La biomasa producida fue cuantificada por peso seco, tomando 80 ml de cada frasco de la fermentación, los cuales se filtraron al vacío con un filtro Whatman número 41 previamente pesado, después se doblo el papel y fue colocado sobre una caja petri limpia y seca. Se secaron en un horno Gallenkamp Size 1 a 80°C por 4 horas, posteriormente se enfriaron y fueron pesados en una balanza analítica. Se realizo el mismo procedimiento para 1 ml de inculo inicial para restarle su valor a los tratamientos y así obtener los gramos de biomasa seca en 80 ml.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Hidrólisis de la cáscara

4.1.1 Hidrólisis para determinar la concentración peso-volumen de cáscara (% p/v)

Los resultados de las hidrólisis realizadas en esta parte de la investigación se muestran en la Tabla 4 y en la Figura 10, donde se observa que la mejor fue de 7.5 % p/v en trozos ya que fue el de mayor gramos de azúcares reductores producidos en promedio.

Tabla 4. Resultado de hidrolizado a diferente % p/v

% p/v	g de cáscara	g de Azucares Reductores
5 %M	12.5	2.42
5 %T	12.5	2.66
7.5 %M	18.75	2.79
7.5 %T	18.75	3.78
10 %M	25	2.35
10 %T	25	2.71

M= molida T= trozos

Para las pruebas de 12.5 y 15 % p/v tanto como para molida y en trozos no fue posible llevar a cabo la hidrólisis ya que absorbían completamente la solución hidrolizante lo cual no permitió una ebullición adecuada.

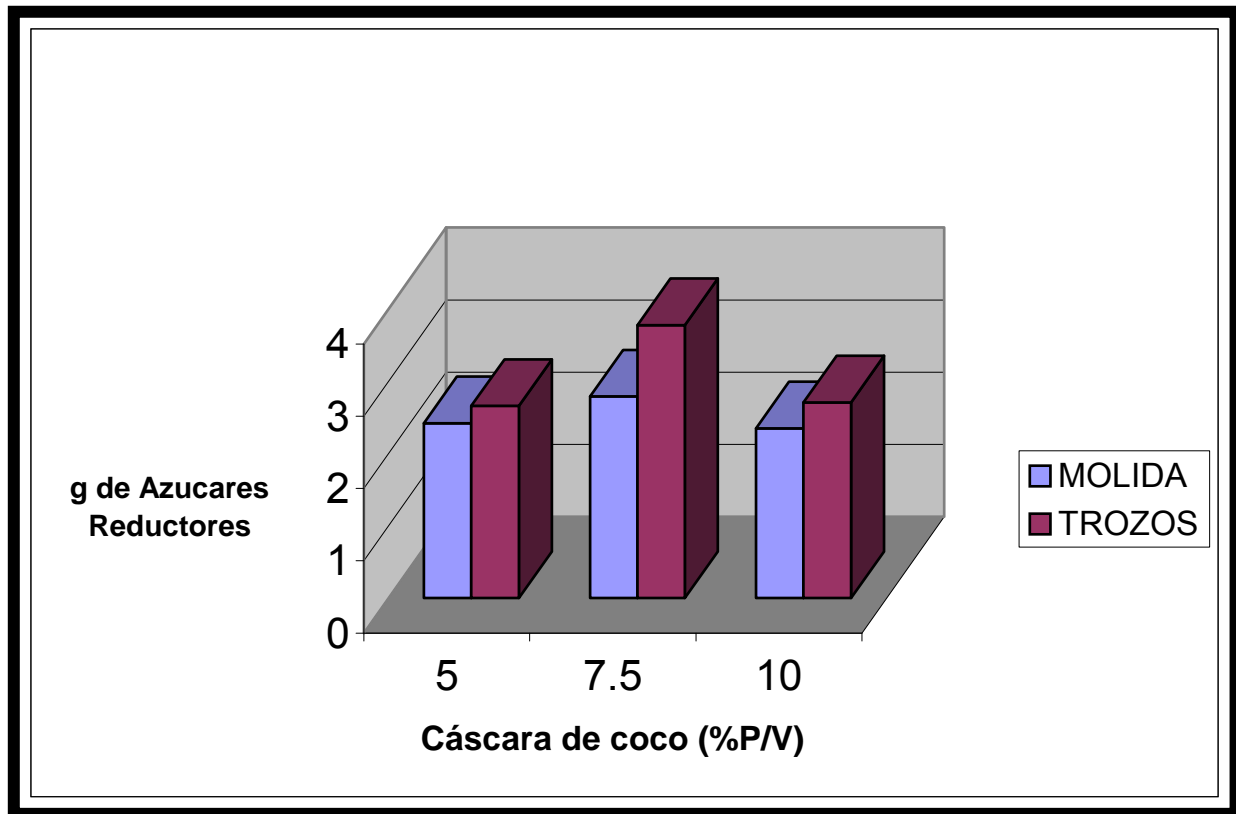


Figura 10. Hidrolizado para obtener la mejor relación peso-volumen de cáscara.

4.1.2. Hidrólisis de la cáscara a diferente concentración de ácido sulfúrico y tiempo.

Los resultados de las hidrólisis realizadas (Ver anexos de 4-9) se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) con un $\alpha = 0.05$ y a una prueba de comparación de medias DUNCAN para observar si hubo diferencias significativas entre los tratamientos, utilizando el paquete estadístico Statgraphics plus versión 3.0.

El diseño experimental utilizado fue un diseño factorial 3 x 9 donde la variable independiente fue la concentración de ácido y la variable dependiente fue los gramos de azúcares producidos. Se analizaron dos factores, el primero fue la concentración de H_2SO_4 con 9 niveles y el segundo fue el tiempo de hidrólisis con 3 niveles.

En la Tabla 5 se muestran los promedios de estos tratamientos y con la prueba de DUNCAN se observó que la concentración de 3.5% tuvo diferencias significativas respecto a los demás tratamientos. Respecto al tiempo de hidrólisis también se observaron diferencias significativas entre los tiempos utilizados, siendo el de 25 minutos el mejor tiempo.

Tabla 5. Resultado de la hidrólisis en cascara con diferentes tiempos.

Tratamiento % H₂SO₄	15 min. g azúcares	20 min. g azúcares	25 min. g azúcares
1.0	0.83	1.19	4.82
1.5	1.24	1.23	6.5
2.0	2.25	2.18	6.36
2.5	2.39	2.67	5.88
3.0	3.18	5.36	6.01
3.5	3.55	4.26	8.17
4.0	4	5.1	6.35
4.5	3.53	5.21	5.64
5.0	3.77	4.87	4.74

En la Figura 11 se observa que el tratamiento con un tiempo de 25 minutos y una concentración de ácido sulfúrico de 3.5 % fue la óptima ya que se produjo la mayor cantidad de azúcares.

Dicho resultado concuerda con Scriban, 1985 donde reporta que la concentración de ácido sulfúrico en un pretratamiento ácido va de 1 a 3 % y que el líquido obtenido contiene los azúcares, principalmente de 5 carbonos, que provienen de la hidrólisis de las hemicelulosas.

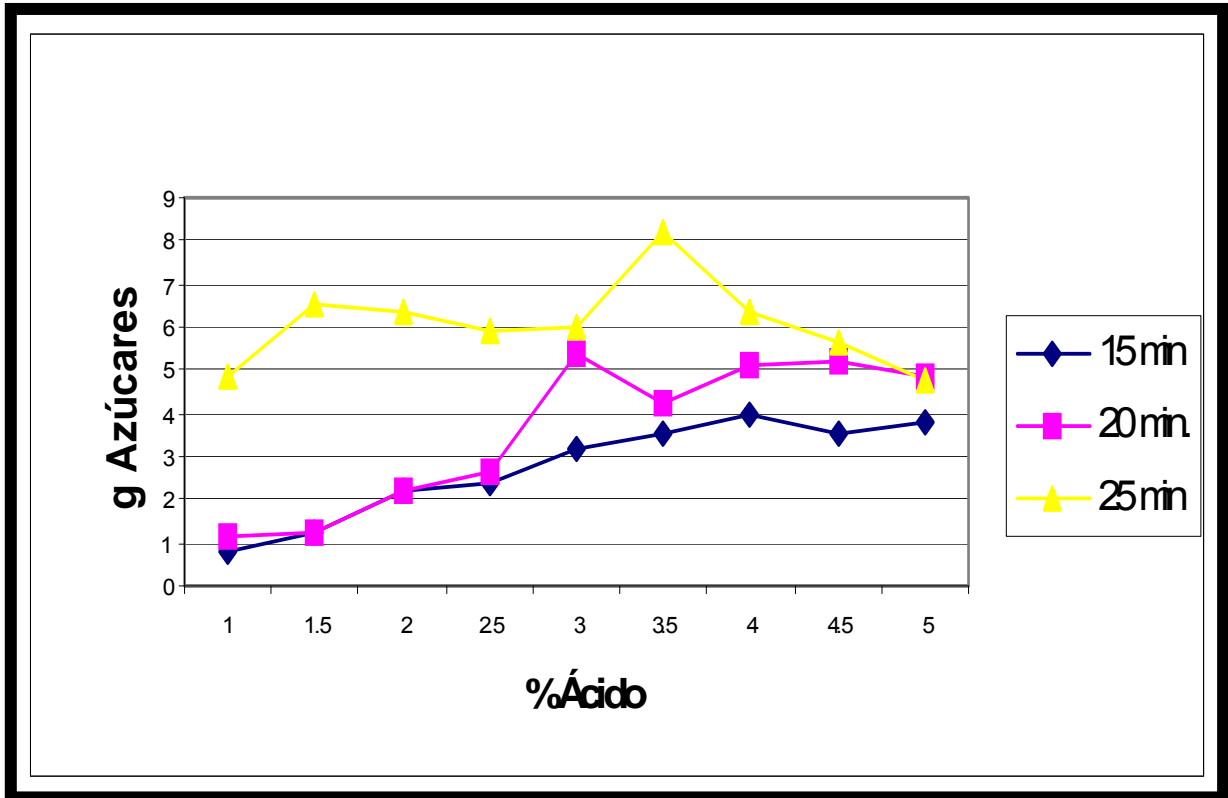


Figura 11. Producción de azúcares durante la hidrólisis de cáscara con diferentes tiempos.

4.2 Fermentación para la producción de puc

4.2.1 Producción de biomasa

En la Tabla 6 se muestran los resultados de la producción de biomasa al final de las fermentaciones y se observó que los promedios de biomasa producida de los tratamientos con nutrientes y sin nutrientes, se tiene que hay un 8.7% más de biomasa en los tratamientos con nutrientes.

Carpenter, 1984 menciona que esto se puede deber a que el magnesio se requiere en cantidades trazas como componentes o activadores de enzimas, el nitrógeno proviene del sulfato de amonio y el fósforo es esencial para el crecimiento y participa en forma importante en el metabolismo de los carbohidratos, de los cuales la porción mayor es oxidada con la producción de energía para la síntesis y otros fenómenos vitales, incrementando la producción de células ocasionando una mayor cantidad de biomasa.

Tabla 6. Producción de biomasa en los diferentes tratamientos.

Tratamientos	g de biomasa
N1	0.1842
N2	0.1950
N3	0.1779
SN1	0.1781
SN2	0.1646
SN3	0.1658
H1	0.0488
H2	0.0463
H3	0.0318

N= nutrientes SN= sin nutrientes H= hidrolizado

4.2.2 Monitoreo del pH

El pH se midió al inicio y al final de la fermentación como se muestra en la Tabla 7 donde se observó un comportamiento uniforme para todos los tratamientos con el pH ajustado a 4.5. Bu'lock, 1987 reporta que el pH de las fermentaciones de levadura se mantiene generalmente entre valores de 3.5 a 5.0, rango en el que se mantuvieron los tratamientos con el pH ajustado.

Tabla 7. Valores de pH al inicio y final de las fermentaciones.

Tratamiento	pH inicial	pH final
N1	4.5	4.28
N2	4.5	4.25
N3	4.5	4.27
SN1	4.5	4.14
SN2	4.5	4.37
SN3	4.5	4.44
H1	0.51	0.55
H2	0.51	0.57
H3	0.87	0.82

N= nutrientes SN= sin nutrientes H= hidrolizado

4.2.3 Monitoreo de azúcares reductores

Los resultados del monitoreo de los azúcares reductores en las fermentaciones para cada tratamiento (Ver Anexos 10-12) se muestran en la Tabla 8. Se observa que en todos los tratamientos la cantidad disminuye respecto a la inicial, debido a que conforme las levaduras se reproducen, estas utilizan una parte del carbono de los azúcares presentes en el medio, el cual es utilizado para la síntesis de constituyentes protoplasmáticos, pero la porción mayor es oxidada con la producción de energía para la síntesis y otros fenómenos vitales como la reproducción según el autor Carpenter, 1984.

Tabla 8. Monitoreo de azúcares de los diferentes tratamientos durante la fermentación.

Tratamiento	g azúcares Iniciales	g azúcares finales
N1	2.50	0.11
N2	2.45	0.07
N3	2.49	0.06
SN1	2.54	0.09
SN2	2.10	0.08
SN3	2.47	0.12
H1	2.42	0.99
H2	2.51	1.07
H3	2.54	1.10

N= nutrientes

SN= sin nutrientes

H= hidrolizado

4.3. Solidificación del hidrolizado para su uso en placa.

Del hidrolizado obtenido con los parámetros óptimos se preparo 100 ml con agar al 2 % para solidificar y vaciar en placa esto con el fin de observar el comportamiento y crecimiento de la levadura *Candida utilis* y hongo *Aspergillus Níger*.

Se observó un crecimiento bueno en las placas inoculadas con la levadura(Ver Figura 12) pero no para la de hongos donde el crecimiento fue nulo, esto se debe a que el hongo requiere la adición de nutrientes al medio ya que el comportamiento de la levadura en las fermentaciones con nutrientes y sin nutrientes presento crecimiento. Con esto se puede decir entonces para este caso que la levadura con las condiciones óptimas de temperatura y pH puede desarrollarse en un medio rico en azucares con y sin nutrientes.



Figura 12. Placa inoculada con levadura *Candida utilis*

CONCLUSIONES

Analizando los resultados obtenidos en la presente investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

- La relación peso en volumen en donde se obtuvo un mayor rendimiento en azúcares fue la de 7.5 % p/v, de cáscara en trozos.
- La mejor combinación de tratamientos para hidrolizar cáscara de coco fue a 3.5 % H_2SO_4 y 25 minutos de cocimiento, dando 8.17 g de azúcares reductores.
- De las fermentaciones en el tratamiento con nutrientes y pH ajustado se obtuvo una producción de 0.1857 g de biomasa seca en 80 ml en un lapso de 24 horas.
- De las fermentaciones en el tratamiento sin nutrientes y pH ajustado se obtuvo una producción de 0,1695 g de biomasa seca en 80 ml en un lapso de 24 horas.
- El pH del medio tiene que ser ajustado, ya que de lo contrario el pH del Hidrolizado inhibe la reproducción de la levadura por su pH tan bajo, entre 0.51 y 0.87.

RECOMENDACIONES

Con el análisis de los resultados de la presente investigación se recomienda:

- Realizar un estudio con un mayor número de repeticiones utilizando los parámetros óptimos de hidrólisis para la producción de PUC a nivel laboratorio y después a planta piloto.
- Además de la adición de nutrientes, realizar pruebas con aeración en la fermentación.
- Realizar un monitoreo de biomasa producida durante la fermentación para determinar el tiempo mínimo de fermentación.
- Caracterizar la PUC producida bajo las condiciones óptimas determinadas.
- Realizar un estudio para producir un medio sólido o en caldo con extracto de hidrolizado de cáscara de coco para el cultivo y aislamiento de levaduras.

BIBLIOGRAFÍA

Bu'lock, John. 1987. Biotecnología básica. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España. Pp.285-308.

Carpenter, Philip. 1984. Microbiología. Cuarta edición. Ed. Iberoamericana S.A. de C. V. México, D.F. P.p 324-325.

De la Torre, M. 1985. Utilización de los recursos celulósicos en la alimentación animal. Ed. I.P.N. México. Pp. 383-386.

García Garibay M. 1998. Biotecnología alimentaría. Ed. Limusa. México. Pp.381 – 392.

Jagnow, G. y Dawing, W. 1991. Biotecnología. Introducción con experimentos modelo. Ed. Acribia. España. Pp 57-62.

Madigan, Michael T. 1998. Brook Biología de los microorganismos. Ed. Pearson Education. Inc. España. Pp 432-433.

Marcor, Roberto. 1979. "Hidrolizado de la paja de trigo para la obtención de proteína unicelular y como subproducto yeso para uso agrícola e industrial".

Pelczar, m. 1993. Microbiología. Segunda Edición. Ed. McGraw Hill. México, D.F. P.p. 275-280.

Quintero, R. 1981. Ingeniería bioquímica, teoría y aplicaciones. Ed. Alambra Mexicana. México, D.F. Pp. 153 – 163.

Scriban, Rene. 1985. Biotecnología. Ed. Manual moderno. México. Pp. 583-588.

Ward, Owen. 1991. Biotecnología de la fermentación. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. Pp. 111 – 116.

Wulf Crueger. 1989. Manual de microbiología industrial. Ed. Acribia. España. Pp. 353 – 364.

<http://www.colatinco.com.mx/cocoteros.htm>

<http://www.camagro.com/frutales/docs/BoletinCoco.pdf>

http://www.consumer.es/web/es/nutricion/aprender_a_comer_bien/guia_alimentos/frutas_y_derivados/2001/12/10/35602.php

<http://www.papelnet.cl/celulosa/celulosa.htm>

<http://es.wikipedia.org/wiki/Celulosa>

ANEXOS

GLOSARIO

Abs: absorbancia

Abs corregida: absorbancia menos blanco de reactivos

Biom-prod.: biomasa producida

BS: biomasa seca

H1, H2, H3: blanco para la fermentación (sin ajustar pH y sin nutrientes)

N1, N2, N3: Tratamiento con nutrientes y pH ajustado

pHi: pH inicial

pHf: pH final

PF: peso de papel filtro

PF + BS: peso de papel filtro más biomasa seca

SN1, SN2, SN3: tratamiento sin nutrientes y pH ajustado

Vol: volumen

% p/v: porcentaje peso en volumen

Anexo 1. Resultado de hidrolizado a diferente concentración peso-volumen de cáscara de coco (% p/v) con 4 % de H₂SO₄ y 15 minutos de cocción

Primera repetición

Relación peso/volumen (% p/v)	g cascara	Volumen 1er. extracción	Agua de arrastre ml	Vol. Total ml	Abs	Abs Corregida	Factor	% Azucares Reductores	g de Azucares Reductores	Promedio de 3 repeticiones
Blanco					0.086					
Xilosa					0.311	0.225	4.4	1	1	
5M	12.5	140	165	338	0.271	0.185	4.4	0.81	2.75	2.42
5T	12.5	135	172	350	0.243	0.157	4.4	0.69	2.41	2.66
7.5M	18.75	70	270	430	0.285	0.199	4.4	0.87	3.76	2.79
7.5T	18.75	50	300	420	0.319	0.233	4.4	1.02	4.3	3.78
10M	25	105	217	350	0.182	0.096	4.4	0.44	1.47	2.35
10T	25	105	217	330	0.225	0.139	4.4	0.61	2.01	2.71

NOTA:

M = Cascara Molida

T = Cascara en trozos

Anexo 2. Resultado de hidrolizado a diferente concentración peso-volumen de cáscara de coco (% p/v) con 4 % de H₂SO₄ y 15 minutos de cocción

Segunda repetición

Relación peso/volumen (% p/v)	g cascara	Volumen 1er. extracción	Agua de arrastre ml	Vol. Total ml	Abs	Abs Corregida	Factor	% Azucares Reductores	g de Azucares Reductores	Promedio de 3 repeticiones
Blanco					0.076					
Xilosa					0.295	0.219	4.5	1	1	
5M	12.5	175	112	230	0.262	0.186	4.5	0.83	1.92	2.42
5T	12.5	130	180	305	0.277	0.201	4.5	0.90	2.75	2.66
7.5M	18.75	165	127	285	0.238	0.162	4.5	0.72	2.07	2.79
7.5T	18.75	100	225	350	0.330	0.254	4.5	1.14	4.0	3.78
10M	25	145	157	320	0.300	0.224	4.5	1.08	3.22	2.35
10T	25	85	247	320	0.310	0.234	4.5	1.05	3.36	2.71

NOTA:

M = Cascara Molida

T = Cascara en trozos

Anexo 3. Resultado de hidrolizado a diferente concentración peso-volumen de cáscara de coco (% p/v) con 4 % de H₂SO₄ y 15 minutos de cocción

Tercera repetición

Relación peso/volumen (% p/v)	g cascara	Volumen 1er. extracción	Agua de arrastre ml	Vol. Total ml	Abs	Abs Corregida	Factor	% Azucares Reductores	g de Azucares Reductores	Promedio de 3 repeticiones
Blanco					0.067					
Xilosa					0.298	0.231	4.3	1	1	
5M	12.5	165	127	290	0.277	0.210	4.3	0.90	2.61	2.42
5T	12.5	160	135	290	0.295	0.228	4.3	0.98	2.84	2.66
7.5M	18.75	165	127	285	0.275	0.208	4.3	0.89	2.54	2.79
7.5T	18.75	140	165	295	0.308	0.241	4.3	1.03	3.05	3.78
10M	25	165	127	275	0.267	0.200	4.3	0.86	2.36	2.35
10T	25	125	187	295	0.286	0.219	4.3	0.94	2.77	2.71

NOTA:

M = Cascara Molida

T = Cascara en trozos

Anexo 4. Resultados de hidrólisis a diferente concentración de ácido sulfúrico y 15 minutos de cocción con 7.5 % p/v de cáscara (Primer repetición)

Tratamiento (H₂SO₄)	Hidrolizado 1er. Extracción ml	Agua de arrastre ml	Hidrolizado Total ml	Abs	Abs Corregida	Factor	% Azúcares Reductores	g de Azúcares Reductores	Promedio de 2 repeticiones
Blanco				0.045					
Xilosa				0.283	0.238	4.2	1	1	
1.0	110	210	310	0.105	0.060	4.2	0.25	0.78	0.83
1.5	120	195	320	0.135	0.090	4.2	0.37	1.20	1.24
2.0	135	172	310	0.228	0.183	4.2	0.76	2.38	2.25
2.5	125	187	315	0.233	0.188	4.2	0.78	2.48	2.39
3.0	115	202	320	0.281	0.236	4.2	0.99	3.17	3.18
3.5	110	210	315	0.355	0.310	4.2	1.30	4.10	3.55
4.0	115	202	305	0.423	0.378	4.2	1.58	4.84	4
4.5	130	180	315	0.315	0.270	4.2	1.13	3.58	3.53
5.0	125	187	310	0.351	0.306	4.2	1.28	3.98	3.77

Anexo 5. Resultados de hidrólisis a diferente concentración de ácido sulfúrico y 15 minutos de cocción con 7.5 % p/v de cáscara (Segunda repetición)

Tratamiento (H₂SO₄)	Hidrolizado 1er. Extracción ml	Agua de arrastre ml	Hidrolizado Total ml	Abs	Abs Corregida	Factor	% Azúcares Reductores	g de Azúcares Reductores	Promedio de 2 repeticiones
Blanco				0.045					
Xilosa				0.283	0.238	4.2	1	1	
1.0	130	180	300	0.116	0.071	4.2	0.29	0.89	0.83
1.5	125	187	305	0.145	0.100	4.2	0.42	1.28	1.24
2.0	125	187	305	0.211	0.166	4.2	0.69	2.12	2.25
2.5	120	195	310	0.222	0.177	4.2	0.74	2.30	2.39
3.0	105	217	335	0.273	0.228	4.2	0.95	3.20	3.18
3.5	140	165	295	0.288	0.243	4.2	1.02	3.01	3.55
4.0	150	150	300	0.297	0.252	4.2	1.05	3.17	4
4.5	130	180	300	0.322	0.277	4.2	1.16	3.49	3.53
5.0	140	165	300	0.329	0.284	4.2	1.19	3.57	3.77

Anexo 6. Resultados de hidrólisis a diferente concentración de ácido sulfúrico y 20 minutos de cocción con 7.5 % p/v de cáscara (Primer repetición)

Tratamiento (H₂SO₄)	Hidrolizado 1er. Extracción ml	Agua de arrastre ml	Hidrolizado Total ml	Abs	Abs Corregida	Factor	% Azucares Reductores	g de Azucares Reductores	Promedio de 2 repeticiones
Blanco				0.048					
Xilosa				0.297	0.249	4.01	1	1	
1.0	160	135	295	0.112	0.064	4.01	0.25	0.75	1.19
1.5	150	157	300	0.161	0.113	4.01	0.45	1.35	1.23
2.0	150	150	305	0.228	0.180	4.01	0.72	2.20	2.18
2.5	150	150	300	0.276	0.228	4.01	0.91	2.74	2.67
3.0	145	157	300	0.547	0.499	4.01	2	6	5.36
3.5	150	150	295	0.402	0.354	4.01	1.41	4.18	4.26
4.0	140	165	310	0.426	0.378	4.01	1.51	4.69	5.10
4.5	145	157	300	0.484	0.436	4.01	1.74	5.24	5.21
5.0	150	150	300	0.457	0.409	4.01	1.64	4.92	4.87

Anexo 7. Resultados de hidrólisis a diferente concentración de ácido sulfúrico y 20 minutos de cocción con 7.5 % p/v de cáscara (Segunda repetición)

Tratamiento (H₂SO₄)	Hidrolizado 1er. Extracción ml	Agua de arrastre ml	Hidrolizado Total ml	Abs	Abs Corregida	Factor	% Azucares Reductores	g de Azucares Reductores	Promedio de 2 repeticiones
Blanco				0.048					
Xilosa				0.297	0.249	4.01	1	1	
1.0	140	165	295	0.187	0.139	4.01	0.55	1.64	1.19
1.5	175	112	280	0.147	0.099	4.01	0.39	1.11	1.23
2.0	160	135	290	0.234	0.186	4.01	0.74	2.16	2.18
2.5	160	135	295	0.268	0.220	4.01	0.88	2.60	2.67
3.0	150	150	295	0.448	0.400	4.01	1.60	4.73	5.36
3.5	140	165	295	0.416	0.368	4.01	1.47	4.35	4.26
4.0	145	157	305	0.449	0.451	4.01	1.80	5.51	5.10
4.5	135	172	295	0.487	0.439	4.01	1.76	5.19	5.21
5.0	150	150	295	0.457	0.409	4.01	1.64	4.83	4.87

Anexo 8. Resultados de hidrólisis a diferente concentración de ácido sulfúrico y 25 minutos de cocción con 7.5 % p/v de cáscara (Primer repetición)

Tratamiento (H₂SO₄)	Hidrolizado 1er. Extracción ml	Agua de arrastre ml	Hidrolizado Total ml	Abs	Abs Corregida	Factor	% Azúcares Reductores	g de Azúcares Reductores	Promedio de 2 repeticiones
Blanco				0.46					
Xilosa				0.305	0.259	3.86	1	1	
1.0	140	165	295	0.431	0.385	3.86	1.48	4.38	4.82
1.5	170	120	295	0.623	0.577	3.86	2.22	6.23	6.50
2.0	180	105	280	0.575	0.529	3.86	2.04	5.71	6.36
2.5	135	172	305	0.522	0.476	3.86	1.83	5.60	5.88
3.0	140	165	290	0.584	0.538	3.86	2.07	6.02	6.01
3.5	155	142	290	0.784	0.738	3.86	2.84	8.26	8.17
4.0	140	165	290	0.614	0.568	3.86	2.19	6.35	6.35
4.5	115	202	300	0.527	0.481	3.86	1.85	5.56	5.64
5.0	145	157	290	0.486	0.440	3.86	1.60	4.92	4.74

Anexo 9. Resultados de hidrólisis a diferente concentración de ácido sulfúrico y 25 minutos de cocción con 7.5 % p/v de cáscara (Segunda repetición)

Tratamiento (H₂SO₄)	Hidrolizado 1er. Extracción ml	Agua de arrastre ml	Hidrolizado Total ml	Abs	Abs Corregida	Factor	% Azucares Reductores	g de Azucares Reductores	Promedio de 2 repeticiones
Blanco				0.046					
Xilosa				0.305	0.259	3.86	1	1	
1.0	130	180	295	0.508	0.462	3.86	1.78	5.26	4.82
1.5	145	157	290	0.651	0.605	3.86	2.33	6.77	6.50
2.0	160	135	280	0.695	0.649	3.86	2.50	7.01	6.36
2.5	125	187	290	0.597	0.551	3.86	2.12	6.16	5.88
3.0	145	157	290	0.583	0.537	3.86	2.07	6.01	6.01
3.5	155	142	290	0.768	0.722	3.86	2.78	8.08	8.17
4.0	125	187	285	0.625	0.579	3.86	2.23	6.36	6.35
4.5	135	172	295	0.549	0.503	3.86	1.94	5.72	5.64
5.0	155	142	275	0.476	0.430	3.86	1.65	4.56	4.7435

**Anexo 10. Monitoreo de azúcares reductores durante la fermentación a pH 4.5 y 30°C con nutrientes
(Tratamiento 1)**

	Monitoreo 0 horas			Monitoreo 4 horas		
Tratamiento	Absorvancia	Abs Corregida	g Azúcares reductores	Absorvancia	Abs Corregida	g Azúcares reductores
<i>Blanco</i>	0.062			0.067		
Xilosa	0.291	0.229	1	0.287	0.22	1
N1	0.645	0.583	2.50	0.438	0.371	1.66
N2	0.632	0.570	2.45	0.518	0.451	2.02
N3	0.642	0.580	2.49	0.473	0.406	1.82
	Monitoreo 8 horas			Monitoreo 24 horas		
Blanco	0.069			0.066		
Xilosa	0.293	0.226	1	0.284	0.218	1
N1	0.350	0.286	1.25	0.092	0.026	0.11
N2	0.409	0.319	1.40	0.083	0.01	0.07
N3	0.373	0.304	1.33	0.080	0.063	0.06

**Anexo 11. Monitoreo de azúcares reductores durante la fermentación a pH 4.5 y 30°C sin nutrientes
(Tratamiento 2)**

Tratamiento	Monitoreo 0 horas			Monitoreo 4 horas		
	Absorvancia	Abs Corregida	g Azúcares reductores	Absorvancia	Abs Corregida	g Azúcares reductores
<i>Blanco</i>	0.062			0.067		
Xilosa	0.291	0.229	1	0.287	0.220	1
SN1	0.654	0.592	2.54	0.499	0.432	1.94
SN2	0.552	0.490	2.10	0.461	0.394	1.77
SN3	0.638	0.576	2.47	0.477	0.410	1.84
	Monitoreo 8 horas			Monitoreo 24 horas		
Blanco	0.069			0.066		
Xilosa	0.293	0.226	1	0.284	0.218	1
SN1	0.414	0.345	1.51	0.087	0.021	0.09
SN2	0.401	0.332	1.46	0.084	0.018	0.08
SN3	0.409	0.340	1.49	0.093	0.027	0.12

**Anexo 12. Monitoreo de azúcares reductores durante la fermentación del hidrolizado a 30°C
(Tratamiento 3)**

	Monitoreo 0 horas			Monitoreo 4 horas		
Tratamiento	Absorvancia	Abs Corregida	g Azúcares reductores	Absorvancia	Abs Corregida	g Azúcares reductores
<i>Blanco</i>	0.062			0.067		
Xilosa	0.291	0.229	1	0.287	0.220	1
H1	0.625	0.563	2.42	0.493	0.426	1.91
H2	0.648	0.586	2.51	0.487	0.420	1.89
H3	0.654	0.592	2.54	0.479	0.412	1.85
	Monitoreo 8 horas			Monitoreo 24 horas		
Blanco	0.069			0.066		
Xilosa	0.293	0.226	1	0.284	0.218	1
H1	0.394	0.325	1.43	0.287	0.221	0.99
H2	0.365	0.296	1.30	0.305	0.239	1.07
H3	0.385	0.316	1.39	0.311	0.245	1.10

Anexo 13. Resultados de biomasa producida, pH inicial y pH final en la fermentación Tratamiento 1

Tratamiento	pHi	pHf	PF (g)	PF + BS (g)	BS(g)	Vol. (ml)	Biom-prod.	Promedio
Inoculo			1.1764	1.1888	0.0124			
N1	4.5	4.28	1.1906	1.3872	0.1966	80	0.1842	
N2	4.5	4.25	1.1745	1.3819	0.2074	80	0.1950	0.1857
N3	4.5	4.27	1.1967	1.3870	0.1903	80	0.1779	

Anexo 14. Resultados de biomasa producida, pH inicial y pH final en la fermentación Tratamiento 2

Tratamiento	pHi	pHf	PF (g)	PF + BS (g)	BS(g)	Vol. (ml)	Biom-prod.	Promedio
Inoculo			1.1764	1.1888	0.0124			
SN1	4.5	4.14	1.1466	1.3371	0.1905	80	0.1781	
SN2	4.5	4.37	1.1925	1.3695	0.1770	80	0.1646	0.1695
SN3	4.5	4.44	1.1532	1.3314	0.1782	80	0.1658	

Anexo 15. Resultados de biomasa producida, pH inicial y pH final en la fermentación Tratamiento 3

Tratamiento	pHi	pHf	PF (g)	PF + BS (g)	BS(g)	Vol. (ml)	Biom-prod.	Promedio
Inoculo			1.1764	1.1888	0.0124			
H1	0.51	0.55	1.2049	1.2661	0.0612	80	0.0488	
H2	0.51	0.57	1.1364	1.1951	0.0587	80	0.0463	0.0423
H3	0.85	0.82	1.1410	1.2352	0.0442	80	0.0318	



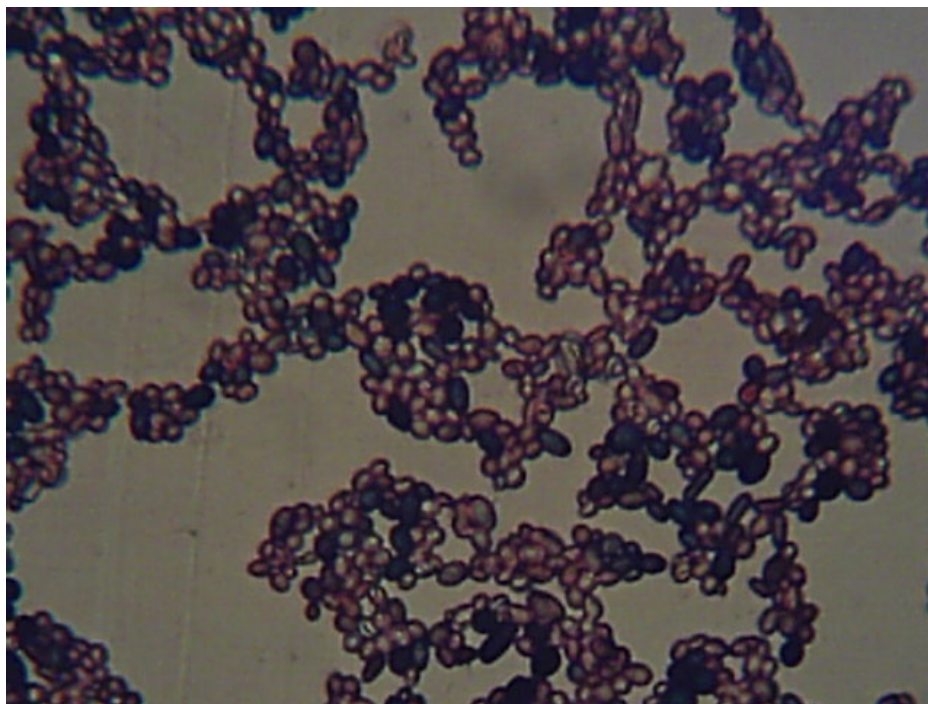
Anexo 16. Cáscara en trozos.



Anexo 17. Cáscara molida.



**Anexo 18. Reactivos de Follin-Wu
(A: Soln. Cuprico alcalina, B: Acido Fosfomolibdico)**



Anexo 19. Tinción Güstein al final de la Fermentación.