

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA

E INGENIERÍA DE ALIMENTOS



**“PRODUCCIÓN DE SORBITOL A PARTIR DE CÁSCARA DE
PAPAYA (*Carica papaya*) POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA”**

TESIS

Para optar el título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Presentado por:

JUAN MANUEL RUMALDO TORRES

TINGO MARIA – PERÚ

2003



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
Tingo María
FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 10 de octubre del 2003, a horas 05:05 p.m. en la Sala de Grados de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, para calificar la tesis presentado por el Bachiller en Ciencias Industrias Alimentarias: **Juan Manuel RUMALDO TORRES**.

“OBTENCIÓN DE SORBITOL A PARTIR DE CÁSCARA DE PAPAYA (*Carica papaya*) POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA”

Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran aprobado con el calificativo de **MUY BUENO**, en consecuencia el Bachiller: **Juan Manuel RUMALDO TORRES**, queda apto para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del Consejo Universitario, de conformidad con el Art.22° de la Ley Universitaria 23733; los artículos 43° y 45° del Estatuto y los artículos 95° y 96° del Reglamento General de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 14 de octubre del 2003

Biga. M.Sc. Margarita Alcedo Romero
Presidente



Ing°. Laureano Zavaleta De La Cruz
Vocal

Biga. Julio Giraldo Huayta
Vocal

Ing°. M.Sc. Pedro Pablo Peláez Sánchez
Asesor

DEDICATORIA

A mis padres: Juan (†) y Amelia, por haberme dado la vida, haber forjado de mi una persona de bien y de quienes siempre estaré orgulloso.

A mis hermanos: Rosa, Justo y Deysi, quienes también contribuyeron decididamente en mi formación personal y profesional

Con inmenso cariño a mis tíos Alfonso Montero Fernández y Pelaya Rumaldo de Montero, por su invaluable apoyo y comprensión durante mi formación profesional y el desarrollo del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el financiamiento brindado para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al Ing. MSc. Pedro Peláez Sánchez, Asesor de esta tesis, por su valiosa orientación profesional durante la ejecución del presente trabajo de investigación.

Al Mtblgo. MSc. César Samuel López López, Co-asesor de la presente tesis por su continuo asesoramiento en la realización del presente trabajo de investigación.

A mis amigos que me colaboraron de una u otra manera en la culminación del presente trabajo dándome su apoyo: Harry, Juan Edson, Humberto, Karina, Iris, Elena, Rossmery, Maria, Evelyn, Gilmer, Edgar, Jesús y Juan Carlos; los tendré siempre presente dentro de mi persona.

INDICE

	Pag.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	3
A. ANTECEDENTES SOBRE TRABAJOS REALIZADOS EN LA OBTENCIÓN DE SORBITOL	3
B. ASPECTOS GENERALES SOBRE LA PAPAYA.....	4
1. Clasificación taxonómica.....	4
2. Descripción agrobotánica	4
3. Variedades comerciales	5
C. POLIALCOHOLES.....	6
1. Definición.....	6
2. Clasificación	6
3. Distribución.....	7
4. Aplicaciones	7
D. EL SORBITOL.....	9
1. Propiedades del sorbitol	10
2. Metabolismo del sorbitol	11
3. Aplicaciones del sorbitol en la industria de alimentos	13
E. FERMENTACIÓN	13
1. Fermentación sumergida discontinua	14
2. Fermentación sumergida continua.....	15
F. BIORREACTORES.....	17
1. Biorreactores de Tanque agitado.....	18

2.	Biorreactores de lecho fijo	19
3.	Biorreactor air lift	20
G.	ANTECEDENTES Y CARACTERÍSTICAS DE <i>Zymomonas mobilis</i>	25
1.	Antecedentes	25
2.	Hábitat	26
3.	Necesidades nutritivas.....	26
4.	Catabolismo	26
5.	Efectos del crecimiento.....	27
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	30
A.	LUGAR DE EJECUCIÓN.....	30
B.	MATERIA PRIMA E INSUMOS.....	30
1.	Materia prima	30
C.	EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS.....	31
1.	Equipos	31
2.	Materiales.....	32
3.	Reactivos y soluciones	33
D.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	34
1.	Caracterización de la cáscara de papaya	34
2.	Proceso de fermentación sumergida	34
3.	Determinación del sorbitol	38
E.	DISEÑO EXPERIMENTAL	40
F.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	42
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43

A. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA CÁSCARA DE PAPAYA (<i>Carica papaya</i>)	43
B. PROCESO DE FERMENTACIÓN SUMERGIDA	45
1. Desarrollo del crecimiento microbiano	45
2. Variación del oxígeno disuelto	49
3. Producción de CO ₂ disuelto	52
C. CUANTIFICACIÓN DEL SORBITOL	55
V. CONCLUSIONES	65
VI. RECOMENDACIONES	66
VII. BIBLIOGRAFÍA	67
VIII. ANEXOS	73

INDICE DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Propiedades generales del sorbitol.....	10
Cuadro 2. Análisis fisicoquímico de la cáscara de papaya (<i>Carica papaya</i>) variedad PTM-335	43
Cuadro 3. Variación del crecimiento de la bacteria <i>Zymomonas mobilis</i> (cel/ml) durante el proceso de fermentación sumergida.....	45
Cuadro 4. Variación del oxígeno disuelto (mg/L) durante el proceso de fermentación sumergida	49
Cuadro 5. Producción de CO ₂ disuelto durante el proceso de fermentación sumergida	52
Cuadro 6. Determinación de la curva patrón para el sorbitol.....	55
Cuadro 7. Formación de sorbitol durante el proceso de fermentación sumergida durante las 6, 12, 18 y 24 horas de proceso.....	57
Cuadro 8. Análisis de varianza de la producción de sorbitol a las 18 h de proceso de fermentación	60
Cuadro 9. Prueba de tukey al 5 % para la producción de sorbitol a las 18 h de fermentación sumergida.....	61
Cuadro 10. Valores de los niveles óptimos de la concentración de inóculo y de sustrato.....	62

INDICE DE FIGURAS

	Pag
Figura 1. Estructura química del sorbitol	10
Figura 2. Fases de crecimiento en un cultivo tipo batch	15
Figura 3. Cultivo tipo continuo	16
Figura 4. Diagrama de flujo para la obtención de sorbitol	35
Figura 5. Diseño experimental para la determinación de sorbitol a partir de la cáscara de papaya	40
Figura 6. Variación del crecimiento de <i>Zymomonas mobilis</i> CECT561 durante el proceso de fermentación sumergida en la producción de sorbitol	46
Figura 7. Variación de oxígeno disuelto durante el proceso de fermentación sumergida en la producción de sorbitol por <i>Zymomonas mobilis</i>	51
Figura 8. Variación del CO ₂ disuelto durante el proceso de fermentación sumergida	53
Figura 9. Curva patrón para el sorbitol	56
Figura 10. Producción de sorbitol durante el proceso de fermentación sumergida con la cepa <i>Zymomonas mobilis</i> CECT 560	58
Figura 11. Superficie de respuesta para la producción máxima de sorbitol en función de la concentración del inóculo y sustrato	63
Figura 12. Gráfica de contorno de la estimación de la superficie de respuesta de la producción de sorbitol en función de las concentraciones del inóculo y sustrato	64

RESUMEN

La papaya (*Carica papaya*), es un fruto de la amazonía peruana, cuyo aprovechamiento radica solo en la parte de la pulpa, no aprovechándose la cáscara. El presente trabajo se desarrollo en la Universidad Nacional Agraria de la Selva de la ciudad de Tingo Maria; utilizándose la cáscara del fruto del papayo, que es un desecho de su beneficio.

Los objetivos trazados fueron: determinar la concentración de sustrato (cáscara de papaya) e inóculo (*Zymomonas mobilis*) para la obtención del sorbitol por fermentación sumergida utilizándose biorreactores del tipo "Air Lift", así como cuantificar la producción de sorbitol.

Para el desarrollo del estudio se realizaron los siguientes pasos: caracterización de la cáscara de papaya, preparación del sustrato, preparación del inóculo, fermentación sumergida y determinación de sorbitol.

Para el proceso de fermentación sumergida se realizaron las siguientes operaciones: molido, tratamiento térmico, enfriado, acondicionamiento del sustrato, siembra en biorreactores, fermentación sumergida y obtención del producto.

Las variaciones de los parámetros durante el proceso de fermentación sumergida fueron: oxígeno disuelto, CO₂ disuelto y crecimiento microbiano.

Como resultado de la investigación se logro caracterizar la cáscara de papaya siendo los más resaltantes el contenido de humedad (14,069 %), carbohidratos (77,318 %), sólidos totales (85,310 %), pH (5,8) y azucares totales (29,8).

Los resultados de las evaluaciones de cada experimento, durante el proceso de fermentación sumergida se analizaron en un D.C.A. con una prueba de tukey con $p < 0,05$, siendo los niveles óptimos de concentración de inóculo y sustrato para la obtención máxima de sorbitol de 20% V/V y 100 ml/L respectivamente, además la producción máxima de sorbitol (3,414 mol/l) a las 18 horas de proceso y a una temperatura de laboratorio de $27 \pm 1^\circ \text{C}$.

SUMMARY

The papaya (*Carica papaya*), it is a fruit of the peruvian amazonia whose use resides alone in the part of the pulp, not taking advantage the skin. The present work was development in the university: Universidad Nacional Agraria de la Selva, in Tingo María city; being used skin of the papaya fruit that is a waste of its benefit.

The objectives were to determine the substrate concentration (papaya skin) and inoculate (*Zymomonas mobilis*) for the obtaining of sorbitol for submerged fermentation begin used bioreactors of the type "Air Lift", as well as cuantify the sorbitol production.

For the development of the study they carried out the following steps: characterization of the papaya skin, preparation of the substrate, preparation of the inoculate, submerged fermentation and determination of the sorbitol.

For the process of submerged fermentation they were carried out the following operations: milled, thermal treatment, cooled treatment, conditioning of the substrate, seeding in bioreactors, submerged fermentation and obtaining of the product.

The variations of the parameters during the process of submerged fermentation were: oxygenate dissolved, CO₂ dissolved and microbial growth.

As a result of the investigation on achievement to characterize the papaya skin being the more emphasize the content of humidity (14,069%), carbohydrates (77,318%), total solids (85,310%), pH (5,8) and sugar total (29,8).

The results of the evaluations of each experiment, during the process of submerged fermentation were analyzed in a D.C.A. with a tukey test with $p < 0,05$, being the good levels of concentration of inoculate and substrate for the maximum obtaining of sorbitol of 20% V/V and 100 ml/L respectively, also the maximum production of sorbitol (3,414 mol/l) at the 18 hours of process and a temperature of laboratory of $27 \pm 1^\circ \text{C}$.

I. INTRODUCCIÓN

La amazonía peruana presenta una considerable producción de frutos de distintas especies y variedades, los cuales constituyen un desafío para el hombre ya que la gran demanda de alimentación hace pensar en buscar la tecnología necesaria para poder aprovecharlas y permitir mayor beneficio. El desarrollo de tecnologías aplicadas a optimizar la utilización de los productos agrícolas beneficia al agricultor, permitiendo la utilización integral de los frutos; ya que éstos no sólo se emplean para el consumo directo, ó en el procesamiento industrial, si no el uso de los desechos como cáscara y semillas, que constituyen aproximadamente el 36 % en el fruto del papayo.

Las cáscaras de los frutos que se eliminan durante el procesamiento industrial, se pueden utilizar como materia prima para producir sorbitol, y como en el caso de la utilización de la cáscara de papaya, esto se ve facilitado por el clima de la zona tropical que permite el desarrollo de este cultivo, permitiendo su adecuada disponibilidad.

El sorbitol es un edulcorante con características funcionales que hace que difiera de los edulcorantes tradicionales, porque puede ser utilizado por los diabéticos y también en la industria alimentaria en productos como mermeladas, bebidas carbonatadas, helados, chocolates, etc.

En tal sentido se desarrolló el siguiente trabajo de investigación durante los meses de diciembre del 2001 a mayo del 2003, teniendo como objetivo principal la producir sorbitol por fermentación sumergida a partir de cáscara de papaya, utilizando cepas de *Zymomonas mobilis*; y como objetivos específicos lo siguiente:

- Caracterización fisicoquímica de la cáscara de papaya.
- Determinar la concentración de sustrato y concentración de inóculo para la obtención de sorbitol por fermentación sumergida a partir de la cáscara de papaya.
- Evaluar la variación de diversos parámetros durante la fermentación.
- Cuantificar la producción de sorbitol después de la fermentación sumergida.

II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

A. ANTECEDENTES SOBRE TRABAJOS REALIZADOS EN LA OBTENCIÓN DE SORBITOL

La bioconversión de sacarosa usando *Zymomonas mobilis* permite obtener polisacáridos, etanol, sorbitol y dióxido de carbono. Puede obtenerse jarabe de fructosa-glucosa de azúcares sintetizados en el proceso de fermentación así como de la sacarosa no utilizada. Así el proceso tecnológico no deja residuos y proporciona los productos mencionados determinados por las condiciones de bioconversión (Are y Samulevitch, 1990).

La bacteria *Zymomonas mobilis* convierte la glucosa y fructosa a productos finales como ácido gluconico y sorbitol. Cuando se cultivó con 250 g/l de sacarosa, la masa celular de 3-4 g/l se separa y el caldo de fermentación contenía 30,9, 8,7 y 79,3 g/l de sorbitol, ácido gluconico y etanol respectivamente. Las enzimas, oxidoreductasas del compuesto glucosa-fructosa (GFOR), gluconolactonasa (GL) e invertasa permanecían activos después de permeabilizar las células con 1% de tolueno en buffer citrato a pH 6,8. La determinación de temperatura óptima para GFOR y GL mostraron respectivamente 25°C y 30°C (Yaowarate, 1994).

Se investigó la habilidad de *Zymomonas mobilis* (ATCC 31821) en la utilización del almidón como fuente del carbono para la producción de

sorbitol. El substrato se preparó por hidrólisis enzimática del almidón en D-glucosa que se convierte como consecuencia a una mezcla de glucosa-fructosa bajo las condiciones pre-optimizadas. La utilización de 30% (w/v, en base seca) de almidones permitió una conversión de 51% y 49%, de glucosa y fructosa, obteniéndose una concentración final de sorbitol de 9,73 g/L después de 24 horas de incubación a 30° C con un pH inicial de 8,0 y una concentración inicial de inóculo de 10% (Masdiaty, 1997).

B. ASPECTOS GENERALES SOBRE LA PAPAYA

1. Clasificación taxonómica.

Su nombre científico es *Carica papaya*, correspondiéndole la siguiente clasificación.

Clase	: Dicotiledónea
Sub-clase	: Arquiclamidea
Familia	: Caricacea
Género	: <i>Carica</i>
Especie	: <i>Carica papaya</i> .

Fuente: Morin (1980).

2. Descripción agrobotánica

La papaya es una planta de crecimiento rápido, tallo herbáceo, fistulado y con un latex lechoso; el fruto es una baya ovoide, de forma esférica o esférico periforme, comestible de 10 a 50 cm. de longitud, pesa hasta 7 kg, su pulpa es de color amarillo anaranjado o rojizo, de

sabor dulce o ligeramente insípido, aromático de consistencia suave. La cavidad central es grande contiene numerosas semillas esféricas y negruzcas de 5 a 7 mm de diámetro cubiertas por un mucílago (Franciosi, 1992).

3. Variedades comerciales

Para el mercado nacional:

- a. **Maradol.** Originaria de Cuba, muy precoz buen rendimiento, susceptible a virosis, favorable en la costa norte pero aún no en la selva sus frutos son de tamaño mediano forma redondeada, pulpa de color rojo, buena conservación soportando bien el transporte a largas distancias (Calzada, 1993).
- b. **Pauna.** De gran rendimiento (30 a 40 TM), semi-enana, pulpa de color amarillo anaranjado, excelente sabor y aroma, gran aceptación en diversas regiones del país (Franciosi, 1992).
- c. **Criolla.** Variedad de mayor área cultivada, fruto pequeño de color amarillo, susceptible a la cercosporiosis, gran cantidad de semillas, regular calidad de frutos tolerante a enfermedades, muy rústico (Calzada, 1993).

Para el mercado de exportación:

- a. **Solo.** Produce frutos de buena calidad, periforme, con un peso de 460-700 g (Franciosi, 1992).
- b. **Wainamalo.** Produce frutos de gran calidad, cuyo peso varia entre 650-1200 g. Se origino de la variedad solo (Franciosi, 1992).
- c. **Sunrise-Solo.** Produce frutos de forma periforme con pulpa rojiza anaranjada con un peso variable entre 400 a 650 g (Franciosi, 1992).

C. POLIALCOHOLES

1. Definición

Los polialcoholes o polioles [$C_nH_2(H_2O)_n$], o alditoles, son alcoholes acíclicos polifuncionales, formalmente, son la forma reducida de los monosacáridos aldosas o cetosas por la reducción del grupo carbonilo y, aunque no son verdaderos carbohidratos, se les consideran en ciertos aspectos como tales (Holme, 1987; Touster y Shaw, 1962; Brimacombe, 1972).

2. Clasificación

Los polioles son clasificados como tetrosas, pentosas, hexosas etc., y pueden en base a sus propiedades fisico-químicas considerarse como hidratos de carbono simples (Lindstad y Koll, 1998).

3. Distribución

Los polioles sorbitol, manitol y xilitol se encuentran en productos vegetales tales como frutos y bayas. A nivel comercial, estos edulcorantes se sintetizan y no se extraen de fuentes naturales. Todos los polioles se absorben en los intestinos en forma lenta e incompleta, mediante una difusión pasiva. En consecuencia, una carga excesiva (por ejemplo, mayor a 50 g de sorbitol al día, mayor a 20 g de manitol al día) puede provocar diarrea. Si los polioles se absorbieran por completo, el metabolismo directo podría proporcionar las 4 kcal/g normales. Sin embargo, la absorción incompleta provoca el metabolismo indirecto de polioles mediante una degradación fermentativa a través de la flora intestinal.

El retorno de energía del metabolismo indirecto es menor que el de la ruta directa; así, a los polioles se les conoce como edulcorantes de energía reducida o edulcorantes bajos en energía. La FDA permite que al etiquetar estos edulcorantes nutritivos se indique que tienen menos kilocalorías por gramo que otros edulcorantes nutritivos (Touster y Shaw, 1962; Brimacombe, 1972).

4. Aplicaciones

En muchos polioles y derivados se han encontrado extensas aplicaciones, el sorbitol y xilitol, por ejemplo, normalmente se usan por razones de salud dental y control de la diabetes; estos son usados

como suplementos de la sacarosa en la nutrición (Jeffrey, 1998), y varios esteres de polioles son usados como agentes emulsificantes y farmacéuticos (Touster y Shaw, 1962; Brimacombe, 1972).

Los polioles también se pueden categorizar como sustitutos del azúcar (McNutt y Sentki, 1996), por lo general sobre una base de uno a uno; ofrecer menos energía y beneficios potenciales para la salud (por ejemplo, respuesta glucémica reducida y menor riesgo de caries dental).

El manitol se utiliza como un agente pulverizante para la goma de mascar y como un agente que proporciona volumen en los alimentos en polvo. El xilitol está aprobado como aditivo de alimentos GRAS para su uso en gomas de mascar, caramelos, productos farmacéuticos y productos higiénicos. La FDA ha aceptado la solicitud de estatus GRAS para isomalta, lactitol, maltitol, hidrolizados de almidón hidrogenado (HSH, por sus siglas en inglés) y eritritol. Estos polioles se usan en repostería y/o como agentes de volumen. El sorbitol se encuentra en la lista GRAS para su uso en caramelos, goma de mascar, mermeladas, productos horneados y helados (Touster y Shaw, 1962).

D. EL SORBITOL

El sorbitol es un poliol con las dos terceras partes del poder edulcorante semejante a la sacarosa y encontrado naturalmente en frutas comestibles comunes, mientras que es raro en los tejidos de los mamíferos (Linden y Lorient, 1994). Así mismo Bruneton (1991), nos dice que este poliol se encuentra en la naturaleza de diversas rosáceas, en particular del "serval silvestre", *Sorbus aucuparia* L así como en el tallo de diversas algas (ej. *Bostrychia scorpioides*).

El sorbitol es metabolizado por el hombre y mejor utilizado que la glucosa por el diabético, dando la misma cantidad de energía (alrededor de 400 calorías); por este hecho el sorbitol se emplea en la fabricación de alimentos de régimen para diabéticos. Otra propiedad que apoya este uso es la no fermentabilidad por las levaduras (Linden y Lorient, 1994).

En 1868, Boussingault al investigar bayas montañosas aisló e identificó el sorbitol, determinando una alta concentración de este compuesto. Hoy, después de un siglo, el consumo mundial de líquido del sorbitol 70% asciende a más de 500,000 toneladas (Wrolstadt y Schallenberg, 1981).

En la Figura 1, se aprecia la estructura química del sorbitol.

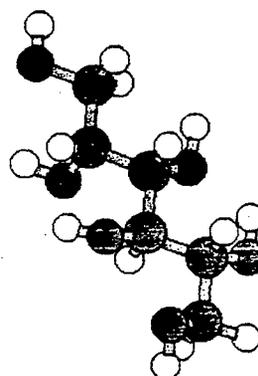
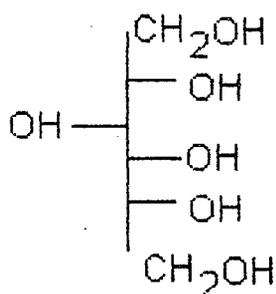


Figura 1. Estructura química del sorbitol (Linden y Lorient, 1994)

1. Propiedades del sorbitol

Las propiedades generales del sorbitol se indican en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Propiedades generales del sorbitol.

PROPIEDAD	VALOR
Peso molecular	182.2
Formula	$\text{C}_6\text{H}_8(\text{OH})_6$
Higroscopicidad	+
Solubilidad (g en 100 ml de agua a 25° C)	235
Punto de fusión (°C)	96 - 98
Calor de disolución (J/g)	-112
Valor energético (KJ/g)	17

Fuente: Linden y Lorient (1994).

Según Linden y Lorient (1994), estas propiedades se resumen así:

- a. Fijación del agua. El agua es corresponsable de la consistencia melosa; el agua se evapora muy lentamente en presencia de una cantidad suficiente de sorbitol.
- b. Resistencia al calentamiento (con el procedimiento de la invertasa, no se puede cocer a más de 70° C).
- c. Efecto retardador sobre la cristalización de la sacarosa y de la glucosa; los cristales formados permanecen pequeños y no son detectables en la boca.
- d. Poco edulcorante (alrededor la mitad de la sacarosa).
- e. Es estable a los ácidos, álcalis, y agentes oxidativos, y no muestra ninguna tendencia a sufrir las reacciones de Maillard, con el amino adicionado tiene un rasgo común a la lactosa.
- f. Viscosidad relativamente baja de los jarabes, facilitando el trabajo.

2. Metabolismo del sorbitol

El sorbitol se obtiene por reducción catalítica de la glucosa (Bruneton, 1991). Así mismo Boussingault nos dice que la producción del sorbitol empieza con el almidón o sacarosa que se convierten a glucosa y se

hidrogenan para formar D-sorbitol. Por consiguiente la forma comercial puede describirse por ser idéntico a la sustancia natural.

El sorbitol participa en el metabolismo de los organismos superiores por la vía de la fructuosa. La sorbitol NAD deshidrogenasa se encuentra en el hígado, la simple difusión (10 a 20 g por hora). El hígado puede mientras tanto transformar de 30 a 40 g de sorbitol en fructuosa en una hora. La oxidación del sorbitol y la transformación oxidativa de la fructuosa que resulta de dicha oxidación son reacciones hepáticas que permiten a estos compuestos alcanzar las vías glucogenolíticas por mecanismos no insulino-dependientes (Linden y Lorient, 1994).

Las enzimas responsables: sorbitol-deshidrogenasa, fosfofructuquinasa y aldolasa hepática no están bajo el control de la insulina. Para los diabéticos, el sorbitol presenta la ventaja de no conducir a una elevación importante de la glucosa sanguínea tras la administración oral. Puede producirse glucosa durante el metabolismo del sorbitol, pero se trata de un fenómeno retardado (Linden y Lorient, 1994).

El sorbitol ingerido es absorbido muy despacio por el intestino mediante difusión pasiva. Ésta es la razón para el efecto laxante del sorbitol y otros polioles (Wrolstadt y Schallenberg, 1981). Según Forster y

Mehnert (1979), la capacidad de absorción de sorbitol oralmente administradas debe ser de 10 - 20 g/hora. Esto significaría que dosis mayores a 20 g de sorbitol producen diarreas.

3. Aplicaciones del sorbitol en la industria de alimentos

La industria alimentaria generalmente utiliza el sorbitol al 70% (líquido) (Bruneton, 1991).

El sorbitol se ha encontrado particularmente atractivo como un edulcorante no azucarado y que puede ser utilizado en diferentes productos como chocolates, gelatina, budines, mermeladas, productos cocidos, helados, etc. (Soumitra y Nirmala, 1998).

E. FERMENTACIÓN

En términos generales la fermentación implica el empleo de microorganismos para llevar a cabo transformaciones de la materia orgánica catalizadas por enzimas. La fermentación ha sido realizada como un arte durante muchos siglos (Ward, 1999).

Se entiende por fermentación a la conversión biológica anaeróbica (sin oxígeno) de las moléculas orgánicas, generalmente hidratos de carbono, en alcohol, ácido láctico y gases, mediante la acción de ciertas enzimas que actúan bien directamente o como componentes de ciertas bacterias y levaduras (Monsanto, 2001).

1. Fermentación sumergida discontinua

La solución esterilizada de nutrientes se inocula con microorganismos y se permite que se lleve a cabo la incubación en condiciones optimas de fermentación. A lo largo de toda la fermentación no se añade nada, excepto oxígeno (en forma de aire), un agente antiespumante y ácidos o bases para controlar el pH. La composición del medio de cultivo, la concentración de biomasa y la concentración de metabolitos cambian generalmente en forma continua como resultado del metabolismo de las células (Crueger, 1993).

Es el método de producción más sencillo, ya que sólo se tiene que poner el medio de cultivo con los substratos necesarios para el crecimiento de biomasa y/o producto, además de controlar las variables del proceso. El tiempo de crecimiento y formación de producto dependerán de la cantidad de substrato que se le haya dado al cultivo (Reed y Rem, 1995).

Las fases que componen este tipo de cultivo se pueden ver en la Figura 2.

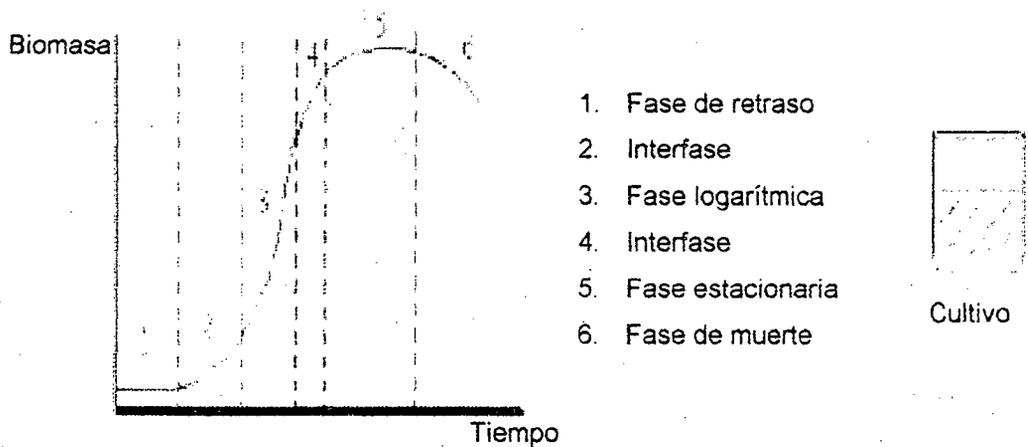


Figura 2. Fases de crecimiento en un cultivo tipo batch.

2. Fermentación sumergida continua

En la fermentación sumergida continua se establece un sistema abierto. La solución nutritiva estéril se añade continuamente al biorreactor y una cantidad equivalente de solución utilizada de los nutrientes, con los microorganismos, se saca simultáneamente del sistema (Crueger, 1993).

Así mismo menciona que en este tipo de cultivo hay una aportación continua de los substratos para la alimentación de los microorganismos (Reed y Rem, 1995), el propósito de este cultivo es mantener constante la producción de biomasa. Esto se logra alimentando al biorreactor a un ritmo estable, el volumen es mantenido constante quitando la misma cantidad que se agrega (Figura 3).

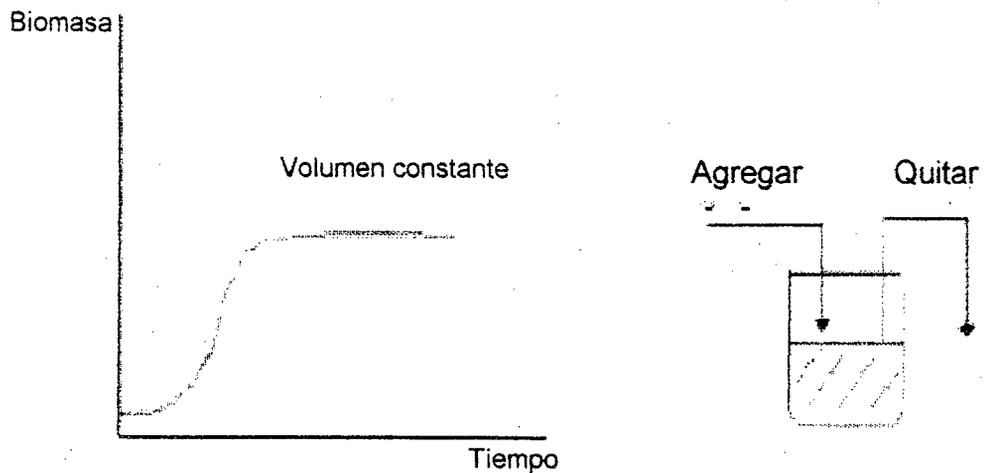


Figura 3. Cultivo tipo continuo.

Crueger (1993), menciona que aunque muchas fermentaciones para la producción de metabolitos funcionan bien como procesos continuos, sólo unos pocos procesos han resultado útiles para la aplicación práctica por varias razones:

- Muchos métodos de laboratorio operan continuamente durante solamente 20 a 200 horas; para que sea de utilidad industrial el sistema debe ser estable durante al menos 500 a 1000 horas.
- Mantener las condiciones estériles a escala industrial a lo largo de un largo período de tiempo es difícil.
- La composición de los sustratos debe ser constante a fin de obtener una producción máxima. La composición de las soluciones de nutrientes industriales son variables (líquido de maceración del maíz, peptona, etc.) lo que puede originar cambios en la fisiología de la célula y disminuir la productividad.

- Cuando se utilizan cepas de alto rendimiento se producen mutantes degenerados, los cuales pueden crecer en cultivo continuo más deprisa que las cepas de producción por lo que el rendimiento disminuye con el tiempo ya que cada vez son menos células las que sintetizan el producto de interés (Crueger, 1993).

F. BIORREACTORES

Los biorreactores o fermentadores son contenedores que son usados para sintetizar productos a escala comercial por medio de reacciones químicas, (Mc Neil y Harvey, 1990); en la mayoría de los casos el metabolismo de las células es explotado para convertir los substratos en productos deseados. Los microorganismos sólo crecen y se reproducen bajo condiciones óptimas, los biorreactores proveen a los microorganismos con las cantidades correctas de substratos para evitar cambios metabólicos no deseados.

El biorreactor es básicamente un recipiente en el cual se lleva a cabo una reacción catalizada por enzimas o células libres o inmovilizadas, junto con los mezcladores, equipos de tomar muestra y aparatos de control (Wiseman, 1989).

Un biorreactor tiene como finalidad particular el mantenimiento de las condiciones ambientales óptimas (pH, temperatura, agitación, aporte de

nutrientes, etc.) para conseguir bien un adecuado crecimiento celular o bien la producción de los metabolitos deseados (Lema, 1999).

Todo fermentador debe cumplir con dos requisitos fundamentales (Quinteros, 1993):

- Mantenimiento de un medio homogéneo sin zonas muertas
- Transferir el oxígeno al medio empleando el mínimo de energía posible

Existen muchas clases de fermentadores, pero se clasifican en tres grandes tipos:

- Tanque agitado
- Lecho fijo
- Airlift

De los tres tipos, el de tanque agitado es el más usado en fermentación, por ser capaz de suministrar altas cantidades de oxígeno por unidad de tiempo y volumen.

1. Biorreactores de Tanque agitado

Sin lugar a dudas el tipo de biorreactor más popular consiste en el tanque agitado mecánicamente mediante una turbina o disco. En los últimos años se han desarrollado, además, otros equipos, como el biorreactor recíproco capaces de proporcionar unas velocidades de transferencia de oxígeno más elevadas y de minimizar limitaciones difusionales, especialmente en cultivos de elevada viscosidad. Se

dispone también de sistemas en donde varios fermentadores se conectan en serie, permitiendo así lograr una separación especial de las diversas fases de la fermentación (Lema, 1999).

Existen varias razones que hacen inadecuado el uso del tanque agitado para cierto tipo de biorreacciones. El grado de agitación requerido para lograr suficiente transferencia de oxígeno, causa daño (en algunos casos) a las células que pasan a través de la zona de grandes esfuerzos de corte cercana al impulsor y la energía mecánica suministrada para lograr una adecuada transferencia de O_2 y un mezclado homogéneo resulta en ocasiones económicamente inconveniente (Merchuk, 1990).

2. Biorreactores de lecho fijo

El desarrollo de técnicas de inmovilización de microorganismos en matrices (por atrapamiento) o sobre soportes (por adhesión) ha permitido la puesta en operación de reactores de lecho fijo. Estos equipos permiten alcanzar unas elevadas productividades y una gran estabilidad de operación (Lema, 1999).

El desarrollo de reactores o sistemas que contengan células atrapadas ha despertado gran interés en la industria. Estos reactores emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial y obviamente impermeables a la enzima. Mediante una bomba

se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor (Arroyo, 1998).

En general, en esta metodología, se procede inicialmente a la adsorción de la enzima sobre la membrana que formará el reactor. Esta adsorción se puede realizar de dos formas:

- Mediante el paso de una solución tamponada de enzima a través de la membrana;
- Por contacto continuo de una solución de enzima con la membrana.

3. Biorreactor air lift

El biorreactor tipo airlift también es un equipo agitado neumáticamente y se caracteriza porque el suministro de energía para mantener homogeneidad en su interior tiene lugar mediante la expansión isotérmica del gas introducido. La alimentación de gas permite el suministro de oxígeno para las operaciones que así lo requieren, y además se mantienen patrones de flujo internos aproximadamente bien definidos (Bello, 1984).

Los reactores airlift tienen una gran cantidad de aplicaciones potenciales tanto en procesos químicos y biológicos como reactores de dos o tres fases (Lema, 1999). En los reactores Airlift, la fluidización de sólidos no es una consecuencia directa del burbujeo del gas sino es,

más bien, debida a la circulación del líquido dentro del reactor. Debido a lo anterior, éstos equipos ofrecen la posibilidad de una fluidización de sólidos muy simple, de alta eficiencia y permiten establecer ambientes internos con esfuerzos de corte aproximadamente constantes a lo largo del biorreactor, debido a que la distribución de la energía suministrada para agitación y mezclado se realiza por expansión del gas inyectado y no se introduce mediante energía cinética de un agitador (Merchuk, 1990). Por lo tanto se evitan cambios morfológicos y metabólicos en las células de cultivo. Entre las configuraciones geométricas más usadas en biotransformaciones, existen las de circulación interna y las de circulación externa.

a. Reactores airlift de circulación interna

El cuerpo del reactor se divide en dos zonas, por medio de un tubo concéntrico o bien por medio de una partición plana colocada en forma vertical. En éstos reactores solamente una de las regiones se mantiene aireada y la otra funciona exclusivamente como recirculación.

b. Reactores airlift con circulación externa

Consisten de dos columnas interconectadas en donde la columna de diámetro mayor es la que se mantiene aireada y los líquidos se recirculan por la columna más pequeña.

Los reactores airlift están comprendidos en cuatro zonas distintas, cada una de estas tiene su propio patrón de flujo, el cual divide al reactor en dos regiones de flujo: flujo ascendente y flujo descendente. Las zonas o canales permiten una recirculación en macro escala del líquido alrededor del circuito formado.

La primera zona en la que el gas es asperjado se conoce como la zona de ascenso, la dispersión de gas en el líquido se da generalmente en dos fases en corriente paralela. Esta sección, tiene la retención de gas más alta en el reactor y es en la que ocurre la mayor parte de la transferencia de oxígeno.

El líquido que ingresa al domo de la columna entra en una zona de liberación de oxígeno (zona II) que es un separador gas-líquido en el la mayoría del oxígeno dispersado es eliminado.

El líquido libre de gas fluye entonces hacia la zona de descenso (III) y viaja hacia el fondo de la columna (zona IV), en el cual completa el ciclo y reingresa a la zona de ascenso (Merchuk, 1990).

Aunque el biorreactor Airlift presenta algunas de las características de las columnas de burbujeo convencionales, la circulación del fluido en escala industrial lo diferencia de los segundos. Esta circulación es un efecto causado por la retención fraccional de oxígeno en la zona I y la

zona III. Así mismo, esto crea una diferencia de presión hidrostática entre el fondo de la zona I y el fondo de la zona III, que actúa como fuerza impulsora para el movimiento del fluido.

Las ventajas principales de los biorreactores airlift con respecto a las columnas burbujeadoras, son: mayores capacidades de transferencia de masa, mayores velocidades superficiales de líquido y gas, y los patrones de flujo bien definidos que se obtienen en ellos, su construcción es simple debido a que no tienen partes mecánicas móviles para llevar a cabo la agitación (Chisti, 1989).

Otras de las ventajas que implica el uso de estos reactores son: existe un riesgo de contaminación muy bajo debido a que se tiene un sellado hermético, y su orientación vertical facilita su limpieza y esterilización, además de ser un reactor en el que se abaten los costos por suministro de energía, ya que el aire cumple con las funciones de aireación y agitación (Lema, 1999).

En procesos biológicos, la principal ventaja de los reactores airlift sobre las columnas de burbujeo y los tanques agitados se debe a que se produce un menor daño celular, exhibiendo mayores velocidades de transferencias de masa y menores costos energéticos.

Desventajas: En la actualidad, los reactores airlift son menos utilizados que los tanques agitados debido a que son menos flexibles a los requerimientos de cambios de proceso, de cantidad de aire suministrado a diferentes procesos, por ende, con diferentes necesidades de transferencia de masa, velocidad del líquido, intensidades de mezclado, etc; características que se manejan perfectamente en un tanque agitado (Chisti, 1989).

Actualmente la aplicación de los fermentadores airlift es limitada, aunque recientemente se han hecho aplicaciones a escala piloto para cultivos celulares con diferentes microorganismos (Siegel y Robinson, 1992). Se han utilizado biorreactores tipo airlift con diversos volúmenes de operación, para la obtención de diferentes productos como proteína unicelular, ácido cítrico, goma xantana, en el cultivo de células animales y vegetales y en biotransformaciones de algunas moléculas como B-metil-digitoxin glucósidos, y de polisacáridos extracelulares (Chisti, 1989). Este tipo de reactores puede emplearse en casi cualquier tipo de fermentación, principalmente en fermentaciones aerobias.

G. ANTECEDENTES Y CARACTERÍSTICAS DE *Zymomonas mobilis*

1. Antecedentes

La existencia de la bacteria *Z. Mobilis* fue publicada por primera vez en 1912 a partir del jugo de agave fermentado, durante mas de 20 años numerosas cepas han sido aisladas y su clasificación ha cambiado en varias ocasiones. Debido a su morfología, y al hecho de metabolizar su sustrato por la vía de Entner – Doudoroff, la bacteria ha sido clasificada dentro de la familia de las Pseudomonadaceae (Swings y Deley, 1977).

Algunas características fenotípicas del género *Zymomonas* se resumen a continuación (Favela, 1998).

- a. Bastón gramnegativo de 1 a 5 μm de ancho y de 2 a 6 μm de largo
- b. Inmóvil o móvil debido a la presencia de 1 a 4 flajelos lotróficos
- c. Arreglo celular pleomórfico (cadenas, rosetas, filamentos).
- d. Ausencia de esporas de cápsulas y de constituyentes de almacenamiento celular.
- e. Catalasa positiva y oxidasa negativa.
- f. Anaeróbico y microaerofílico.
- g. La utilización de sacarosa es inducible y puede ir acompañada de formación de levanas
- h. Las únicas fuentes de carbono que metabolizan son: glucosa, fructuosa y sacarosa.
- i. Contenido G+C de 47,5 a 49,5 %.

- j. Talla del genoma $1,5 \times 10^9$ kdaltones, aproximadamente 1500 cistrones.

2. Hábitat

Zymomonas forma parte de la microflora presente en el material de reserva de algunos vegetales tropicales. Algunas bacterias de este género se han aislado como contaminantes durante la producción de sidra y cerveza (Favela, 1998).

3. Necesidades nutritivas

Zymomonas mobilis es una bacteria quimiorganótrofa que presenta auxotrofia por el pantotenato de calcio, y en algunos casos por la biotina (Swings y Deley, 1977). El nitrógeno necesario para el crecimiento puede proporcionársele por medio de las sales minerales, aminoácidos o peptidos. Los nitratos y nitritos no son asimilados por la bacteria. El azufre, magnesio y potasio son proporcionados en forma de sales. Los oligoelementos (Mo, Fe, Mn, etc.) necesarios al metabolismo de la bacteria se encuentra en estado de trazas en las sales utilizadas para la preparación del medio del cultivo (Favela, 1998).

4. Catabolismo

Zymomonas mobilis metaboliza sus sustrato por la via de Entner Doudorof, via generalmente usada por microorganismos aerobios

estrictos. Desde el punto de vista energético *Z. Mobilis* ha sido considerada ineficiente para producir biomasa, ya que una sola molécula de ATP es producida por cada molécula de monosacárido metabolizada. Sin embargo, si uno considera la producción de etanol, es claro que la bacteria representa un sistema biológico muy eficaz.

La bacteria *Zymomonas mobilis* puede producir gluconolactona y sorbitol de una mezcla de glucosa y fructosa a través de las reacciones catalizadas por glucosa-fructosa oxidoreductasa (GFOR; CEE 1.1.1.99), una enzima con una NADP herméticamente acoplado. Como consecuencia, la glucono-d-lactona es hidrolizada por la glucono-d-lactonasa (GL; CEE 3.1.1.17) al ácido gluconico (Zachariou y Scopes, 1986).

5. Efectos del crecimiento

a. Efecto del sustrato

Algunas cepas de *Z. mobilis* pueden crecer en medios con concentraciones muy elevadas de azúcares. De las cepas estudiadas por Swings y Deley (1977), ventidos crecieron en medios con 400 g/L de glucosa. Todas las cepas crecieron en presencia de 200 g/L de glucosa.

A partir de resultados obtenidos con diferentes cepas de *Z. mobilis* se pudo estimar que el carbono incorporado a la biomasa varía

entre 0,5 y 4,5 % de la fuente inicial de carbono, el resto es utilizado para la formación de los productos de la fermentación (Rogers 1979).

b. Efecto de la temperatura

Aunque *Z. mobilis* es capaz de crecer en una amplia gama de temperaturas de 25 a 40 °C, su temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 30 y 35 °C. A temperaturas superiores a 30 °C, los rendimientos en etanol y biomasa se ven mas afectados (Lee y Rhom, 1981).

El aumento de la temperatura induce a la acumulación del etanol en el interior de las células, lo que amplifica su efecto inhibitorio (Laudrin y Goma, 1982).

c. Efecto del pH

Dependiendo de las cepas *Z. mobilis* puede crecer en un rango de pH (3 a 7). De las cepas estudiadas por Swings y De Ley (1977), alrededor de 20 pudieron crecer a valores de pH de 3,5. El hecho de que la bacteria pueda crecer a pH inferiores a 5,0 hace interesante desde el punto de vista biotecnológico, reduciéndose los riesgos de contaminación considerablemente (Doelle, 1985).

d. Efecto del oxígeno

Aunque *Z. mobilis* puede crecer en aerobiosis, el oxígeno tiene un efecto negativo sobre la producción de alcohol y positivo en la formación de otros subproductos de la fermentación (Bringer y Sahm, 1984). Aparentemente el efecto inhibitor del oxígeno está ligado a la concentración del sustrato.

Para bajas concentraciones de sustratos, la tasa de crecimiento y el rendimiento en biomasa son independientes de la presencia de oxígeno (Laudrin-Seiller, 1984).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en la Universidad Nacional Agraria de la Selva ubicada en el distrito de Rupa - Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, a 660 m.s.n.m. de altitud, clima tropical húmedo, con humedad relativa promedio de 84% y temperatura promedio de 24°C con variación de 18 - 30 °C.

Se trabajó en los laboratorios de: Biotecnología, Análisis de Alimentos, Microbiología General y Microbiología de los alimentos.

B. MATERIA PRIMA E INSUMOS

1. Materia prima

Se utilizó cáscara de papaya (*Carica papaya*), obtenida de frutos maduros, variedad PTM-335, procedente del Fundo Agrícola del IIAP-Tingo María; se realizó un pelado a mano, empleando cuchillos de acero inoxidable.

Así mismo, se utilizó la cepa microbiana *Zymomonas Mobilis* CECT 560 (ATCC 29191), obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España).

C. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

1. Equipos

a. De laboratorio

- Autoclave marca Presicion, modelo 184, EE UU.
- Balanza electrónica marca Sartorius sensibilidad 0,1 y 0,0001 g, EE.UU.
- Baño María marca Memmert, modelo WB10, con rango de trabajo hasta 100 °C.
- Biorreactor del tipo "air lift" de capacidad de 1 litro, provisto con bomba aireadora marca Air Pump y termómetro, cuya figura se muestra en el **Anexo 1**.
- Cámara de flujo laminar marca EEE, modelo Pedestal.
- Centrífuga de rango 1000-9000 RPM.
- Equipo de destilación y recolección semi micro kjeldahl.
- Estufa bacteriológica con termostato para temperatura regulable de 0 a 300 °C, marca Lab-Line. Instruments Inc. Melrose Park t11.
- Estufa tipo Ip 201/al, con temperatura máxima de 200 °C.
- Kitt de análisis marca Hanna.
- Mufla marca Esztergon, Temp. regulable de 0 a 1200 °C.
- Oxímetro digital marca Barstead. Alemania.
- Potenciometro marca Scott modelo CG842.
- Espectrofotómetro de luz visible marca Génesis 8. EE.UU.
- Lámpara de luz ultravioleta marca Silvana; Japón.

b. De proceso

- Refrigeradora con termostato regulable marca Freezer, modelo NT15B436.
- Molino manual marca Corona.
- Balanza manual, marca Ohaus, EE.UU. Rango de 0 a 2610 g.

2. Materiales**a. De laboratorio**

- Crisoles.
- Fiolas.
- Matraces de capacidades de 100, 150, 500, 1000 ml.
- Microcubetas de poliestireno de 1 ml de capacidad.
- Micropipeta marca Boeco de rango de 1 a 100 μ l Alemana.
- Micropipeta marca Eppendorf de rango de 100 a 1000 μ l Alemania.
- Pipetas de 1, 5 y 10 ml.
- Placas petri.
- Probetas graduadas , de capacidades de 20, 50, 100 ml.
- Termómetros graduados de 0 a 60°C y 0 a 110°C.
- Tubos de ensayo.
- Tubos de prueba con tapa rosca.
- Vasos de precipitación, capacidad de 20, 50, 100, 500 y 1000 ml.
- Embudos de vidrio.

- Papel filtro Wattman #42.
- Pinzas.

3. Reactivos y soluciones

Ácido clorhídrico 1 N (HCl) Riedel de Haer; Ácido sulfúrico concentrado Merck; Agar nutritivo, Britania; Agua destilada; Alcohol al 90%; Citrato de sodio, J.F. Baker; Extracto de levadura, Becton Dickinson; Fenol al 5%, Riedel de Haer; Fosfato de potasio, RPE Carlos Erba; Glucosa anhidra Scharlav; Hexano, EM Merck; Hidroxido de sodio al 40% (NaOH), Riedel de Haer; Hipoclorito; Peptona, Difco; Solución de fenolftaleína al 1%, Riedel de Haer; Sulfato de amonio, Merck; Sulfato de magnesio, Mallinkrodt; Sulfato ferroso, Paul Lohman.

D. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

A continuación se presenta las etapas del trabajo de investigación.

1. Caracterización de la cáscara de papaya

Se consideraron los siguientes análisis:

- Acidez titulable, método 942.15(A,a) (AOAC, 1995).
- Carbohidratos totales, se determinará por diferencia, después de haber realizado los análisis anteriores (Hart Fisher, 1984; AOAC, 1995).
- Ceniza, método 940.26 (AOAC, 1995).
- Fibra bruta, método 962.26(A) (AOAC, 1995).
- Grasa, método 13.074 (AOAC, 1995).
- Humedad, método 12.002 (AOAC, 1995).
- Índice de madurez, cociente de dividir los grados brix por la acidez titulable (Royo, 1977).
- pH, método 11.032 (AOAC, 1995).
- Proteínas, método Semi Micro Kjendahl, utilizando como factor de conversión de nitrógeno proteína 6.25 (AOAC, 1995).
- Sólidos solubles, método refractométrico 934.14(C) (AOAC, 1995).
- Sólidos totales, por diferencia de porcentaje de humedad (Hart y Fisher, 1994).

2. Proceso de fermentación sumergida

El proceso de fermentación sumergida se realizó de acuerdo a lo indicado en la Figura 4:

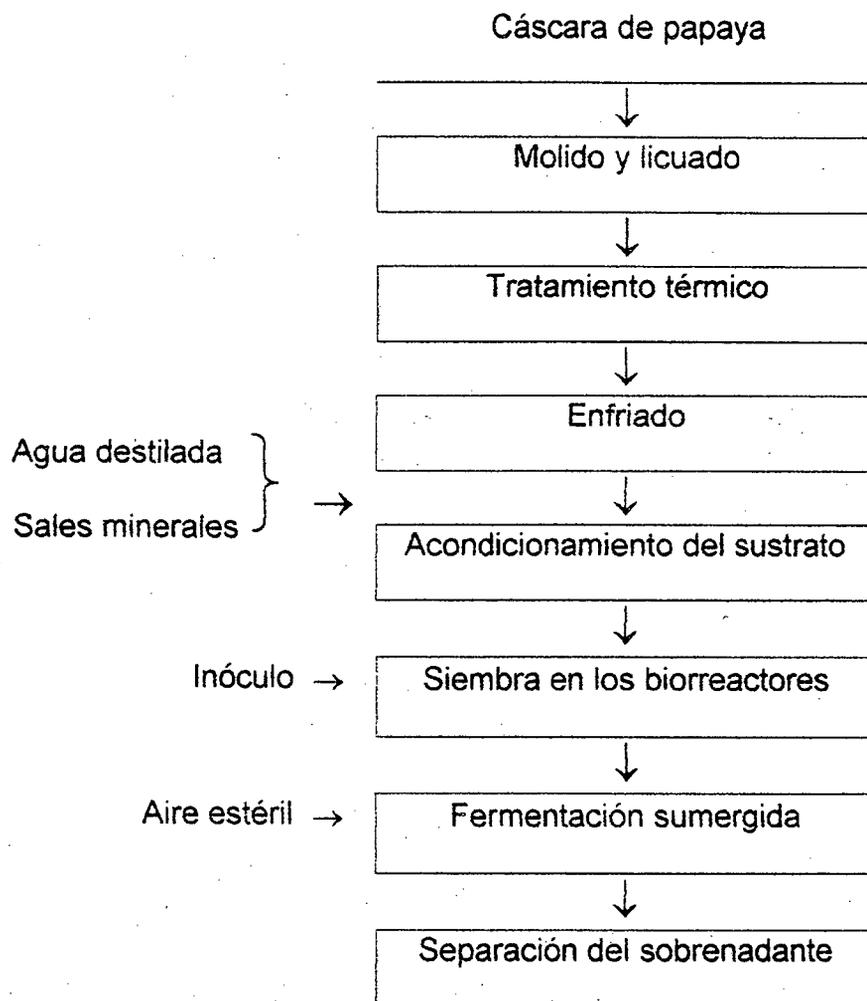


Figura 4. Diagrama de flujo para la obtención de sorbitol

a. Cáscara de papaya

Se seleccionó cáscara de papaya, de frutos maduros con un porcentaje de sólidos solubles de 14,20% en promedio, medidos refractométricamente.

b. Molido y licuado

El molido se realizó en un molino manual y posteriormente fue licuado, para así obtener una pulpa fina y homogénea (Yaowarate, 1994).

c. Tratamiento térmico

Esta operación se realizó por medio de un autoclave a una temperatura de 121 °C por un tiempo de 30 minutos; en esta operación los polisacáridos son desdoblados entre otros componentes a glucosa y fructosa; sirviendo también esta operación para eliminar todo tipo de microorganismos presentes en el sustrato.

d. Enfriado

Se realizó hasta llegar a temperatura ambiente (27 °C), el producto obtenido es el sustrato que se llevó a fermentación sumergida para producir el metabolito de interés.

e. Acondicionamiento del sustrato

El sustrato obtenido se mezcló de acuerdo a las concentraciones establecidas en el diseño experimental, con un medio semi sintético (SS) para *Zymomonas mobilis*, previamente esterilizado que está formado por agua destilada, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, fosfato de potasio, citrato de sodio, sulfato ferroso, glucosa y extracto de levadura (Silveira, 1999). Las especificaciones del medio se muestran en el **Anexo 2**.

f. Siembra en los biorreactores

Se agregó el sustrato acondicionado de acuerdo a cada tratamiento en biorreactores previamente esterilizados; posteriormente se adicionó el inóculo de la bacteria *Zymomonas mobilis* ya reanimada de acuerdo a cada concentración sellándose luego cada biorreactor (Quinteros, 1993; Masdiaty, 1997).

g. Fermentación sumergida

Esta operación es la de mayor importancia por que es en donde las bacterias producen el metabolito de interés; dicha operación se realizó a temperatura de 27 ± 1 °C por un tiempo de 24 horas (Chun, 1998). Durante el desarrollo de este proceso se realizaron los siguientes análisis a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas de fermentación:

- **Desarrollo del crecimiento bacteriano.** Se realizó siguiendo el método de Recuento Estándar en Placa (ICMSF, 1983).
- **Determinación del oxígeno disuelto.** Se realizó mediante el uso de un oxímetro digital.
- **Determinación del CO₂ disuelto.** Se realizó mediante el uso de un potenciómetro y su posterior conversión (Godía, 1998).

h. Separación del sobrenadante

Del producto obtenido se tomó una muestra de 150 ml al final de la fermentación separándose el sobrenadante por medio de centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos (Silveira, 1999), con el fin de realizar el análisis espectrofotométrico.

3. Determinación del sorbitol

Las concentraciones de sorbitol de cada tratamiento se determinaron por espectrofotometría (Rivera 2003), para ello se levantó una curva patrón de acuerdo a los principios de la ley de Lambert – Beer (Skoog, 1993).

Los pasos seguidos para el desarrollo fueron:

a. Preparación de la curva espectral para la determinación del sorbitol

La curva espectral de absorbancia se construyó teniendo un amplio rango de variación de longitud de onda entre 270 y 300 nm,

empleándose una solución estándar de sorbitol químicamente puro cumpliéndose lo que menciona Skoog (1993), que el cambio de absorbancia por unidad de concentración es mayor en este punto y se alcanza por lo tanto la sensibilidad máxima; determinándose que la longitud de onda de 288 nm produjo la mayor absorbancia; estos resultados se muestran en el **Anexo 3**.

b. Preparación de la curva patrón

Posteriormente se elaboró la curva patrón, de acuerdo a lo que menciona Skoog (1993), respecto a que las medidas espectrofotométricas de las absorbancias se hacen normalmente a una longitud de onda correspondiente a un pico de mayor absorbancia que en nuestro caso fue de 288 nm.

c. Determinación espectrofotométrica del sorbitol producido

La determinación colorimétrica del sorbitol se realizó mediante lecturas espectrofotométricas de las muestras obtenidas a las 6, 12, 18 y 24 horas. Dichas lecturas posteriormente fueron expresadas en unidades de sorbitol producidas mediante la aplicación de la ecuación lineal de la curva de sorbitol siguiendo el método Boehringer Mannheim (R-BIOPHARM, 2001) adaptado por Rivera (2003).

E. DISEÑO EXPERIMENTAL

La distribución experimental se presenta en la Figura 5 la cual fue estructurada de forma que permita evaluar la concentraciones de inóculo y sustrato en la producción de sorbitol.

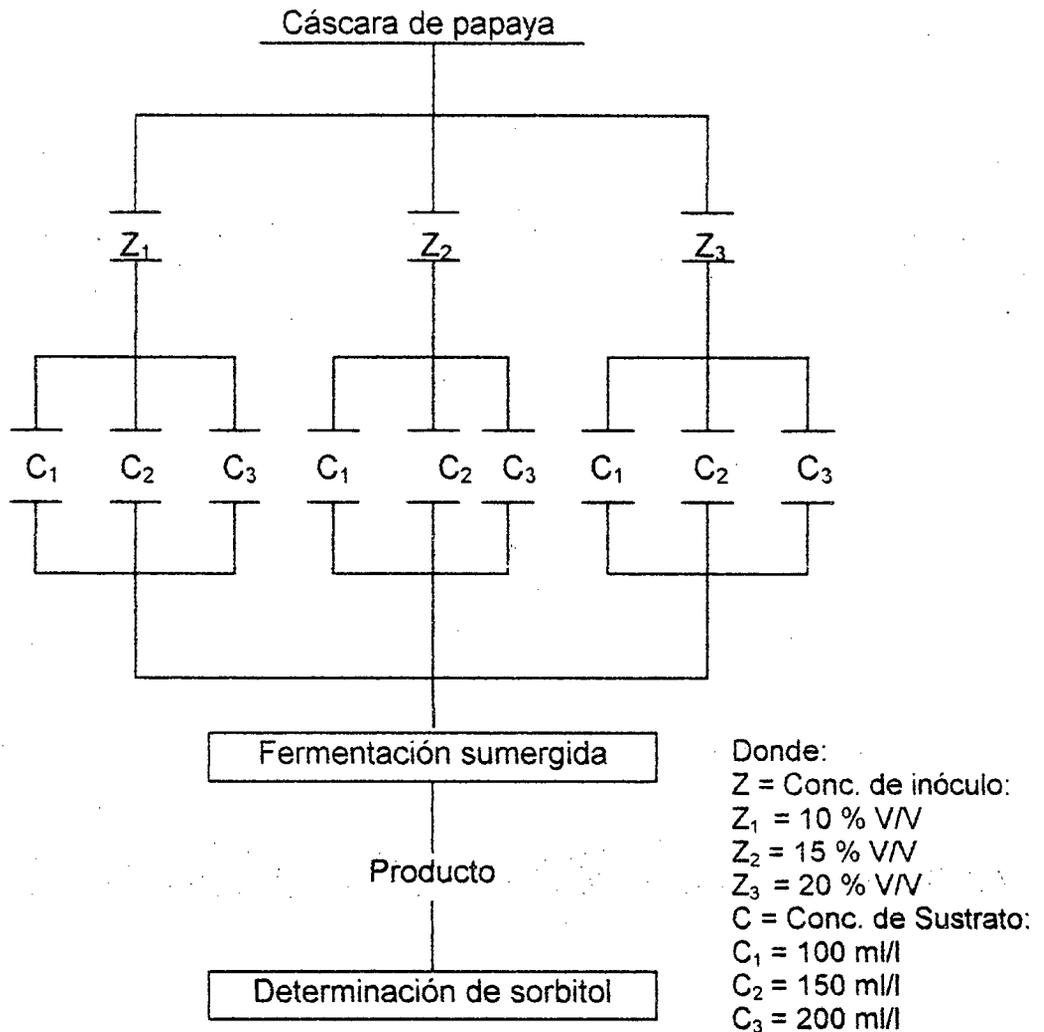


Figura 5. Diseño experimental para la determinación de sorbitol a partir de la cáscara de papaya.

En este diseño se detallan las variables en estudio, teniendo los parámetros de concentración del inóculo (Z) y concentración del sustrato (C).

Obteniéndose de la combinación de éstos los siguientes tratamientos:

T₁ = 10 % V/V de inóculo + 100 ml/l (100 ml de sustrato en un litro de agua destilada).

T₂ = 10 % V/V de inóculo + 150 ml/l (150 ml de sustrato en un litro de agua destilada).

T₃ = 10 % V/V de inóculo + 200 ml/l (200 ml de sustrato en un litro de agua destilada).

T₄ = 15 % V/V de inóculo + 100 ml/l (100 ml de sustrato en un litro de agua destilada).

T₅ = 15 % V/V de inóculo + 150 ml/l (150 ml de sustrato en un litro de agua destilada).

T₆ = 15 % V/V de inóculo + 200 ml/l (200 ml de sustrato en un litro de agua destilada).

T₇ = 20 % V/V de inóculo + 100 ml/l (100 ml de sustrato en un litro de agua destilada).

T₈ = 20 % V/V de inóculo + 150 ml/l (150 ml de sustrato en un litro de agua destilada).

T₉ = 20 % V/V de inóculo + 200 ml/l (200 ml de sustrato en un litro de agua destilada).

F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para analizar los resultados de los tratamientos experimentales de la Figura 5 se utilizó el diseño completamente al azar (DCA), con arreglo factorial de 3A x 3B (3 concentraciones de inóculo y 3 concentraciones de sustrato), con 3 repeticiones con un total de 27 observaciones, la significación estadística se evaluó con la prueba de Tukey al 5 % ($\alpha = 0,05$) de probabilidad seleccionándose el mejor tratamiento (Steel y Torrie, 1995).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA CÁSCARA DE PAPAYA

En el Cuadro 2, se muestra el análisis físicoquímico realizado en la cáscara de papaya.

Cuadro 2. Análisis físicoquímico de la cáscara de papaya (*Carica papaya*) variedad PTM-335.

ANÁLISIS	%	±SD ¹
Humedad	14,069	0,797
Ceniza	5,565	0,064
Proteína	0,590	0,015
Grasa	0,098	0,035
Fibra	2,360	0,007
Carbohidratos	77,318	0,028
Sólidos totales	85,310	0,020
Sólidos solubles (°Bx)	14,20	0,210
Acidez titulable	0,8915	0,010
pH	5,8	0,010
Índice de madurez (°Bx/acidez tit.)	15,928	0,111
Azúcares totales	29,80	0,038

¹ Los valores representan el promedio ± la desviación estándar, de tres repeticiones.

La caracterización de la cáscara de papaya indica que ésta es de naturaleza energética, dado el alto contenido de carbohidratos tal como menciona Fennema (1993). Podemos agregar que los azúcares totales son la fuente principal de energía para obtener el metabolito deseado en el presente trabajo.

Estas características fueron determinadas en frutos con un índice de madurez de 15,93, no existiendo datos de trabajos anteriores para su respectiva comparación.

En la determinación del contenido de humedad, se debe tener en cuenta el efecto del método utilizado ya que se debe utilizar un método que impida la hidrólisis de la fructosa y por lo tanto la liberación de agua; esta es afectada a temperaturas superiores a 60 °C (Hart y Fisher, 1994).

B. PROCESO DE FERMENTACIÓN SUMERGIDA

1. Desarrollo del crecimiento microbiano

El Cuadro 3, nos muestra los resultados del desarrollo del crecimiento microbiano.

Cuadro 3. Variación del crecimiento de la bacteria *Zymomonas mobilis* (cel/ml) durante el proceso de fermentación sumergida

Trat.	Crecimiento bacteriano (cel/ml)				
	0 Horas	6 Horas	12 Horas	18 Horas	24 Horas
T1	4,060E+06	2,392E+07	3,118E+07	3,421E+07	3,755E+07
T2	4,060E+06	1,955E+07	3,252E+07	3,559E+07	3,908E+07
T3	4,060E+06	3,205E+07	3,605E+07	3,739E+07	3,971E+07
T4	4,060E+06	2,744E+07	3,123E+07	3,453E+07	3,702E+07
T5	4,060E+06	2,445E+07	3,377E+07	3,648E+07	3,838E+07
T6	4,060E+06	2,851E+07	3,514E+07	3,877E+07	4,119E+07
T7	4,060E+06	3,493E+07	3,824E+07	4,617E+07	4,710E+07
T8	4,060E+06	2,577E+07	3,567E+07	3,899E+07	4,051E+07
T9	4,060E+06	2,890E+07	3,292E+07	3,557E+07	3,640E+07

Los resultados del Cuadro 3 se muestra la Figura 6, donde vemos la variación del crecimiento bacteriano en los distintos tratamientos.

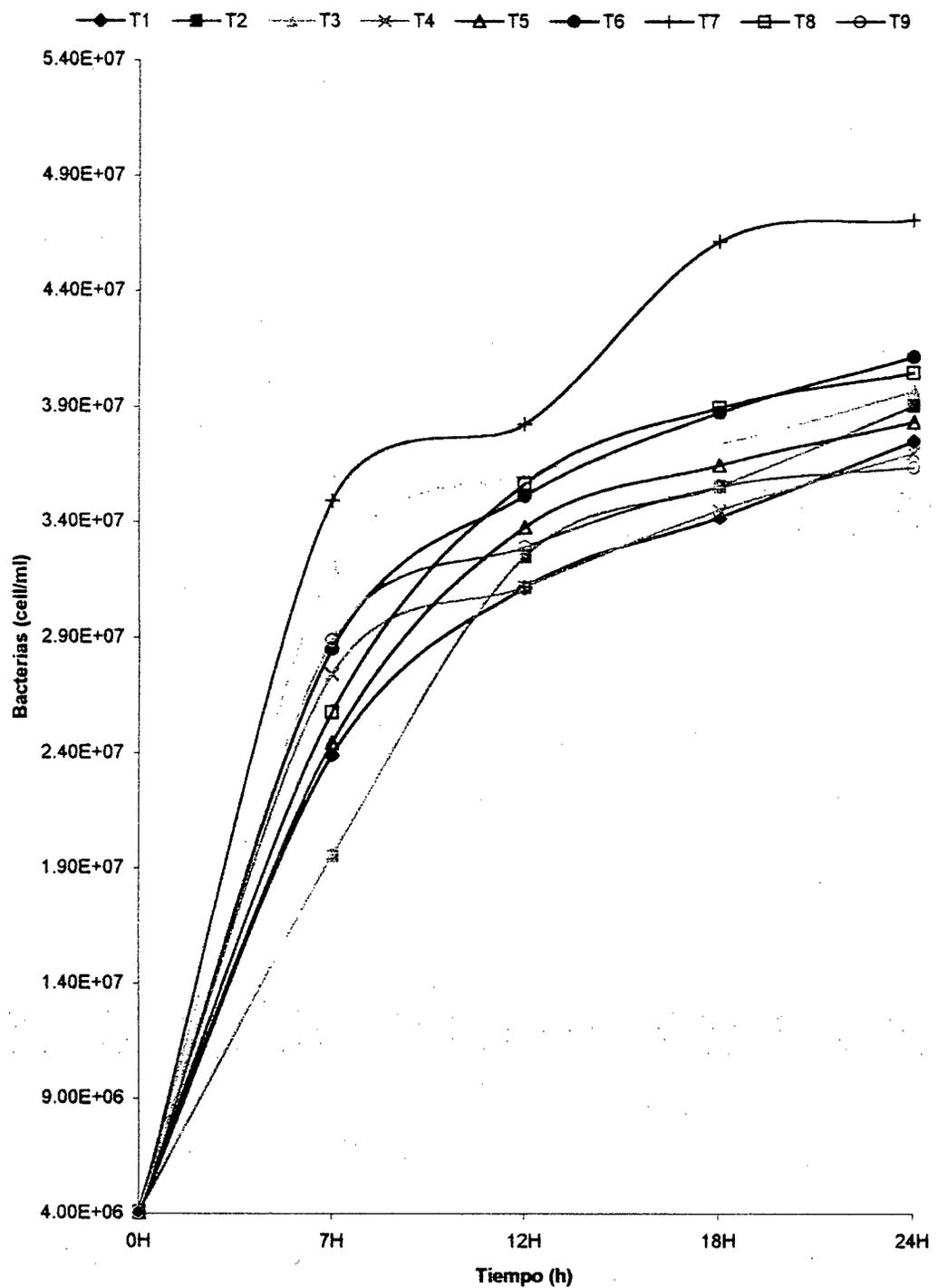


Figura 6. Variación del crecimiento de *Zymomonas mobilis* CECT 561 durante el proceso de fermentación sumergida en la producción de sorbitol.

Analizando los resultados del Cuadro 3 y la Figura 6, podemos observar que el crecimiento de las células microbianas cumple la fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria tal como menciona Godía (1998), entendiéndose también que el crecimiento celular se produce a partir del consumo de determinados sustratos (en nuestro caso la cáscara de papaya) que suministran la energía y la materia prima necesaria para la síntesis del material celular y demás productos del metabolismo. Básicamente el crecimiento bacteriano observado cumple con lo especificado por diversos autores (Godía, 1998; Ertola, 1994; Scragg, 1996), quienes mencionan que comienza con una fase de latencia que dura muy poco y que no se pudo observar por ser breve; seguido de una fase de crecimiento logarítmico o exponencial y luego una fase estacionaria, llegando posteriormente a una fase de declinación que no hemos llegado a observar pues nuestras lecturas solo abarcan hasta el inicio de la fase estacionaria.

La Figura 6, nos muestra que el tratamiento 7 (T7), produce el mayor aumento en la cantidad celular bacteriana, diferenciándose de los demás tratamientos a las 6 horas, seguido de los tratamientos T4 y T6, esto puede deberse que al haber mayor cantidad de sustrato la división bacteriana es mas alta tal como menciona Reed y Rem, (1995); por otro lado los tratamiento T1, T2 y T3 son los que presentaron menor crecimiento bacteriano.

A partir de las 12 h, notamos que el desarrollo microbiano ingresa a la fase estacionaria, destacándose el tratamiento 7 por su mayor producción de células del microorganismo, notándose en algunos tratamientos que a partir de las 18 horas en adelante es mínimo el aumento de las bacterias, esto se debe a que se va acabando la disponibilidad de los nutrientes o a que las bacterias hayan producido sustancias que inhiban el crecimiento como el CO_2 (Ertola, 1994; Godía, 1998).

Tal como se indicó anteriormente la fase de declinación no se pudo apreciar pues el proceso de fermentación sólo se evaluó hasta las 24 horas.

2. Variación del oxígeno disuelto

El Cuadro 4, se muestra la variación del oxígeno disuelto durante el proceso de fermentación sumergida.

Cuadro 4. Variación del oxígeno disuelto (mg/L) durante el proceso de fermentación sumergida.

TRAT.	Oxígeno Disuelto (mg/L)			
	6 Horas	12 Horas	18 Horas	24 Horas
T1	4,64	4,03	3,77	3,15
T2	5,01	3,91	3,80	3,04
T3	3,95	3,61	3,50	3,30
T4	4,34	4,22	3,74	3,53
T5	4,60	3,81	3,58	3,08
T6	4,25	3,69	3,41	3,18
T7	3,71	3,43	2,93	2,79
T8	4,49	3,65	3,37	3,24
T9	4,22	3,88	3,66	3,58

En los resultados del Cuadro 4, se observa que a las 6 h de fermentación los valores de oxígeno disuelto están en un rango de 3,71 a 5,01 mg/L y a las 24 h de fermentación los rangos están entre 2,79 a 3,58 mg/L, no llegando a concentraciones críticas que limiten a los microorganismos aeróbios a reproducirse y producir sus metabolitos, Ertola (2000), menciona que la concentración crítica de oxígeno

disuelto para la mayoría de los microorganismos está entre 0,1 y 1 mg/L; de los tratamientos estadísticos, ninguno de ellos llegó hasta valores críticos, pero sí hubo una disminución debido al aumento en el crecimiento bacteriano.

La Figura 7, grafica los valores del Cuadro 4 en la variación del oxígeno disuelto durante el proceso de fermentación se siguió notando que la variación en la concentración del oxígeno disuelto estuvo en función al crecimiento bacteriano pues los tratamientos T6, T7 y T8, son aquellos en donde hubo mayor crecimiento bacteriano y por ende mayor consumo de oxígeno; pero podemos notar entre estos tres tratamientos que el efecto del tratamiento T7 mantiene valores mucho menores que los anteriores ya que este produce mayor crecimiento bacteriano.

También se aprecia que entre las 18 y 24 h en los tratamientos T1, T2, y T5 existe un marcado descenso del nivel de oxígeno; esto nos puede indicar que el desarrollo bacteriano continua en estos tratamientos.

La importancia en la variación del oxígeno disuelto radica en que los microorganismos necesitan oxígeno para su normal crecimiento, ya que una fermentación anaerobia daría un subproducto no deseado (etanol), que también es posible obtener a partir del mismo microorganismo estudiado (Gunasekeran y Chandra, 2000; Wilberg y Alves, 1997).

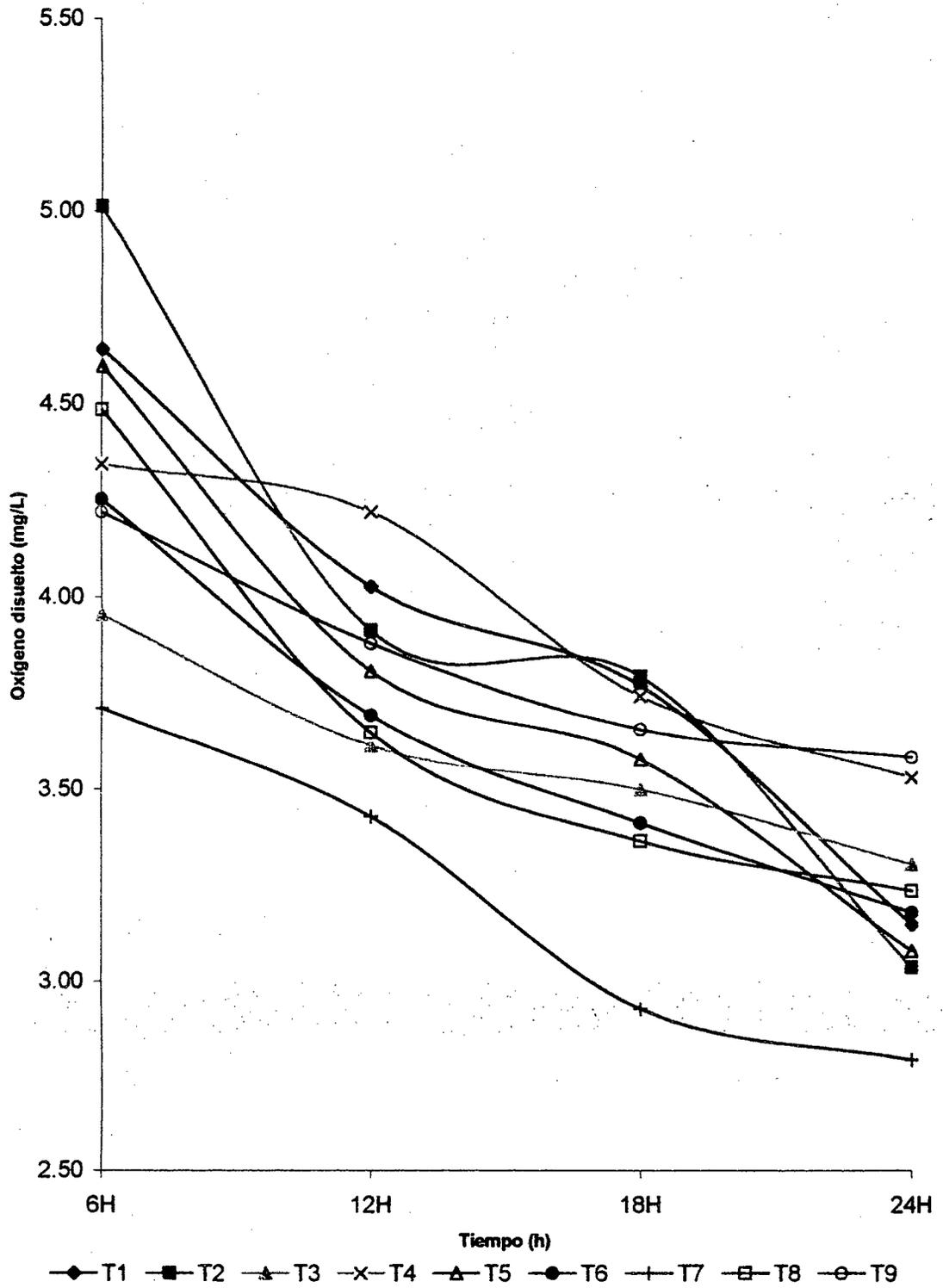


Figura 7. Variación de oxígeno disuelto durante el proceso de fermentación sumergida en la producción de sorbitol por *Zymomonas mobilis*.

3. Producción de CO₂ disuelto

El cuadro 5, muestra la variación de los niveles de CO₂ disuelto durante el proceso de fermentación sumergida.

Cuadro 5. Producción de CO₂ durante el proceso de fermentación sumergida.

Tratam.	CO ₂ Disuelto (mg/L)			
	7 Horas	12 Horas	18 Horas	24 Horas
T1	120,226	301,995	301,995	380,189
T2	239,883	239,883	380,189	478,630
T3	190,546	478,630	478,630	602,560
T4	301,995	380,189	478,630	602,560
T5	190,546	239,883	380,189	602,560
T6	190,546	301,995	478,630	478,630
T7	190,546	602,560	758,578	954,993
T8	190,546	301,995	478,630	758,578
T9	190,546	301,995	478,630	602,560

Los valores de CO₂, se obtuvieron en función a la variación del pH, tal como lo menciona Godía (1998), en el que la medida del CO₂ se basa en la medida del pH siguiendo la reacción de equilibrio de disolución del ácido carbónico.

Los datos del Cuadro 5, se expresaron gráficamente en la figura 8 para observar la variación del CO₂ disuelto en los diversos intervalos de tiempo.

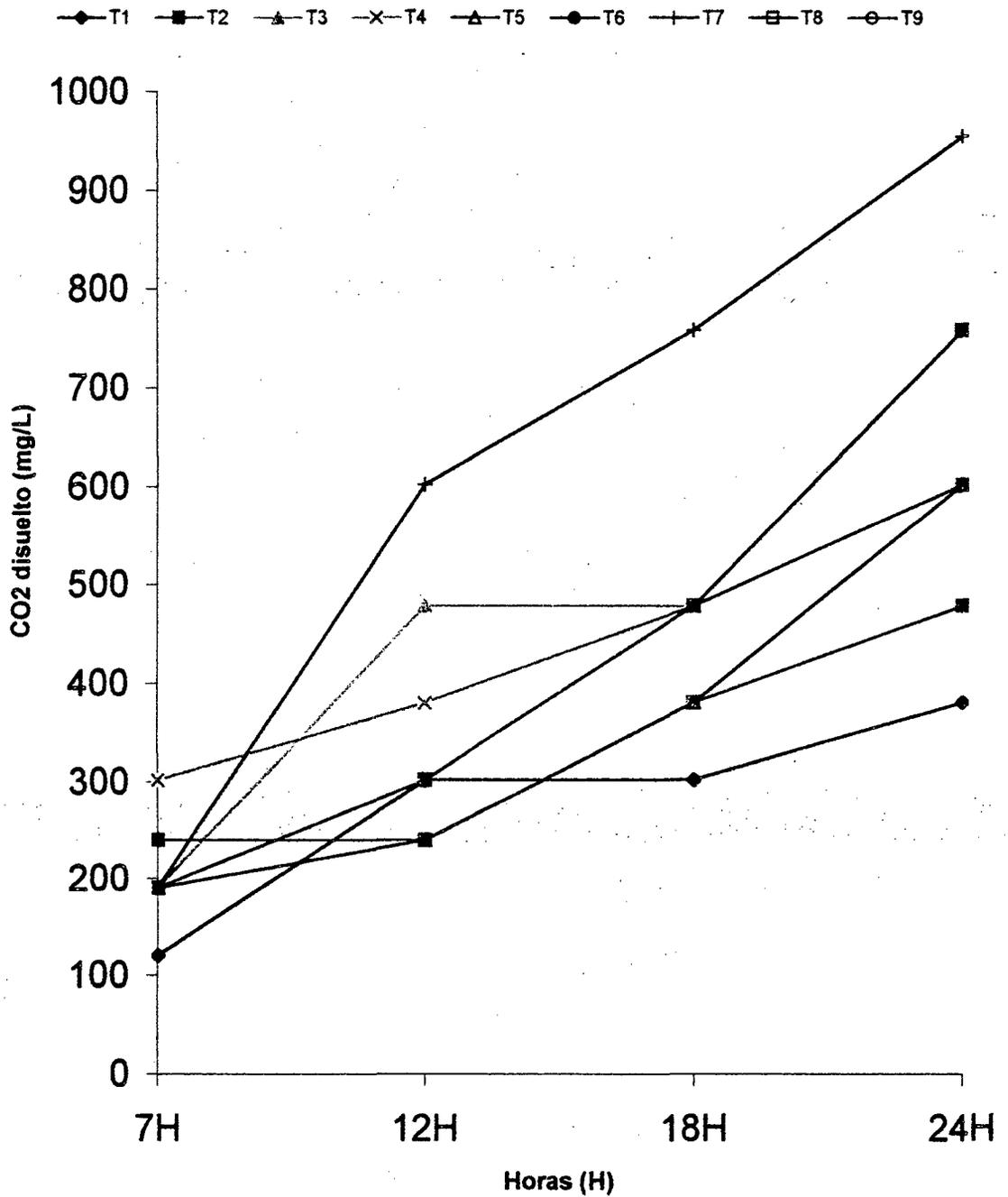


Figura 8. Variación del CO₂ disuelto durante el proceso de fermentación sumergida.

El CO₂ disuelto es uno de los productos finales de la oxidación de los sustratos por parte de los microorganismos (Godía, 1998), En cuanto a la producción de CO₂ disuelto de cada tratamiento, la formación de mayores cantidades de CO₂ se produce a las 24 horas de fermentación por efecto de los tratamientos T6, T7 y T8; en especial el tratamiento T7 que produjo mayor cantidad de CO₂ disuelto. No se encontró bibliografía con respecto a la producción de CO₂ disuelto en otros trabajos realizados con anterioridad pero se sabe que altos niveles de CO₂ pueden afectar el metabolismo celular (Ertola, 1994); por lo que podemos mencionar que cuando se formó altas cantidades de CO₂, disminuyó la actividad bacteriana y por ende la producción de sorbitol .

C. CUANTIFICACIÓN DEL SORBITOL

El cuadro 6, muestra los valores de las absorbancias y concentración de sorbitol en la construcción de la curva patrón.

Cuadro 6. Determinación de la curva patrón para el sorbitol.

Concentración de sorbitol (mol/L)	Absorbancia ($\lambda = 288 \text{ nm}$)
0,005	0,086
0,08	0,303
0,1	0,312
0,12	0,360
0,14	0,363
0,16	0,404
0,18	0,488
0,20	0,495

Los datos del Cuadro 6, fueron sometidos a un análisis de regresión lineal, representando gráficamente en la Figura 9.

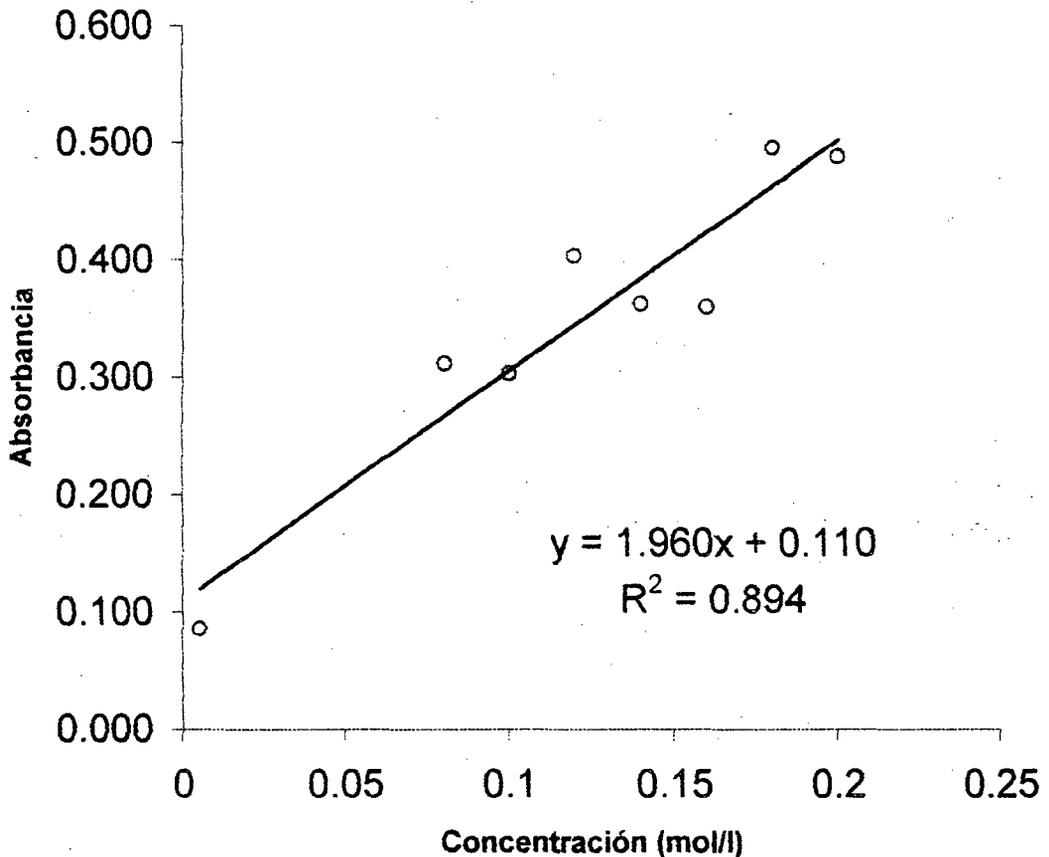


Figura 9. Curva patrón para el sorbitol.

De acuerdo a la Figura 9, podemos ver que la absorbancia está influenciada en un 89,4 % respecto a la concentración del sorbitol ($R^2 = 0,894$), cumpliéndose lo que menciona Calzada (1976) quien con respecto al coeficiente de regresión indica que si alteramos el valor de la variable independiente que en nuestro caso es la absorbancia, cuánto podemos esperar que la concentración varíe.

La correlación $R = 0,95$, indica la mutua asociación entre las variables absorbancia y concentración (Calzada, 1976).

El Cuadro 7, nos muestra los resultados de la formación de sorbitol durante el proceso de fermentación sumergida.

Cuadro 7. Formación de sorbitol durante el proceso de fermentación sumergida durante las 6, 12 18 y 24 horas de proceso.

TRAT.	Sorbitol (mol/L)				
	0 Horas	6 Horas	12 Horas	18 Horas	24 Horas
T1	0	1,3159	1,6379	2,0933	2,6202
T2	0	1,0609	1,6859	2,1930	2,5983
T3	0	1,6490	2,0334	2,3308	2,3443
T4	0	1,3015	1,4053	2,1540	1,8924
T5	0	1,3973	1,8609	2,5975	2,3430
T6	0	1,5057	2,0055	2,6381	2,3861
T7	0	1,9048	2,2936	3,4141	3,0919
T8	0	1,4489	2,0091	2,5717	2,3876
T9	0	1,4311	1,7370	2,0195	1,9854

Estos datos se expresan gráficamente en la figura 10 con el fin de poder observar la variación de la concentración de sorbitol de cada tratamiento empleado en los debidos intervalos de tiempo.

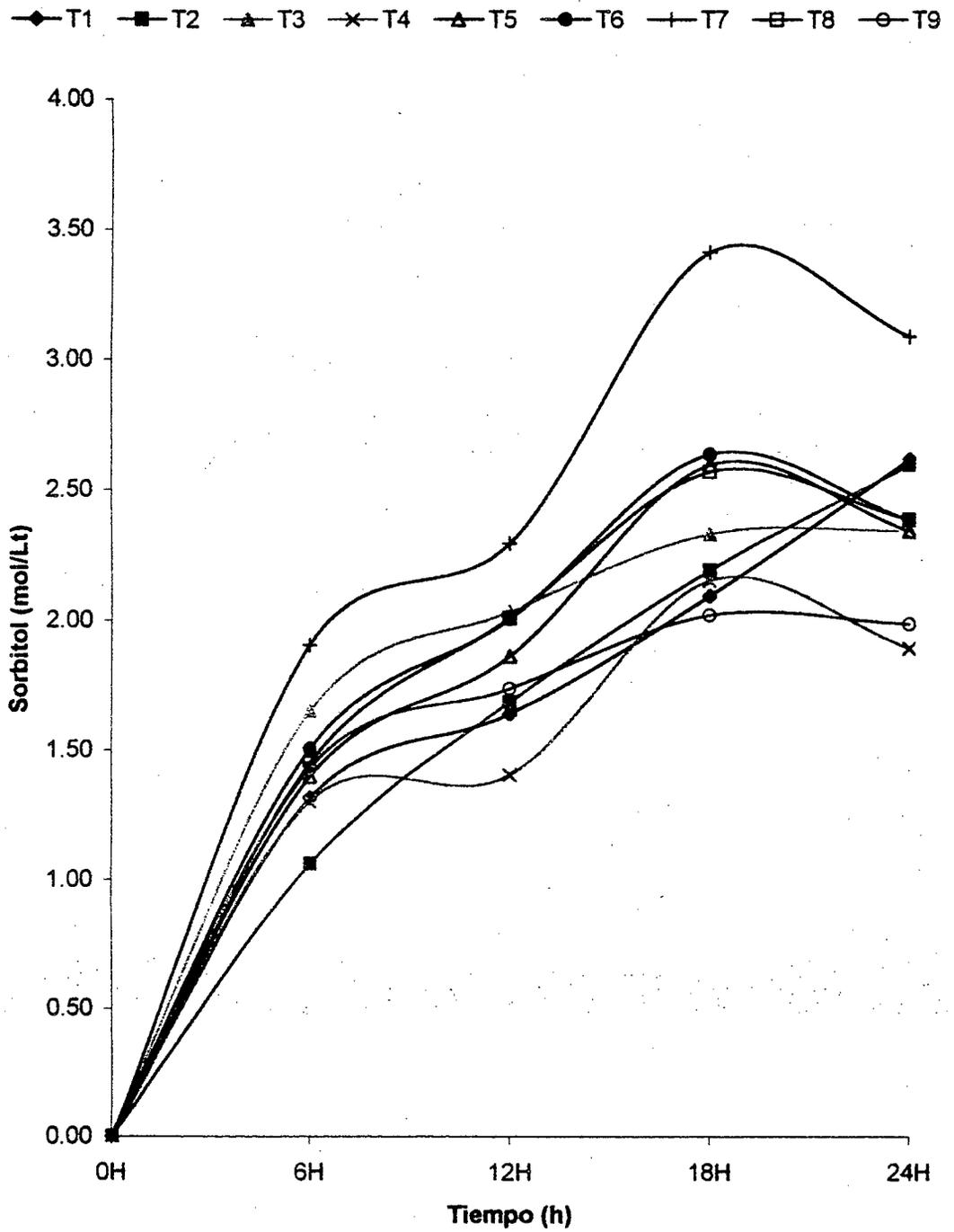


Figura 10. Producción de sorbitol durante el proceso de fermentación sumergida con la cepa *Zymomonas mobilis* CECT 560.

Analizando la Figura 10, apreciamos la formación de sorbitol a partir de las 6 h de fermentación, destacándose el tratamiento T7 que se diferencia de los demás tratamientos, seguido del tratamiento T3, T6 y T8, mientras que los tratamientos T2 y T4 contienen bajos niveles de sorbitol.

Todos los tratamientos muestran que el crecimiento microbiano y la producción de los metabolitos está en función al consumo de sustrato hasta un punto en que se consume todo el sustrato y se comienza a consumir los metabolitos primarios, tal como lo menciona Scragg (1996).

Comparando la Figura 10 (producción de sorbitol) y la Figura 4 (crecimiento bacteriano), notamos que la concentración celular como la capacidad biosintética son importantes en la formación del producto (Ertola, 1994); pues haciendo una comparación entre los tratamientos y la cantidad de células en crecimiento de los tratamientos en la Figura 4, ambas guardan una relación hasta las 18 h y 24 h en algunos casos (T1, T2, T3).

A las 12 h de fermentación los valores de sorbitol siguen un orden ascendente en todos los tratamientos. Podemos notar que después de las 18 h en la mayoría de los tratamientos (T4 a T9), comienza a disminuir el metabolito formado (sorbitol). Esto se debe a que los

microorganismos una vez consumido el sustrato comienzan a consumir el metabolito formado (Scragg, 1996). En el caso de los tratamientos T1, T2 y T3, después de las 24 h todavía siguen produciendo sorbitol, no lográndose determinar el tiempo en el que llegan al máximo. La producción máxima de dichos tratamientos no fue tomada en cuenta, similares cantidades obtenidas a las 24 h se pueden obtener con los otros tratamientos en menores horas ahorrándonos costos de tiempo y energía. Por lo tanto podemos decir que las máximas cantidades de sorbitol se obtuvieron a las 18 h. En el cuadro 8 se muestra el análisis de varianza de los resultados de la producción de sorbitol a las 18 h.

Cuadro 8. Análisis de varianza de la producción de sorbitol a las 18 h de proceso de fermentación.

F.V.	G.L.	S.C.	Fc	Pr>F	NS
[I] Inóculo	2	2,8155	72,05	0,0001	**
[S] Sustrato	2	0,2984	7,64	0,0040	**
[I] x [S]	4	8,6966	111,28	0,0001	**
Error	18	0,3517			
Total	26	12,1621			

R^2	C.V	Media
0,971	5,376	2,599

El análisis de varianza indica que existe una alta significación estadística en la interacción inóculo y sustrato, deduciéndose que existe una combinación óptima entre los niveles de cada factor estudiado.

Para determinar qué combinación de niveles es la más adecuada, se realizó la prueba de Tukey al 5 %, la cual se muestra en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Prueba de tukey al 5 % para la producción de sorbitol a las 18 h de fermentación sumergida.

FACTORES						
A (Inóculo)			B (Sustrato)			
A	Prom.	Sig.	B	Prom.	Sig.	
1	a1	2,15586	a	b3	2,47816	a
2	a2	2,72824	b	b2	2,58616	a b
3	a3	2,91483	c	b1	2,73462	b

Como podemos observar en el cuadro 9, el factor A en sus niveles a2 y a3, muestran mayores rendimientos superando estadísticamente al factor a1, siendo el nivel a3 mayor estadísticamente inclusive con el nivel a2; el factor B no muestra diferencias estadísticas entre sus niveles b3 y b2, pero si entre estos niveles y b1, presentando este nivel mayor rendimiento. En general, de acuerdo a todas las combinaciones

lo más apropiado para la producción de sorbitol sería el factor a3 y b1, que corresponde al tratamiento 7 (T7).

Los factores óptimos y la máxima producción de sorbitol se muestran en el Cuadro 10. Estos resultados son obtenidos de la siguiente ecuación:

$$\text{SORBITOL} = (0,782454) + (0,0486389 \times \text{inóculo}) + (0,0286161 \times \text{sustrato}) + (0,00484222 \times \text{inóculo}^2) - (0,00131633 \times \text{inóculo} \times \text{sustrato}) - (0,0000220444 \times \text{sustrato}^2)$$

La ecuación se halla del resultado del estudio de superficie de respuesta, tal como indica Cochran (1962), que los efectos principales y los efectos simples relacionados por las interacciones pueden ser representados e interpretados fácilmente a través de la superficie de respuesta. El análisis de superficie de respuesta se realizó empleando el programa STATISTICA 5,0 (Stat Soft Inc; Tulsa, USA).

Cuadro 10. Valores de los niveles óptimos de la concentración de inóculo y de sustrato.

Factores	Factores óptimos	Máxima producción
Inóculo	18,9342	3,58056102
Sustrato	108,4124	

La Figura 11 muestra la superficie de respuesta tridimensional que representa los resultados de las combinaciones de los factores de inóculo y sustrato. En dicha figura se encuentran representados los nueve promedios de las combinaciones del efecto inóculo y sustrato en ella también se encuentra el punto de combinación óptima para la máxima producción de sorbitol.

La Figura 12, representa con mayor detalle los contornos de la variable respuesta (sorbitol) y las combinaciones de las concentraciones de inóculo y sustrato

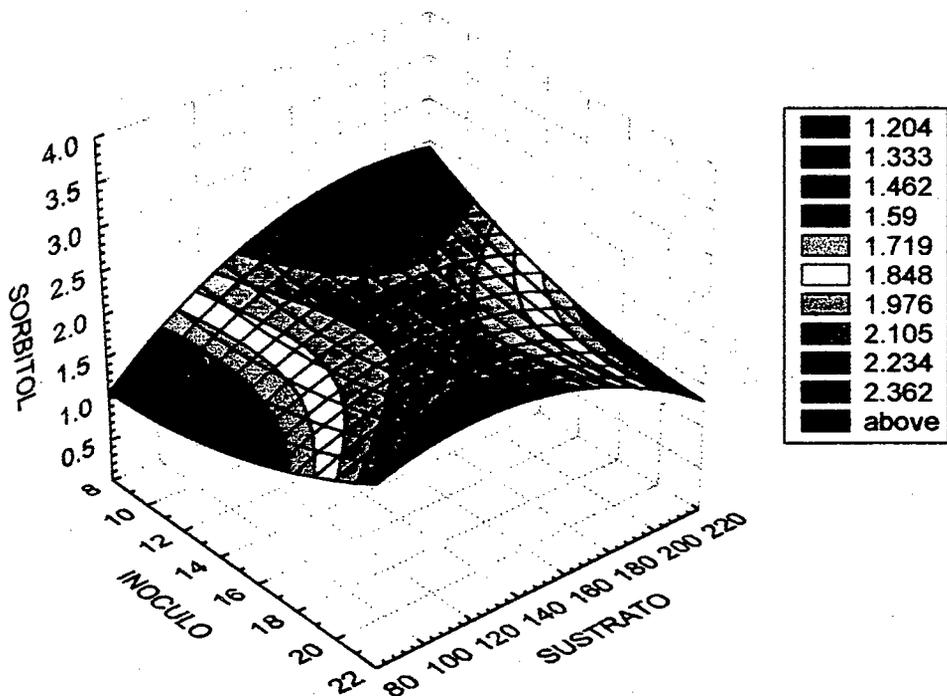


Figura 11. Superficie de respuesta para la producción máxima de sorbitol en función de la concentración del inóculo y sustrato.

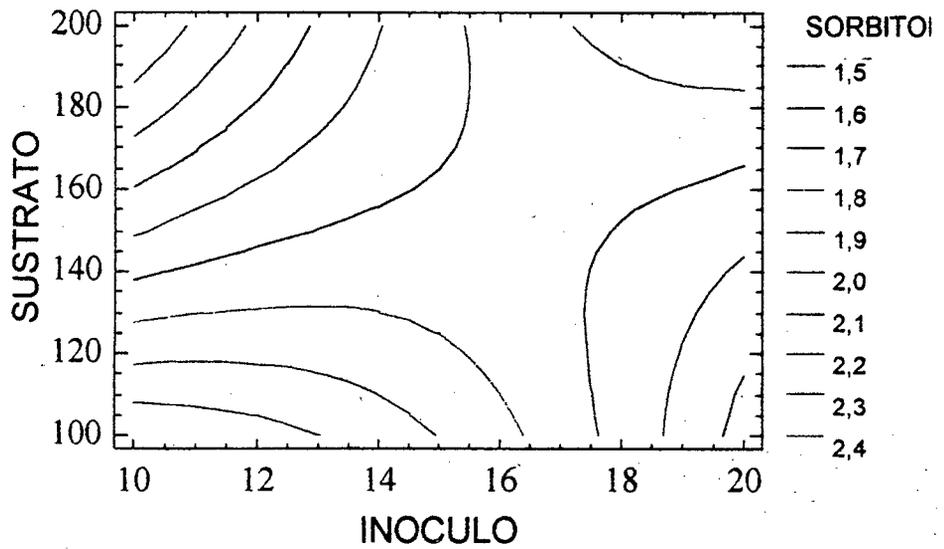


Figura 12. Gráfica de contorno de la estimación de la superficie de respuesta de la producción de sorbitol en función de las concentraciones del inóculo y sustrato.

V. CONCLUSIONES

Sobre la base de los resultados obtenidos podemos indicar las siguientes conclusiones:

- ❖ Se determinó mediante la caracterización fisicoquímica de la cáscara de papaya como mayores componentes los sólidos totales (85,31%), los carbohidratos (77,32%) y el contenido de humedad (14,07%).
- ❖ Se logró determinar la concentración de sustrato y concentración de inóculo, para la obtención del sorbitol por fermentación sumergida a partir de la cáscara de papaya siendo la combinación óptima: inóculo, 20 % V/V y sustrato, 100 ml/L; correspondiendo al tratamiento 7.
- ❖ Se logró evaluar diversos parámetros durante el proceso de fermentación sumergida como el comportamiento del crecimiento bacteriano, oxígeno y CO₂ disuelto en la producción de sorbitol
- ❖ Se obtuvo una producción máxima de sorbitol (3,4141 mol/L), a las 18 horas de proceso y a una temperatura de laboratorio de 27 ± 1 °C.

VI. RECOMENDACIONES

- ❖ Realizar trabajos de investigación acerca de la producción de sorbitol con bacterias aisladas en Tingo María.

- ❖ Realizar investigaciones sobre la producción de sorbitol con otros tipos de desechos agroindustriales en la región.

- ❖ Implementar un laboratorio para trabajos en biotecnología de alimentos y que cuente con cromatógrafos de gas y HPLC.

- ❖ Realizar trabajos de investigación para purificación del sorbitol obtenido para así evaluar los costos de producción y un posterior escalamiento a nivel industrial.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- AOAC. 1995. Official methods of analysis. Agricultural Chemicals Contaminants and Drugs. 15° Ed. Gaithersburg Md. USA.
- ARE, R.; SAMULEVITCH, H. 1990. Technological possibilities of sucrose bioconversion biotechnological potencial of *Zymomonas mobilis*. USA.
- ARROYO, M. 1998. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Complutense de Madrid 28040 Madrid
- BELLO R.A., 1984. Liquid circulation and mixing characteristics of airlift contactors. J. ChemEng. N° 62. Pp 573-577.
- BRIMACOMBE, J. 1972. The carbohidrates. Vol 1ª. Academic Press. New York. Pp 479-516.
- BRINGER, S.; SAHM, H. 1984. Effect of oxygen on the metabolism of *Zymomonas mobilis*. Arch. Microbiol. N° 139. Pp 376-381.
- BRUNETON. 1991. Elementos de fitoquímica y de farmacología. Editorial Acribia. Zaragoza. España. Pp 7-19.
- CALZADA, B. 1976. Métodos estadísticos. 3° edición. Editorial Jurídica. Lima. Perú. Pp 208-212.
- CALZADA, B. J. 1993. Frutales nativos. UNA Molina. Lima. Perú. Pp.
- CHISTI, M.Y. 1989. Airlift Bioreactors, Elsevier Science Publishers, N.Y. U.S.A

- CHUN, U.; ROGERS, P. 1998. The simultaneous production of sorbitol from fructose and gluconic acid from glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. Appl Microbiol. Biotechnol. Vol 29. Pp 19
- COCHRAN, D. 1962. Diseños experimentales. Editorial Trillas. México D.F. México. 661 p.
- CRUGER, W. 1993. Biotecnología manual de microbiología industrial. Editorial. Acribia. Zaragoza. España. 125 p.
- DOELLE. H. 1985. Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* at high sugar concentration. Appl Microbiol. Biotechnol. N° 22. Pp 411-415.
- ERTOLA, R. 1994. Microbiología industrial. Editado por la Organización de Estados Americanos, Secretaria General. Washington. 1994. Pp 23-46.
- FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS - COMISION DE TESIS Y EXAMEN PROFESIONAL. 2000. Guía para la redacción de tesis y reglamento de tesis. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María. Perú.
- FAVELA, E. 1998. The effect of pH , temperature and sucrose concentration on high productivity continuous ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. N° 27. Pp 121-128.
- FENNEMA, O. 1993. Química de los alimentos. Editorial acribia. Zaragoza. España. 1070 p.
- FORSTER H., MEHNERT H. 1979. Die orole Anwendung von Sorbit ols Zuckeraustouschstoff in der Diat des Diabetes mellitus, Akt. Ernährung 5, 245.

- FRANCIOSI, T. R. 1992. Manual: El cultivo del papayo en el Perú. Editorial Fundeagro. Lima. Perú.
- GODIA, F. 1998. Ingeniería bioquímica. Editorial Síntesis. Madrid. España. Pp 189-214, 261-273.
- GUNASEKERAN, P.; CHANDRA, K. 2000. Ethanol fermentation technology – *Zymomonas mobilis*. School of Biological Sciences. University of Madurai Kamaraj. Madurai. India.
<http://ces.iiscernet.in/curscinew/july10/articles14.htm>
- HART; FISHER. 1994. Análisis moderno de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- HOLME, J. 1987. Bioquímica analítica. Editorial Acribia. Zaragoza. España. Pp 307-326.
- ICMSF. 1983. Microorganismos de los alimentos 1. Técnicas de análisis microbiológicos. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 243 p.
- JEFFREY, J. 1998. Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism. Vol 3. Plenum Press. Pp 327-336.
- LAUDRIN, I.; GOMA, G. 1982. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*: effect of temperature on cell growth. Biotechnol. Lett. N° 3. Pp 537-542.
- LAUDRIN-SEILLER, I. 1984. Fermentation alcoolique par *Zymomonas mobilis*, estude du compartement dynamique de la souche et potentielles technologiques. Toulouse. Francie.
- LEE, K.; RHOM. 1981. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by strings of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. N° 3. Pp 291-296.

- LEMA, J. 1999. Biorreactores para el cultivo de microorganismos. Universidad de Santiago de Compostela. España.
http://www.usc.es/biopress/articulos/antiguos1/lema_01.html
- LINDEN, G.; LORIENT, D. 1994. Bioquímica agroindustrial. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- LINDSTAD, R.; KOLL, P. 1998. Substrate specificity of sheep liver sorbitol dehidrogenase. J. Biochem. Vol 4. Pp 479-486.
- MASDIATY MUNIR, MANAF . 1997. Production of sorbitol from sago starch by *Zymomonas mobilis* (ATCC 31921). Faculty of Food Science and Biotechnology, University Putra. Singapore.
<http://gene.um.edu.my/MSMBB/publication/10thmsmbb/ps.html>
- MCNEIL, B.; HARVEY, L. 1990. Fermentation a practical approach laboratory fermenters, chapter 2. IRL Press. Oxford University. Pp 17-38.
- MCNUTT K.; SENTKI A. 1996. Sugar replacers: a growing group of sweeteners in the United States. Nutr Today. 31 (6): 255 -261.
- MERCHUK, J.C. 1990. Why use Bioreactors? TIBTECH, 8, 66-71
- MONSANTO AGRICULTURA. 2001. Glosario de ingeniería genética y biotecnología. España. <http://www.monsanto.es/biotecnologia/glosario>.
- MORIN, Ch. 1980. Frutos cítricos. 2° edición. Editorial IICA. Lima. Perú.
- QUINTEROS, R. 1993. Ingeniería bioquímica. Editorial Alhambra. México. Pp 20-101.
- R-BIOPHARM, 2001., D-sorbitol, colorimetric method. Cat N° 0.670 057. 3 p.
- REED, G.; REM, A. 1995. Biotechnology, enzymes, biomass, food and feed. VHC Press. Germany. 547 p.

- RIVERA, H. 2003. Producción de xilitol a partir de cáscara de camu camu, en fermentación sumergida. Tesis. UNAS. Tingo María. Perú. 90 Pp.
- ROGERS, P.; LEE, K. 1979. Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentration. *Biotechnol. Lett.* N° 5. Pp 3345-350.
- ROYO, 1977. Contenido de pectina en jugos y cortezas. En: *Revista agroquímica y tecnología alimentaria.* 17 (1). Pp 79-85.
- SIEGEL, M.; ROBINSON, C. 1992. Application of airlift gas-solid-liquid reactors in biotechnology. *Chem.Eng.Sci.* N° 47. 3215-3229.
- SILVEIRA, M. 1999. Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cell of *Zymomonas mobilis*. Vol 75. Pp 99-103.
- SKOOG, A. 1993. Análisis instrumental. 4° edición. Editorial Mc. Graw Hill. Madrid. España. Pp 184-187.
- SOUMITRA, B.; NIRMALA, V. 1998. Polyoles: Technology & business opportunities (<http://www.Exicom.org/cew/jan98/nirmala.htm>)
- SRAGG, A. 1996. *Biotecnología para ingenieros.* Editorial Limusa. México DF. Pp 156-158.
- STEEL, R.; TORRIE, J. 1995. *Bioestadística, principios y procedimientos.* 2° edición. Editorial Mc Graw Hill. México DF. 622 p.
- SWINGS, J.; DELEY, J. 1977. The biology of *Zymomonas*. *Rev. Bacteriol.* N° 41. Pp 1-46.
- TOUSTER, O.; SHAW, D. 1962. The polyols-synthesis. *Rev Physiol.* N° 42. Pp 181-225.

- WARD, O. 1999. Biotecnología de la fermentación. Editorial Acribia. Zaragoza: España.
- WILBERG, K.; ALVES, T. 1997. Enzymatic catalysis by permeabilized cells. Braz. J. Chem. Eng. Vol 14, N° 4.
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci.html>
- WISEMAN, A. 1989. Biotecnología de las Enzimas. Editorial Acribia. España.
- WROLSTADT R.E., SCHALLENBERG R.S. 1981 Free sugars and sorbitol in fruits - A compilation from literature, J. Assoc. Anal. Chem. 64, 91 (1981)
- YAOWARATE I. 1994. Formation of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. Joint Seminar on Biotechnology. Khon Kaen. Thailand.
- ZACHARIOU, M., SCOPES, R.K. 1986. Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. J. Bacteriol. 167, 803-809.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1.

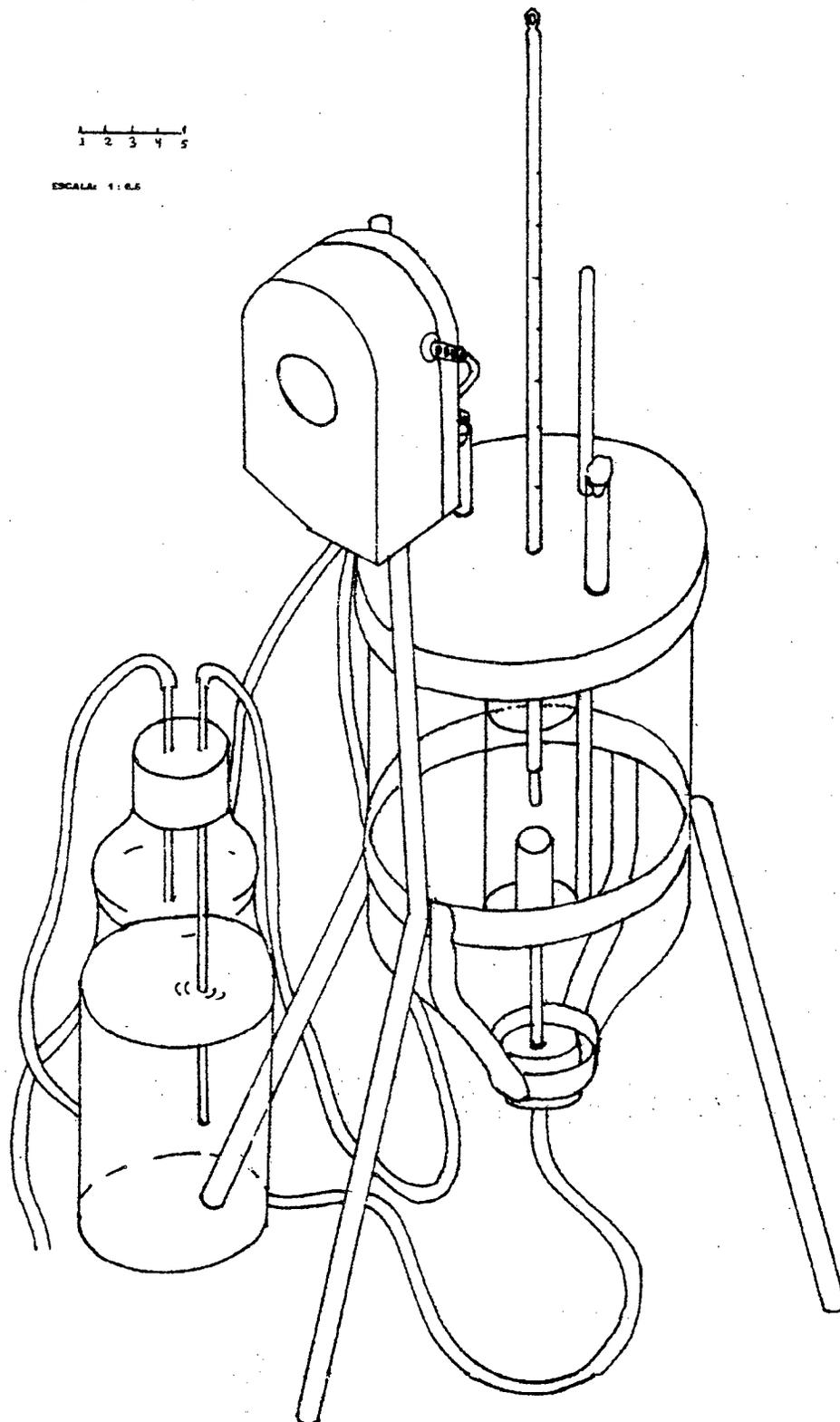


Figura. Esquema a escala del Bioreactor Air Lift usado en los experimentos.

ANEXO 2.

Composición del medio semi sintético (SS) para el desarrollo de la bacteria

Zymomonas mobilis CECT 560

Componente	g/L
Sulfato de amonio	2,00
Sulfato de magnesio	1,00
Fosfato de potasio	0,01
Citrato de sodio	0,20
Sulfato ferroso	0,01
Glucosa	20,0
Extracto de levadura	5,00

Fuente: Silviera (1999).

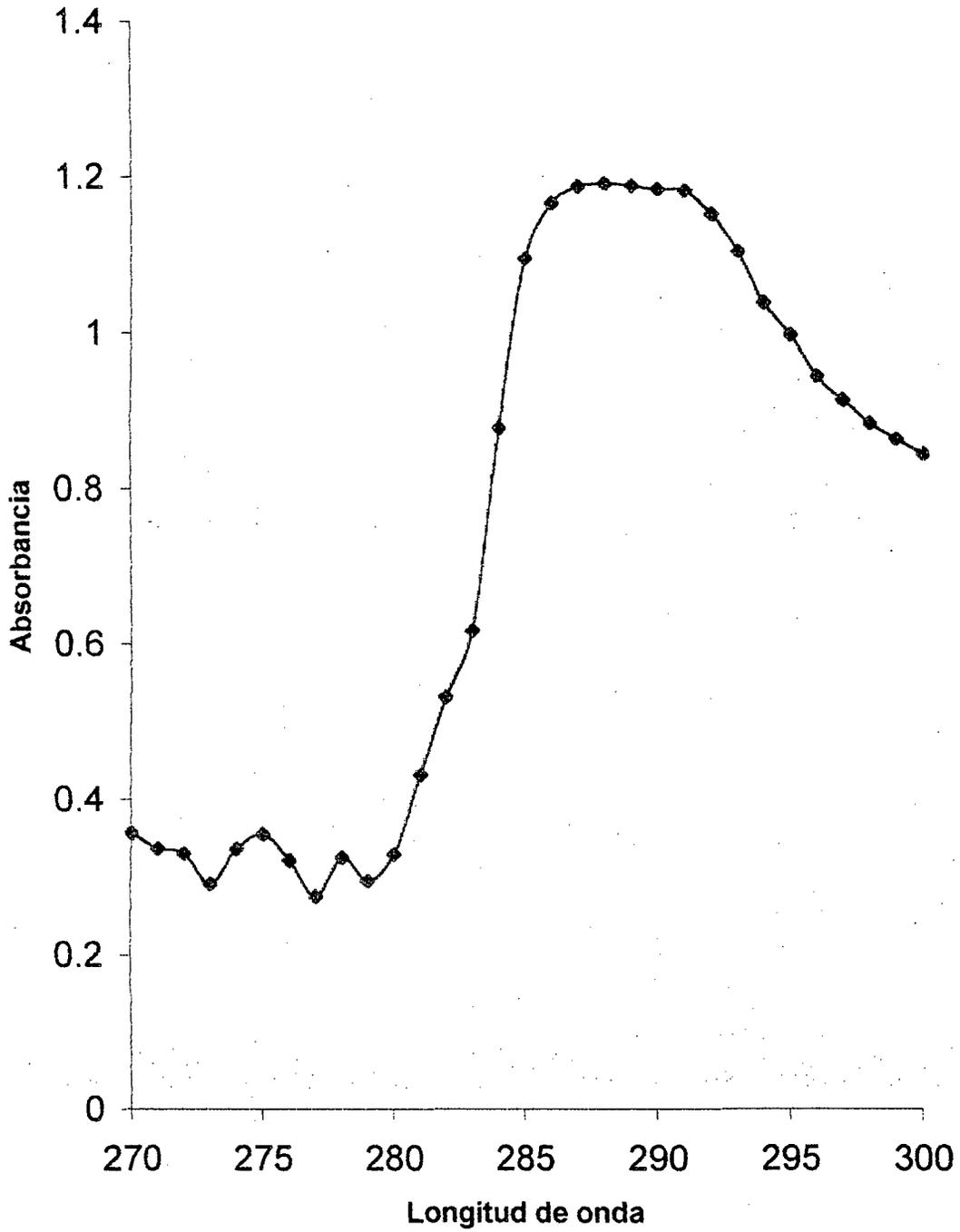
ANEXO 3.

Anexo 3-A

Lecturas de absorbancia de la solución estándar para la obtención de la máxima longitud de onda.

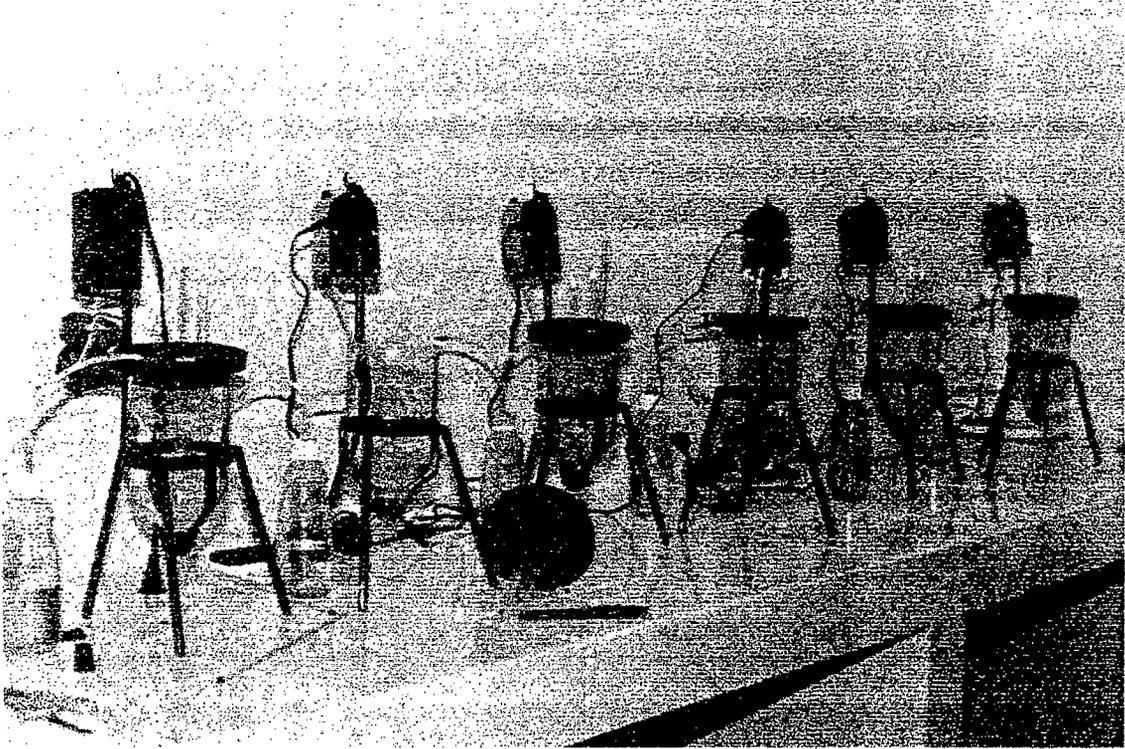
Longitud de onda (nm)	Absorbancia
270	0,357
271	0,337
272	0,331
273	0,292
274	0,337
275	0,356
276	0,322
277	0,276
278	0,326
279	0,296
280	0,33
281	0,432
282	0,533
283	0,618
284	0,877
285	1,095
286	1,166
287	1,188
288	1,192
289	1,189
290	1,185
291	1,183
292	1,153
293	1,105
294	1,039
295	0,998
296	0,945
297	0,914
298	0,884
299	0,864
300	0,845

Anexo 3-B

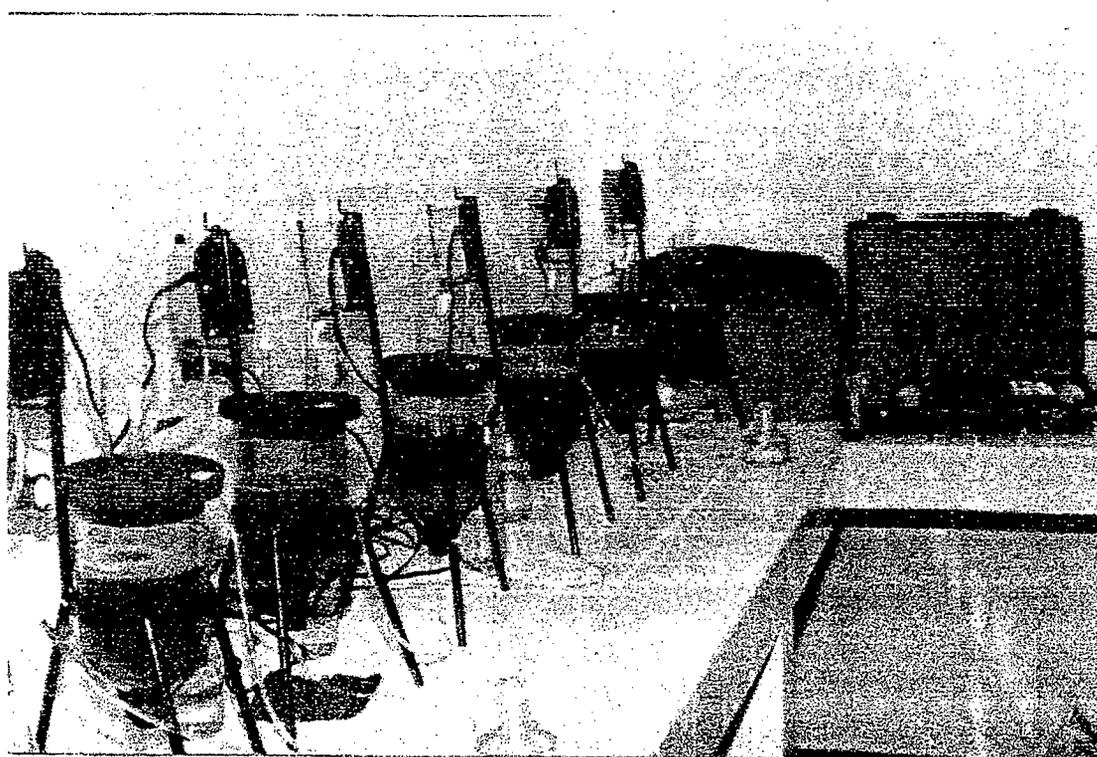


Curva de selección de la longitud de onda de máxima absorbancia para la solución estándar.

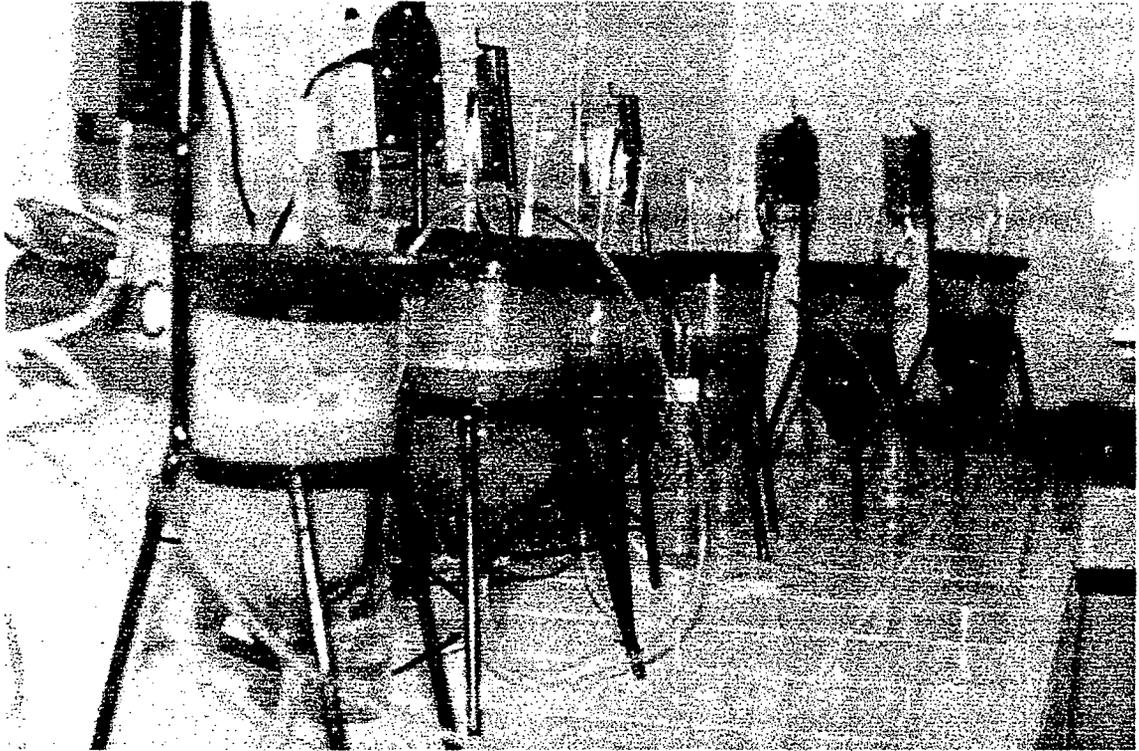
Anexo 4.



Biorreactores esterilizados listos para el inicio de la fermentación.



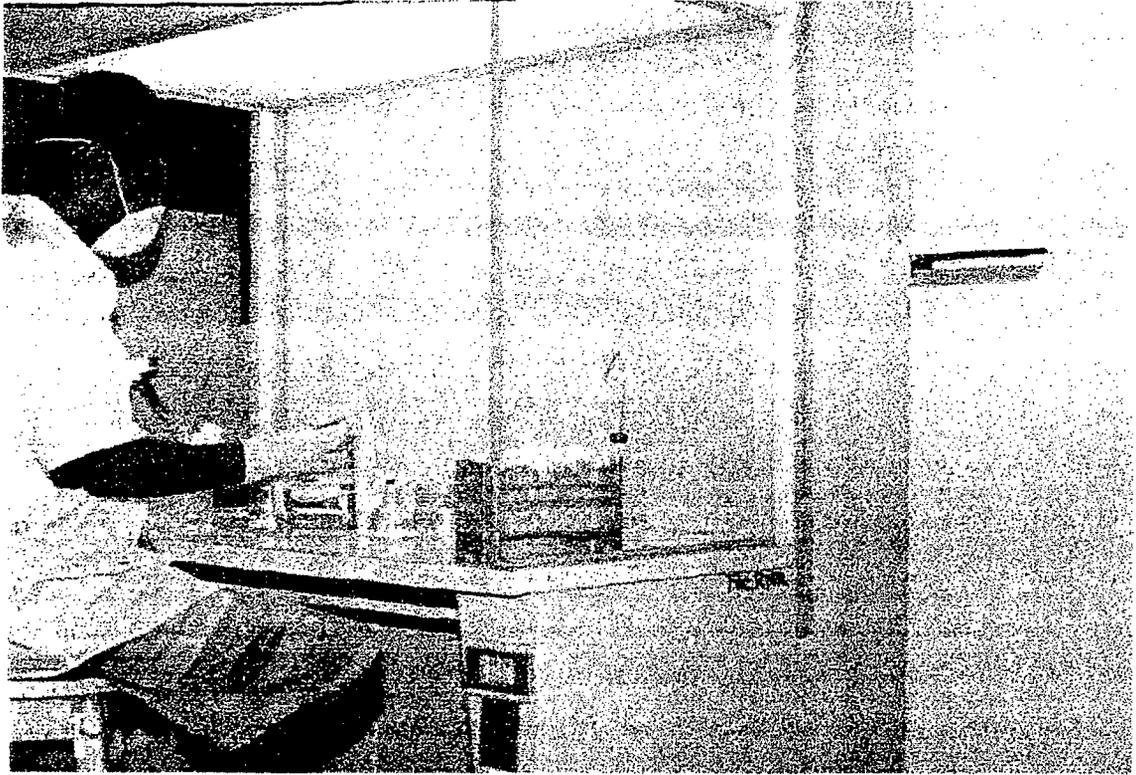
Inicio del proceso de fermentación sumergida.



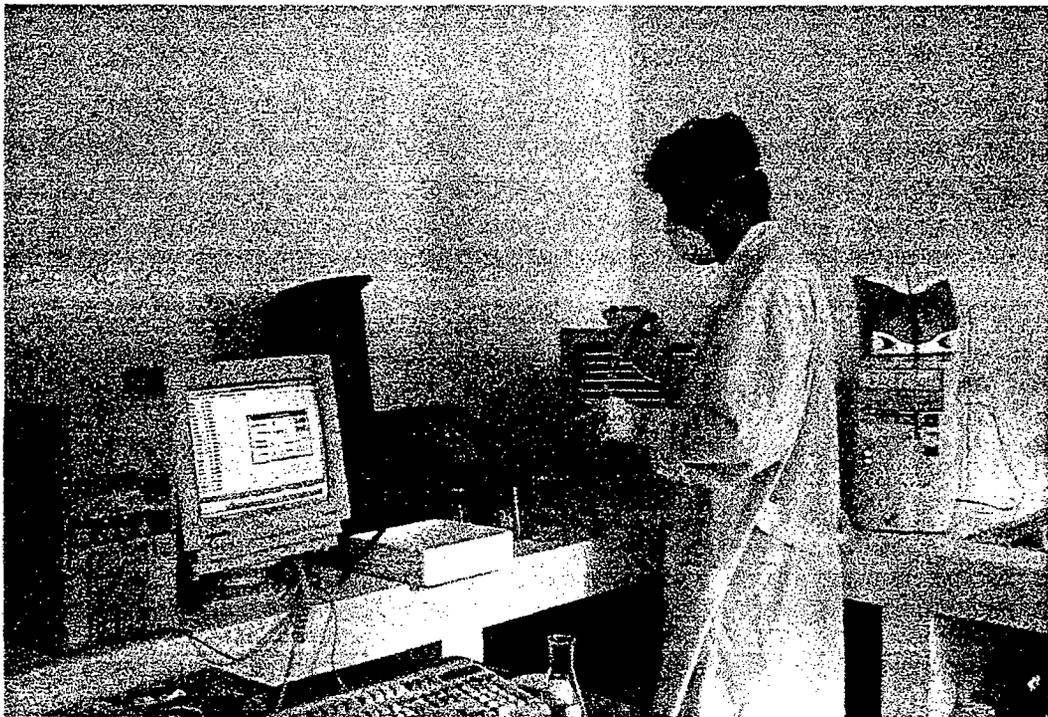
Proceso de fermentación sumergida en la fase terminal.



Toma de muestras durante la fermentación.



Análisis de muestras de la fermentación en la cámara de flujo.



Determinación espectrofotométrica del sorbitol