

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES**



**UTILIZACION DE CASCARA DE NARANJA
PARA PRODUCCION DE PROTEINA
UNICELULAR**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL
GRADO ACADEMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA
INDUSTRIAL**

PRESENTA

MARGARITA XIOMARA CORNEJO MONTENEGRO

MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE DE 1984

TM
QR15
C6
c.1



1080074533

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES

UTILIZACIÓN DE CASCARA DE NARANJA PARA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR



Se ha aceptado como requisito parcial para optar el grado académico de maestro en Ciencias Químicas con especialidad en Microbiología Industrial.

En virtud de haber cumplido satisfactoriamente con el reglamento de tesis vigente y a la vez en conformidad con la aprobación de la tesis.

UTILIZACIÓN DE CASCARA DE NARANJA
PARA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA
UNICELULAR

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL
GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA
INDUSTRIAL

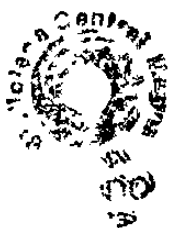
PRESENTA

MARGARITA XIOMARA CORNEJO MONTENEGRO

MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE DE 1984

TM
GR 151
C6



Señor coordinador de la maestría en ciencia, la tesis elaborada por la Licenciada en Biología Margarita Xiomara Cornejo Montenegro, intitulada

UTILIZACION DE CASCARA DE NARANJA PARA PRODUCCION DE PROTEINA UNICELULAR.

Ha sido aceptada como requisito parcial para optar el grado académico de maestro en ciencias, especialidad en Microbiología Industrial.

En virtud de haber cumplido íntegramente con el reglamento de tesis vigente y a la vez solicitamos a usted la aprobación final

COMITE DICTAMINADOR DE LA TESIS

SINODAL



DR. MANUEL RODRIGUEZ Q.

SINODAL



M.C. SERGIO FERNANDEZ D.

SINODAL



M.C. LUIS GALAN WONG

VoBo



M.C. BLANCA E. VILLARREAL DE G.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES

UTILIZACION DE CASCARA DE NARANJA PARA PRODUCCION DE
PROTEINA UNICELULAR

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO ACADE-
MICO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICRO
BIOLOGIA INDUSTRIAL PRESENTA

MARGARITA XIOMARA CORNEJO MONTENEGRO

RESUMEN

Se hace un análisis de las características nutricionales de la cáscara de naranja, para considerarlos como parte de un medio de cultivo que utilizado en un proceso fermentativo proporcione un producto con una mayor cantidad de proteína. En este proceso de fermentación se utilizaron cepas de Penicillium sp. y un Aspergillus sp., ambos aislados de materiales pectínicos. El uso de éstos en medio de cultivo con cáscara de naranja, conduce a la obtención de un producto con un 20% de incremento en el contenido de proteínas respecto al material sin fermentar. También se determinan experimentalmente los parámetros óptimos de fermentación, como pH y relación sólido-líquido.

INDICE GENERAL

	página
A.- Introducción	1
B.- Materiales y Métodos	5
I.- Aislamiento y selección de microorganismos	5
II.- Identificación de los Microorganismos	7
III.- Identificación de microorganismos pecti- nolíticos	7
IV.- Material de desecho industrial utilizado - como sustrato	8
V.- Composición del medio de cultivo	8
VI.- Proceso de esterilización	10
VII.- Método de inoculación	10
VIII.- Proceso de fermentación	11
IX.- Métodos de análisis	11
C.- Resultados y observaciones	13
D.- Conclusiones	17
E.- Referencias bibliográficas	19
F.- Apéndice de tablas	21
G.- Apéndice de gráficas	31
H.- Biografía de la autora	35

INDICE DE TABLAS

	Página
I.- Composición química de la cascara de naranja	22
II.- Parámetros utilizados para la selección de microorganismos en agar cáscara de naranja	23
III.- Observación macroscópica del <u>Penicillium</u> sp. - en el medio de esporulación de Czapeck.	24
IV.- Observación macroscópica del <u>Aspergillus</u> sp. en el medio de esporulación de Czapeck.	25
V.- Constituyentes químicos de la cáscara de naranja	26
VI.- Composición química del medio de cultivo	27
VII.- Composición de compuestos carbonados y nitrogenados de la cáscara de naranja seca	28
VIII.- Características microscópicas del <u>Aspergillus</u> sp.	29
IX.- Características microscópicas del <u>Penicillium</u> sp.	30

INDICE DE GRAFICAS

	Página
1.- Efecto del pH del medio de cultivo sobre la producción de proteína	32
2.- Curva de producción de proteína en función del tiempo	33
3.- Variantes en el proceso	34

A.- INTRODUCCION

A la biotecnología microbiana, se le describe como la Cien-
cista tecnológica de nuestros días con su gran potencial -
para alterar la fisonomía de la industria de nuestra época
que redundaría en beneficio de la sociedad.

Los antecedentes acerca de la utilización de los microorga-
nismos como agentes de biosíntesis aplicables a la alimenta-
ción animal o humana, emergen de los estudios de Delbruck,-
Hayduck y Wohl, llevados a efecto en el Instituto de Fermen-
taciones de Berlín, durante los años de la Primera Guerra -
Mundial (1). Al hablar de estos antecedentes que se re-
montan a la época de Guerra, es riguroso considerar las raf-
ces científicas de la biotecnología que tuvo lugar en el si-
glo XIX, cuando Louis Pasteur estableció los orígenes micro-
bianos y la diferencia entre fermentación y putrefacción-
(2). Las contribuciones de Koch, Jenner, Fleming y otros
investigadores formaron la base de diversos procesos micro-
biológicos que han contribuido al desarrollo y progreso del
hombre.

Entre las especialidades de la Biotecnología se puede -

considerar que en la última década, ha surgido un renovado interés en los procesos de biosíntesis proteica por microorganismos; denominada proteína unicelular, este término se utiliza genéricamente para aplicarlo al concentrado proteico procedente de microorganismos unicelulares como son: Bacterias, algas, hongos y levaduras.

En los países industrializados y en vías de desarrollo existen materiales subproductos naturales, que pueden ser útiles como complemento de la dieta animal. Estos subproductos, con su contenido residual de materiales asimilables y fermentables (polímeros carbonados) son utilizados como fuente de carbono, empleando microorganismos como agentes de biosíntesis. Es evidente que la tecnología microbiana pueda proveer algunas de las soluciones a los problemas del crecimiento poblacional como son: La reutilización de aguas (residuales, industriales, municipales), producción de bioenergía, alimentación, control de insectos y producción de proteína unicelular.

Entre los materiales de desecho que son comunmente empleados como sustrato para producir proteína unicelular encontramos algunos industriales; como las mezclas de azúcar, bagazo de caña, residuos de papel y el suero de leche. Algunos residuos agrícolas como frutas tropicales, cascari-lla de cereales y plantas desérticas, y se incluyen también

algunas fracciones de petróleo como las querosinas y el gasoleo (1).

Los desechos vegetales, resultan relativamente abundantes y baratos, entre estos tenemos la cáscara de naranja, - que es utilizada generalmente como alimento para aves y ganado, siendo una fuente potencialmente significativa en el contenido de proteína de origen unicelular si es sometida a un proceso fermentativo, ya que la cáscara de naranja contiene una cantidad de carbohidratos, que la hace atractiva como sustrato. Al hablar de cáscara de naranja, se hace referencia a todo el desecho sobrante en el procesamiento del jugo con previa extracción de los aceites esenciales que por sus características pueden actuar como bactericidas.

La composición química de la cáscara de naranja, no se ha estudiado con detenimiento, sin embargo, se conocen en forma general los constituyentes de cada uno de sus tejidos.

En el Flavedo o Edicarpio encontramos pigmentos carotenoides, vitaminas y aceites esenciales. En el Albedo o Mesocarpio están presentes celulosa, carbohidratos solubles, protopectina, pectina, aminoácidos y vitaminas y en los segmentos que cubren los sacos de jugo se ponen en evidencia celulosa, pectina, azúcares, aminoácidos y minerales (3).

En los procesos biotecnológicos generalmente se involucra

la presencia de enzimas extracelulares que hidrolizan los polímeros carbonados de alto peso molecular, y en el caso del material que en éste nos ocupa, las pectinasas son de gran importancia. Tales enzimas se forman debido a la acción aislada o en conjunto de una serie de enzimas como las pectinesterasas, producidas por algunos géneros de Clostridium, Pseudomonas y algunos hongos como el Fusarium, Penicillium y Aspergillus, las poligalacturonasas producidas por hongos y levaduras, las poligalacturonato-lisas producidas por algunos bacillus, Aeromonas, Xantomonas, Erwinias y las polimetilgalacturonato-liasa producidas generalmente por hongos (4).

Esta investigación está encaminada a determinar el valor potencial de la cáscara de naranja como fuente de materiales que por biotransformación generen proteína unicelular, y de evidenciar la actividad pectinolítica de una cepa de Aspergillus sp. y otra de Penicillium sp. aisladas de materiales pécticos.

B.- MATERIALES Y METODOS

I.- Aislamiento y Selección de Microorganismos:

El aislamiento de los microorganismos se llevó a cabo - en una relación de 10:5 v/v. Para naranjas infectadas y tejidos infectados se tomó de la muestra con hisopo estéril, diluyéndolo en agua estéril. Para aislar cepas con posible actividad pectinolítica y capacidad de asimilar los productos de hidrólisis, se escogió áreas específicas como suelos, naranjas infectadas y tejidos infectados. Para determinar la selección de los microorganismos que se emplearon en esta investigación, éstos se inocularon en un medio de cultivo, que contenía cáscara de naranja como fuente de energía (tabla No. I). En la tabla No. II, se describe el criterio - utilizado en la selección de estos microorganismos.

El crecimiento de los microorganismos se observó por un tiempo máximo de 72 horas, sin embargo, algunas de las cepas; en 24 horas crecieron profusamente, en agar cáscara de naranja, a una temperatura de 28°C.

Conjuntamente con este método de crecimiento, se observó

el desarrollo de las cepas en un medio nutritivo líquido similar al anterior, donde se colocaron porciones uniformes de tres cms. de la cáscara (8% p/v), y se mantuvo en agitación por ocho días en matraces de 250 ml., con 100 mls. de muestra a 28°C; al cuarto día de agitación a 200 r.p.m., disminuyó la porción de la cáscara con formación de micelios. Se hicieron pruebas para la determinación de proteína encontrándose una cantidad significativa en una de las cepas investigadas.

Se aislaron un total de 15 cepas, de éstas, se escogieron dos que se evaluaron de acuerdo a su disposición de crecimiento, cantidad de proteína presente posterior al proceso fermentativo. En las cepas trabajadas predominaron las de aspecto de hongos y levaduras.

Los dos microorganismos seleccionados, posiblemente de los géneros Aspergillus sp. y Penicillium sp., se emplearon unidos en el proceso considerando que el microorganismo con características pectinolíticas conduciría a la biodegradación de la pectina con la posterior utilización de los productos catabolizados por ambos.

Para comprobar si los microorganismos, uno aislado del suelo y otro de naranjas infectadas, podrían trabajar armiosamente, se hicieron crecer en agar cáscara de naranja durante 24 horas a 28°C sin observar inhibición.

II.- Identificación de los Microorganismos.

Para la identificación de las cepas se llegó hasta el género sin abarcar la especie, se empleó para su identificación los métodos clásicos con los que se cuenta: Observación macroscópica, observación microscópica y preparación con azul de lactofenol. Para la observación macroscópica -- se hace referencia a las tablas No. III y IV (5).

III.- Identificación de Microorganismos Pectinolíticos:

El medio se preparó de acuerdo a la literatura citada y una vez que se esterilizó se ajustó el pH a 7, se observó el crecimiento de las cepas y a las 48 horas se le agregó a la placa petril, acetil bromuro de amonia conocida como Cetavlon TM. El Cetavlon TM es un agente opaco; el diámetro de la zona clara generalmente se relaciona con el microorganismo que potencialmente descompone la pectina (6 y 7). El promedio de la zona de precipitado fue de 0.5 cms. Este método de identificación se utilizó con cinco microorganismos que incluían el Aspergillus sp. y Penicillium sp. La literatura científica comenta que el Cetavlon se deja de 20 a 30 minutos, sin embargo, en la investigación que se realizó se encontró que variaba el tiempo de incubación con rangos que oscilaban de 45 minutos a 1 hora. El Cetavlon TM se probó a diversas concentraciones encontrándose que en la solución original era como actuaba satisfactoriamente (6, 7).

IV.- Material de Desecho Industrial Utilizado como Sustrato:

La cáscara de naranja procesada, fue el sustrato empleado en la investigación, se pulverizó en la licuadora Osterizer a cinco minutos en baja revolución y cinco en alta; para obtener partículas uniformes se llevó a cabo la tamización. La muestra pulverizada se probó a concentraciones de 25, 30, 35, 40 y 45% p/v encontrándose que los mejores resultados se obtenían a 20% p/v.

V.- Composición del Medio de Cultivo:

Se acepta en términos generales que el medio de fermentación se desarrolla con una mezcla de arte y ciencia. Las bases científicas se afianzan en el concepto de las bases bioquímicas de los microorganismos, encontrándose que son generales a un buen número de especies. El arte se requiere cuando se desconocen los detalles específicos del microorganismo en estudio.

Para elaborar la parte científica de un medio de cultivo, es necesario tomar en cuenta:

- i).- La composición química del sustrato a utilizar
- ii).- Necesidades nutricionales de los organismos
- iii).- Estudio de los compuestos empleados como factores importantes para estimular la acción catabólica. Estos factores son fundamentales ya que tienen influencia significativa

tiva sobre el sistema bioquímico del proceso.

La cáscara de naranja posee compuestos químicos que se requieren para la fermentación, según puede observarse en la Tabla No. V, lo que se tomó en cuenta para la elaboración del medio de cultivo. En la Tabla No. VI se observa la concentración de carbono que es importante tomando en cuenta que entre los aportadores principales de estos carbonos esta la fibra cruda compuesta de: celulosa, pentosanas, hemicelulosas, etc. En la literatura científica se pueden estudiar las distintas concentraciones de la fibra cruda presente en mayor o menor cantidad en los productos vegetales. En la tabla No. VII se observa que en la cáscara de naranja es de un 30%. Es importante señalar la presencia de otros compuestos, que pueden servir como fuente de energía como son: Almidón, pectina, etc.

La fuente de nitrógeno utilizada fue fosfato de amonio sirviendo el fosfato en el proceso como estabilizador del pH. Hay ciertos elementos que son esenciales para el crecimiento de los hongos como son: cobre, magnesio, calcio, zinc, y también como activadores de las enzimas necesarias en el metabolismo del proceso. En la Tabla No. V se considera los puntos de este medio utilizado en la investigación.

En la solución con trazas de elementos, el cloruro de -

calcio se disolvió aparte ya que presentaba dificultad en su clarificación; el cloruro de Zinc se acidificó para que no precipitara el resto de la solución. La presencia de extracto de levadura en el medio fue para proveer a los organismos de fuentes de vitaminas y aminoácidos, porque aunque se conoce la existencia de estos compuestos en los tejidos de la cáscara no se contó con un dato exacto al respecto.

VI.- Proceso de Esterilización:

La esterilización se probó a diversas presiones y temperaturas debido a la resequedad que se observaba en las muestras inclusive a 0.703 Kg/cm^2 y 110°C durante 15 min., encontrándose que no había alteración en el medio cuando la esterilización de llevaba a efecto a 0.563 kg/cm^2 de presión a 114°C por 45 minutos. Para probar la efectividad del método de esterilización utilizada, todos los matraces esterilizados se dejaron a temperatura de 28 y 37°C durante 10 días y en ninguno de los casos se observó crecimiento.

VII.- Método de Inoculación:

Para eliminar o disminuir la fase de latencia requerida para la germinación de esporas, se colocó suspensión de cada una de las cepas en un matraz de 250 ml. con 100 ml. de muestra empleada en la investigación, sustituyendo la cáscara de naranja por glucosa como fuente de carbono, (8).

Se colocó en agitación por 24 horas a 200 r.p.m. a 28°C, - para leer en el espectrofotómetro Beckman Junior II a - 500 nm empleándose una turbidez equivalente a 66% de trans- mitancia. De esta muestra se tomó 5 ml. respectivamente - para el proceso de fermentación.

VIII.- Proceso de Fermentación:

En matraces de 250 ml. con 100 ml. de solución a una temperatura de 28°C y agitación a 250 r.p.m. se dió inicio al cultivo sumergido. El tiempo de fermentación fue de - seis días a pH 6, sin observarse disminución en el volúmen del medio y leves variaciones en la temperatura. No se ob- servaron cambios físicos visibles, la variación del pH se comprobó al tercer día cuando bajó a 5, agregándole una so- lución de fosfatos para mantenerlo en el pH óptimo.

IX.- Métodos de Análisis:

A.- Determinación de Pectina Total:

La muestra se trabajó a una dilución de 1:35, a 10 ml.- de la muestra se le agregó 1 ml. de la solución de hidróxi- do de sodio al 10% para solubilizar los compuestos pécticos como pectato de sodio. A los 15 minutos se filtraba la so- lución, se agregó el ácido clorhídrico, y posteriormente se empleó calor. La curva de calibración se trabajó con pecti- na grado 1, con una solución patrón de 1g. x 1000 ml. (9).

B.- Análisis de Carbohidratos:

Las muestras se trataron por el método de Fenol para la determinación cuantitativa de carbohidratos (10).

C.- Determinación de Proteína:

En la determinación de proteína se trabajó con la modificación de Biuret llamada de Robinson-Hodgen, haciendo las extracciones con hidróxido de sodio 1.0 N (10).

Para la identificación de los carbohidratos presentes - en el proceso de fermentación se utilizó cromatografía de - papel por el método descendente, empleándose para el revelado una solución p-anisidina 0.1 M y ácido ftálico 0.1 M - en etanol al 96% (11 y 12).

El proceso de secado se realizó en una estufa de vacío a -0.84 Kg/cm^2 a 80°C , por 48 Hs.

C.- RESULTADOS

Los microorganismos utilizados, cuyas características se mencionan en las tablas VIII y IX, fueron seleccionados de acuerdo a su capacidad de crecimiento sobre el agar cáscara de naranja, considerándose que había 15 cepas distintas de las cuales solo dos se escogieron de acuerdo a los parámetros mencionados en la Tabla II y la comprobación en el medio de fermentación de la presencia de proteína unicelular en cantidad aceptable.

La cepa de *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. conducen a una buena asimilación de carbohidratos, principalmente de la glucosa, evidenciando su capacidad para biotransformar sustratos carbonados en proteínas. La cepa de *Aspergillus* sp. manifiesta características pectinolíticas significativas, si tomamos en cuenta que ambos microorganismos se inocularon en un medio conteniendo pectina como única fuente de carbono. El *Aspergillus* sp. creció en forma de esferillas, no así el *Penicillium* que no presentó crecimiento por los tres días en que se mantuvo en agitación 200 r.p.m. a 20°C.

Adicional a esta etapa en el proceso de fermentación se tiene la fase del oxígeno solubilizado por difusión simple de aire durante la agitación, en la que no se empleó ningún control adicional debido a la limitación de los instrumentos utilizados.

Esta agitación se llevó acabo a 250 r.p.m. para proveer hasta donde se pudiera la oxigenación del proceso.

La temperatura fue mantenida a 28°C ya que se comprobó que trabajaba satisfactoriamente a la vez que simplificaría el proceso de escalamiento.

En los experimentos realizados para demostrar la actividad pectinolítica se encontraron halos de precipitado con promedio de 0.5 cm en el caso del Aspergillus sp., lo cual pone en evidencia que esta cepa tiene cualidades excelentes para ser usada tanto como biodegradador de los polímeros carbonados, así como de biotransformador de los productos de hidrólisis en proteína.

La utilización de 2 cepas microbianas, una de ellas con capacidad de hidrolizar polímeros carbonados presentes en el sustrato (pectina) y la buena capacidad de ambas para asimilar los productos de hidrólisis aumenta la posibilidad de obtener cantidades apreciables de proteína unicelular.

Las pruebas realizadas para determinar la relación sólido-líquido óptima para la producción de proteína, dieron como resultado que si la cáscara de naranja se adiciona al 20% p/v, las mayores concentraciones de proteína[®] fueron obtenidas, las otras cantidades probadas mostraron problemas de esterilización ya que la muestra al salir del autoclave se mostraba pastosa, y se hacía difícil la agitación y en consecuencia se presentaba una aereación deficiente. Cabe aclarar aquí que en estos casos la esporulación se presentó más tempranamente.

En la gráfica No. 1 se muestran los resultados de proteína unicelular obtenidas haciendo variaciones en el pH - del medio de fermentación, en la mencionada gráfica puede notarse que los mejores rendimientos de producción de proteína fueron obtenidos en un rango de pH que va de 5 a 7 - con un máximo observable a pH 6. Esto nos da una idea clara respecto a que las enzimas involucradas en el proceso tienen su máxima actividad a pH ligeramente ácidas.

En las gráficas 2 y 3, se puede observar la curva de incremento de proteína unicelular en función del tiempo de fermentación, detectándose un máximo de producción al 5° - día de incubación a 28°C. En la figura 3 puede también observarse que el máximo de producción de proteína coincide con una clara disminución en la velocidad de asimilación - de carbohidratos, mientras que el pH se mantiene constante

durante todo el proceso. La curva de proteína soluble presenta un incremento considerable entre el primero y segundo día de fermentación, lo cual indica que la mayor producción de pectinasas ocurre en ese lapso de tiempo, manteniéndose con ligero incremento en los días posteriores.

En el análisis cromatográfico del caldo de fermentación al 5° día de incubación se detectó que la glucosa había sido consumida casi en su totalidad, mientras que otros carbohidratos se presentaron en el análisis como por ejemplo - ácido galacturónico, ramnosa, arabinosa y galactosa. La literatura científica menciona que la pectina en su hidrólisis total, rinde ácido péctico (ácido poligalacturónico) en el cual hay un grupo carboxilo por cada residuo de ácido galacturónico, por lo cual la presencia de ácido galacturónico confirma la presencia de una actividad pectinolítica en el medio de fermentación.

D.- DISCUSION Y CONCLUSIONES

Las dos cepas del proceso conducen a un incremento importante de la proteína unicelular, que puede considerarse posteriormente en procesos con una concentración mayor de sustrato, tomando en cuenta las características pectinolíticas de uno de los dos microorganismos que podrían llevar a la hidrólisis total de la pectina o de otro polímero presente en el sustrato sólido.

La adición de glucosa en el proceso podría llevarnos a datos interesantes, ya que fue la de mayor asimilación, si consideramos que hay una cantidad de galactosa presente en el cromatograma al final de la biotransformación, sin embargo, los microorganismos utilizados tienen capacidad de crecer asimilando galactosa como fuente de carbono.

En los matraces inoculados en la investigación se observaron residuos del sustrato (como puntos oscuros) que no fueron biodegradados que pueden pertenecer a la celulosa residual, lignina o hemicelulosa.

La técnica de evaporación parece recomendable en alter-

nativa a una filtración para recuperar la proteína desuelta en el sobrenadante ya que como se observa en la gráfica No. 3 es de importancia en el proceso.

El producto procesado se obtiene con buena textura y olor penetrante pero agradable con un porcentaje de proteína de aproximadamente el 30% en base seca, sin llegar a determinarse su disponibilidad como alimento balanceado, el contenido de la cáscara sin su biotransformación se emplea como alimento para aves y ganado vacuno.

No se realizó un estudio de las diversas temperaturas que podrían optimizar el sistema, sin embargo, considerando que los hongos trabajan a temperatura ambiente y en un proceso biotecnológico lo que se aspira es reducir los gastos de operación y optimizar las fases de la biotransformación adecuadamente a las necesidades.

E.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Casas Campillo C.; Rev. Tecnol. Alimen., 11:124 (1976).
- 2.- Da Silva E. J., Process Biochemistry; 38. (1981)
- 3.- Joseph G. H., The Orange (Editor Sinclair B.) --
pp. 195. University of California, Division of Agricultural Sciences (1961).
- 4.- Fogarty W.M. and Ward O.P., Process Biochemistry pp. 13
(1972).
- 5.- Smith G., Introducción a la Micología Industrial pp. 171
Editorial Acribia, México
- 6.- Jayasankar, N.P., and Graham P.H., Canadian Journal of -
Microbiology; 16:1021 (1970).
- 7.- Hankin L., Zucker M., and Sands D.C., Applied Microbio-
logy; 8:98 (1968).
- 8.- Hockenull D. J., Progress in Industrial Microbiology; -
8:98 (1968).
- 9.- Monselise J.J., Israel Journal of Technology; 7:271 (1969).
- 10.- Hebert D., Strange R.E., Methods in Microbiology, Editorial
Ribbons D.W. and Norris J.R., 5B Academic Press, New York
(1972).

- 11.- Peitersen N.; Biotechnology Bioeng.; XVII:361 (1975).
- 12.- Schwartz, D., Analytical Chemistry pp. 1069 Meites L.
Ed. Academic Press, N.Y. (1963).
- 13.- Sincall B., The Orange; Ed. Sinclair B. pp. 129. --
University of California, Division of Agricultural Sciences
(1961).
- 14.- Litchfield J.H.; Overbeck R. C., and Davidson R. S.; -
Agricultural and Food Chemistry; 11:2 (1963).
- 15.- Frazier W. C., Food Microbiology, Ed. John Wiley & Sons
Third Edition. 14 (1967).

F.- APENDICE DE TABLAS

TABLA No. I

Composición Química de Agar Cáscara de Naranja para selección de microorganismos -- pecinolíticos.

Cáscara de Naranja	8% p/v
Fosfato de Potasio Monobásico	0.2 g/l
Fosfato de Potasio Dibásico	0.2
Cloruro de Sodio	0.1
Sulfato de Magnesio	0.1
Cloruro de Calcio	0.1
Extracto de Levadura	0.3
Agar	3%

TABLA No. II

**Parámetros utilizados para la Selección de
Microorganismos en Agar Cáscara de Naranja**

a).- Tiempo de crecimiento

b).- Observación macroscópica de la cepa (Abundancia en crecimiento sobre la superficie).

c).- Area de crecimiento.

(Total, mediana, parcial)

TABLA No. III

Observación Macroscópica del Penicillium sp. en el Medio de Es-
 porulación de Czapek (5).

- Colonias de tonalidad verde claro en el micelio aéreo.
- El micelio en el sustrato muestra pigmentación verdosa.
- Crecen uniformemente por el medio

El micelio aéreo cambia a los cuatro días a un color pardo.

Smith, G., Introducción a la micología industrial pp. 171
 Editorial acríbia, México.

TABLA No. IV

Observación Macroscópica del Aspergillus sp. en el Medio de Esporulación de Czapek (5).

- Colonias de tono verde intenso en el micelio aéreo.
- El micelio en el sustrato no muestra pigmentación.
- Crecen uniformemente por el medio
- El micelio aéreo no cambia de tonalidad a los cuatro días.

Smith, G., Introducción a la Micología Industrial pp. 171 Editorial Acribia, México.

TABLA No. V

Constituyentes Químicos de la Cáscara de Naranja.

	% en Peso seco
Materia seca	80%
Cenizas	2.91%
Calcio	0.64%
Magnesio	0.11%
Potasio	0.46%
Sodio	0.02%
Sulfato	0.23%
Fosfato	0.19%
Carotenos	265 µg/g
Vitamina Complejo B	Trazas.

Rockland, L., The Orange Ed. Sinclair, W
The University of California, Division of -
Agricultural Science (1961).

TABLA No. VI

Composición Química del Medio de Cultivo
(14).

Cáscara de Naranja	20	g/l
Fosfato de Amonia	2	
Fosfato de Potasio Monobásico	0.5	
Fosfato de Potasio Dibásico	0.5	
Solución con Trazas de Elementos		
Sulfato de Magnesio	100	g/l
Cloruro de Sodio	20	
Cloruro de Calcio	2	
Sulfato de Manganeso	5	
Cloruro de Hierro	0.5	
Sulfato de Cobre	0.05	
Cloruro de Zinc	0.005	
Extracto de levadura	0.5	

TABLA No. VII

Composición de Compuestos Carbonados y -
Nitrogenados con la Cáscara de Naranja -
seca (13).

Fibra cruda	30%
Azúcares reductores	8.5%
Pectinas (como Pectato de - Calcio)	8.0
Nitrógeno total	5.9%

TABLA No. VIII

Características Microscópicas de Aspergillus sp. (5, 15).

Conidióforos no septados

Conidios alargados en cadenas

Separación de los conidios en -
la vesícula

Smith, G., Introducción a la Micología Industrial pp. 171 Editorial Acribia, México.

TABLA No. IX

Características Microscópicas de Penicillium sp. (5, 15).

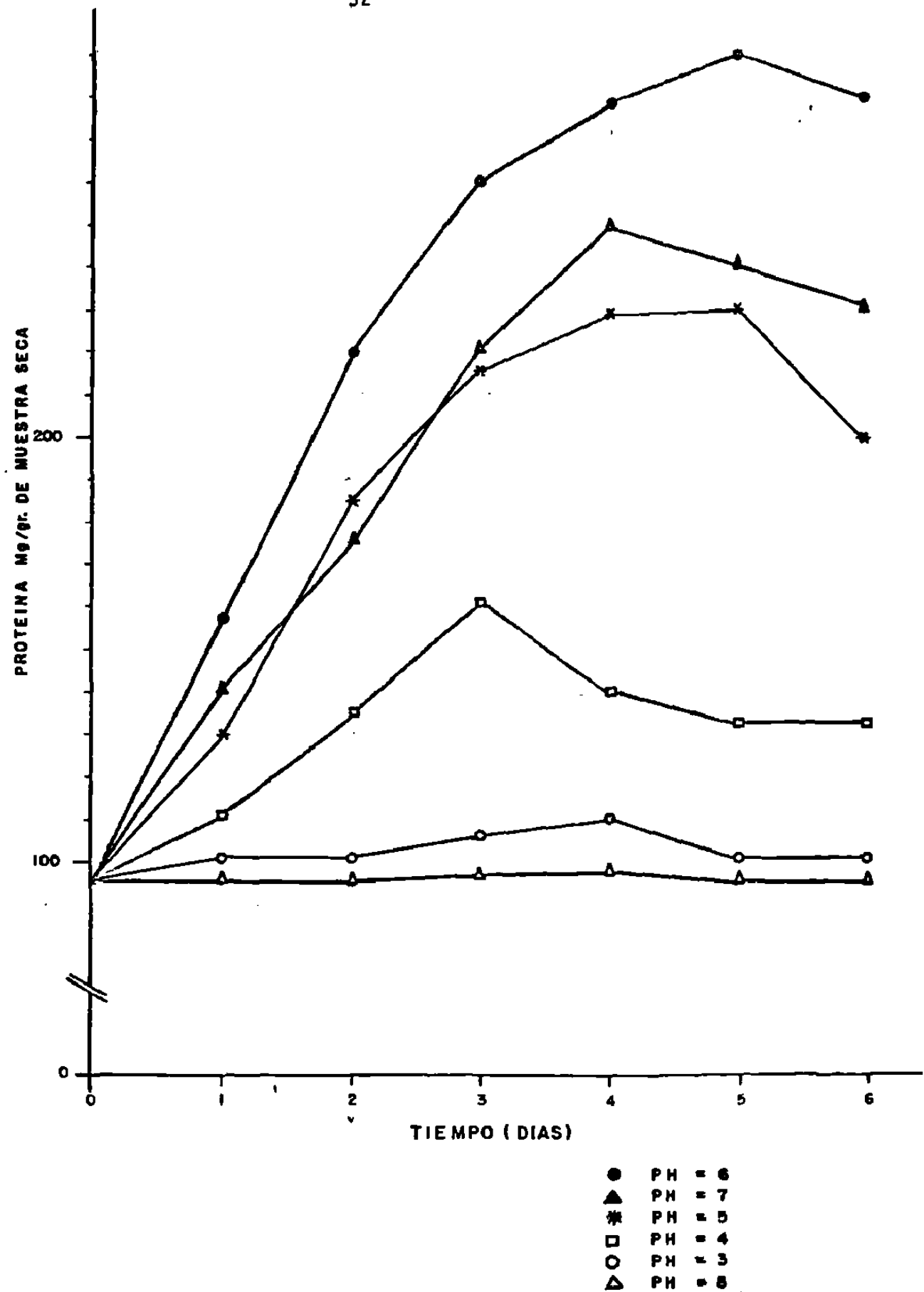
Conidióforo septado

Cadena de conidios unidos al esterigma

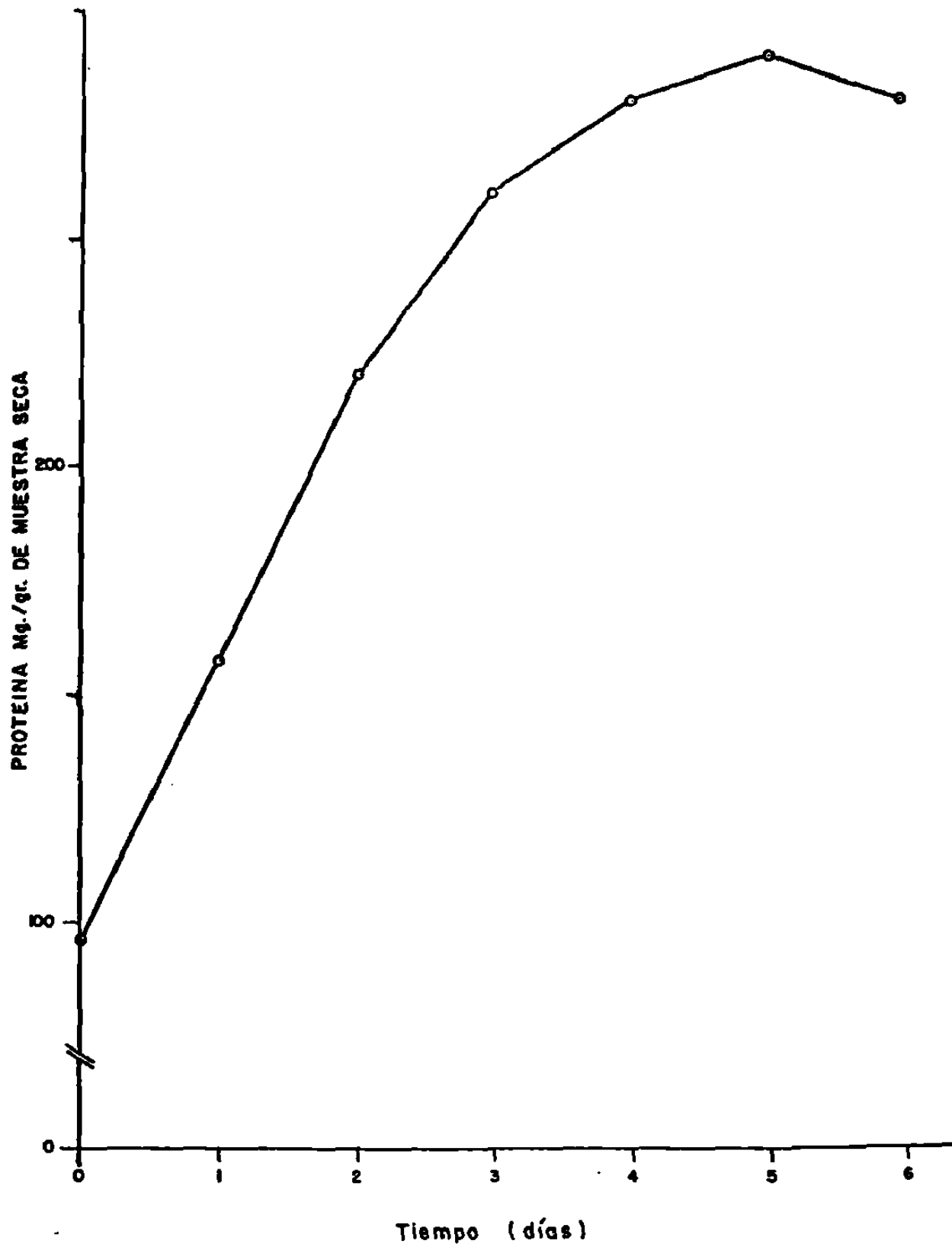
Sin separación de los conidios en la vesícula

Smith, G., Introducción a la micología Industrial pp. 171 Editorial Acribia, México.

G.- APENDICE DE GRAFICAS

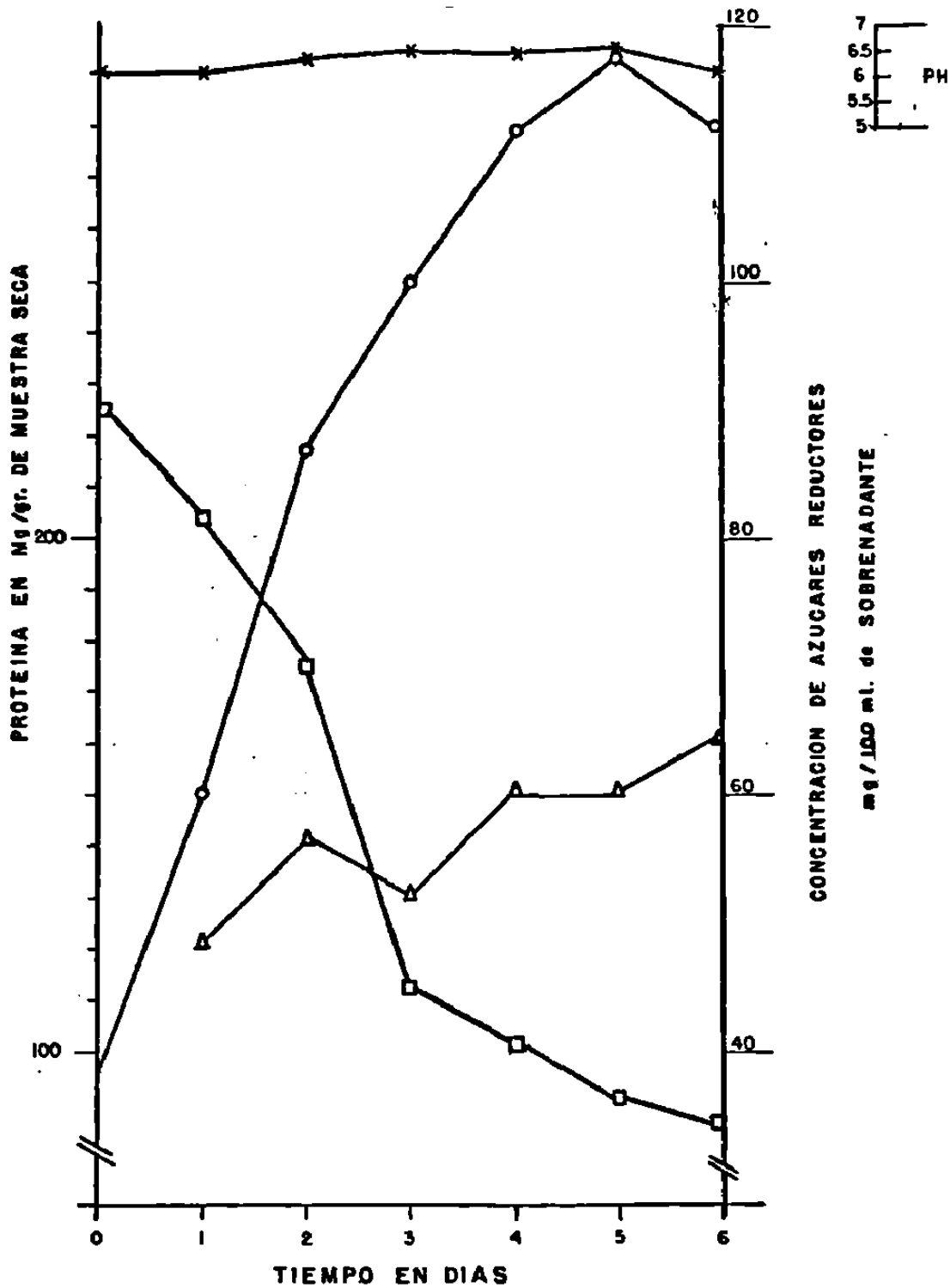


GRAFICA 1 - Efecto del pH del medio de cultivo sobre la pro-



○- CONCENTRACION DE PROTEINA UNICELULAR EN MG/gr.
DE MUESTRA SECA.

GRAFICA 2 .- Curva de producción de protefna en función del tiempo.



- ○ — CONCENTRACION DE PROTEINA UNICELULAR
- □ — CONCENTRACION DE CARBOHIDRATOS (SOBRENADANTE)
- △ — CONCENTRACION DE PROTEINA SOLUBLE
- * — CONTROL DE PH

H.- BIOGRAFIA DE LA AUTORA

La autora, originaria de Panamá, República de Panamá, nació el 4 de mayo de 1945, es hija de Crispin Cornejo Meneses y de Iluminada Montenegro de Cornejo, matrimonio formado por dos hermanos más; Rolando Anel y Marcela Judith, la Instrucción primaria fue recibida en el Colegio Internacional de Marfa Inmaculada, los estudios secundarios fueron realizados en el Colegio antes mencionado, de la capital, - Panamá. De allí pasó a la Universidad de Panamá, para cursar la Licenciatura en Biología con especialidad en Tecnología Médica. Al recibir el Título, inició la docencia en la Universidad de Panamá hasta el año 1979, que vino a Monterrey, a iniciar estudios de Maestría en Microbiología Industrial, en la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, finalizando en mayo de 1982. -- Actualmente trabaja de Profesor Temporal en la Escuela de - Biología, Universidad de Panamá, en el área de Microbiología.

