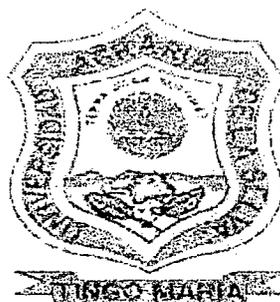


UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

**DEPARTAMENTO ACADEMICO DE CIENCIA TECNOLOGÍA E INGENIERIA DE
LOS ALIMENTOS**



**“PRODUCCIÓN DE XILITOL A PARTIR DE CÁSCARA DE CAMU
CAMU (*Myrciaria dubia* HBK Mc Vough) POR
FERMENTACIÓN SUMERGIDA”**

Tesis

Para Optar el Título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

HUMBERTO HUGO RIVERA ROJAS

PROMOCION I – 00

“UNASINOS FORJADORES HACIA UN NUEVO ECOMILENIO”

TINGO MARIA - PERU

2002



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

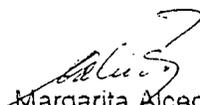
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 08 de enero del 2003, a horas 10:00 a.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: **Humberto Hugo RIVERA ROJAS**.

“PRODUCCIÓN DE XILITOL A PARTIR DE CÁSCARA DE
CAMU CAMU (*Myrciaria dubia* HBK Mc Vough) POR
FERMENTACIÓN SUMERGIDA”

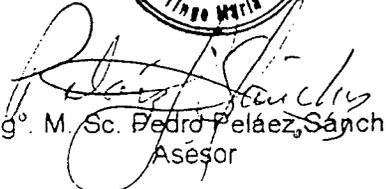
Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran aprobado con el calificativo de **Bueno**, en consecuencia al Bachiller: **Humberto Hugo RIVERA ROJAS**, queda apto para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del Consejo Universitario, 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, 08 de enero del 2003


Biga. M. Sc. Margarita Aicedo Romero
Presidente




Ing. Laureano Zavaleta De La Cruz
Vocal


Ing. M. Sc. Pedro Peláez Sánchez
Asesor

DEDICATORIA

A DIOS:

Por brindarme la vida, sabiduría, paciencia, e
iluminarme mi camino y por alcanzar mis
metas.

EN MEMORIA A MI QUERIDA

ABUELA:

PUALINA ARANDA por sus consejos,
formación y orientación para
realizarme como profesional.

A MI MADRE:

ELENA ROJAS por su comprensión, paciencia,
y sacrificio para lograr mi más deseado anhelo

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional Agraria de la Selva mi alma mater.

Al Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana por el financiamiento del presente trabajo de investigación.

Al Mcbg. MSc. César Samuel López López por sus sabios consejos y por su continuo asesoramiento en la realización del presente trabajo de investigación.

Al Ing. MSc. Pedro Pelaéz Sánchez asesor del presente trabajo de investigación y por el apoyo brindado.

Al Dr. Manuel Sandoval Chacon por su apoyo brindado para la realización del presente trabajo de investigación.

A mis tías: Rhut, Lupe por el apoyo brindado para realizarme como profesional.

A mis hermanos y hermanas por el apoyo brindado y por su comprensión.

A quienes me brindaron su apoyo y su solidaridad les retribuyo aquí mi gratitud.

INDICE

	Pag.
RESUMEN	1
SUMMARY	2
I. INTRODUCCION.....	3
II. REVISION BIBLIOGRAFICA	4
A. CARACTERISTICAS GENERALES DEL CAMU CAMU (<i>Myrciaria dubia</i> HBK Mc. Vaugh).....	4
1. Clasificación taxonómica:	4
2. Sinonimia y nombres comunes.....	4
3. Descripción botánica	5
4. Origen y adaptación	5
5. Composición química.	6
6. Cosecha y poscosecha.....	8
7. Productos y usos	8
B. HIDRATOS DE CARBONO.....	9
1. Monosacáridos	9
2. Oligosacáridos.....	10
3. Polisacáridos	10
C. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS EDULCORANTES	12
1. Teoría molecular del sabor dulce.....	12
2. Polioles.....	12
D. CARACTERÍSTICAS DEL XILITOL.....	14
1. Propiedades físicas y químicas del xilitol.....	15
2. Síntesis del xilitol	15

3. Proceso de obtención del xilitol	16
4. Aplicaciones del xilitol en la industria de alimentos	16
E. FERMENTACION.....	17
1. Fermentación sumergida discontinua	18
2. Fermentación sumergida continua.....	18
F. BIORREACTORES BIOQUÍMICOS	18
1. Biorreactor de tanque agitado.....	19
2. Biorreactores no convencionales.....	19
G. RESIDUOS	21
1. Tipos de residuos	21
2. El problema de los residuos.....	21
H. TIPOS DE MICROORGANISMOS CON APLICACIÓN INDUSTRIAL ..	22
1. Hongos.....	22
2. Bacterias	24
3. Virus	24
4. Algas	25
I. METABOLISMO MICROBIANO	25
1. Metabolitos primarios.....	26
2. Metabolitos secundarios	26
III. MATERIALES Y METODOS.....	27
A. LUGAR DE EJECUCIÓN.	27
B. MATERIA PRIMA E INSUMOS.	27
C. MATERIALES DE LABORATORIO Y PROCESO.	27
1. Equipos	27

2. Materiales.....	29
3. Reactivos y soluciones	29
D. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	30
1. Construcción y calibración de los biorreactores	30
2. Caracterización de la cáscara de camu camu	30
3. Preparación del sustrato.....	31
4. Obtención del medio de cultivo y proceso de la fermentación sumergida.....	32
5. Determinación espectrofotométrica de xilitol.....	35
E. DISEÑO EXPERIMENTAL	35
F. ANALISIS ESTADISTICO	38
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
A. CONSTRUCCIÓN Y CALIBRACIÓN DE LOS BIORREACTORES	39
B. CARACTERIZACION DE LA MATERIA PRIMA	41
C. AJUSTE DEL pH DE LA CÁSCARA HIDROLIZADA DE CAMU CAMU	42
D. DESARROLLO DE BIOMASA DE LA LEVADURA <i>Cándida tropicalis</i> .	44
E. OXÍGENO DISUELTO EN EL FERMENTADOR	48
F. CURVA PATRÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE XILITOL	52
G. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE XILITOL.....	53
V. CONCLUSIONES	65
VI. RECOMENDACIONES.....	66
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	67
VIII. ANEXOS.....	71

INDICE DE CUADROS

	Pag.
1. Composición química y nutricional de la pulpa de camu camu maduro en 100 g de pulpa	5
2. Composición química de la cáscara de camu camu en base seca.....	41
3. Valores del ajuste del pH de la materia prima.....	43
4. Desarrollo de biomasa de la <i>Cándida tropicalis</i> durante el proceso de fermentación	44
5. Variación del oxígeno disuelto durante el proceso de fermentación	48
6. Determinación de la curva Patrón de xilitol.....	52
7. Producción de xilitol (mol/l) por fermentación a las 24, 48 y 72 horas del proceso.....	54
8. Análisis de variancia de la producción de xilitol (mol/l) a 24 horas de fermentación.....	57
9. Análisis de variancia de la producción de xilitol (mol/l) a las 48 horas de fermentación	58
10. Prueba de Tukey al 5 % para la producción de xilitol vs concentración de inóculo a 48 horas de fermentación	59
11. Prueba de Tukey al 5 % para la producción de xilitol vs concentración de sustrato a 48 horas de fermentación.....	59
12. Valores de los niveles óptimos de la concentración de inóculo y sustrato	60
13. Predicción de la producción de xilitol	63
14. ANVA de la producción de xilitol (mol/l) a las 72 horas fermentación.....	64

INDICE DE FIGURAS

	Pag.
1. Diagrama de flujo para la obtención el sustrato	31
2. Diagrama de flujo para la producción biotecnológica de xilitol	33
3. Diseño experimental para la determinación de xilitol	37
4. Biorreactor air lift construido y calibrado.....	39
5. Vista frontal del biorreactor air lift construido	40
6. Desarrollo de biomasa durante el proceso de fermentación	47
7. Variación del oxígeno disuelto durante el proceso de fermentación en la producción del xilitol por <i>Cándida tropicalis</i>	51
8. Curva patrón de xilitol	53
9. Producción de xilitol de los tratamientos estudiados durante el proceso de fermentación	56
10. Superficie de respuesta para la producción de xilitol en función de la concentración del inoculo y sustrato	61
11. Gráfica de contorno de la estimación de la superficie de respuesta de la producción de xilitol en función de las concentraciones de inoculo y sustrato	62

RESUMEN

El camu camu (*Mirciaria dubia* HBK Mc Vough), es una planta tropical de cuyos frutos se pueden obtener concentrados o deshidratados con alto contenido de vitamina C, de la cáscara se puede obtener polioles a través de procesos biotecnológicos.

El presente trabajo de investigación consideró la obtención de xilitol empleando la cáscara de camu camu como sustrato y levadura *Cándida tropicalis*, estableciéndose como objetivos determinar la concentración de sustrato e inóculo indispensables, utilizando biorreactores tipo air lift, así mismo determinar la concentración de xilitol. Para desarrollar el estudio se consideraron las siguientes etapas: diseño, construcción y calibración de los biorreactores, caracterización de la cáscara de camu camu, preparación del sustrato, obtención del medio de cultivo y proceso de fermentación sumergida y determinación de la producción de xilitol.

Los resultados de la investigación, permitieron establecer las siguientes conclusiones:

Los niveles óptimos de concentración de inóculo y de sustrato para la producción máxima de xilitol fueron inóculo 10 % V/V (inóculo / medio de cultivo) y 150 ml/l de sustrato, no existiendo significancia estadística con los valores de inóculo 15 % V/V y 200 ml/l de sustrato.

La producción máxima de xilitol (0,6737 mol/l), se obtuvo a las 48 horas de fermentación sumergida, a una temperatura de 27 °C y pH de 6,9.

RESUMEN

El camu camu (*Mirciaria dubia* HBK Mc Vough), es una planta tropical de cuyos frutos se pueden obtener concentrados o deshidratados con alto contenido de vitamina C, de la cáscara se puede obtener polioles a través de procesos biotecnológicos.

El presente trabajo de investigación consideró la obtención de xilitol empleando la cáscara de camu camu como sustrato y levadura *Cándida tropicalis*, estableciéndose como objetivos determinar la concentración de sustrato e inóculo indispensables, utilizando biorreactores tipo air lift, así mismo determinar la concentración de xilitol. Para desarrollar el estudio se consideraron las siguientes etapas: diseño, construcción y calibración de los biorreactores, caracterización de la cáscara de camu camu, preparación del sustrato, obtención del medio de cultivo y proceso de fermentación sumergida y determinación de la producción de xilitol.

Los resultados de la investigación, permitieron establecer las siguientes conclusiones:

Los niveles óptimos de concentración de inóculo y de sustrato para la producción máxima de xilitol fueron inóculo 10 % V/V (inóculo / medio de cultivo) y 150 ml/l de sustrato, no existiendo significancia estadística con los valores de inóculo 15 % V/V y 200 ml/l de sustrato.

La producción máxima de xilitol (0,6737 mol/l), se obtuvo a las 48 horas de fermentación sumergida, a una temperatura de 27 °C y pH de 6,9.

SUMMARY

The camu camu (*Mirciaria dubia* HBK Mc Vough). It is a tropical plant of whose fruits can be obtained concentrated or dehydrated with high content of vitamin C, of the skin one can obtain polyols through biotechnical processes.

The present investigation work considered the xylitol obtaining. Using the skin of camu camu like substrate and yeast candid tropicalis, settling down as objectives to determine the concentration substrate and indispensable inoculate, using bioreactors type air lift, likewise to determine the xylitol concentration. To develop the study they were considered the following stages: Design, construction and calibration of the bioreactor, characterization of the skin of camu camu, preparation of the substrate, obtaining the type of cultivation and process of submerged fermentation and determination of the production of the xylitol.

The results of the investigation allow to establish the following conclusions:

The good levels of concentration of inoculate and of substrate for the maximum production of xylitol were inoculate 10% V/V (inoculate / half of cultivation) and 150 substrate ml/l, not existing significant statistical with the values of inoculate 15% V/V and 200 substrate ml/l.

The maximum production of xylitol (0,6737 mol/l), it was obtained 48 hours of submerged fermentation, to a temperature of 27°C and pH of 6,9

I. INTRODUCCION

El camu camu (*Myrciaria dubia* HBK MC. Vaugh), es un cultivo tropical originario de América del Sur. Es un fruto rico en ácido ascórbico, ya que por cada 100 g de pulpa contiene alrededor de 2700 mg de ácido ascórbico, mientras que la naranja tiene sólo 92 mg, Por su alto contenido en ácido ascórbico tiene una gran demanda en el mercado exterior. En la actualidad se está promocionando el cultivo, consumo e industrialización del camu camu en la amazonía.

Generalmente se consume e industrializa la pulpa de camu camu, (50 a 55 % del peso total del fruto) y el resto (cáscara y semilla), no tienen ningún tipo de aprovechamiento.

El presente trabajo plantea la posibilidad de aprovechar la cáscara para la producción biotecnológica de un aditivo alimentario como el xilitol. El xilitol es un edulcorante con especiales características funcionales que lo diferencia de los edulcorantes tradicionales, es empleado en la elaboración de alimentos dietéticos y en alimentos para diabéticos. El xilitol puede ser producido biotecnológicamente por *Cándida tropicalis* al otorgarle como sustrato xilosa obtenida por hidrólisis ácida de celulosa y hemicelulosa de cáscara de camu camu; el periodo de ejecución fue de agosto del 2001 a diciembre del 2002.

Se consideraron los siguientes objetivos:

- Determinar la concentración de sustrato e inóculo, indispensables para la obtención de xilitol a partir de cáscara de camu camu en un biorreactor tipo air lift (movimiento por aire).
- Determinar la concentración de xilitol producido.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

A. CARACTERISTICAS GENERALES DEL CAMU CAMU (*Myrciaria dubia* HBK Mc. Vaugh)

1. Clasificación taxonómica.

Vásquez (2000), clasifica al camu camu de la siguiente manera:

Reino	: Vegetal
División	: Fanerógamas
Subdivisión	: Angiosperma
Clase	: Dicotiledoneas
Sección	: Eleuteropetales
Orden	: Calciflora
Familia	: Myrtiflorinea
Genero	: Myrciaria
Especies	: Dubia MC. Vaugh (camu camu arbustivo) Grandiflorum (camu camu árbol) Floribunda (West ex Willdenow) O. Berg (camu camillo)

2. Sinonimia y nombres comunes

Según Villachica (1996), los sinonimias que tiene el camu camu son:

- *Myrciaria divaricata* (Bentham) O. Berg.
- *Myrciaria paraencis* O. Berg.
- *Myrciaria spruceana* O. Berg.
- *Psidium dubia* H.B.K.

3. Descripción botánica

Villachica (1996), menciona que es un arbusto de 3 m, pudiendo alcanzar hasta 8 m de altura, glabro, muy ramificado, con ramas que nacen desde la tierra, tronco delgado que puede desarrollar hasta 15 cm de diámetro, corteza color marrón claro, lisa. El fruto es una baya globosa, de 10 a 32 mm de diámetro, color rojo hasta violeta, blando, con una a tres semillas reniformes de 8 a 15 mm de largo, conspicuamente aplanadas y cubiertas por una malla de fibrillas.

4. Origen y adaptación

El centro de distribución de camu camu arbustivo parece ser la cuenca occidental del Amazonas, a partir de la cual se le puede encontrar en la amazonía del Perú, Colombia, Brasil y Venezuela. El camu camu arbustivo tiene como hábitat las orillas de los ríos y lagos amazónicos, especialmente aquellos con aguas negras con alto contenido de materia orgánica. La adaptación a zonas inundables reduce la competencia de otras especies y el arbusto puede aprovechar los altos niveles de radiación solar y la abundante humedad del suelo, características de su hábitat ripario. Sin embargo, a pesar de esta adaptación, las fluctuaciones del nivel de agua delimitan el potencial productivo, así mientras menos tiempo permanezca sumergido mayor será la producción de frutos (Villachica, 1998).

5. Composición química.

Villachica (1998), indica que los análisis bromatológicos muestran muy altas cantidades de ácido ascórbico reducido (2800 mg/100 g) y ácido ascórbico total (2994 mg/100 g). Estos valores mucho mayores que las encontradas en el jugo de limón y 2,1 veces mayor que su mas cercano competidor la acerola. También son importantes sus contenidos de aminoácidos esenciales como valina y leusina.

La composición química y nutricional de la pulpa de camu camu se indica en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Composición química y nutricional de la pulpa de camu camu maduro en 100 g de pulpa.

Componentes	unidad	Valor
Agua	g	94,40
Calorías	cal	16,00
Proteínas	g	0,50
Carbohidratos	g	4,70
Fibra	g	0,60
Ceniza	g	0,20
Calcio	mg	27,00
Fósforo	mg	17,00
Fierro	mg	0,50
Serina	mg	29,90
Valina	mg	9,90
Leusina	mg	9,00
Glutamato	mg	8,80
Aminobutamato	mg	7,10
Prolina	mg	4,30
Fenilalamina	mg	1,70
Treolina	mg	2,00
Alanina	mg	1,70
Tiamina (vit. B1)	mg	0,10
Riboflavina (vit.B5)	mg	0,04
Niacina (vit.B5)	mg	0,62
Acido ascórbico reducido	mg	2880,00
Acido ascórbico total	mg	2994,00

Fuente: Villachica (1998).

6. Cosecha y poscosecha

Villachica (1996), reporta que la cosecha de las poblaciones naturales y de las plantas sembradas en las zonas inundables se produce en un solo periodo del año, entre los meses de diciembre y marzo. En cambio las plantas sembradas en tierras no inundables tienen un mayor periodo de cosecha (noviembre a marzo), encontrándose frutos en el resto del año.

Las frutas se cosechan al estado verde pintón, es decir cuando se presentan los primeros síntomas de maduración. Cuando se desea obtener pulpa con mayor color rosado se deja madurar más los fruto en la planta. La cosecha debe efectuarse cada cuatro a cinco días en la época de máxima producción (diciembre a marzo) y cada ocho a diez días en el resto del año.

Los frutos cosechados deben colocarse en envases de no más de 5 Kg de capacidad. Los frutos deben ser lavados y colocados en lugares airados, después de lo cual se puede proceder a procesar.

7. Productos y usos

En la amazonía peruana, se han identificado antiguas y diversas modalidades de uso, que realizan las comunidades rurales y urbanas. Entre dichas modalidades, la población ribereña utiliza la corteza como medicina y los frutos como carnada para pescar. El tallo y las ramas se emplean, eventualmente como leña (Pinedo, 2001).

La pulpa, los concentrados o deshidratados obtenidos de los frutos, son empleados en la industria para una variedad de productos cuyo principal atractivo radica, obviamente, en el alto contenido de vitamina C. En los últimos años han surgido conceptos que coadyuvan a la ampliación y diversificación del mercado de vitamina C. Es el caso llamado "medicina ortomolecular" que emplea megadosis de 12 y hasta 20 g de vitamina C por día para el tratamiento de enfermedades tan importantes como el cáncer y el sida (Pinedo, 2001).

B. HIDRATOS DE CARBONO.

Coultate (1998), menciona que los azúcares, como la sacarosa y la glucosa, son junto con los polisacáridos, como el almidón y la celulosa, los componentes más importantes del tipo de sustancias que conocemos con la denominación genérica de hidratos de carbono.

1. Monosacáridos

Los monosacáridos constituyen el grupo más simple de los hidratos de carbono y como veremos, la mayor parte de ellos pueden denominarse azúcares. Los monosacáridos tienen entre tres y ocho átomos de carbono, pero solo son comunes los que tienen cinco o seis. El sufijo *osa* se incluye en el nombre de los monosacáridos que tienen un grupo carbonilo y el número de carbonos se indica con términos tales como *triosa* y *pentosas* (Ocultate, 1998).

2. Oligosacáridos

Coultate (1998), indica que los oligosacáridos son polímeros de hasta 20 unidades de monosacáridos. La unión de los monosacáridos tiene lugar mediante enlaces glicosídicos, un caso concreto de enlace acetálico. Los más abundantes son los disacáridos, oligosacáridos formados por dos monosacáridos, iguales o distintos. Los disacáridos pueden seguir uniéndose a otros monosacáridos por medio de enlaces glicosídicos. Así se forman los trisacáridos, tetrasacáridos, o en general, oligosacáridos. Se ha establecido arbitrariamente un límite de 20 unidades para definir a los oligosacáridos. Por encima de este valor se habla de polisacáridos.

3. Polisacáridos

Según Badui (1993), convenientemente se ha considerado polisacáridos aquel polímero constituido por más de 20 monosacáridos unidos por distintos enlaces glucosídicos; los que tienen menos de 20 son los oligosacáridos. No producen verdaderas soluciones, sino más bien dispersiones de tamaño coloidal; puros no tienen color, aroma o sabor. Su peso molecular puede llegar a ser hasta de millones. Se encuentran como cadenas lineales, o bien ramificadas, que a su vez pueden estar integradas por un solo tipo de monosacáridos, como es el almidón y la celulosa o también por varios tipos de monosacáridos como es el caso de las gomas.

a. Celulosa

Es el polisacárido estructural de todo el reino vegetal; por estar considerado como el compuesto orgánico mas abundante en la naturaleza y ser una fuente de glucosa prácticamente inagotable que se renueva continuamente mediante la fotosíntesis. Al igual que la amilosa del almidón, un homopolisacárido lineal de unidades de D – glucopiranosas; su peso molecular llega a ser hasta de varios millones, su alta resistencia mecánica y química se debe a que sus cadenas paralelas se alinean sobre un eje longitudinal y establece un gran numero de puentes de hidrógeno intermolecular lo que da origen a microfibrillas altamente estructurales (Badui,1993).

b. Hemicelulosa

Este termino es algo ambiguo y se emplea para referirse a un grupo muy extenso de polisacáridos con diversos tipos de monómeros que se localizan principalmente en la pared celular y que son muy distintos a la celulosa y al almidón. Su composición química esta basada en la unión glucosidico de distintos monosacáridos, sobre todo pentosas (arabinosa y xilosa), hexosas (glucosa, manosa y galactosa), ácidos urónicos (galacturónico y glucorónico) y algunas desoxi-azucars (Badui, 1993).

C. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS EDULCORANTES

Dominic (1995), refiere que los edulcorantes pueden clasificarse en dos categorías elementales: nutritivos y no nutritivos. Entre los edulcorantes nutritivos se encuentran los azúcares, polioles y los jarabes de maíz ricos en fructosa. Entre los edulcorantes no nutritivos se encuentran la sacarina, el ciclamato; la mayor parte de los edulcorantes nutritivos se obtienen de los vegetales; los no nutritivos son sintéticos.

1. Teoría molecular del sabor dulce

Según Dominic (1995), las reacciones entre la naturaleza química y el sabor dulce de una sustancia puede establecerse teniendo en cuenta el modelo tripartito hoy ampliamente aceptado. El glicóforo (grupo que lleva consigo el sabor dulce, de un compuesto edulcorante), consta de dos unidades (AH y B) y un tercer componente γ , que integra una estructura tripartita.

2. Polioles

La mayoría de los alcoholes polihídricos derivados de los azúcares son ligeramente menos dulces que la sacarosa (Dominic, 1995).

a. Alditoles

Linden (1996), indica que no son osas pues no tienen grupos carbonilos. Son sin embargo muy interesantes pues se derivan de las manosas por hidrogenación y se encuentran en las frutas y diversas partes de los vegetales. La reducción del grupo CO por

vía química es fácil (por hidruros de Na, con catalizador amalgama de Na, etc.). Pero la vía biológica es mas interesante; se conocen las enzimas de oxido reducción que provocan la reacción en un sentido o en otro (oxidación del poliol a manosas).

1) D-Sorbitol

El D- sorbitol es un constituyente importante de numerosos alimentos naturales, sobre todo en frutas comestibles comunes, mientras que es raro en los tejidos de los mamíferos. Es metabolizado en el hombre y mejor utilizado 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. En el campo tecnológico otras características han hecho del sorbitol una sustancia auxiliar importante en la industria alimentaría y en particular en los productos de confitería, donde reemplaza con frecuencia al azúcar invertido. El sorbitol se fabrica por hidrogenación y por vía biotecnológica (Linden, 1996).

2) Manitol

Linden (1996), menciona que el metabolismo del manitol difiere poco del sorbitol. Tras difusión a través de la pared intestinal, el manitol se oxida a fructosa por la manitol - deshidrogenasa. Es

menos microscópico que los otros polioles, es conveniente para la fabricación de gomas de mascar.

3) Isomaltosa

La isomaltosa tiene un gusto azucarado puro, parecido al de la sacarosa y sin ningún regusto, presenta efectos cinagéticos cuando se asocia con otros polioles permite obtener un poder azucarante comparable a la sacarosa; la isomaltosa refuerza el efecto aromático en los alimentos y no produce un efecto refrescante como otros polioles (Linden, 1996).

D. CARACTERÍSTICAS DEL XILITOL

Según Martínez (1999), el xilitol es un poliol con poder edulcorante semejante a la sacarosa y encontrado naturalmente en frutas, vegetales, como también en mamíferos. El xilitol se caracteriza químicamente como un alcohol de azúcar de cinco carbonos (1,2,3,4,5 pentahidroxi pentano) con una fórmula molecular ($C_5H_{12}O_5$).

Según Soumitra (1998), el xilitol se encuentra en bajas concentraciones en frutas y productos vegetales (las fuentes primarias son frambuesas, fresas, ciruelas amarillas, coliflor, espinaca y otros), se extrae de la hemicelulosa de la madera. Es un agente edulcorante que tiene el mismo valor energético, el mismo aspecto y un poder edulcorante de 97 mientras que la sacarosa tiene un poder edulcorante de 100, pero como

numerosos polioles se recomienda como azúcar no carrogénico en industrias alimentarias. Otra propiedad significativa del xilitol ha sido la prevención de caries dental haciéndole así el suplente de azúcar. El xilitol se metaboliza fácilmente (independientemente de insulina) en el cuerpo humano y produce la misma cantidad de energía (4 cal/g) por lo cual se aplica en todas las comidas para diabéticos.

1. Propiedades físicas y químicas del xilitol

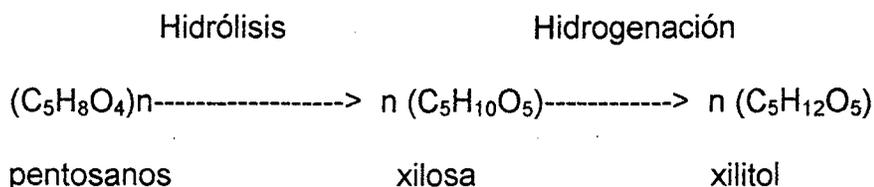
Soumitra (1998), menciona que las propiedades físicas y químicas del xilitol son:

Peso molecular	: 152,15
Apariencia	: polvo blanco y cristalino
Olor	: ninguno
Punto de ebullición	: 126° C (a 760 mm Hg)
Punto de fusión	: 92° a 96° C
Solubilidad a 20°C	: 169 g en 100 ml de agua
pH en agua (1g/10 ml)	: 5 a 7
Calor de solución	: - 34,8 cal/g (endotérmico)
Valor calorífico	: 4,06 cal/g

2. Síntesis del xilitol

Soumitra (1998), la síntesis de xilitol de los productos naturales está basado en la química de las pentosas que ocurre en muchas plantas. El xilano, un elector de pentosano, es un polisacárido; éste puede ser

hidrolizado a D-xilosa que también es conocido como azúcar de madera que tiene el sabor dulce. El xilitol puede sintetizarse por la hidrogenación de xilosa. las reacciones de la síntesis pueden resumirse como sigue:



3. Proceso de obtención del xilitol

Motta (1997), indica que para la obtención de xilitol se realiza los siguientes pasos:

1° Obtención de la xilosa: Esta se realiza mediante hidrólisis ácida, con exposición al vapor produciendo el fraccionamiento de los componentes de la hemicelulosa.

2° Conversión de la xilosa en xilitol: Se realiza por hidrogenación química, vía enzimática y fermentación microbiana o alguna otra alternativa a través de la combinación de la vía enzimática con una fermentación microbiana.

4. Aplicaciones del xilitol en la industria de alimentos.

Soumitra (1998), indica que a partir de 1980, 28 países han estado usando el xilitol en productos comerciales. En los inicios de los años noventa, la producción anual de xilitol se ha reportado alrededor de

5000 toneladas en el mundo. Aproximadamente el 95 % de la producción del mundo pertenece a dos empresas de Finlandia y la cantidad de equilibrio es distribuida entre cuatro empresas en Japón, uno en China y dos en Suiza. Además de que existen varias compañías en EE.UU. que están interesados en la producción de xilitol. Actualmente, el mayor uso del xilitol se encuentra en la fabricación de gomas de mascar.

El xilitol se ha encontrado particularmente atractivo como un edulcorante no azucarado y que puede sustituir a la sacarosa en diferentes productos como chocolates, gelatina, budines, mermeladas, productos cocidos, helados etc. está comercializándose también usando el xilitol como dulcificante.

E. FERMENTACION

Crueger (1993) indica que la fermentación comparte con la biocatálisis la característica de ser la forma más vieja de biotecnología. Tradicionalmente, la fermentación significaba la producción de alcohol de bebida a partir de los carbohidratos. Sin embargo, la fermentación es la aplicación del metabolismo microbiano para transformar una materia prima simple en productos de valor puede producir una asombrosa variedad de sustancias útiles, por ejemplo, sustancias químicas como ácido cítrico, antibióticos, biopolímeros y proteínas unicelulares. El potencial es tan inmenso y variado como los mismos microorganismos. Lo

que se necesita es conocer los microorganismos, controlar su metabolismo, crecimiento y manejarlos a gran escala.

1. Fermentación sumergida discontinua

Según Crueger (1993), la solución esterilizada de nutrientes se inocula con microorganismos y se permite que se lleva a cabo la incubación en condiciones óptimas 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.

2. Fermentación sumergida continua

Según Crueger (1993), en la fermentación 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.

F. BIORREACTORES BIOQUÍMICOS

Es básicamente un recipiente en el cual se lleva a cabo una reacción catalizada por enzimas, células libres o inmovilizadas, junto con los mezcladores, equipos de tomar muestra y aparatos de control. el papel

que cumple el biorreactor es de obtener el producto específico a una velocidad dada a partir de unos biorreactores concretos y con un costo mínimo (Wiseman, 1989).

Los tipos de biorreactores en el ámbito de laboratorio y de planta piloto son diversos, pero a escala industrial y en operación son cuatro los tipos principales: el waldhoft, el de turbina, la columna burbujeadora y el air lift (Quinteros, 1993).

1. Biorreactor de tanque agitado

Es el tipo de biorreactor más empleado en la industria. Se puede operar de tres formas diferentes: discontinuo, discontinuo alimentado (fed batch) y continuo. Esta basada en el uso de cultivos de células microbianas o enzimas en disolución (Casablanca, 1998).

2. Biorreactores no convencionales

a. Biorreactor air lift

Según Quinteros (1993), este tipo de reactor opera con menos energía y es capaz de suministrar más oxígeno, pero todavía su uso no está muy difundido. Las formas y velocidades de las corrientes de líquido en el fermentador definen un factor llamado redispersión de burbuja. La cantidad de burbujas recién formadas o dispersas en el fermentador se obtiene con la función de distribución del tiempo de residencia de las burbujas. La distribución del tiempo de residencia muestra las cantidades

relativas de las burbujas de diferentes edades: la edad de la burbuja se cuenta a partir de su formación hasta el momento en que es redispersada.

b. Biorreactor de lecho fijo

Se implementa un sistema de retención frecuentemente adhesión o inclusión que permite aumentar notablemente la concentración enzimática o células en el sistema, con el objetivo de lograr una mayor capacidad transformadora (Casablanca, 1998).

c. Biorreactor pulsante

Los sistemas pulsantes han sido aplicados en diferentes procesos biotecnológicos, tanto en el campo de la producción de metabolitos por fermentación y en reactores enzimáticos como el tratamiento anaeróbico y aeróbico de aguas residuales (Casablanca, 1998).

d. Fotobiorreactor

Los organismos fotosintéticos (bacterias fotosintéticas, cianobacterias y microalgas rojas, verdes o marrones) pueden transformar el CO_2 en macromoléculas constitutivas de la biomasa, mediante la utilización de una fuente de energía luminosa y un compuesto dador de electrones (H_2O , H_2S , compuestos orgánicos sencillos) (Casablanca, 1998).

G. RESIDUOS

Llamamos residuos a cualquier tipo de material que esté generando por la actividad humana y que está destinado a ser desechado. Hay objetos o materiales que son residuos en determinadas situaciones, mientras que en otras se aprovechan (Muller, 1994).

1. Tipos de residuos

Para poder disponer de los residuos eficazmente es importante distinguir los distintos tipos que hay. Es muy distinto el residuo industrial que el agrícola a que el doméstico y también son totalmente diferentes los residuos gaseosos o líquidos que los sólidos, a los radioactivos (Muller, 1994).

a. Residuos agrarios

Son los que proceden de las agricultura, la ganadería, la pesca, explotaciones forestales o la industria alimentaria.

b. Residuos peligrosos

Son aquellos que por su composición química u otras características requieren tratamientos especiales (Muller, 1994).

2. El problema de los residuos

El continuo aumento de la cantidad de residuos que generamos están provocando importantes problemas, por que no se usan las cosas que

se desechan en grandes cantidades, sin que haya conciencia clara, en muchos casos, de que luego algo hay que hacer con todos estos residuos. El problema se agrava porque la creciente actividad industrial genera muchos productos que son tóxicos o muy difíciles de incorporar a los elementos naturales. No hay solución única y clara a este problema, el reciclaje es la mejor opción desde el punto de vista ambiental pero tiene sus límites. En el momento actual se combina con plantas de tratamiento, vertederos e incineradoras (Doménech, 1995).

H. TIPOS DE MICROORGANISMOS CON APLICACIÓN INDUSTRIAL

Casablancas (1998), menciona que los organismos vivos se clasifican en procariotas y eucariotas en función de la complejidad de su organización celular. Un grupo independiente lo constituyen los virus, organismos que carecen de estructura celular.

1. Hongos

Son eucariotas quimioheterótrofos que pueden producir esporas por medio de un ciclo sexual o bien asexual. Se puede presentar bajo dos formas morfológicas diferentes: la filamentosa constituida por las hifas en los mohos y la unicelular en el caso de las levaduras (Casablancas 1998).

a. Levaduras

Se puede considerar que las levaduras son hongos unicelulares, en contra posición a los mohos que son multicelulares; ésta no es

una definición exacta, ya que algunas de las consideradas habitualmente levaduras producen micelios en cantidades variables. Las levaduras pueden ser diferenciadas de las bacterias por el mayor tamaño de sus células y por la forma ovalada, alargada, elíptica o esférica de las mismas. Las células típicas de las levaduras tienen un diámetro que oscila entre 5 y 8 micrómetros, siendo algunas incluso de mayor tamaño. Las levaduras son capaces de crecer dentro de amplios intervalos de pH ácido y en concentraciones de etanol de incluso un 18 %. Algunas crecen en concentraciones de sacarosa del 55 a 60 %. Las levaduras producen algunos pigmentos cuyo color varia del cremoso al rojo pasando por el rosa (Jay, 1994).

1) Tipos de levaduras industriales

Las levaduras mas utilizadas en las fermentaciones industriales son: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia utilis* y *Endomycopsis fibuliger* (Owen, 1991).

a) *Cándida*

Es este el genero mas amplio de las verdaderas levaduras. Se reproducen por gemación multilateral, y las ascas suelen contener cuatro esporas esferoidales, con forma de sombrero o con forma del planeta Saturno. Especies sin precisar del genero *Pichia* o *Cándida* forman películas en

los medios líquidos y se sabe que son importantes en la producción de alimentos autóctonos en distintas partes del mundo (Jay, 1994).

b. Hongos filamentosos

La unidad estructural de los mohos son las hifas, que pueden ser simples, ramificadas y estar tabicadas o no. El crecimiento se produce por alargamiento de las hifas y da lugar a una masa filamentosa conocida como micelio (Casablanca, 1998).

2. Bacterias

Son organismos procariotas unicelulares, de pequeño tamaño de 0,1 a 50 μm de diámetro y morfología diversa (bacilos, cocos, espirilos filamentosos, etc). Típicamente presentan una pared celular, rígida formada mayormente por mucopéptidos, en el caso de las bacterias gram positivas, o por mucopéptidos y lipopolisacáridos en las bacterias gram negativas (Casablanca, 1998).

3. Virus

Son organismos, submicroscópicos que no poseen estructura celular, ni metabolismo cuando están aislados, pero si entran en contacto con una célula, se convierten en una entidad capaz de replicarse y de realizar otras funciones propias de los seres vivos. Son elementos

genéticos de DNA o RNA, que controlan su propia replicación y su transferencia de célula a célula (Casablanco, 1998).

4. Algas

Según Casablanco (1998), son organismos vegetales fotosintéticos, no vasculares con pared celular rígida formado por celulosa como polisacárido principal. el interior celular contiene plastidios, que pueden acumular material de reserva como polisacáridos (amiloplastos), pigmentos fotosintéticos (cloroplastos) o pigmentos de otro tipo (cromoplastos).

I. METABOLISMO MICROBIANO

Quinteros (1993), menciona que una vez que se provean los nutrientes necesarios y el microorganismo, las células empiezan a crecer y/o a producir algunos metabolitos de interés. La transformación de nutrientes en células y/o productos se denominan metabolismo y se presentan las principales reacciones que ocurren durante éste.

Mateos (2002), indica que el termino metabolismo se utiliza cuando nos referimos a todos los procesos bioquímicos que tiene lugar dentro de una célula. Los elementos químicos son transformados por la célula en los constituyentes característicos que conforman dicha célula. Estos compuestos químicos se llaman nutrientes y el proceso por el cual una célula transforma estos nutrientes en sus componentes celulares se denominan anabolismo o biosíntesis.

1. Metabolitos primarios

Según García (1998), los metabolitos primarios son moléculas de bajo peso molecular que intervienen, bien como productos finales o intermediarios, en las distintas rutas anabólicas y catabólicas. Los más importantes desde el punto de vista industrial son los aminoácidos, nucleótidos, vitaminas, ácidos orgánicos y alcoholes. La superproducción de metabolitos primarios es evitada por la mayoría de los microorganismos, puesto que son procesos que consumen gran cantidad de energía, lo cual hace que sean menos competitivos en los ambientes naturales. Sin embargo existen en la naturaleza microorganismos que tienen alterados sus sistemas reguladores y éstos son precisamente los que a lo largo del proceso de búsqueda son seleccionados para su utilización en biotecnología.

2. Metabolitos secundarios

Según García (1998), los metabolitos secundarios son moléculas sintetizadas por determinados microorganismos, normalmente en una fase tardía de su ciclo de crecimiento, cuyas características son:

- No son necesarios para el crecimiento del microorganismo que los produce y generalmente se produce como mezclas de productos muy relacionados químicamente entre sí.

III. MATERIALES Y METODOS

A. LUGAR DE EJECUCIÓN.

El presente trabajo de investigación se desarrolló en los laboratorios de: Biotecnología, Microbiología General, Análisis de los Alimentos, Química y Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, en la ciudad de Tingo María, situada a 650 msnm con una humedad relativa promedio de 80 %. y en las instalaciones del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), de Ucayali, ubicada geográficamente a 8° 24' 9,8" latitud sur, 74° 38' 21,1" latitud oeste y 197 msnm.

B. MATERIA PRIMA E INSUMOS.

- Cáscara fresca de camu camu de la variedad *Myrciari dubia* HBK Mc. Vaughn procedente de la zona de Pacacocha - Pucallpa.
- Cepa de *Cándida tropicalis* 750 del American Type Culture Collection (ATCC) de los Estados Unidos.

C. MATERIALES DE LABORATORIO Y PROCESO.

1. Equipos

a. De laboratorio

- Biorreactor del tipo air lift capacidad 1 litro.
- Epectrofotómetro, Génesis 8, EE.UU.

- Potenciometro, rango de pH 0 - 14, marca Schott, modelo cg-840, EE.UU.
- Balanza electrónica marca Sartorius, EE.UU.
- Estufa tipo Ip 201/al, con temperatura máxima de 200 °C.
- Estufa bacteriológica con termostato para temperatura regulable de 0 a 300°C, marca Lab-Line. Instruments Inc. Melrose Park t11.
- Mufla marca Esztewrgon, (temperatura regulable de 0 - 1200 °C).
- Equipo de destilación y recolección semi micro kjeldahl.
- Microscopio óptico compuesto (Reicher One Fifty), Aleman.
- Cámara de siembra de flujo laminar, EE.UU.
- Centrifuga rango 1000 a 5000 RPM.
- Autoclave.
- Baño maría.
- Oxímetro OXI 330, Alemán.
- Bomba airadora, Elite 800, EE.UU.

b. De proceso

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

2. Materiales

a. De laboratorio

- Micropipetas transferpette, rango 100 - 1000 μ l Alemanas.
- Micropipetas transferpette, rango de 1 - 100 μ l Alemanas.
- Microcubetas de poliestireno 1 ml de capacidad.
- Probetas capacidades 20, 50 y 100 ml.
- Termómetros graduados, 0 - 60°C y 0 - 100°C.
- Vasos de precipitación de 20, 50, 100, 500 y 1000 ml.
- Pipetas, placas petri, crisoles, fiolas.
- Matraces de 100, 150, 500, 1000 ml.
- Tubos de ensayo.

3. Reactivos y soluciones

- Sulfato de magnesio ($MgSO_4$), Mallinckrodt Chemical.
- Fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4), Baker Analysed.
- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4), Baker Analysed.
- Fosfato disódico (Na_2HPO_4), Baker Analysed.
- Ácido clorhídrico 1 N.
- Hidróxido de sodio al 40 % V/V.
- Fenol al 5 % V/V.
- Hipoclorito de sodio al 10 %.
- Etanol al 70 %.
- Agar sabouraud, Scharlav.
- Glucosa anhidra, Scharlav.

- Extracto de levadura, Becton Dickinson.
- Extracto de malta, Becton Dickinson.
- Peptona, Difco.
- Agua destilada.

D. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El desarrollo del trabajo de investigación se dividió en 5 etapas:

1. Construcción y calibración de los biorreactores

Se construyeron los biorreactores air lift de acuerdo a los criterios establecidos por Quinteros (1993) y Quintana (1998).

Se calibraron los equipos de acuerdo a lo indicado por Quintana (1998) y según consulta realizada al Mcbg. MSc. César Samuel López López docente de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

2. Caracterización de la cáscara de camu camu

Se realizaron los siguientes análisis, cada uno con tres repeticiones.

- Proteína total. Semi micro Kjeldahl, método N° 930.07 (AOAC, 1997).
- Humedad, método N° 930.04 (AOAC, 1997).
- Grasa (Soxhlet), método N° 930.09 (AOAC, 1997).
- Fibra, método N° 962.0.9E (AOAC, 1997).
- Ceniza, método N° 930.05 (AOAC, 1995).
- Carbohidratos totales. Por diferencia (Hart y Fisher, 1991).

- pH, método 11.032 (AOAC, 1996).

3. Preparación del sustrato

Para obtener el sustrato (cáscara fresca hidrolizada de camu camu) se realizaron las operaciones que se muestran en la Figura 1.

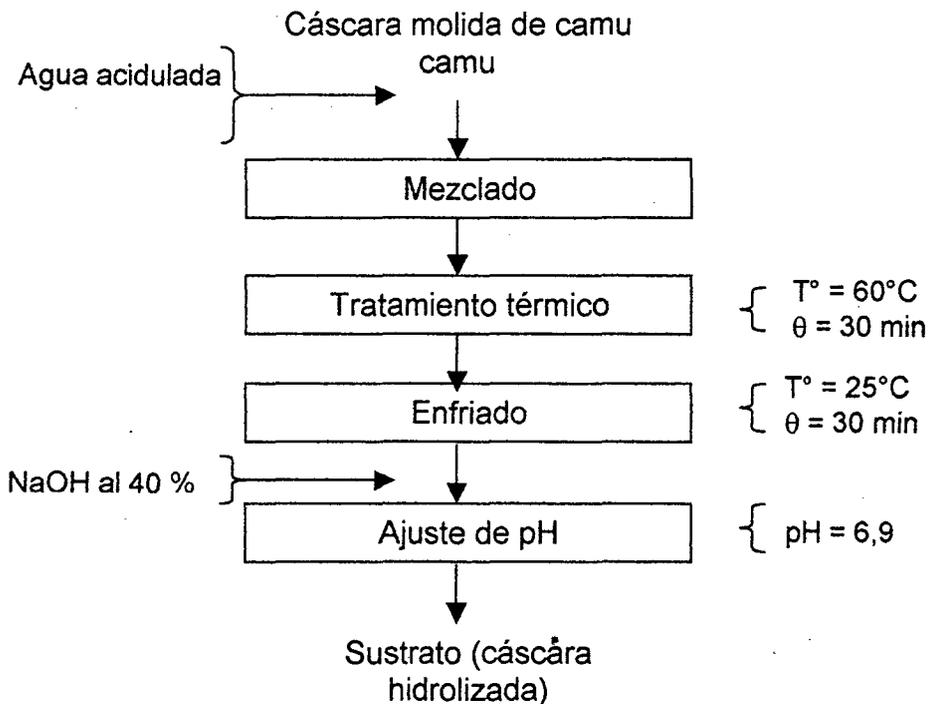


Figura 1. Diagrama de flujo para la obtención del sustrato.

Descripción del diagrama de flujo de la Figura 1:

- **Cáscara molida del camu camu.** Fue obtenida del residuo al realizar el proceso de pulpeado del fruto del camu camu y molida con un equipo manual.

- **Mezclado.** La cáscara molida se mezcló con el agua acidulada con una concentración del 3 % de HCl 1 N; con una proporción de (1/1) según lo indicado por Garassini (1964).
- **Tratamiento térmico.** Esta operación se realizó en baño maría a una temperatura de 60° C por un tiempo de 30 minutos; en esta operación los polisacáridos tales como celulosa y hemicelulosa son desdoblados a azúcares simples y a pentosas como la D-xilosa (Holme, 1987).
- **Enfriado.** Se realizó en baño frío hasta 25°C por 30 min.
- **Ajuste de pH.** Se llevo a cabo agregando solución de NaOH al 40 % a la cáscara hidrolizada hasta obtener un pH de 6,9 (Sene, 2001).
- **Sustrato.** Es el compuesto resultante de todas las operaciones realizadas anteriormente y que a partir de ello la levadura va a producir el metabolito de interés.

4. Obtención del medio de cultivo y proceso de la fermentación sumergida.

El diagrama de flujo de los procesos se muestra en la Figura 2, a continuación se describe las diversas operaciones:

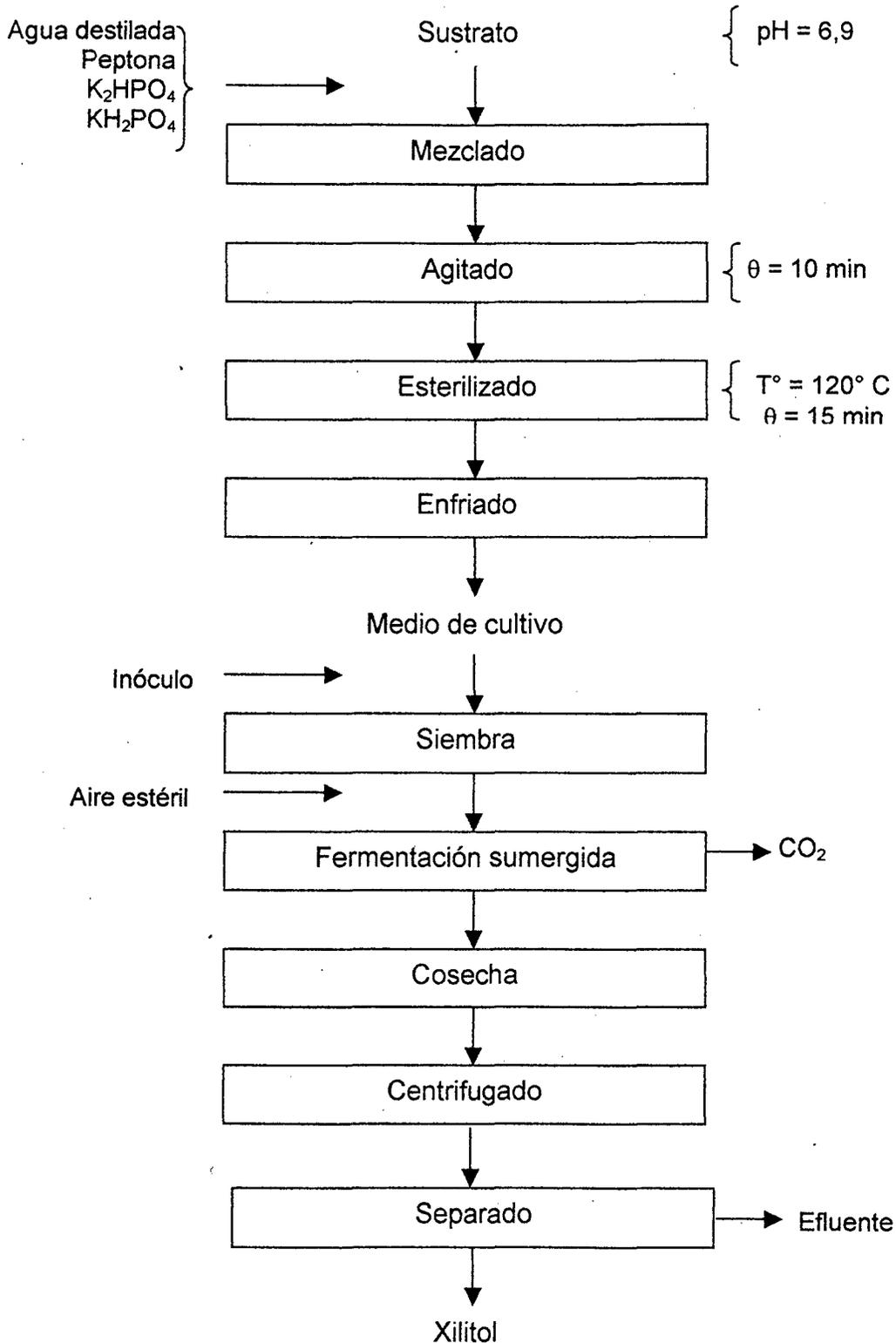


Figura 2. Diagrama de flujo para la producción biotecnológica de xilitol.

- **Mezclado.** El sustrato obtenido se mezcló de acuerdo a las concentraciones establecidas en el diseño experimental, con el medio básico que esta formado por agua destilada, peptona, fosfato dipotásico (K_2HPO_4), fosfato monopotásico (KH_2PO_4), formando el medio de cultivo.
- **Agitado.** La mezcla obtenida se agitó por 10 minutos, obteniendo una mezcla homogénea.
- **Esterilizado.** El medio de cultivo, se esterilizó por calor húmedo, a una temperatura de $121^\circ C$ por 15 minutos, en esta operación los microorganismos existentes en el sustrato son destruidos.
- **Enfriado.** El medio de cultivo esterilizado fue enfriado a medio ambiente hasta $25 \pm 1^\circ C$.
- **Medio de cultivo.** Es el resultado que se obtuvo al finalizar toda las operaciones realizadas anteriormente.
- **Siembra.** Se realizó dicha operación teniendo el inóculo (*Cándida tropicalis*), preparado para cada concentración de medio de cultivo; se vertieron las concentraciones de inóculo y sustrato en los biorreactores de acuerdo a nuestro diseño experimental. El inóculo se preparó de acuerdo lo indicado por la ATCC.
- **Fermentación sumergida.** Esta operación se realizó a temperatura de $27 \pm 1^\circ C$ por un tiempo de 3 días, con un pH inicial de 6,9 según Sene (2001), dicha operación es la de mayor importancia por que es donde se produce el metabolito de interés por acción de las levaduras. En esta operación se determinó el crecimiento microbiano

cada 24 horas, en forma indirecta (recuento en placas), (ICMSF, 1982), y la variación de oxígeno disuelto en el cultivo sumergido empleando un equipo digital (Oximeter OXI 330), ambos análisis se realizaron durante los tres días que se realizó el proceso.

- **Cosecha.** Se realizó tomando una muestra de 50 ml del producto fermentado en tubos de ensayo previamente esterilizados, de los nueve biorreactores, cada 24 horas durante las 72 horas que duró el proceso de fermentación.
- **Centrifugado.** Se separó el sobrenadante y el afluente por diferencia de densidades.
- **Separado.** Se eliminó el efluente y se obtuvo el sobrenadante donde se encuentra el xilitol.

5. Determinación espectrofotométrica de xilitol

Las concentraciones de xilitol de cada tratamiento se determinaron por espectrofotometría, para ello se levantó una curva patrón (Skoog, 1993).

E. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental se presenta en la Figura 3, el cual nos permite evaluar la acción del inóculo y del sustrato. En este diseño se detallan las variables en estudio, teniendo los parámetros de concentración del inóculo (I) y concentración del sustrato (S).

Donde:

$I_1 = 10 \% V/V$ (inóculo / medio de cultivo) $S_1 = 100 \text{ ml/l}$

$I_2 = 15 \% V/V$ (inóculo / medio de cultivo) $S_2 = 150 \text{ ml/l}$

$I_3 = 20 \% V/V$ (inóculo / medio de cultivo) $S_3 = 200 \text{ ml/l}$

Obteniéndose de la combinación de estos los siguientes tratamientos:

$T_1 = 10 \% V/V$ de inóculo + 100 ml/l (100 ml de sustrato en un litro de agua destilada).

$T_2 = 10 \% V/V$ de inóculo + 150 ml/l (150 ml de sustrato en un litro de agua destilada).

$T_3 = 10 \% V/V$ de inóculo + 200 ml/l (200 ml de sustrato en un litro de agua destilada).

$T_4 = 15 \% V/V$ de inóculo + 100 ml/l (100 ml de sustrato en un litro de agua destilada).

$T_5 = 15 \% V/V$ de inóculo + 150 ml/l (150 ml de sustrato en un litro de agua destilada).

$T_6 = 15 \% V/V$ de inóculo + 200 ml/l (200 ml de sustrato en un litro de agua destilada).

$T_7 = 20 \% V/V$ de inóculo + 100 ml/l (100 ml de sustrato en un litro de agua destilada).

$T_8 = 20 \% V/V$ de inóculo + 150 ml/l (150 ml de sustrato en un litro de agua destilada).

$T_9 = 20 \% V/V$ de inóculo + 200 ml/l (200 ml de sustrato en un litro de agua destilada).

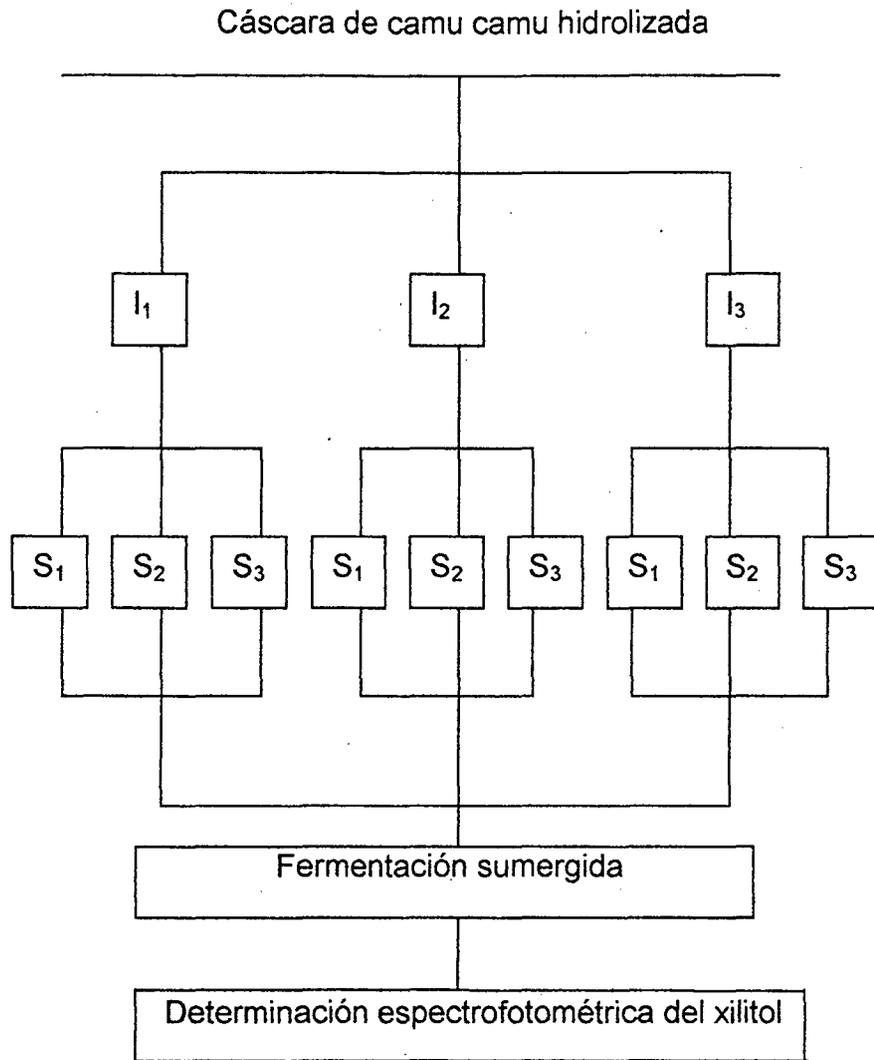


Figura 3. Diseño experimental para la determinación de xilitol.

F. ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico para el diseño experimental de la Figura 3, se adecua a un diseño completamente al azar (DCA), con arreglo factorial 3 x 3 (tres concentraciones de inóculo y tres concentraciones de sustrato), con dos repeticiones con un total de 18 observaciones, la significación estadística se evaluó con la prueba de Tukey al 5 % ($\alpha = 0,05$) de probabilidad seleccionándose el mejor tratamiento (Steel, 1995).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. CONSTRUCCIÓN Y CALIBRACIÓN DE LOS BIORREACTORES

En la Figura 4, se muestra el biorreactor air lift construido, montado y calibrado, las imágenes de los biorreactores construidos y en pleno proceso se encuentran en le anexo I.

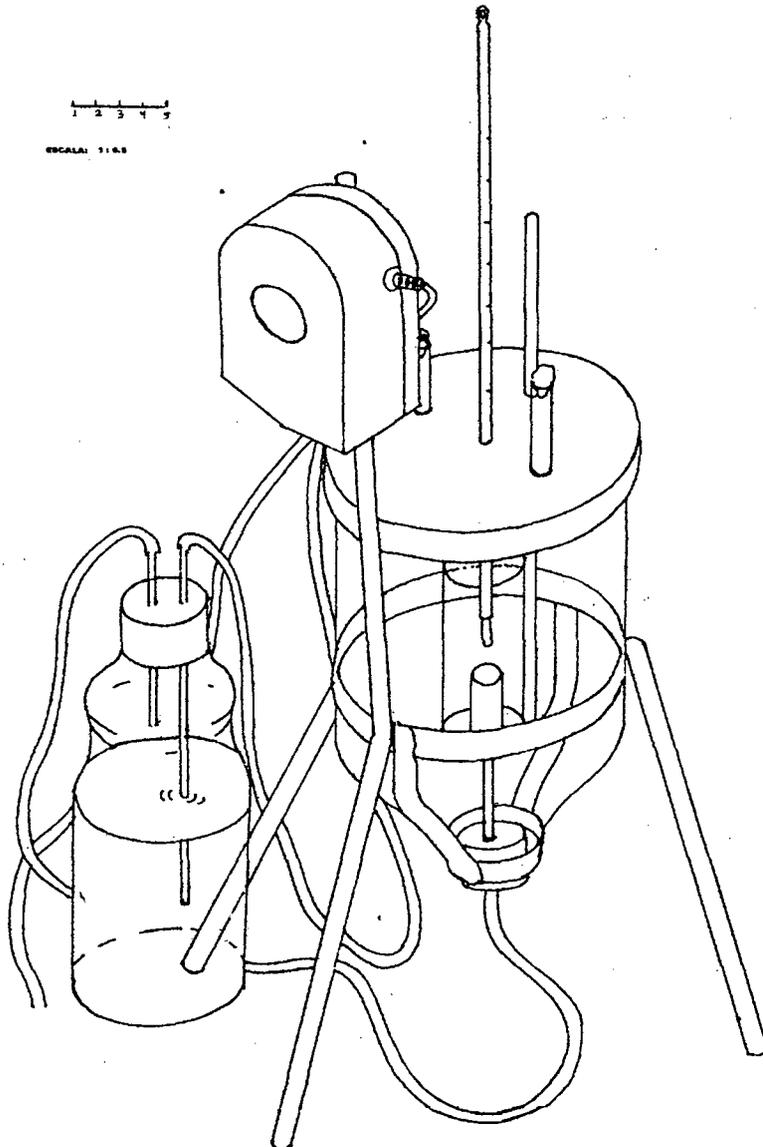


Figura 4. Biorreactor air lift construido y calibrado.

En la Figura 5, se muestra la vista frontal del biorreactor air lift construido y calibrado; las medidas de los accesorios de dicho equipo se indica en el anexo I.

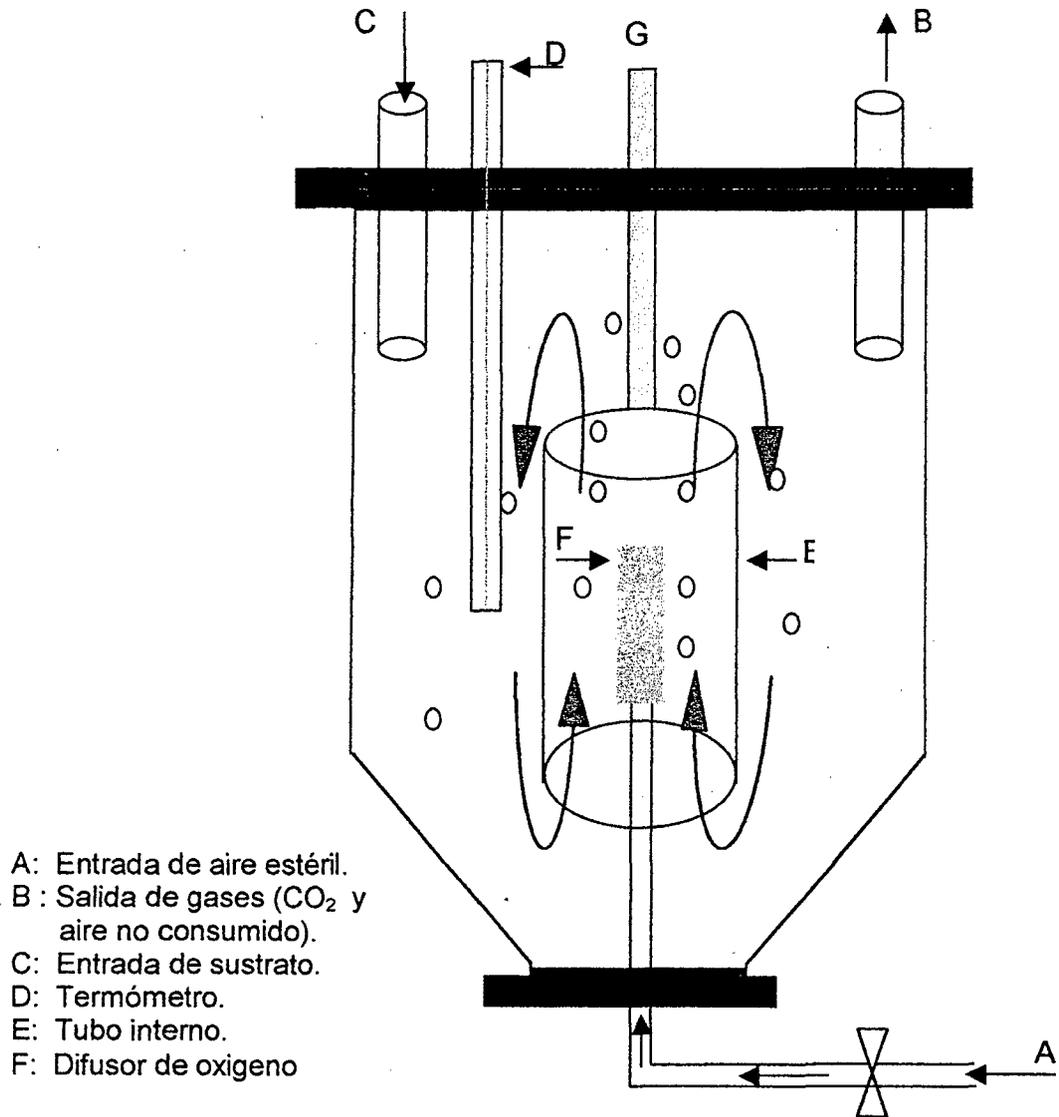


Figura 5. Vista frontal del biorreactor air lift construido.

El calibrado se realizó tomando dos biorreactores como muestra, para ello se utilizo como fuente de aireación bombas de pecera con una capacidad de 0,2 a 0,4 uvm de aire (volumen de aire por volumen de medio por minuto), según (Quintana,1998).

En ambos biorreactores se obtuvo un crecimiento microbiano (*Bacillus sp.*) aceptable, teniendo una tasa de crecimiento celular aproximado de $1,587 \times 10^{10}$ cell/h, en la fase logarítmica, la curva del crecimiento bacteriano se muestra en el anexo I

B. CARACTERIZACION DE LA MATERIA PRIMA

En el Cuadro 2, se reporta la composición química de la cáscara de camu camu en base seca.

Cuadro 2. Composición química de la cáscara de camu camu en base seca .

Componentes	Unidad (%)
Humedad	6,7
Ceniza	1,7
Grasa	8,3
Proteína	4,9
Fibra	7,8
Carbohidratos	70,6
Sólidos totales	93,4

Se observa en el Cuadro 2, que de todos los componentes de la cáscara de camu camu, los carbohidratos se encuentran en mayor cantidad con 70,6 % , y 7,8 % de fibra ; siendo estos compuestos orgánicos de vital importancia en el sustrato porque a partir de ellos la levadura va a producir el metabolito de interés (xilitol) y son la fuente de carbono, que es uno de los requerimientos mas importantes para el crecimiento microbiano. Los requerimientos de nitrógeno, azufre y fósforo son proveídos por las proteínas y grasas que se encuentran en el sustrato, todos ellos intervienen en la producción del metabolito de interés. Esto está en concordancia con Gerard (1993), quien indica que el carbono, es uno de los requerimientos mas importantes para el crecimiento microbiano por que el carbono es la estructura básica de la materia viva y es necesario para todo los compuestos orgánicos que constituyen la célula viva; nitrógeno, azufre y fósforo son necesarios para la síntesis de su material celular.

C. AJUSTE DEL pH DE LA CÁSCARA HIDROLIZADA DE CAMU CAMU

El en Cuadro 3, se presenta los valores del pH de la cáscara molida, cáscara hidrolizada y del sustrato.

Cuadro 3. Valores del ajuste del pH de la materia prima.

Materia prima	pH
Cáscara molida	2,511
Cáscara hidrolizada	3,310
Sustrato	6,900

El valor inicial de 2,511 de pH de la cáscara fresca molida de camu camu, indica que la materia prima es bastante ácida; la cáscara fresca hidrolizada tiene un valor de pH de 3,310, dicho valor fue ajustado hasta un pH de 6,9 siendo el pH óptimo para la producción de xilitol por la acción de la levadura *Cándida tropicalis*, en concordancia con Sene (2001), quien sugiere un pH dentro del rango de 6,80 a 7,00 para el sustrato con la finalidad de obtener la producción óptima de xilitol.

D. DESARROLLO DE BIOMASA DE LA LEVADURA *Cándida tropicalis*

En el Cuadro 4, se muestran los resultados del desarrollo de biomasa.

Cuadro 4. Desarrollo de biomasa de la levadura *Cándida tropicalis* durante el proceso de fermentación.

Tratamientos	Biomasa (células/ ml)			
	0:00 h (inicio)	24 horas	48 horas	72 horas
T ₁	9,5 E+05	9,90 E+05	1,15 E+06	1,20 E+06
T ₂	9,5 E+05	4,20 E+06	4,60 E+06	4,70 E+06
T ₃	9,5 E+05	2,10 E+06	2,85 E+06	2,90 E+06
T ₄	9,5 E+05	4,10 E+06	4,15 E+06	4,20 E+06
T ₅	9,5 E+05	3,00 E+06	3,40 E+06	3,60 E+06
T ₆	9,5 E+05	1,90 E+06	2,15 E+06	2,20 E+06
T ₇	9,5 E+05	9,55 E+05	9,70 E+05	1,00 E+06
T ₈	9,5 E+05	1,10 E+06	1,30 E+06	1,50 E+06
T ₉	9,5 E+05	2,90 E+06	3,10 E+06	3,20 E+06

En el Cuadro 4, observamos que la biomasa se incrementó en forma gradual conforme transcurrió el tiempo de proceso, este desarrollo indicó que los microorganismos se encontraban en fase de crecimiento e indirectamente la producción del metabolito de interés, por estar aun en la fase logarítmica bajo parámetros controlados coincidentes con lo manifestado por Bullock (1991), quien indica que un microorganismo crece gradualmente dependiendo de varios aspectos, tales como el medio de

cultivo, control de los parámetros fisiológicos como el pH, oxigenación y temperatura entre los principales.

En la Figura 6, se muestra las curvas descritas por el incremento en la biomasa en los nueve tratamientos, teniendo el mayor aumento de biomasa el tratamiento dos (T_2); los tratamientos T_2 , T_5 , T_3 y T_6 muestran la fase de crecimiento exponencial hasta las 48 horas de iniciada la fermentación, suponiéndose que pasan a la fase estacionaria; los tratamientos T_4 y T_9 supuestamente que llegan a la fase estacionaria a las 24 horas del proceso, el tratamiento T_7 presenta un bajo desarrollo de biomasa, posiblemente se deba a que el sustrato ha sido rápidamente utilizado por las levaduras del inóculo que se encuentran en condiciones de saturación por lo que probablemente que los microorganismos se encuentran en la fase estacionaria o en fase de latencia, algo similar sucede con los tratamientos T_1 y T_8 , dichos tratamientos presentan este comportamiento de crecimiento microbiano por estar conformados por una alta concentración de inóculo y baja concentración de sustrato de acuerdo a las combinaciones que se muestran en el diseño experimental. Crueger (1993), menciona que durante el crecimiento los microorganismos pasan por diversas fases tales como: fase de latencia es donde no existe inicialmente aumento significativo en el número de células.

La fase logarítmica o fase de crecimiento exponencial en esta etapa el número de células se incrementan significativamente y están en su máximo desempeño.

La fase estacionaria, en dicha fase el crecimiento de los microorganismos se detiene completamente.

La fase de la muerte, en esta fase la reserva de energía se agota, lo que indica que las células mueren a una velocidad exponencial.

En el proceso experimental se supone que la levadura presentó las tres primeras fases mencionadas por Crueger (1993).

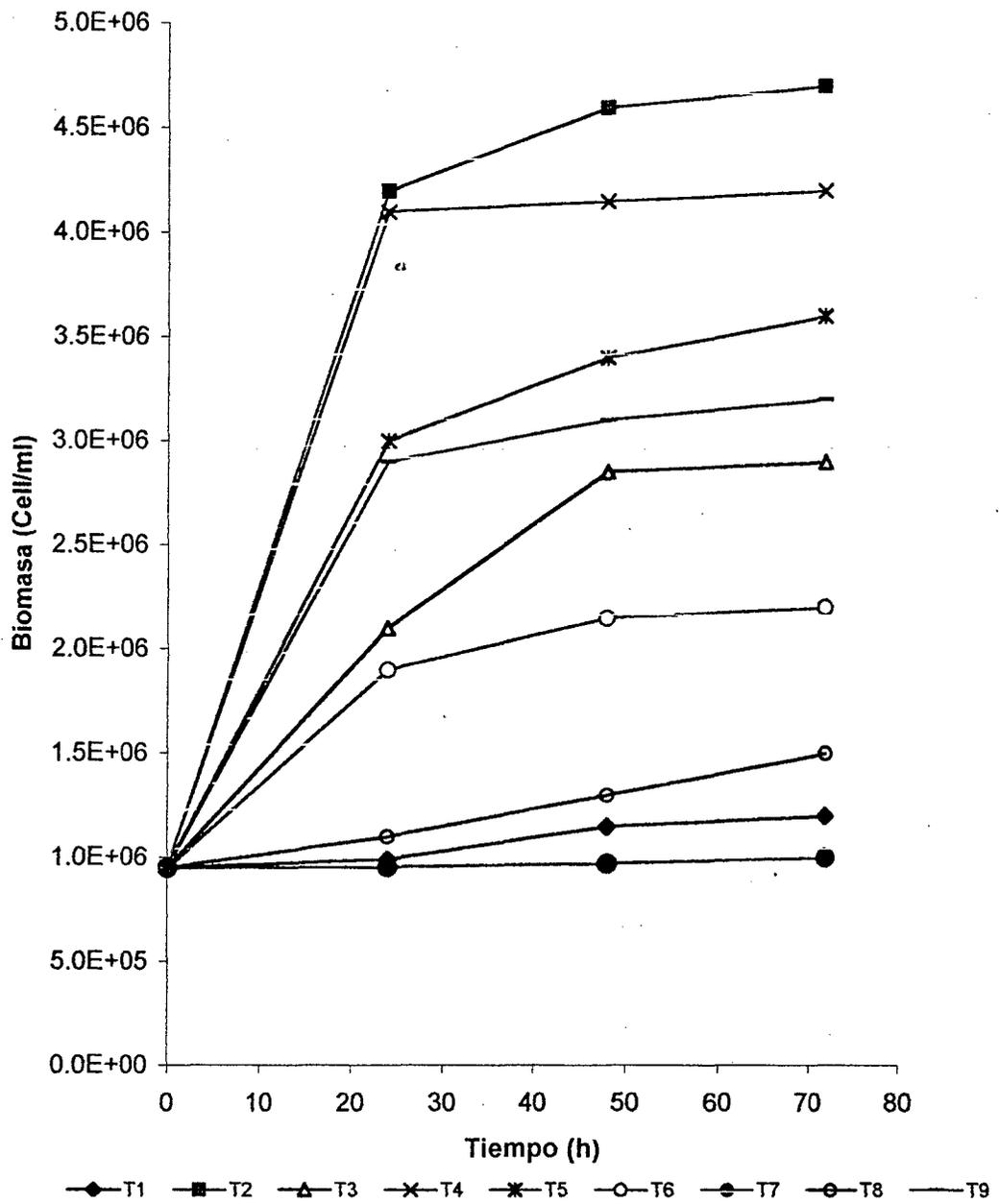


Figura 6. Desarrollo de la biomasa durante el proceso de fermentación sumergida.

E. OXÍGENO DISUELTO EN EL FERMENTADOR

En el Cuadro 5 y Figura 7, se observan los resultados de la variación del oxígeno disuelto desde el inicio hasta el final del proceso.

Cuadro 5. Variación del oxígeno disuelto durante el proceso de fermentación sumergida en la producción de xilitol.

Tratamientos	Oxigeno disuelto (mg/l)		
	24 horas	48 horas	72 horas
T ₁	5,10	3,40	3,15
T ₂	3,80	2,70	2,40
T ₃	4,80	3,10	2,90
T ₄	4,00	2,90	2,60
T ₅	4,70	3,00	2,80
T ₆	5,00	3,30	3,00
T ₇	5,20	4,70	3,30
T ₈	5,10	4,60	3,10
T ₉	4,75	3,20	2,90

Los resultados del Cuadro 5, fueron tomadas a partir de las 24 horas de iniciada la fermentación sumergida; los valores del oxígeno disuelto al transcurrir el tiempo de fermentación, tienden a disminuir a causa del incremento de la biomasa en cada uno de los tratamientos. Dicho proceso se realizó aeróbicamente donde el suministro de oxígeno es vital para el desarrollo celular y para mantener en constante movimiento el

sustrato y a las células que se encuentran dentro del biorreactor air lift, Bullock (1991), respecto a la multiplicación de un microorganismo indica es necesario que se desarrolle en un medio donde haya oxígeno pues éste sirve para producir energía e incrementar la oxidación, también indica que el medio de cultivo y los microorganismos sumergidos que se encuentran dentro de los biorreactores air lift deben estar en continuo movimiento para que haya una dispersión uniforme de oxígeno y del sustrato.

Los tratamientos T_2 y T_4 presentaron una disminución del 1,10 de oxígeno disuelto durante el periodo de 24 a 48 horas y de 48 a 72 horas 0,30 de oxígeno disuelto; ello indica que durante el primer periodo de tiempo el crecimiento microbiano es mucho mayor que el periodo final; dichos tratamientos son los que obtuvieron el mayor incremento microbiano durante el proceso ejecutado.

Los tratamientos T_7 y T_8 presentaron una disminución del 0,50 de oxígeno disuelto durante el periodo de 24 a 48 horas y de 48 a 72 horas 1,40 y 1,50 respectivamente indicándonos que en el primer periodo de tiempo el incremento de biomasa es menor en comparación con el segundo periodo de tiempo; dichos tratamientos obtuvieron el menor incremento de biomasa durante el proceso desarrollado.

En la Figura 7, podemos apreciar el comportamiento de la variación del oxígeno disuelto en el proceso.

El tratamiento dos (T_2) presentó a las 72 horas la menor concentración de oxígeno disuelto, debido que en dicho tratamiento el contenido celular es

mayor en comparación al resto de los tratamientos; los tratamientos T₁, T₆, T₉, T₃, T₅ y T₄ muestran una concentración de oxígeno disuelto en orden decreciente durante las 48 y 72 horas y esto está relacionado indirectamente con el incremento de la población microbiana, durante los tiempos indicados. Los tratamientos T₇ y T₈ son los que presentan mayor concentración de oxígeno disuelto durante las 24, 48 y 72 horas esto debido a que dichos tratamientos presentan bajas concentraciones de biomasa.

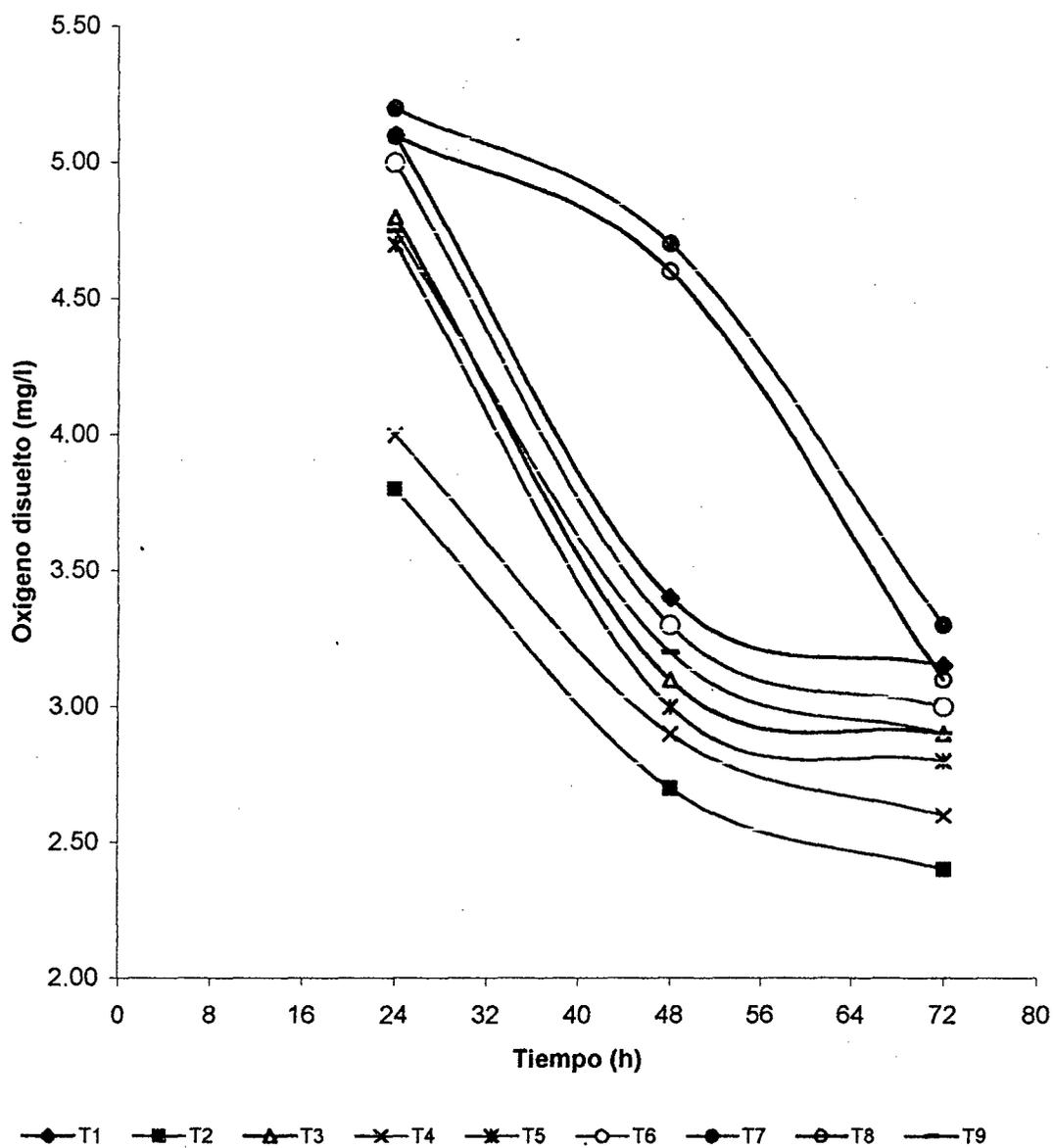


Figura 7. Variación del oxígeno disuelto durante el proceso de fermentación sumergida en la producción de xilitol por *Cándida tropicalis*.

F. CURVA PATRÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE XILITOL

En el Cuadro 6, se muestran los valores de absorbancias y de concentraciones de xilitol para construir la curva patrón, para ello se determinó la absorbancia máxima, como se muestra en el anexo III.

Cuadro 6. Determinación de la curva patrón de xilitol

Absorbancia (300 nm de λ)	Concentración (mol/l)
0,125	0,6572
0,120	0,5974
0,114	0,5478
0,107	0,5054
0,104	0,4820
0,099	0,4381

Los datos que se procesaron para realizar la curva patrón se obtuvieron luego de llevar a cabo la verificación de la máxima absorbancia con dilución de 1/5, determinándose la longitud de onda de 300 nm. Posteriormente se elaboró la curva patrón utilizando diluciones 1/10, los resultados obtenidos para su elaboración, se muestra en el anexo III, de acuerdo a lo indicado por Skoog (1993), respecto a que las medidas espectrofotométricas de la absorbancia se hacen normalmente a una longitud de onda correspondiente a un pico de mayor absorbancia, ya que

el cambio de absorbancia por unidad de concentración es mayor en este punto y se alcanza por lo tanto la sensibilidad máxima.

En la Figura 8, se muestra gráficamente la curva patrón construida del xilitol, la cual es típica y ajustada por regresión lineal tal como lo indican Newbold (1998) y Calzada (1976).

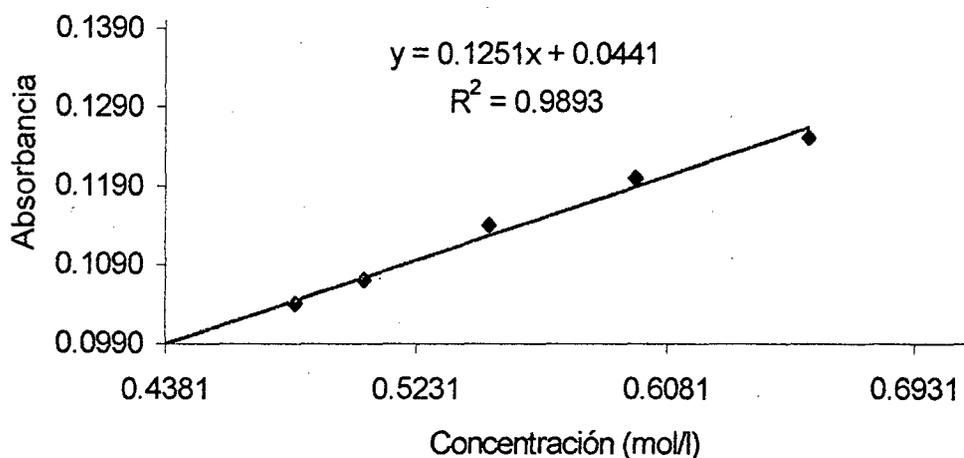


Figura 8. Curva patrón de xilitol

G. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE XILITOL

En el Cuadro 7, se puede apreciar en forma general que la cantidad de xilitol formada aumenta conforme transcurre el tiempo de fermentación, este comportamiento es coincidente con la producción de diversos metabolitos (Crueger, 1993). En la Figura 9, se expresa gráficamente el comportamiento en la producción de xilitol.

Para determinar las concentraciones de xilitol obtenido del proceso se aplicó la ecuación lineal de la curva patrón.

Cuadro 7. Producción de xilitol (mol/l) por fermentación sumergida durante las 24, 48 y 72 horas proceso.

Tratamiento	Xilitol (mol/l)					
	24 horas	SEM	48 horas	SEM	72 horas	SEM
T ₁	0,5182	0,103	0,6114	0,0057	0,6194	0,0171
T ₂	0,5304	0,017	0,6437	0,0057	0,6032	0,0400
T ₃	0,6437	0,005	0,6194	0,0056	0,6194	0,0171
T ₄	0,5789	0,017	0,6194	0,0172	0,6073	0,0114
T ₅	0,6316	0,022	0,6437	0,0057	0,6194	0,0171
T ₆	0,6315	0,034	0,6356	0,0056	0,6154	0
T ₇	0,5200	0,011	0,6033	0,0057	0,5992	0,0114
T ₈	0,4251	0,005	0,5911	0,0115	0,6235	0,0229
T ₉	0,4574	0,005	0,6275	0,0057	0,6316	0

SEM: Error estándar promedio

A las 24 horas de fermentación sumergida con el tratamiento tres (T₃), se obtuvo la mayor producción de xilitol; esto indicó que el contenido de xilosa en el sustrato fue consumido con mayor velocidad por las levaduras en comparación a los demás tratamientos.

A las 48 horas de proceso los tratamiento T₂ y T₅, presentaron la mayor producción de xilitol.

A las 72 horas de proceso los resultados empezaron a ser constantes en algunos tratamientos tales como T₁ y T₃, a disminuir en otros T₂, T₄, T₅, T₆, y T₇ y continuó aumentando para el caso de los tratamientos T₈ y T₉; los resultados obtenidos guardan relación con la teoría que menciona que a mayor concentración de inóculo la velocidad de consumo de sustrato es menor Casablanco (1998) y Quinteros (1993).

En los tratamientos T₂, T₄, T₅, T₆, y T₇ a las 72 horas de proceso disminuyó el contenido de xilitol esto ocurre porque el xilitol es un metabolito primario estos metabolitos son moléculas de bajo peso molecular y son productos finales o intermedios que pueden ser consumidos por los microorganismos según lo indicado por Casablanco (1998).

De acuerdo a los resultados se obtuvo la máxima producción de xilitol a las 48 horas de iniciado el proceso en los tratamientos T₂ y T₅. Sene (2001), obtuvo la máxima producción de xilitol a las 48 horas de fermentación sumergida.

En la Figura 9, se muestra gráficamente el comportamiento de la producción de xilitol en cada uno de los tratamientos evaluados tal y como se han anotado en el Cuadro 7, los gráficos obtenidos guardan similitud con los obtenidos por Sene (2001) y Vandeska (1995).

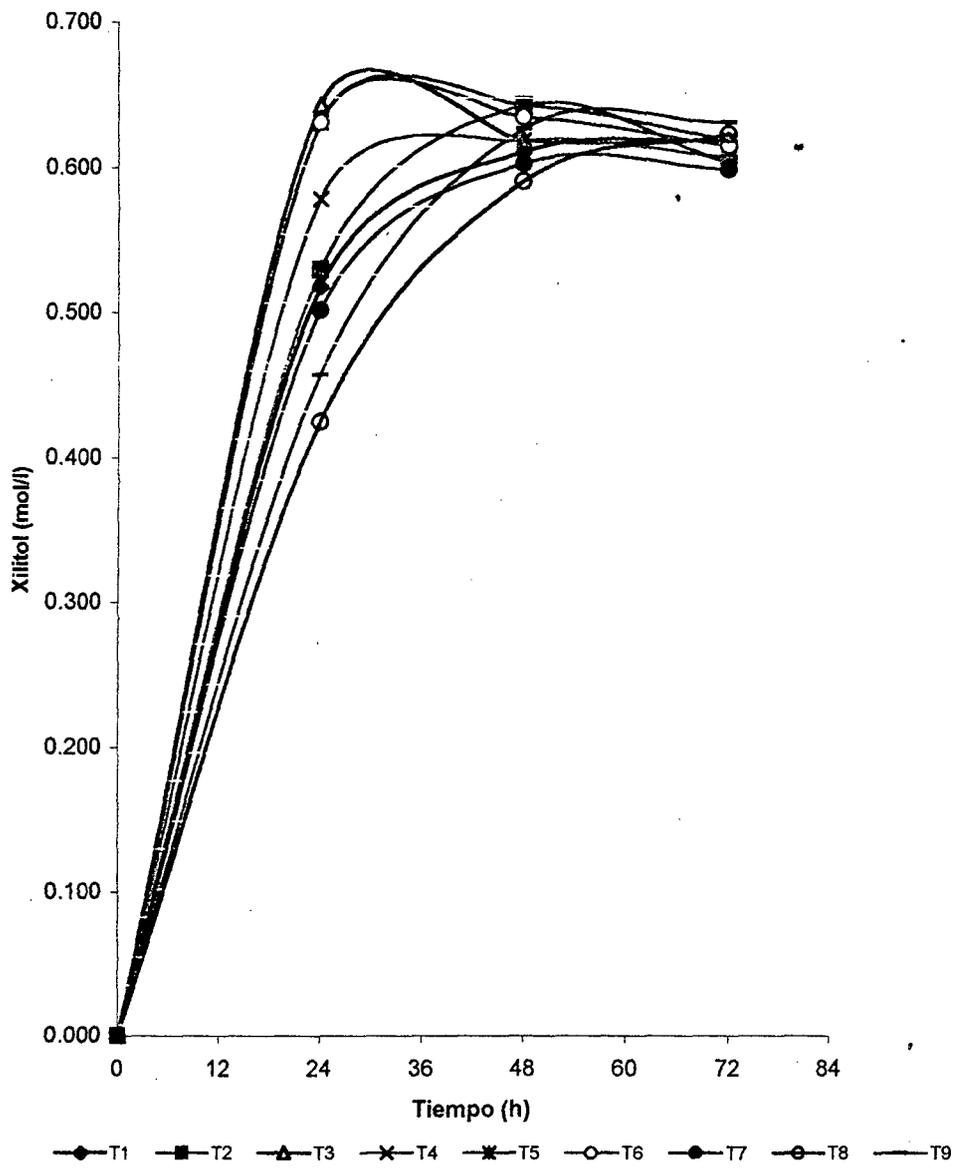


Figura 9. Producción de xilitol en los tratamientos estudiados durante el proceso de fermentación sumergida.

En el Cuadro 8 se muestra el ANVA aplicado a los resultados de la producción de xilitol a las 24 horas de fermentación.

Cuadro 8. Análisis de variancia de la producción de xilitol (mol/l) a las 24 horas de fermentación.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Pr>F
[I] Inoculo	2	0,072556	0,036278	24,83	0,0002
[S] Sustrato	2	0,008716	0,004358	2,98	0,1014
[I] x [S]	4	0,020119	0,005029	3,44	0,0571
Error	9	0,013149	0,001461		
Total	17	0,114540			

R ²	C.V.	Raíz C.M.E.	Media
0,885201	6,993549	0,038223	0,546550

El Cuadro 8, indica que de los factores estudiados, el factor inóculo es el que presentó alta significación estadística, afectando la producción de xilitol; quedando sin efecto significativo el factor sustrato y la interacción de los factores.

En el Cuadro 9, se muestra el ANVA aplicado a los resultados de la producción de xilitol de las 48 horas de proceso.

Cuadro 9. Análisis de variancia de la producción de xilitol (mol/l) a las 48 horas de proceso de fermentación.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Pr>F
[I] Inoculo	2	0,002060	0,001030	14,06	0,0017
[S] Sustrato	2	0,000967	0,000483	6,60	0,0172
[I] x [S]	4	0,002162	0,000540	7,38	0,0064
Error	9	0,000659	0,000073		
Total	17	0,005849			

R^2	C.V.	Raíz C.M.E.	Media
0.887282	1.376830	0.008559	0.621672

Del análisis de variancia del cuadro anterior se puede apreciar que la interacción de los factores presentó una alta significación estadística, deduciéndose entonces que existe una combinación óptima entre los niveles de cada factor estudiado.

Para determinar qué combinación de niveles es la más adecuada, es necesario hacer la prueba de Tukey, cuyos resultados se muestra en el Cuadro 10 y en el Cuadro 11, respectivamente.

Cuadro 10. Prueba de Tukey al 5 % para la producción de xilitol vs concentración de inóculo a 48 horas de fermentación.

Agrupación de Tukey	Promedio	Tratamiento
A	0,632917	15 %
A	0,624817	10%
B	0,607283	20 %

Cuadro 11. Prueba de Tukey al 5 % para la producción de xilitol vs concentración de sustrato a 48 horas de fermentación.

Agrupación de Tukey	Promedio	Tratamiento
A	0,627517	200 ml/l
A	0,626167	150 ml/l
B	0,611333	100 ml/l

Los cuadros 10 y 11 muestran los datos del ajuste estadístico con la prueba de Tukey verificándose que no existe diferencia estadística en la producción de xilitol empleándose las concentraciones de 15, 10 % V/V de inóculo y 200, 150 ml/l de sustrato. De acuerdo a los criterios económicos lo más apropiado para la producción de xilitol sería empleando la combinación del 10 % del V/V de inóculo y 150 ml/l de sustrato.

En el Cuadro 12, se indica las concentraciones óptimas de inóculo y sustrato con las cuales se obtiene la máxima producción de xilitol.

Cuadro 12. Valores de los niveles óptimos de la concentración de inóculo y de sustrato.

Factores	Factores óptimos	Máxima producción
Inoculo	14,0254	0,640455
Sustrato	177,072	

Los factores óptimos y máxima producción de xilitol que se muestran en el Cuadro 12, se obtiene a partir de la ecuación (obteniéndola empleando el programa STATGRAPHICS Plus 4.0).

$$\text{Xilitol} = 0,463524 + 0,0160492 \times \text{inóculo} + 0,000727083 \times \text{sustrato} - 0,000674667 \times \text{inóculo}^2 + 0,00001625 \times \text{inóculo} \times \text{sustrato} - 0,00000269667 \times \text{sustrato}^2.$$

Dicha ecuación es el resultado del estudio de la superficie de respuesta, tal como lo indica Calzada (1976), 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.

La Figura 10, 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 xilitol.

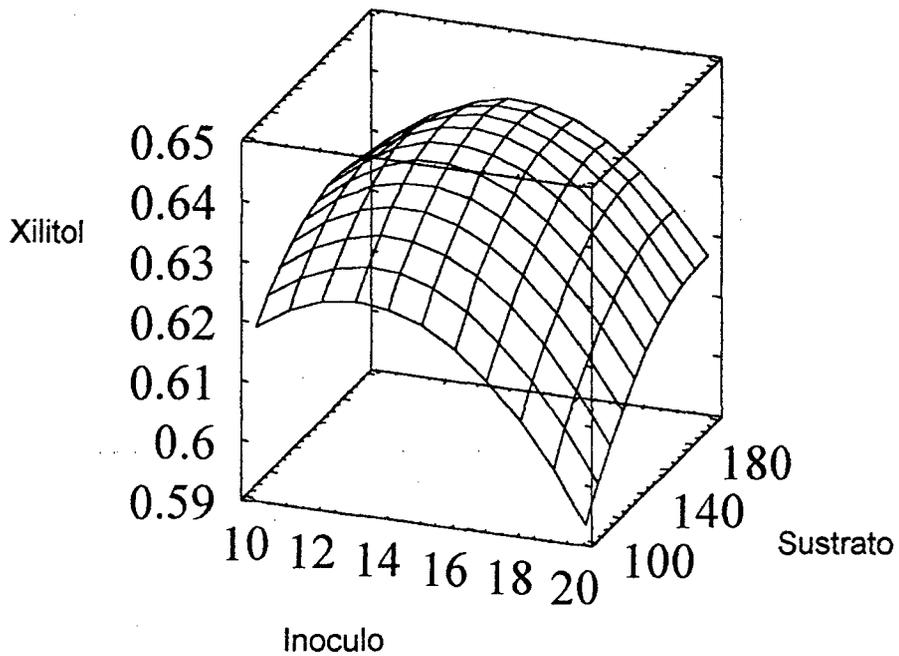


Figura 10. Superficie de respuesta para la producción máxima de xilitol en función de la concentración del inóculo y sustrato.

La Figura 11, es la proyección de la vista superior de la Figura 8, donde se puede observar con mayor detalle los contornos de la variable respuesta (xilitol) y las combinaciones de las concentraciones de inóculo y sustrato.

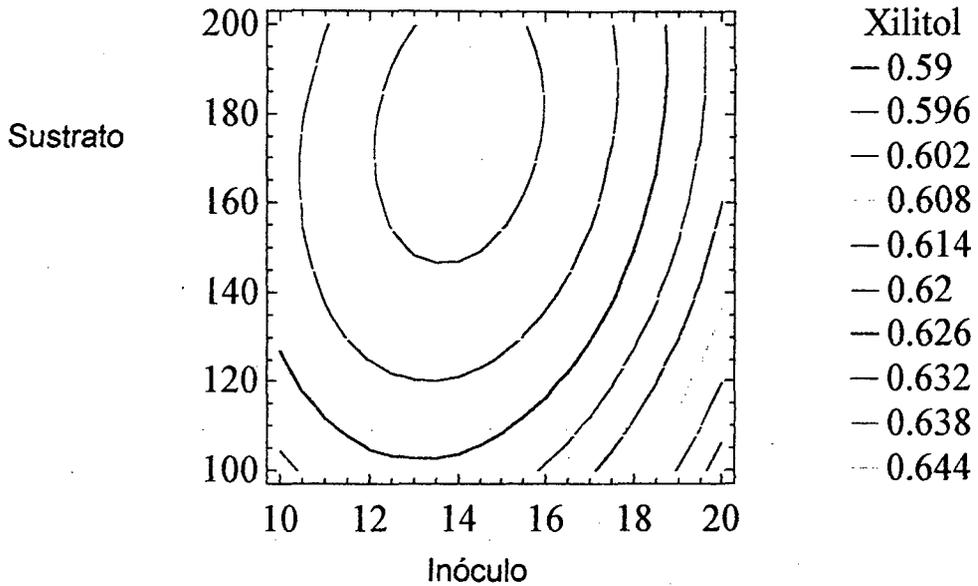


Figura 11. Gráfica de contorno de la estimación de la superficie de respuesta de la producción de xilitol en función de las concentraciones del inóculo y sustrato.

En el Cuadro 13, se muestra la predicción de la producción de xilitol al realizar las combinaciones que se muestran en dicho cuadro, los resultados de la variable xilitol se obtienen aplicando la ecuación obtenida en el análisis de superficie de respuesta.

Cuadro 13. Predicción de la producción de xilitol.

Inóculo %	Sustrato (ml/l)	Predicción de xilitol (mol/l)
15	150,00	0,6374
16	142,30	0,6334
17	136,14	0,6279
18	130,76	0,6210
19	125,87	0,6126
20	121,32	0,6026

Los valores que se muestran en Cuadro 13, son valores estimados de la producción de xilitol que se obtendrían al realizarse las combinaciones de las concentraciones de inóculo y sustrato que se muestran; se observa que la producción de xilitol tiende a disminuir cuando la concentración de inóculo aumenta y el sustrato disminuye.

En el Cuadro 14, se presentan el ANVA de la producción de xilitol a las 72 horas de iniciado el proceso.

Cuadro 14. Análisis de variancia de la producción de xilitol (mol/l) a las 72 horas de proceso de fermentación.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Pr>F
[I] Inoculo	2	0,000065	0,000032	0,09	0,9173
[S] Sustrato	2	0,000545	0,000272	0,75	0,5003
[I] x [S]	4	0,001093	0,000273	0,75	0,58169
Error	9	0,003278	0,000364		
Total	17	0,004983			

R ²	C.V.	Raíz C.M.E.	Media
0,342165	3,101235	0,019085	0,615394

En el Cuadro 14, se muestra que ninguno de los factores presentan significación estadística, de igual forma no existe interacción entre los factores, indicándonos que el proceso de fermentación sumergida para la producir xilitol no es necesario realizarlo a las 72 horas porque los resultados óptimos se obtienen a las 48 horas de fermentación sumergida a pH 6,9 y a una temperatura promedio de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ dentro del biorreactor.

V. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. Los niveles óptimos de concentración de inóculo y de sustrato para la producción máxima de xilitol son 10 % V/V de inóculo y 150 ml/l de sustrato, no existiendo significancia estadística con los valores de 15 % V/V, 20 % V/V de inóculo y 100 ml/l, 200 ml/l de sustrato.
2. La producción máxima de xilitol (0,6737 mol/l), se obtuvo a las 48 horas de fermentación sumergida, a una temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, pH de 6,9.

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios para el aislamiento e identificación de microorganismos para la producción de xilitol.
2. Realizar investigaciones para identificar materias primas de desechos agroindustriales para la producción de metabolitos de interés industrial.
3. Evaluar otro tipo de biorreactor para la producción de xilitol.
4. Realizar los análisis de cromatografía líquida de alta eficiencia o cromatografía de gases para determinar con mayor precisión la producción de xilitol.
5. Realizar estudios de escalamiento para la producción de xilitol a nivel de planta piloto e industrial.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AOAC. 1995. Official methods of analysis. Agricultural chemicals contaminants and drugs. Edición. 15va. Editorial Gaithersburg Md. USA.
- BADUI, S. 1994. Química de los alimentos. Tercera Edición. Editorial Acribia Zaragoza España. Pp 45 – 61.
- BULOCK, J. 1991. Biotecnología básica. Editorial Acribia. Zaragoza España. Pp 3 – 10.
- CALZADA, J. 1976. Métodos estadísticos. Tercera edición. Editorial de Jurídica S.A. Lima Perú. Pp 208 – 212.
- CASABLANCAS, G. 1998. ingeniería bioquímica. Editorial Síntesis. Madrid España. Pp 16 – 24.
- COÚLTATE, P. 1998. Manual de química y bioquímica de los alimentos. Segunda edición. Editorial Acribia. Zaragoza España. Pp 5 – 14.
- CRUEGER, W. 1993. Biotecnología manual de microbiología industrial. Editorial Acribia. Zaragoza España. Pp 72 – 77.
- DOMENECH, X. 1995. Química del suelo el impacto de los contaminantes. Madrid España. Pp 16 – 24.
- DOMINIC, W. 1995. Química de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza España. Pp 40 – 50.
- GARASSINI, L. 1964. Microbiología tecnológica. Editorial de la biblioteca. Caracas Venezuela. Pp 115 – 119.
- GARCIA, G. 1998. Biotecnología alimentaría. Editorial Limusa. Zaragoza España. Pp 20 – 25.

- GERARD, T. 1993. Introducción a la microbiología. Editorial Acribia. Zaragoza España. Pp 145 – 449.
- HOLME, J. 1987. Bioquímica analítica. Editorial Acribia. Zaragoza España. Pp 307 – 344.
- ICMSF. 1982. Microorganismos de los alimentos. Técnicas de análisis microbiológico. Vol. 1. Segunda edición. Editorial Acribia. Zaragoza España. Pp 160 – 162.
- JAY, J. 1994. Microbiología moderna de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza España. Pp 38 – 41.
- LINDEN, G. 1998. Bioquímica industrial. Editorial Acribia. Zaragoza España. Pp 247 – 281.
- MARTINEZ, E. 1999. Estudo de parâmetros do processo contínuo de produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar: (en línea):
(<http://www.unilivre.org.br/centro/experiencias/experiencias/292.html>).
- MATEOS, P. 2002. Metabolismo microbiano: (en línea):
(<http://www.geocities.com/CollegePark/Lab/2960/Mic7.htm>).
- MOTTA, R. 1997. Xilitol - o adoçante do futuro (en línea):
(<http://www.ufrj.edu.br/quimica/xilitol.htm>).
- MULLER, T. 1994. Ecología y medio ambiente. Editorial Iberoamericana. México 420 p.
- NEWBOLD, P. 1998. Estadística para los negocios y la economía. Editorial Faescol. España. Pp 388-395.

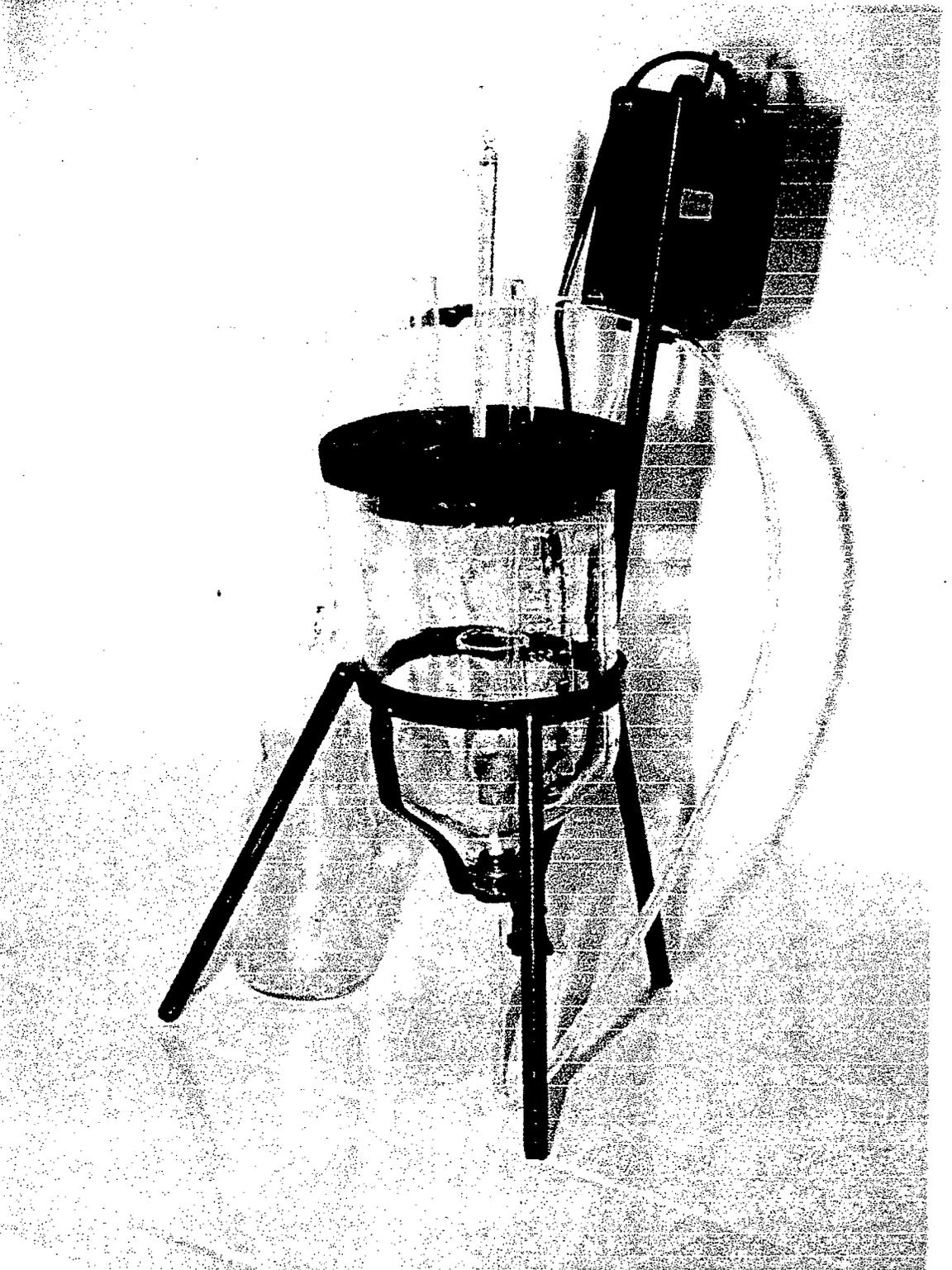
- OWEN, P. 1991. Biotecnología de la fermentación. Editorial. Acribia Zaragoza España. Pp 120 – 121.
- PINEDO, M. 2001. Sistema de producción de camu camu en restinga. Editorial IIAP. Iquitos Perú. Pp 87 – 96.
- QUINTANA, A. 1998. Producción de proteasas en biorreactores de tanque agitado. Trujillo Perú.
- QUINTEROS, R. 1993. Ingeniería bioquímica. Editorial Alambra. México. Pp 29 – 93.
- SENE, L. 2001. Aproveitamiento do bacaco de caña de acucar para a producao enzimatica de xilitol. Dept. de tecnologia bioquímica farmaceutica – FCF – USP Brasil (en línea): (<http://www.feq.unicamp.br/~telma/tesesem.html>).
- SKOOG, D. 1993. Análisis instrumental. Cuarta edición. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. Madrid España. Pp 184 – 187.
- SOUMITRA, B; NIRMALA, V. 1998. Xylitol: technology & business opportunities (en línea): (<http://www.exicom.org/cew/jan98/nirmala.htm>).
- STEEL, G; TORRIE, H. 1995. Bioestadística principios y procedimientos. Segunda edición. Editorial Mc Graw Hill. México 622 p.
- VASQUEZ, A. 2000. El camu camu cultivo, manejo e industrialización. Editorial Universal. Iquitos Perú. Pp 10 – 15.
- VILLACHICA, H. 1996. Frutales y hortalizas promisorios de la amazonía. Tratado de cooperación amazónica. Lima Perú. Pp 75 – 83.
- VILLACHICA, H. 1998. Productos amazónicos del Perú. Tratado de cooperación amazónica. Lima Perú. Pp 61 – 93.

WISEMAN, A. 1989. Biotecnología de las enzimas. Editorial Acribia. España.

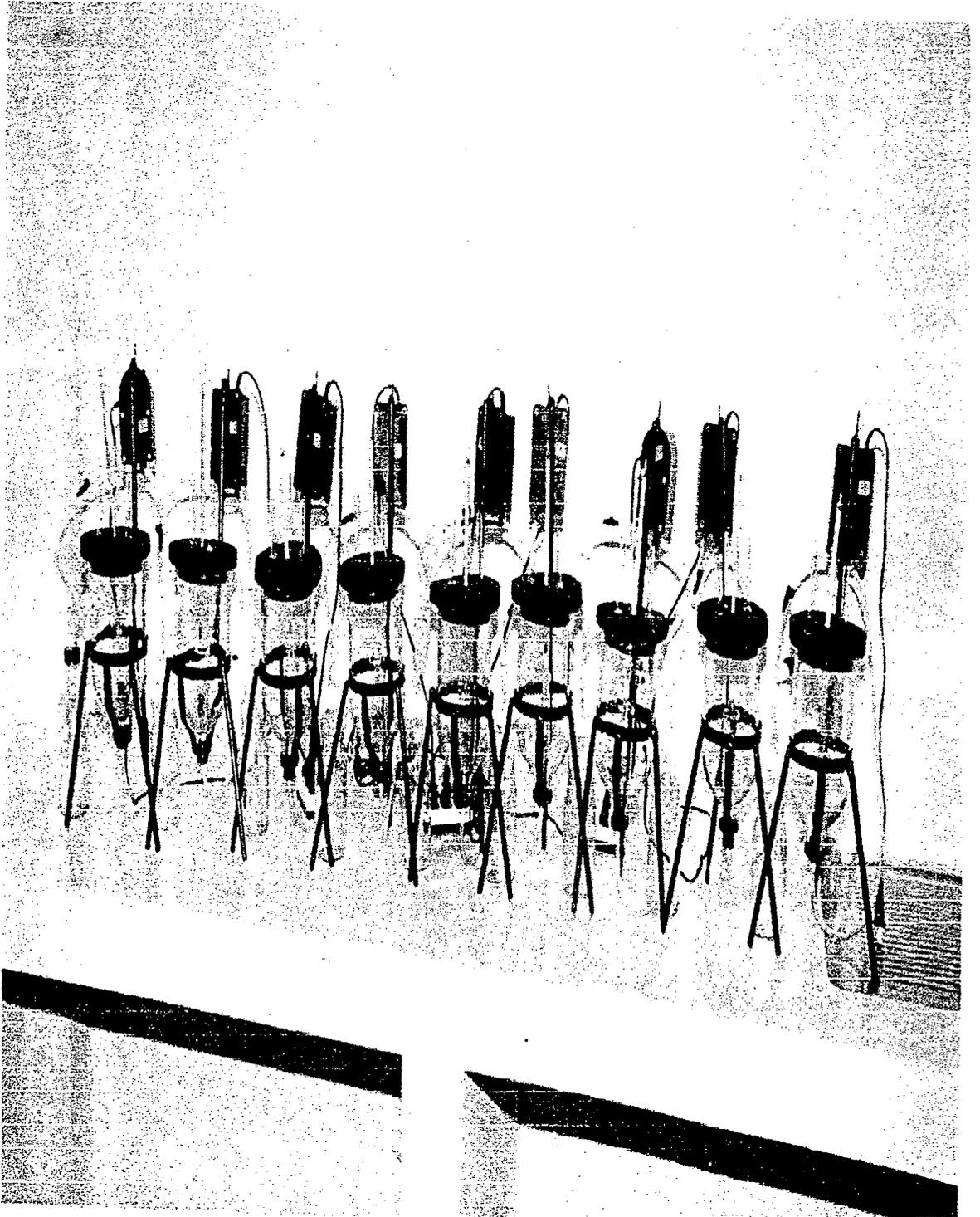
Pp 25 – 30.

VIII. ANEXOS

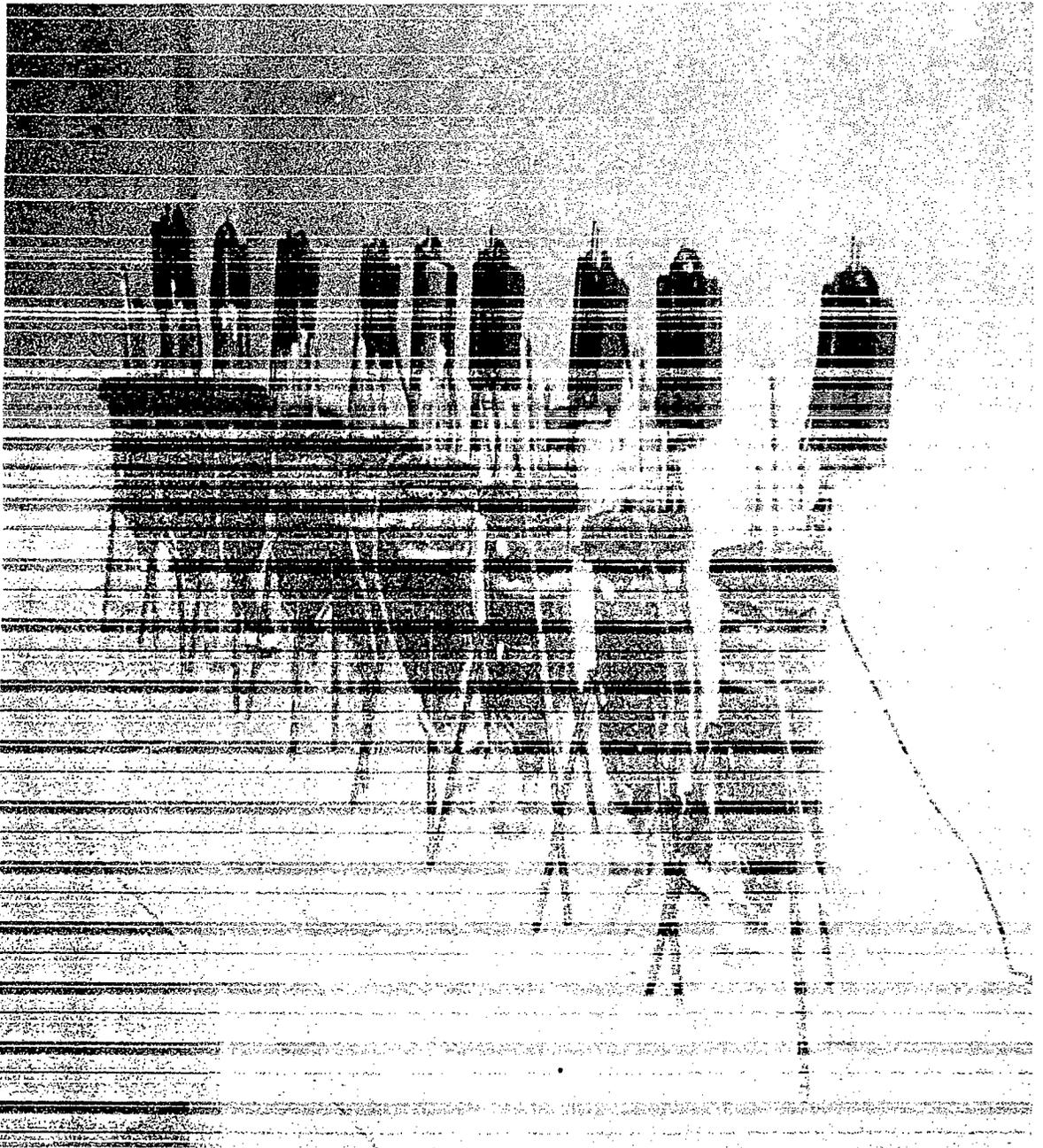
ANEXO I



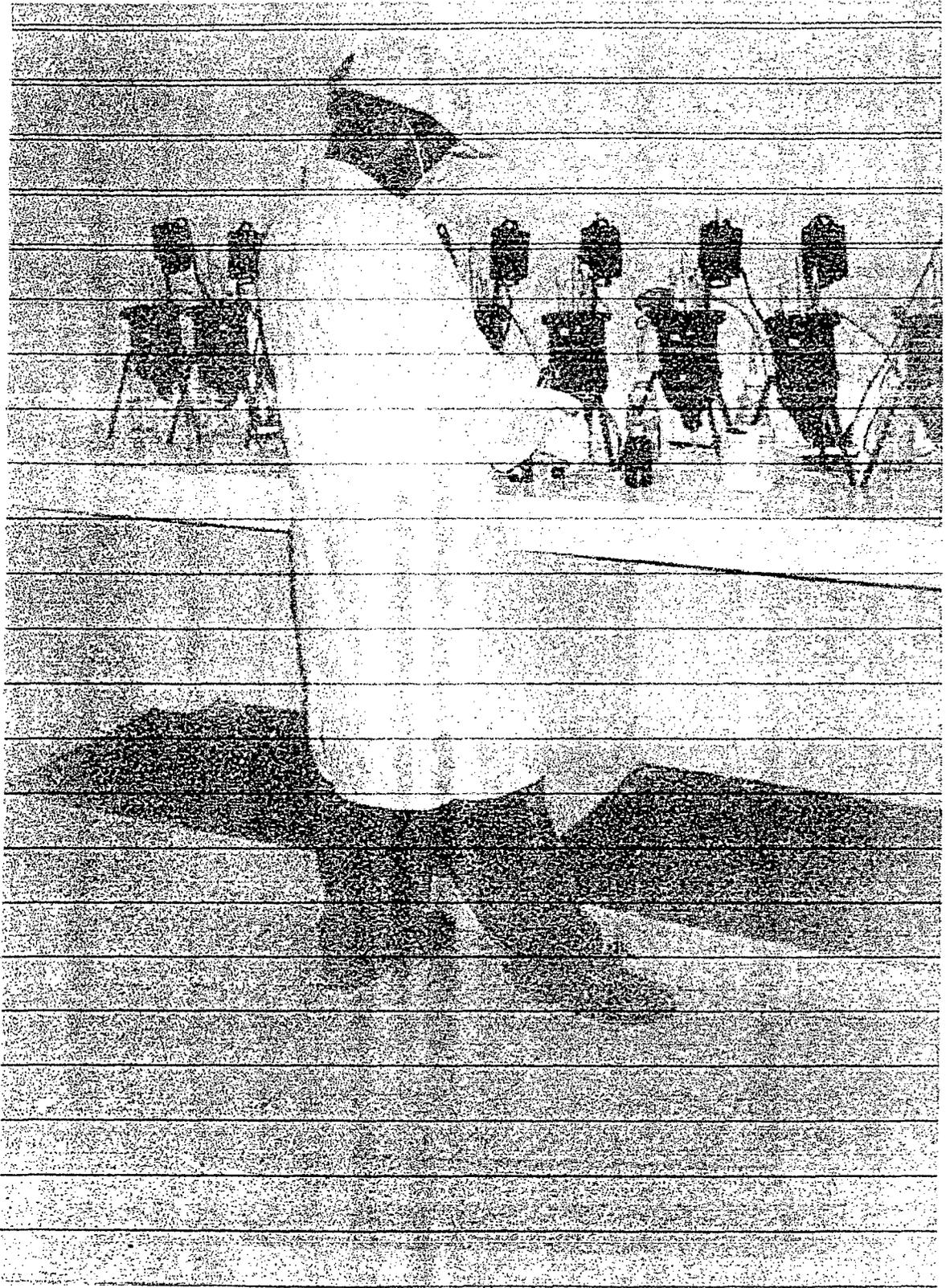
Biorreactor air lift.



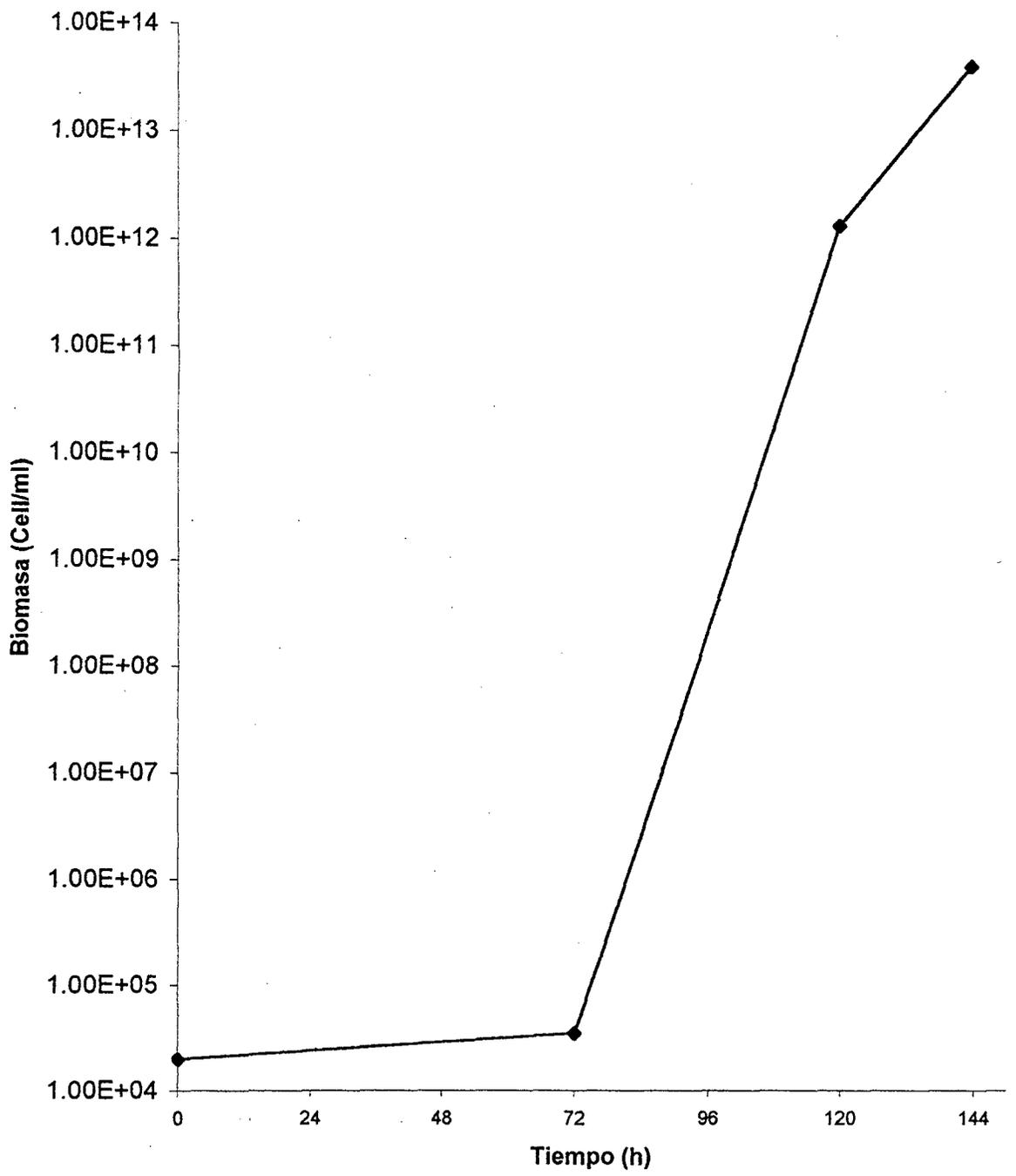
Biorreactores air lift listos para iniciar el proceso de fermentación.



Biorreactores air lift en pleno proceso de fermentación sumergida



Obtención de muestras del medio de cultivo fermentado.



Crecimiento bacteriano para la calibración de los biorreactores air lift.

MEDIDAS DE LOS ACCESORIOS DE LOS BIORREACTORES AIR LIFT

- Cámara de cultivo, de 27,5 cm de altura y 15 cm de diámetro interior.
- Una varilla de vidrio (G), de 25 cm de altura y 0,5 cm de diámetro.
- Un tubo de vidrio (E), de 8 cm de altura y 3,5 cm de diámetro interior.
- Dos tubos de vidrio (C, B), de 6 cm de altura y 1 cm de diámetro interior.
- Un termómetro (D), de 20 cm de altura.
- Manguera de plástico (A), con 0,25 cm de diámetro interior.

ANEXO II

Rendimiento del crecimiento microbiano en porcentaje (%) durante las 24 , 48 y 72 horas de realizado.

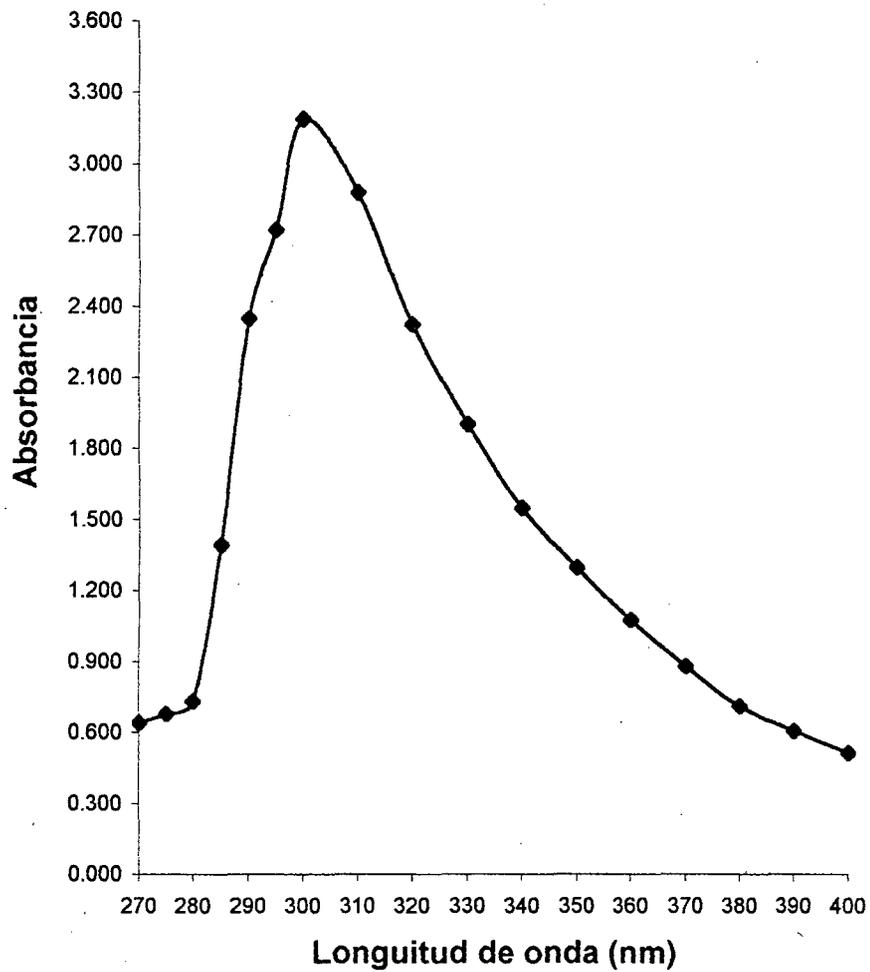
Tratamientos	Porcentaje (%) del crecimiento microbiano (biomasa)		
	24 horas	48 horas	72 horas
T ₁	104,21	121,05	126,31
T ₂	442,10	484,21	494,74
T ₃	221,05	300,00	305,26
T ₄	431,58	436,84	442,11
T ₅	315,78	357,89	378,94
T ₆	200,00	226,32	231,57
T ₇	100,53	102,11	105,26
T ₈	115,76	136,84	157,89
T ₉	305,26	326,31	336,84

ANEXO III

Datos obtenidos para determinar la longitud de onda de máxima absorbancia.

Lecturas de absorbancia de la solución cromóforo, leídas en el rango de 270 a 450 nm.

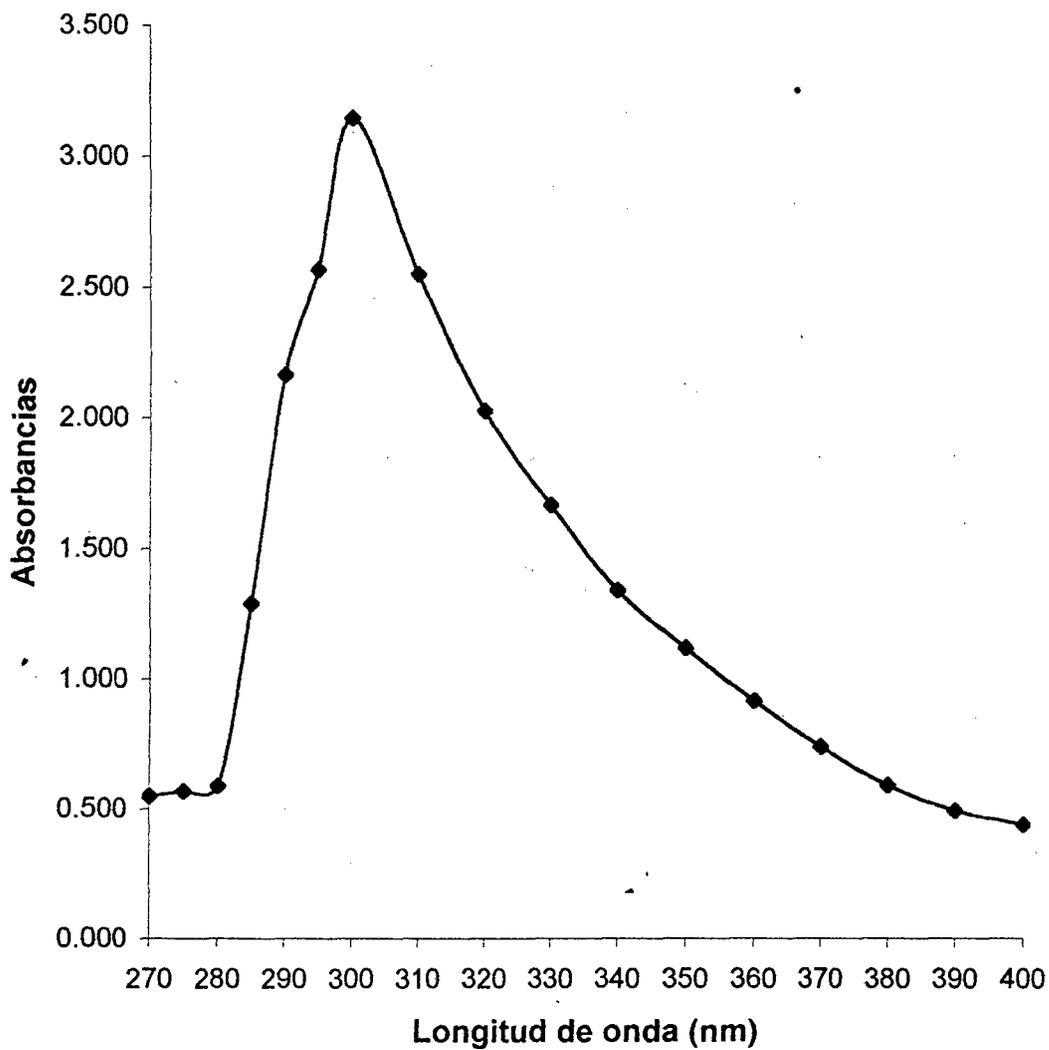
Longitud de onda (nm)	Absorbancia
270	0,678
275	0,733
280	1,395
285	2,235
290	2,860
295	2,722
300	3,189
310	2,878
320	2,322
330	1,903
340	1,550
350	1,298
360	1,075
370	0,879
380	0,710
390	0,604
400	0,512



curva de selección de la longitud de onda de máxima absorbancia para la solución cromóforo.

Lecturas de absorbancia de la solución cromóforo mas xilitol en el rango de 270 a 450 nm.

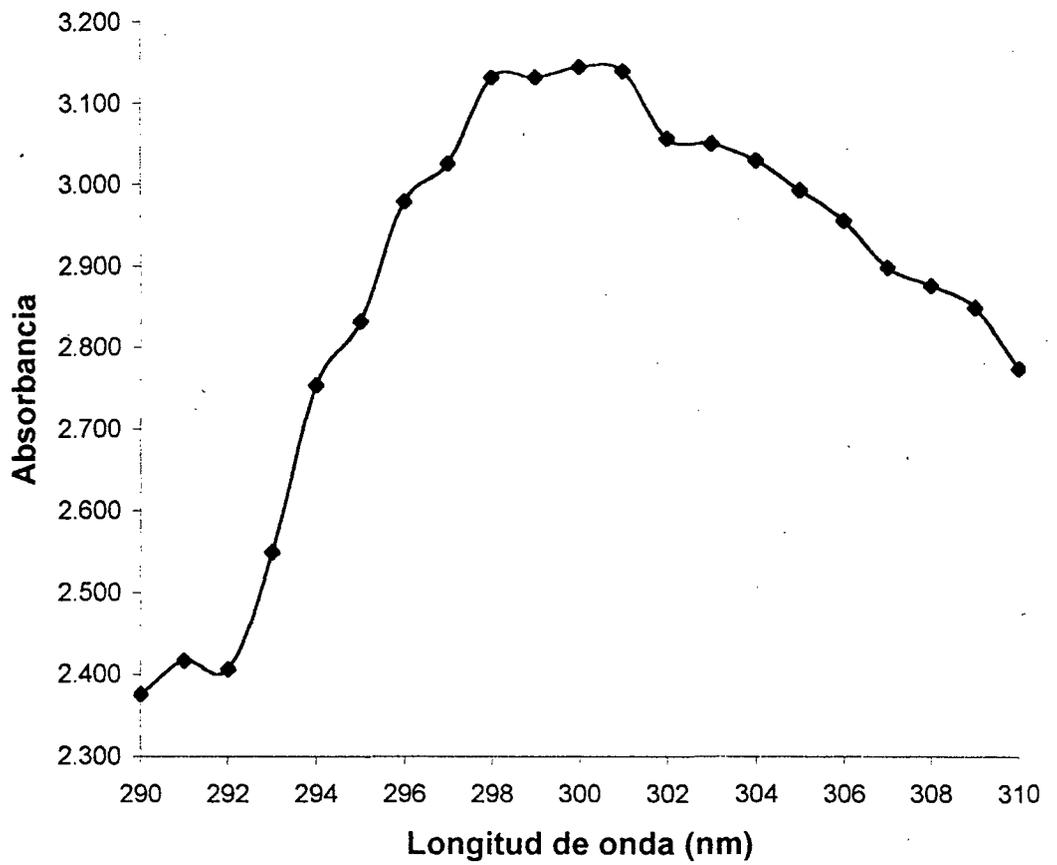
Longitud de onda (nm)	Absorbancia
270	0,548
275	0,567
280	0,587
285	1,290
290	2,167
295	2,570
300	3,148
310	2,550
320	2,023
330	1,662
340	1,335
350	1,116
360	0,913
370	0,739
380	0,590
390	0,492
400	0,438



Curva de selección de la longitud de onda de máxima absorbancia de la solución cromóforo mas xilitol.

Lecturas de absorbancia de la solución cromóforo en el rango de 290 a 310 nm.

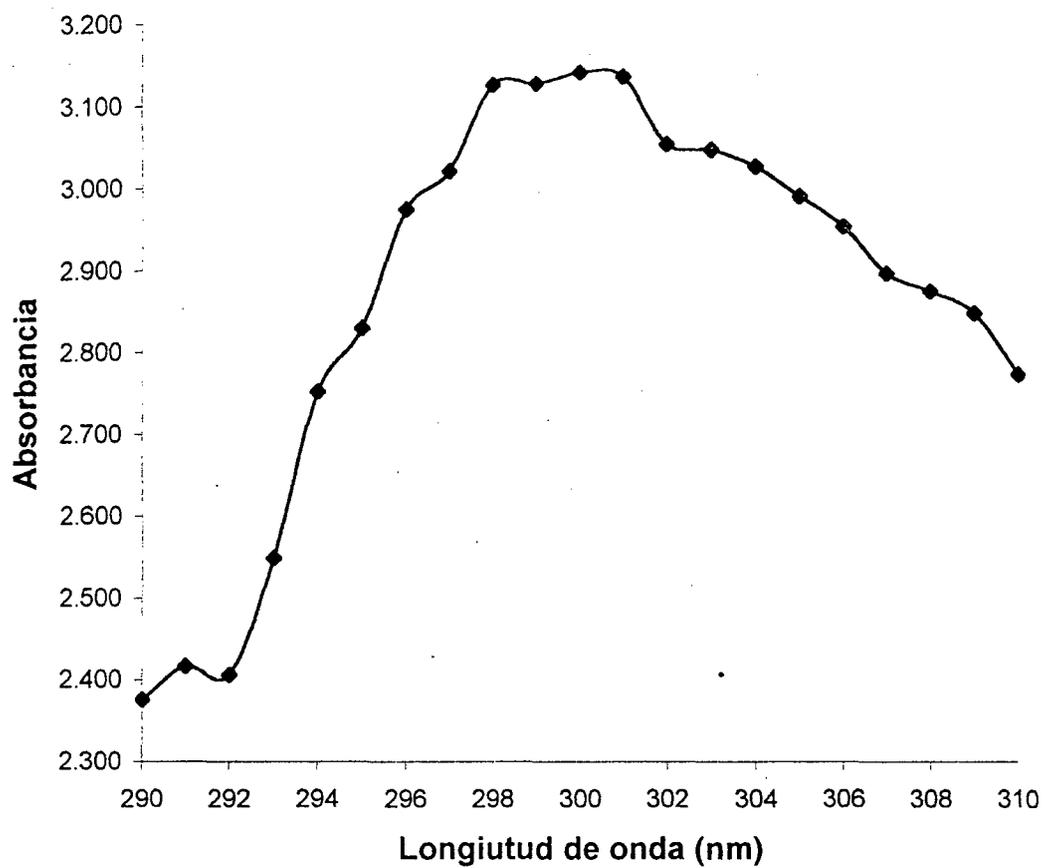
Longitud de onda (nm)	Absorbancia
290	2,376
291	2,417
292	2,407
293	2,550
294	2,754
295	2,832
296	2,978
297	3,024
298	3,129
299	3,129
300	3,142
301	3,137
302	3,055
303	3,048
304	3,028
305	2,992
306	2,955
307	2,898
308	2,876
309	2,849
310	2,774



Curva de optimización de selección de la longitud de onda de máxima absorbancia de la solución cromóforo.

Lecturas de absorbancia de la solución cromóforo mas xilitol, leídas en el rango de 290 a 310 nm.

Longitud de onda (nm)	Absorbancia
290	2,292
291	2,290
292	2,374
293	2,501
294	2,650
295	2,808
296	2,903
297	2,978
298	3,027
299	3,027
300	3,027
301	2,942
302	2,936
303	2,910
304	2,892
305	2,835
306	2,727
307	2,727
308	2,605
309	2,574
310	2,530



Curva de optimización de selección de la longitud de onda de máxima absorbancia de la solución cromóforo mas xilitol.