

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CORDOBA

POSTGRADO EN AGROINDUSTRIA

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES DILUCIONES DE
AGUA DE COCO SUPLEMENTADA CON BIOTINA, PARA LA
PRODUCCIÓN DE LEVADURA (*Saccharomyces cerevisiae*) A
NIVEL MATRAZ Y EN BIORREACTOR DE TANQUE AGITADO”

JACQUELINE PÉREZ RAMÍREZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA TECNOLÓGICA EN AGROINDUSTRIA

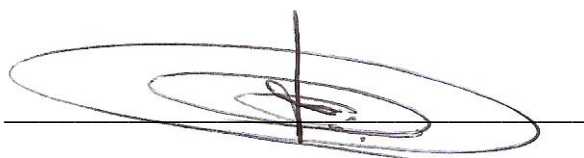
CORDOBA, VERACRUZ, NOVIEMBRE DE 2011.

La presente tesis titulada: “Evaluación del efecto de diferentes diluciones de agua de coco suplementada con biotina, para la producción de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) a nivel matraz y en biorreactor de tanque agitado”, realizada por la alumna: **Jacqueline Pérez Ramírez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRÍA TECNOLÓGICA EN AGROINDUSTRIA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ ROSAS

DIRECTOR:



DR. LEANDRO CHAIRES MARTÍNEZ

ASESOR:



DRA. KATIA ANGÉLICA FIGUEROA RODRÍGUEZ

Córdoba, Veracruz, Noviembre de 2011.

*“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES DILUCIONES DE AGUA DE COCO SUPLEMENTADA CON BIOTINA, PARA LA PRODUCCIÓN DE LEVADURA (*Saccharomyces cerevisiae*) A NIVEL MATRAZ Y EN BIORREACTOR DE TANQUE AGITADO”*

JACQUELINE PÉREZ RAMÍREZ, M.T.

Colegio de Postgraduados, 2011

En esta investigación, se evaluó el efecto de las diluciones del agua de coco y la adición de biotina sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. En este sentido, la dilución 1:1 adicionada con biotina ($\mu = 0.21 \text{ h}^{-1}$) y biomasa (3.32 g/L) fue suficiente para dar los requerimientos nutricionales a la cepa estudiada, en comparación con el agua de coco 100% ($\mu = 0.13 \text{ h}^{-1}$) y biomasa (3.28 g/L) y un medio cultivo sintético ($\mu = 0.12 \text{ h}^{-1}$) con biomasa de 2.86 g/L.

Los nutrientes disponibles en diluciones 1:2 ($\mu = 0.18 \text{ h}^{-1}$) y biomasa (2.25 g/L), podrían ser considerables para estudios posteriores; no así, las diluciones 1:5 y 1:10 que parecen inadecuadas para el óptimo crecimiento de *S. cerevisiae*.

Se observó el efecto positivo de la biotina sobre el crecimiento de las levaduras (*S. cerevisiae*). Lo más importante que se puede mencionar es que con la dilución 1:2 se obtuvo una producción de biomasa de 2.25 g/L; pero, si consideramos como unidad base un litro de agua de coco, entonces la producción neta a partir de esta unidad de volumen sería de 6.75 g/L superior a la reportada para el agua de coco al 100% con 3.28 g/L.

PALABRAS CLAVE: Cepa, medio de cultivo, biomasa.

"EVALUATION OF COCONUT WATER DILUTION EFFECT, SUPPLEMENTED WITH BIOTIN, ON YEAST PRODUCTION (*Saccharomyces cerevisiae*) IN FLASK AND STIRRED TANK BIOREACTOR"

JACQUELINE PÉREZ RAMÍREZ, M.T.

Colegio de Postgraduados, 2011

The aim of this project was to evaluate the effect of dilutions of coconut water and the addition of biotin on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. In this sense, the dilution 1:1 added with biotin ($\mu = 0.21 \text{ h}^{-1}$) and biomass (3.32 g/L) was enough to give nutritional requirements to the studied strain, compared with the 100% coconut water ($\mu = 0.13 \text{ h}^{-1}$) and biomass (3.28 g/L) and a synthetic culture medium ($\mu = 0.12 \text{ h}^{-1}$) with biomass of 2.86 g/L.

The nutrients available in dilution 1: 2 ($\mu = 0.18 \text{ h}^{-1}$) and biomass (2.25 g/L), could be considerable for further studies; not so the dilutions 1:5 and 1:10 that were inappropriate for the optimal growth of *S. cerevisiae*.

It was noted the positive effect of biotin on growth of yeast (*S. cerevisiae*). The most important thing we can mention is that with the dilution 1:2 was a production of biomass of 2.25 g/L; but if we consider a unit based on a liter of coconut water, then the net production from this would be 6.75 g/L greater than the reported for coconut water at 100% (3.28 g/L).

KEYWORDS: *Strain, culture medium, biomass production.*

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios por darme vida, salud y fuerzas para seguir adelante, por ser mi luz, al conducirme siempre por el buen camino.

Al Colegio de Postgraduados por la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría y por su apoyo en recursos materiales y económicos durante mi estancia en la institución.

Al Instituto Tecnológico Superior de Álamo Temapache por permitirme el uso de sus instalaciones, materiales y equipos utilizados para la realización de éste proyecto de investigación.

A mi director de tesis el Dr. Leandro Chaires Martínez por su asesoría y apoyo incondicional durante la elaboración de éste trabajo.

Al Dr. Francisco Hernández Rosas y la Dra. Katia Angélica Figueroa Rodríguez por su asesoría, insistencia y paciencia para la conclusión de este proyecto.

Al M.E.V. José Osorio Antonia por su colaboración, para la obtención de material biológico, fundamental para ésta investigación.

DEDICATORIA

A mis padres María Luisa y Melitón que gracias a sus consejos, palabras de aliento y cariño hicieron de mi una mejor persona.

A mis hermanos por su gran ejemplo de superación y por estar conmigo siempre en los momentos más importantes de mi vida.

De manera especial dedico este trabajo a mi esposo Alejandro por su apoyo incondicional, por su amor y por ese optimismo que siempre me impulso a seguir adelante para la conclusión de este trabajo.

De manera muy especial dedico este trabajo a mi hija alexita por ser la razón de mi existencia y por darme la fuerza para siempre seguir adelante... te amo!!! mi nena hermosa.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA.....	vi
ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	3
2.1. Hipótesis	4
2.2. Objetivos.....	5
3. MARCO TEORICO.....	6
3.1. Fermentación.....	6
3.1.1. Clasificación de las fermentaciones	6
3.2. Levaduras	9
3.2.1. Generalidades de las levaduras.....	10
3.2.2. Caracteres morfológicos de las levaduras	12
3.2.3. Propiedades fisiológicas.....	13
3.2.4. Características nutricionales	14
3.3. Coco o palma de coco (<i>Cocos nucifera L.</i>)	15
3.3.1. Clasificación taxonómica.....	17
3.3.2. Tipos de cocotero.....	18
3.3.3. Importancia económica y distribución geográfica.....	20

3.3.4. Contenido nutricional.....	21
3.3.5. Uso del agua de coco para experimentos previos.....	25
4. MATERIALES Y METODOS	27
4.1. Inoculación de <i>S. cerevisiae</i> en medio sólido	27
4.2. Preparación del medio de cultivo en matraz	27
4.3. Programa de muestreo en matraz	27
4.4. Preparación del medio de cultivo a nivel biorreactor	28
4.5. Programa de muestreo en el fermentador	28
4.6. Determinación de parámetros cinéticos de crecimiento.....	28
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

ÍNDICE DE TABLAS

	PAG.
Tabla 1. Usos industriales de las levaduras y de los productos de la levadura.....	11
.	
Tabla 2. Contenido nutricional de la copra tierna y madura.....	21
Tabla 3. Aminoácidos presentes en agua de coco.....	24
Tabla 4. Cálculos de las variables cinéticas de crecimiento para <i>S cerevisiae</i>	32
Tabla 5. Cálculos de las variables cinéticas de crecimiento para <i>S. cerevisiae</i> con el suplemento vitamínico (Sukrolito).....	35
Tabla 6. Cálculos de las variables cinéticas de crecimiento para <i>S. cerevisiae</i> con adición de biotina.....	37
Tabla 7. Cálculo de las variables cinéticas de crecimiento para fermentaciones de mayor producción de biomasa.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

	PAG.
Figura 1. <i>Cocos nucifera</i> L.....	17
Figura 2. Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en diferentes medios de cultivo: agar, agua de coco al 100%, agua de coco/ agua en diluciones 1:1, 1:2, 1:10.....	30
Figura 3. Regresión lineal de los datos cinéticos, para agar, agua de coco al 100% y de las diluciones 1:1, 1:2, 1:10.....	31
Figura 4. Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en diferentes medios con Sukrolito.....	34
Figura 5. Regresión lineal de la cinética de <i>S. cerevisiae</i> en diferentes medios con Sukrolito.....	34
Figura 6. Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en diferentes medios de cultivo en dilución 1:1, 1:2, 1:5 y 1:10, adicionados con biotina.....	36
Figura 7. Regresión lineal de la cinética para <i>S. cerevisiae</i> en diferentes medios de cultivo adicionados con biotina.....	37
Figura 8. Consumo de sustrato de <i>S. cerevisiae</i> en agua de coco al 100%.....	39

1. INTRODUCCIÓN

El uso de la fermentación con levaduras es de gran importancia en la actualidad, para sintetizar algunas vitaminas, grasas y proteínas a partir de azúcares simples. También, las levaduras han contribuido al progreso científico por ser un buen modelo para el estudio de varios procesos bioquímicos y metabólicos básicos de las células eucariontes vivas. Un caso, es el uso de levaduras del tipo *Sacharomyces cerevisiae* que son utilizadas en la fabricación del vino, cerveza y para fermentar la masa del pan. Las levaduras para su crecimiento necesitan oxígeno, fuentes de carbono orgánicas y nitrógeno mineral u orgánico, diversos minerales, temperatura y pH adecuados. Algunas, necesitan de una o varias vitaminas (tiamina, biotina, inositol, ácido pantoténico) y otros factores de crecimiento. Todas utilizan como fuente de carbono D- glucosa, D- fructosa y D-manosa. Por ejemplo en la fermentación con levaduras se utilizan sustratos como la melaza en combinación con otros nutrientes para bajar los costos de producción; por lo tanto, la búsqueda de nuevos sustratos con propiedades nutricionales elevadas se sigue dando. En el caso de México, debido a la gran diversidad biológica y de recursos naturales que no han sido explotados se pueden aprovechar diversas fuentes como medios de cultivo para el crecimiento de levaduras. Una fuente alternativa, es el agua de coco, que es un líquido presente al interior del fruto y que posee un alto contenido de carbohidratos, susceptibles de ser aprovechados para la producción de las

levaduras. Los estados productores de coco son Guerrero, Tabasco, Colima, Oaxaca, Michoacán, Jalisco, Veracruz y Campeche, que en conjunto comprenden 140 mil hectáreas en producción. En Veracruz, los principales municipios productores de coco son Tecolutla, Coatzacoalcos y Agua Dulce. Estos datos estadísticos nos indican que en México existe el potencial para el desarrollo de este trabajo de investigación y poder hacer el aprovechamiento integral a un subproducto como es el agua de coco para la propagación de levaduras como fuente alternativa y esto implicaría nuevas investigaciones tomando en cuenta que la industria alimentaría está en un constante cambio e innovando alternativas para el desarrollo de mejores tecnologías.

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

El agua de coco es un líquido turbio opaco obtenido de frutos (nueces) maduros cuando se cosechan para la copra y la obtención de aceite de coco. Este líquido es desechado a gran escala en varios países tropicales. Sin tomar en cuenta su contenido de carbohidratos en el agua como la glucosa, fructosa, sacarosa y sorbitol. Estos se encuentran en proporciones variables dando una concentración total hasta de 8%. Además, el agua de coco contiene la mayoría de nutrientes requeridos para el crecimiento microbiano a pesar de que, *a priori*, la suplementación con nitrógeno adicional parece ser esencial para maximizar los rendimientos de los microorganismos en el aprovechamiento de esta fuente de carbono.

El agua de coco constituye un peligro serio de contaminación debido a que este es vertido de la industria del cocotero hacia corrientes de agua y/o en tierras de cultivo. La demanda bioquímica de oxígeno esta comúnmente en el orden de los 40 000 mg/L y puede llegar a superar al doble este valor; por ello la importancia de transformar este desecho agroindustrial a productos con beneficios al hombre y que disminuyan el potencial como fuente de contaminación.

A nivel nacional se está incrementando la importancia del cultivo del cocotero. Por ejemplo, en el Estado de Guerrero se está implementando un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales con la finalidad de propagar clones de un híbrido enano para fomentar esta industria.

Esto nos indica que existe un gran potencial para el desarrollo de este trabajo de investigación, al existir en un futuro una gran disponibilidad de desechos de agua de coco, que hasta ahora en México poco se ha realizado para darle un uso industrial.

2.1. Hipótesis

H1: A partir de diluciones establecidas la producción de biomasa aumentará conforme se incremente la dilución desde 1:1, 1:2, 1:5 hasta 1:10 agua de coco: agua destilada. Este aumento de producción de biomasa tendrá un límite hasta que se observe el efecto de la disminución drástica de azúcares en el medio, como lo sería en la dilución 1:10.

H2: La adición de biotina en los diferentes tratamientos incrementará la producción de biomasa.

H3: La cantidad de biomasa total por litro de agua de coco utilizada como sustrato en las diluciones será mayor en comparación con el uso de solamente agua de coco.

2.2. Objetivos

Evaluar el efecto de diferentes diluciones de agua de coco suplementada con biotina, sobre la producción de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) a nivel matraz y en biorreactor de tanque agitado de 10 L.

Específicamente se tienen como objetivos:

- 1.- Llevar a cabo fermentaciones con *Saccharomyces cerevisiae* a nivel matraz y a nivel fermentador utilizando diferentes diluciones de agua de coco (1:1, 1:2, 1:5 y 1:10) con y sin biotina como sustrato.
- 2.- Determinar la cantidad de biomasa por el método de la estufa y con el de densidad óptica.
- 3.- Calcular los parámetros cinéticos t_d , μ , $Y_{x/s}$ y q_x .

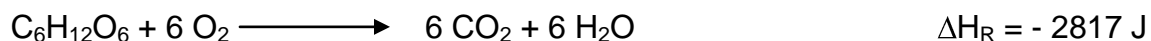
3. MARCO TEÓRICO

3.1. Fermentación

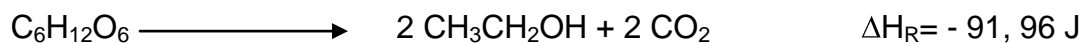
Puede definirse como el proceso metabólico que transforma los carbohidratos en alcoholes, ácidos orgánicos, aldehídos o cetonas con la formación de dióxido de carbono (Jorgensen y Hansen, 1968). Podemos también definir la fermentación como la oxidación incompleta de carbohidratos, aminoácidos y sustancias similares por la acción de los microorganismos (Sasson y Albert, 1984). El tipo de fermentación más importante es la fermentación alcohólica, en donde la acción de la levadura convierte los azúcares simples, como la glucosa y la fructosa, en alcohol etílico y dióxido de carbono. Hay otros tipos de fermentación que se producen de forma natural, como la formación de ácido butanoico cuando la mantequilla se vuelve rancia, y de ácido acético cuando el vino se convierte en vinagre (Caplán, 1997).

3.1.1. Clasificación de las fermentaciones

La participación de los microorganismos puede requerir O_2 (fermentación aeróbica). La fermentación aeróbica puede llevar la descomposición de los carbohidratos u otra sustancia fermentable hasta la oxidación completa o sea hasta obtener dióxido de carbono y agua.



En la fermentación anaerobia el microorganismo realiza la oxidación incompleta de las sustancias orgánicas a expensas de su habilidad para tomar el oxígeno de estas. En la fermentación anaerobia el microorganismo no es capaz de liberar toda la energía que puede obtenerse de su proceso respiratorio donde la oxidación es completa.



Debemos tener en cuenta que el microorganismo utiliza parte de la energía en su reproducción (asimilación de nutrientes) y el resto se libera en forma de calor, es decir que el proceso de fermentación (desasimilación) es exotérmico aspecto de gran importancia en su explotación industrial (www.cervezadeargentina.com.ar/).

Otra clasificación más bien práctica tiene en cuenta la forma de conducirse el proceso industrial y así tenemos:

a) Cultivo discontinuo o en lote (Batch). El cultivo en lote es un sistema cerrado, porque después de iniciado el proceso (al mezclar los nutrientes y el microorganismo), solo se adiciona oxígeno, antiespumantes y ácidos o bases para el control del pH. La fermentación se lleva a cabo en un periodo definido de tiempo, durante el cual varía la composición del medio de cultivo, la concentración de biomasa y los metabolitos. Después se interrumpe el proceso y se recupera el producto. Para realizar de manera exitosa la fermentación en lote, es necesario conocer la curva de crecimiento del microorganismo y saber el comportamiento de su crecimiento, para ello, se pueden manipular las condiciones de manera que se obtenga el producto deseado.

b) Sistema lote alimentado (Fed-Batch). En los procesos convencionales discontinuos que acabamos de describir, todos los sustratos se añaden al principio de la fermentación. Una mejora del proceso cerrado discontinuo es la fermentación alimentada que se utiliza en la producción de sustancias como la penicilina. En los procesos alimentados, los sustratos se añaden escalonadamente a medida que progresa la fermentación. La formación de muchos metabolitos secundarios está sometida a represión catabólica (efecto glucosa). Por esta razón en el método alimentado los elementos críticos de la solución de nutrientes se añaden en pequeñas concentraciones al principio de la fermentación y continúan añadiéndose a pequeñas dosis durante la fase de reproducción.

c) Cultivo continuo. El cultivo continuo se puede describir como un sistema abierto y, a diferencia del cultivo por lotes, se adiciona constantemente medio de cultivo fresco a los microorganismos, a una determinada velocidad, y se extrae caldo de fermentación (medio de cultivo con microorganismos y metabolitos), a la misma velocidad. Así, se logra mantener, en el reactor, una población estable de microorganismos en condiciones uniformes. En muchas fermentaciones, el compuesto de interés se produce durante la fase exponencial; al respecto, una de las ventajas del sistema continuo es que se puede mantener estable la población en esta fase por periodos prolongados de tiempo (Hernández, 2003).

3.2. Levaduras

Las levaduras son abundantes en la naturaleza; el término levadura, se asigna a un grupo de hongos unicelulares (eucariotas), la especie más estudiada es *S. cerevisiae* (*Eukaryota; Fungi/Metazoa group; Fungi; Dikarya; Ascomycota; saccharomyceta; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Saccharomycetaceae; Saccharomyces*) (NCBI, 2011) que crece en forma anaeróbica, aunque puede tener fases aeróbicas. Su rápido ciclo celular, el conocimiento de muchos de sus procesos moleculares y la secuencia de su genoma (6200 genes aproximadamente), han hecho de este organismo celular uno de los modelos más utilizados en diversas áreas de investigación biomédica (Dámaso, 2006).

3.2.1. Generalidades de las levaduras

La reproducción vegetativa tiene lugar habitualmente por gemación. En comparación con otros grandes grupos de microorganismos, las levaduras presentan escasa diversidad (39 géneros y 350 especies). Las características generales de las levaduras por las que se les diferencia entre sí, son más bien fisiológicas que morfológicas (Parés y Juárez, 2002).

Las levaduras son los microorganismos más importantes ampliamente utilizados en la industria (Tabla 1). Las levaduras se utilizan en la fermentación del pan, como fuente de alimento, en la producción de vitaminas y de diversos factores de crecimiento. La producción de biomasa y de alcohol son dos procesos que se diferencian desde el punto de vista industrial en el hecho de que el primero requiere la presencia de oxígeno para producción máxima de material celular, mientras que la fermentación alcohólica es anaerobia. Sin embargo, en casi todos los procesos industriales se utiliza una misma especie de levadura, *S. cerevisiae* (Madigan *et al.* 2006).

Tabla 1. Usos industriales de la levadura y de los productos de la levadura

Producción de biomasa	Levadura de panadería Levadura como suplemento alimenticio Levadura como pienso de animal
Productos de la levadura	Extracto de levadura para medios de cultivo Vitaminas B, Vitamina D Enzimas para la industria alimentaria
Productos de fermentación de la levadura	Etanol para alcohol industrial y como aditivo de la gasolina Glicerol
Alcohol para bebidas	Cerveza Vino
Bebidas destiladas	Güisqui Brandy Vodka Ron Cachaza

Fuente: Madigan *et al.* (2006) y Oliveira *et al.* (2008).

La clasificación de los grupos taxonómicos superiores de las levaduras señala tres principales subdivisiones reconocidas de las mismas.

- 1.- Las levaduras ascosporogenas y ascomiceticas (esporas resultantes de la cariogenia y meiosis que nacen en ascas).
- 2.- Las levaduras basidimiceticas (las esporas son el resultado de las cariogamia y meiosis que nacen en basidios).
- 3.- Las levaduras que no tienen estadios perfectos pertenecen a los hongos imperfectos (Deutoromycetos) (Pelczar *et al.* 1996).

3.2.2. Caracteres morfológicos de las levaduras

Las levaduras crecen generalmente en forma de agregados de células independientes, que pueden ser globosas, ovoides, piriformes, alargadas o casi cilíndricas. En algunos casos, forman cadenas de células alargadas, adheridas de modo suelto, semejantes a un micelio, por lo que se les denomina pseudomicelio. Algunas especies forman extensiones de verdadero micelio, con frecuencia ramificado (Pascual, 2000). Las levaduras también se diferencian en cuanto a su tamaño. Son partes observables de su estructura, la pared celular, el citoplasma, las vacuolas, los glóbulos de grasa y gránulos (Frazier y Westhoff, 1996).

3.2.3. Propiedades fisiológicas

A pesar de que las distintas especies de levaduras pueden ser muy diferentes en cuanto a su fisiología, las que tienen importancia en la industria comparten un número suficiente de actividades fisiológicas como para poder estudiarlas desde un punto de vista muy general. Las levaduras tienen requerimientos de a_w mínimos de 0.88 y 0.94. El intervalo de temperaturas de crecimiento de la mayoría de las levaduras oscila entre los 25 y 30 °C. En general, los azúcares son la fuente energética más apropiada para las levaduras aunque las oxidativas, por ejemplo las formadoras de película oxidan los ácidos orgánicos y el alcohol (Frazier y Westhoff, 1996).

La mayoría de las levaduras se reproducen asexualmente por gemación multicelular o por gemación polar mecanismo de reproducción mediante el cual una porción de protoplasma sobresale de la pared de la célula de la levadura y forma una protuberancia; esta protuberancia o yema, aumenta de tamaño y finalmente se desprende como célula de levadura neoformada. La reproducción sexual de las levaduras “verdaderas” (Ascomycotina) da lugar a la producción de ascosporas, desempeñando la función de asca la propia célula de levadura. En la mayoría de las especies de células de levaduras verdaderas, la formación de ascosporas tiene lugar tras la conjugación de dos células, aunque algunas pueden producir ascosporas sin que exista conjugación previa, teniendo lugar después la conjugación de las ascosporas o células hijas de pequeño tamaño. Tanto el

número habitual de esporas por asca, como el aspecto de las ascosporas, son típicos de cada especie de levadura. Las ascosporas se pueden diferenciar por su color, por la rugosidad o lisura de su pared, y por su forma (redondeada, ovalada arriñonada, forma de habichuela o falciforme, forma de sombrero, hemisférica, angular, fusiforme y aciculada) (Dámaso, 2006).

3.2.4. Características nutricionales

Las levaduras fermentan y asimilan la glucosa y normalmente también la sacarosa, maltosa y galactosa, no así la lactosa. No pueden utilizar como fuente de nitrógeno el nitrato. La capacidad de crecer en medios libres de vitaminas es variable, lo que implica que algunas cepas presentan auxotrofias y otras no; sin embargo, aun cuando no existan requerimientos absolutos por ellas, las vitaminas en el medio estimulan el crecimiento e incrementan la productividad. La auxotrofia más común es por biotina y algunas cepas también lo hacen por ácido pantoténico, ácido nicotínico, tiamina, inositol. Existe un requerimiento absoluto de ergosterol (precursor biológico), es una provitamina de la vitamina D, así también de otros esteroides, ácidos grasos insaturados y ácido nicotínico. En *S. cerevisiae* cuando se crece en condiciones estrictamente anaerobias, estos requerimientos no se manifiestan pero cuando la levadura crece en condiciones aerobias o microaerófilas, en presencia de oxígeno en concentraciones de por lo menos de 1 ppm, es capaz de sintetizar estos nutrimentos (García *et al.* 2004).

Seis vitaminas del grupo B han sido identificadas como factores de crecimiento de la levadura: biotina, ácido pantoténico, inositol, vitamina (B1), piridoxina (B2), niacina (pp) (Calaveras, 2004). La biotina es una vitamina hidrosoluble que corresponde al ácido carboxílico del heterociclo de condensación de los anillos de imidazol y de tiofeno hidrogenados, que puede existir en ocho isómeros diferentes, pero solo el *d*, que se encuentra en la naturaleza, tiene actividad biológica. Funciona como una coenzima en la hidrólisis y síntesis de ácidos grasos y de aminoácidos a través de reacciones de carboxilación y de transcarboxilación. Está presente en levadura de cerveza deshidratada y en diversos alimentos sobre todo en alimentos de origen animal, como hígado riñón y músculo y en los cereales (Badui, 2006).

3.3. Coco o palma de coco (*Cocos nucifera L.*)

Cocos nucifera L., conocida comúnmente como coco o palma de coco, es tal vez uno de los árboles de los trópicos mejor reconocido y uno de los más importantes económicamente. El coco crece a lo largo de las costas arenosas a través de los trópicos y en la mayoría de las regiones subtropicales. El coco, una palma alta y erecta, usualmente de 10 a 20 m de altura, posee un tronco delgado, ya sea curvo o recto, a menudo ensanchado e inclinado en la base, con una corteza parda o gris ligeramente rajada. El coco se planta extensamente por su fruto y como una planta ornamental y se usa a través de su área de distribución

como una fuente de alimento y bebida, aceite, fibra, combustible, madera y otros numerosos productos (Parrotta, 1993; Oliveira *et al.*, 2008; Walter *et al.*, 2009).

El cocotero es originario del sudeste de Asia y sigue siendo una de las regiones más importantes de cultivo de esta planta. El cocotero es una planta monocotiledónea y como tal se puede reproducir sólo por medio de semillas; puede desarrollar en cada estípula una inflorescencia que contiene flores masculinas y femeninas. Estas florecen en un solo racimo en períodos inversos, de manera que el cocotero en general es polinizado por diferentes especies de abejas, otros insectos o por el viento. En promedio el cocotero alcanza una edad de 60 años. Todas las partes componentes del cocotero son útiles.

Los cocos semimaduros (de 6-7 meses) se cosechan para el consumo inmediato (Fig. 1). Se bebe el agua de coco y se exprime la leche de la pulpa (endospermo). De los cocos completamente maduros (de 11 a 12 meses) se obtiene la "copra", que resulta de la pulpa compactada. La copra es muy rica en aceite y proteínas (65% de aceite y 25% de proteínas). El aceite de coco se exprime de la copra deshidratada, el coco rallado de copra fresca. La cáscara dura del coco se utiliza como combustible para el secado de la copra y para la elaboración de carbón activo. Las cáscaras bien pulidas sirven como relleno para materias plásticas de las cuales se elaboran botones, recipientes y otros objetos. La fibra del cocotero se utiliza en la producción de cuerdas y cordeles, en la industria de muebles tapizados, como abono orgánico o como sustituto de turba.

Las hojas y la madera sirven como material de construcción y encuentran aplicación en utensilios de uso doméstico (escobas) y también como herramientas (Augstburger, 2000).



Figura 1. *Cocos nucifera* L.

Fuente: http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/coco.htm

3.3.1. Clasificación taxonómica

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) se clasifica botánicamente como:

Clase: Monocotyledoneae.

Orden: Palmales

Familia: Palmae

Subfamilia: Cocowsideae

Género: *Cocos*

Especie: *nucifera*

3.3.2. Tipos de cocotero

Los tipos de cocoteros se clasifican en función de su altura en gigantes, enanos e híbridos y dentro de cada grupo existen un gran número de variedades de acuerdo con su localidad de origen (http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/coco.htm):

- a) Cocoteros gigantes. Son empleados para la producción de aceite y para consumo como fruta fresca, aunque su contenido de agua es elevado, el sabor es poco dulce. La polinización es cruzada, por ello existen una gran diversidad de variedades. Tiene una longevidad de 40-90 años, son robustos y prosperan en todo tipo de suelos y condiciones climáticas. Comienzan a florecer a los 8-10 años de ser plantados, siendo la producción media de frutos por planta al año es de 50-80 en variedades gigantes. Entre sus ventajas destacan el tamaño del fruto, la robustez de la planta y el contenido elevado de copra. Sin embargo, posee varios inconvenientes como: tolerante a la enfermedad conocida como Amarillamiento letal del cocotero, la fructificación tardía, la dificultad para realizar labores de cultivo por su elevado porte y la baja producción de frutos por planta. Las variedades más cultivadas son: Gigante de Malasia (GML), Gigante de Renell (GRL) de Tahití, Gigante del Oeste Africano (GOA) de Costa de Marfil, Alto de Jamaica, Alto de Panamá, Indio de Ceilán, Java Alta, Laguna, Alto de Sudán, etc.

- b) Cocoteros enanos. A diferencia de los tipos gigantes en los cocoteros enanos la autofecundación es mayor del 94%, lo que disminuye la diferenciación entre padres e hijos. Tienen una longevidad de 30-35 años. Prosperan en suelos fértiles y florecen al cuarto año de ser plantados. Las variedades más cultivadas son: Amarillo de Malasia (AAM), Verde de Brasil (AVEB) de Río Grande del Norte, Naranja Enana de la India. En variedades enanas la producción media es de 150-240 frutos por planta al año. Debido al sabor del agua, su principal uso es la producción de agua para consumo en bebidas envasadas, por el pequeño tamaño del fruto es poco atractivo para consumo como fruta fresca.
- c) Híbridos. Son el producto del cruce entre plantas del grupo de los gigantes y los enanos. Los usos de los híbridos son múltiples ya que adquieren las mejores cualidades de los padres dando como resultado frutos de tamaño de mediano a grande, buen sabor, buen rendimiento de copra, crecimiento lento, producción de frutos alta y también hereda la resistencia al amarillamiento letal del enano y mejorando la tolerancia del alto a otras enfermedades. El híbrido más cultivado es: MAPAN VIC 14, que es un cruce entre Enano Malasino y Alto de Panamá.

3.3.3. Importancia económica y distribución geográfica

En México los principales estados productores de coco son Guerrero, Tabasco, Colima, Oaxaca, Michoacán, Jalisco, Veracruz y Campeche. Los Productores de coco de estos ocho estados de la República tienen 140 mil hectáreas en producción, de las cuales 75 por ciento es para obtener aceite y el restante 25 por ciento para el consumo en fresco y para la elaboración de productos que demanda la industria de la confitería (www.sagarpa.gob.mx).

En el 2004 inició operaciones el Comité Nacional Sistema Producto Palma de Coco, en beneficio directo de 50 mil productores de coco de los estados de Guerrero, Tabasco, Colima, Oaxaca, Michoacán, Jalisco, Veracruz y Campeche, quienes laboran en 140 mil hectáreas. En el país se obtienen 150 mil toneladas de copra anuales, lo que genera una importante cantidad de empleos directos e indirectos; de este volumen de producción el 75% es para obtener aceite y el 25% restante para consumo en fresco y la elaboración de diversos productos que demanda la industria de la confitería. Los principales actores involucrados en el desarrollo del Sistema Producto Palma de Coco son 60 mil familias entre productores, transformadores e industriales que decidieron conformar finalmente este esquema de trabajo, ya que es la única manera de poder alcanzar el crecimiento de todos los eslabones que conforman la cadena productiva (<http://www.sagarpa.gob.mx>).

3.3.4. Contenido nutricional

El cocotero proporciona varios productos del fruto que son nutritivos para el humano. Sin embargo, por las posibilidades de mercado, el agua de coco, la copra tierna y madura son los más importantes. A continuación se presenta el contenido nutricional de estos productos del coco (Tabla 2). Se reporta que el agua de coco tierno, además de ser nutritiva como bebida natural, posee propiedades medicinales. Además, es considerada bacteriológicamente más segura que otras aguas. También, se reporta el poder disolvente de cálculos renales y biliares (Arancón, 1998)

Tabla 2. Contenido nutricional de la copra tierna y madura

Composición	Contenido (%)	
	Tierna	Madura
Agua	80.6	51.9
Lípidos	5.5	26.1
Carbohidratos	11.0	15.1
Cenizas	0.6	0.9
Fibra	0.9	2.1
Calcio	10 mg	32 mg
Fósforo	54 mg	96 mg
Hierro	0.7 mg	1.5 mg
Tiamina	0.07 mg	0.04 mg

Riboflavina	0.04 mg	0.03 mg
Niacina	0.9 mg	0.4 mg
Vitamina C	4 mg	3 mg
Energía	96 Kcal	293 Kcal

Fuente: FNRI, 1990.

El agua de coco es el líquido que se encuentra de forma natural en el hueco interior del fruto de coco. Tiene un color transparente, a veces un poco opaco, y se encuentra en el hueco interior, rodeado por la pulpa del coco, en la nuez del coco. Posee un sabor característico que puede variar por la especie hasta por el estado del coco (seco o fresco), también el sabor puede depender del terreno donde se encuentra la palma cocotero. Este líquido se puede preparar junto con bebidas alcohólicas o incluso tomarse solo, comúnmente con hielo. Su sabor incluso puede ser ligeramente salado, si la palma cocotero se encuentra cerca del agua de mar o bien en la costa de la playa. Los principales productos obtenidos del coco se derivan de su fruta. El agua de la fruta del coco obtenida de las frutas inmaduras se consume como una bebida nutritiva y refrescante. El agua de coco contiene azúcar, enzimas y vitaminas, incluyendo ácido ascórbico (0.70 a 3.70 mg/100 ml), ácido nicotínico (0.64 a 0.70 mg/100 ml), ácido pantoténico (0.52 a 0.55 mg/100 ml), biotina (0.02 a 0.025 mg/100 ml), riboflavina (0.01 mg/100 ml) y ácido fólico (0.003 mg/100 ml). El agua de coco maduro tiene una concentración de sólidos totales de 4 a 6%, que en un 95% son azúcares y 2% sólidos orgánicos, el resto es agua y minerales (Parrotta, 1993).

Los azúcares naturales en la forma de fructosa y glucosa son un elemento importante en el agua de los cocos tiernos. La concentración de azúcares naturales en el agua de coco aumenta considerablemente de 1.5% hasta cerca de 5.0 a 5.5% en los primeros meses de crecimiento. Este proceso comienza a decaer lentamente hasta 2% en la etapa de madurez total del coco. Es en la etapa de madurez temprana que las azúcares están en forma de fructosa y glucosa (azúcar reductor) y sacarosa (azúcar no reductor). La sacarosa sólo aparece en las últimas etapas y aumenta con la madurez del coco, mientras que los azúcares reductores decaen. En la madurez total del coco aproximadamente 90% de las azúcares totales están en forma de sacarosa.

El agua de los cocos tiernos contiene muchos minerales necesarios para nuestro cuerpo, tal como el calcio, sodio, potasio, cobre, hierro, fósforo, sulfatos y cloruros. Entre los minerales que proporcionan más de la mitad de la concentración del agua de coco está el potasio. El ambiente donde las palmas de cocos crecen influye en la concentración de los minerales.

El agua de coco contiene pequeñas cantidades de proteína. El porcentaje de alanina, arginina, cisteína y serina en la proteína del agua de cocos tiernos (Tabla 3) es mayor que el encontrado en la leche de vaca.

El agua de coco es baja en contenido graso y calorías, no tiene colesterol y posee un balance natural de sodio, potasio, calcio y magnesio, lo que la convierte en una bebida electrolítica muy estable (<http://www.conacoco.com.mx/>).

Tabla 3. Aminoácidos presentes en agua de coco.

Aminoácido	Proteína total (%)
Alanina	2.41
Arginina	10.75
Ácido aspártico	3.60
Cisteína	0.97 - 1.17
Ácido glutámico	9.76 - 14.5
Histidina	1.95 - 2.05
Leucina	1.95 - 4.18
Lisina	1.95 - 4.57
Prolina	1.21 - 4.12
Fenilalanina	1.23
Serina	0.59 - 0.91
Tirosina	2.83 - 3.00

Fuente: www.conacoco.com.mx

3.3.5. Uso del agua de coco para experimentos previos

El agua de coco se ha utilizado como objeto de estudio en diversas investigaciones. Algunos autores la han utilizado para formular bebidas rehidratantes (Falck, 2000; Marques, 2007); en tratamientos para promover su conservación (Dutta, 1995; Reddy, 2007) y evaluando su composición química y sus propiedades funcionales (Magda, 1992; Sylianco, 1992; Jackson, 2004; Sandhya, 2006). Además, se han estudiado los niveles de asepsia del agua de coco en fresco aunque no se han reportado la incidencia de *Listeria monocytogenes*, otros patógenos como *Salmonella* sp han sido detectados y encontrado algunas cuentas de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* del orden de 10^5 UFC/mL en agua de coco en fresco mantenida bajo refrigeración (Walter *et al.*, 2009).

En el área de fermentaciones, Smith (1976a), realizó un estudio sobre el uso del agua de coco y de un medio sintético a base de glucosa, fructosa, sacarosa y sorbitol para la producción de la levadura *Saccharomyces fragilis* y en otro trabajo (Smith, 1976 b), reporto el contenido nutricional de estas levaduras. De los resultados más importantes se puede comentar que el crecimiento en el poliol produce una reducida velocidad específica de crecimiento, tasa de asimilación, rendimiento celular y productividad comparada con el crecimiento en los azúcares simples. Además, demostró que la suplementación con biotina y ácido nicotínico incrementa la producción de biomasa en cultivos en quimiostatos.

En estudios más recientes, Shivakumar (2006), llevo a cabo la producción de exopolisácaridos con *Agrobacterium* cultivado en agua de coco y Peixe (2007) realizó un cultivo por micropropagación de *Olea europaea* (L.) donde reemplazo el uso de zeatina por el uso exitoso de agua de coco y BAP.

En el grupo de trabajo del Instituto Tecnológico Superior de Álamo Temapache se ha venido realizando investigación básica en el uso del agua de coco como sustrato para el crecimiento de *S. cerevisiae*. De los resultados más sobresalientes se tiene que el agua de coco resultó mejor sustrato para la producción de levaduras en comparación con un sustrato artificial a base de agar nutritivo, peptona y glucosa. Además, se encontró mayor producción de biomasa utilizando un fermentador de columna burbujeante en comparación con un fermentador de tanque agitado (Hernández, 2008; Ricabar, 2008).

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Inoculación de *S. cerevisiae* en medio sólido

Para la proliferación de *S. cerevisiae* en medio sólido se prepararon 400 mL de medio Sabourand (agar 6 g, peptona 4 g, glucosa 16 g, cloranfenicol 4 mL); se esterilizó a 121 ° C por un tiempo de 15 minutos y se sembró en caja petri un inoculó de levadura comercial (*S. cerevisiae* – Azteca S.A de C.V).

4.2. Preparación del medio de cultivo en matraz

Los cocos verdes y tiernos se recolectaron en el municipio de Tuxpan Ver. Se extrajo el agua de forma manual y se filtró en papel Whatman No. 1. Posteriormente, se prepararon medios de cultivo de 300 mL en diluciones 1:1, 1:2, 1:5 y 1:10 (agua de coco: agua), sin Biotina, con Vitamina Sukrolito (0.04%) y con Biotina (0.003%). Después, se llevó a cabo la esterilización a 121 °C durante 15 minutos, se dejaron enfriar hasta alcanzar los 30 °C y se prosiguió la inoculación con el cultivo de *S. cerevisiae* en agitación constante a 30 °C.

4.3. Programa de muestreo en matraz

Se tomaron muestras del medio de cultivo (alícuotas de 10 mL) en el tiempo cero y posteriormente cada 2 h. Para ello, se realizaron las mediciones con el uso de un espectrofotómetro (UV-VIS, de Doble Haz –Cecil®-) con lecturas a 600 nm para la determinación de biomasa por densidad óptica. Los datos de absorbancia

se correlacionaron con la ecuación de una curva de calibración de levaduras para calcular el peso seco (Hernández, 2008).

4.4. Preparación del medio de cultivo a nivel biorreactor

Se prepararon 7 litros de medio de cultivo. El medio de cultivo consistió de agua de coco: agua destilada (1:2) más Biotina (0.33 g) para colocarlo al sistema de fermentación (Biorreactor Xplora® con jarra de 10 L) y en conjunto esterilizó a 121 °C por 15 minutos y se dejó enfriar a 30 °C. Después se inoculó con la biomasa generada a nivel matraz con una densidad óptica de 0.872. Se mantuvo la fermentación a 30 °C con una agitación constante de 200 rpm.

4.5. Programa de muestreo en el fermentador

Después de la siembra en el sistema de fermentación se tomó la muestra en tiempo (0 h) y posteriormente cada (2 h), se tomaron las lecturas correspondientes en el espectrofotómetro a 600 nm de longitud de onda, para determinar biomasa.

4.6. Determinación de parámetros cinéticos de crecimiento.

Las variables cinéticas se estudiaron de acuerdo con el procedimiento de Pirt (1975). Los valores para la velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1}) y el tiempo de duplicación (td) se calcularon a partir de las fórmulas de $\ln(X)$ contra el

tiempo de fermentación. El coeficiente de rendimiento ($Y_{x/s}$) se calculó con la masa celular producida dividida por la cantidad de sustrato utilizado durante la fermentación. Las constantes de la velocidad específica para la utilización de sustrato (q_s) se determinó por la ecuación $q_s = (\mu x) (Y_{s/x})$. La velocidad específica para la formación de la masa celular (q_x) fue calculada mediante la multiplicación de la velocidad específica de crecimiento (μ) con el coeficiente del rendimiento ($Y_{x/s}$).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el objetivo de resaltar las propiedades del agua de coco como medio de cultivo y el efecto de las diluciones con agua destilada se realizó una comparación del crecimiento de levaduras contra un medio sintético de uso común formulado con agar nutritivo, peptona y glucosa (Figura 2).

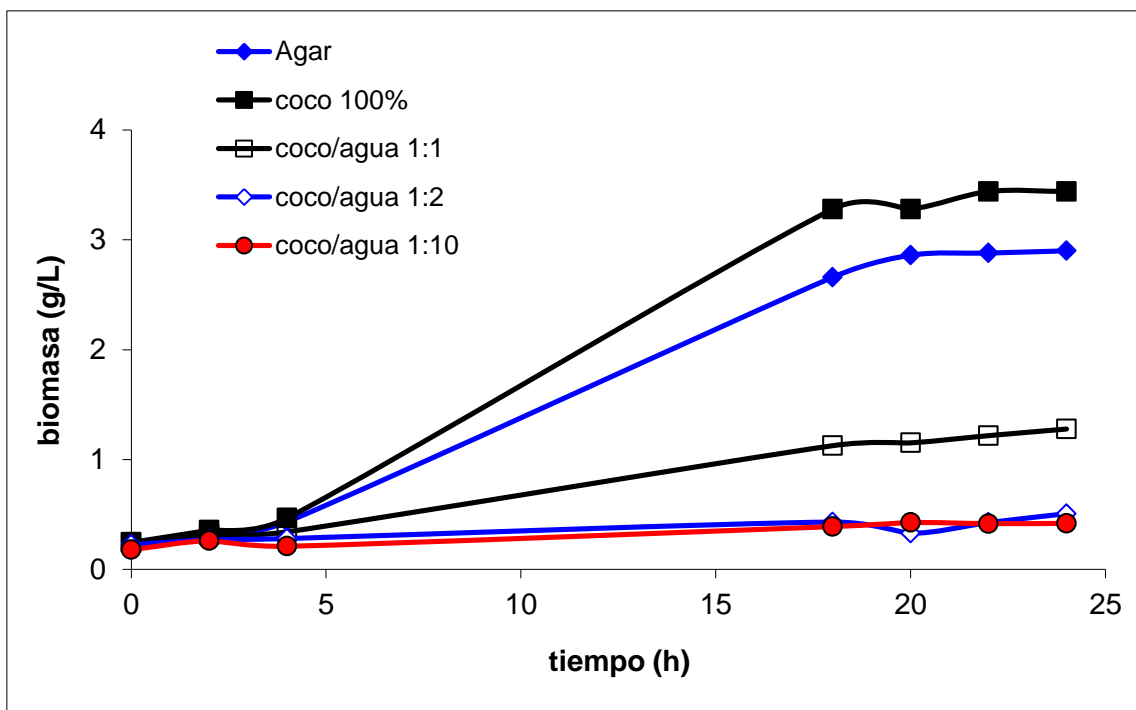


Figura 2. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* en diferentes medios de cultivo: Agar, agua de coco 100%, agua coco: agua, en diluciones 1:1, 1:2 y 1:10.

Se puede observar que *S. cerevisiae* tuvo el mejor crecimiento en agua de coco 100% seguido del medio de cultivo con agar nutritivo, peptona y glucosa alcanzando niveles de biomasa entre 4 y 3 g/L, respectivamente. Con tiempos de agitación de 18 a 25 horas. Las diluciones de agua de coco en proporciones de 1:1, 1:2 y 1:10 apenas si alcanzaron los niveles de biomasa de 1 g/L entre las 18 y 25 horas. Contrastando el crecimiento con el uso de agua de coco al 100% y no solo eso, superando el crecimiento con medios sintéticos.

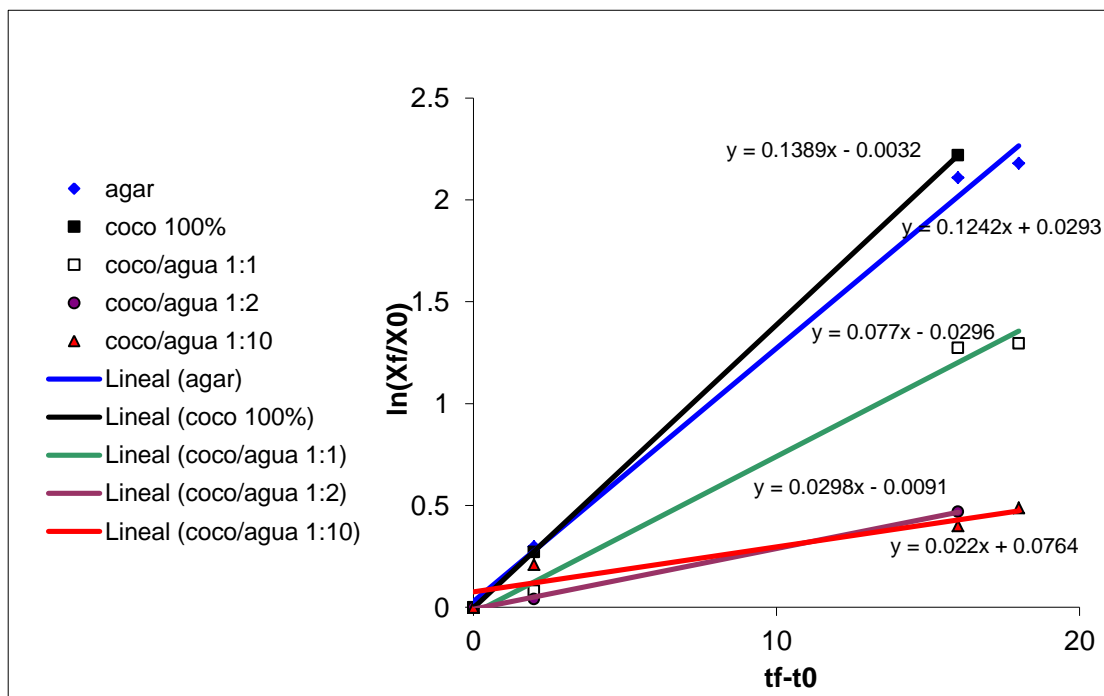


Figura 3. Regresión lineal de los datos cinéticos, para agar, coco 100 %, y de las diluciones (1:1, 1:2; 1:10)

A partir de los datos de la figura 2., se procedió a obtener las curvas de regresión lineal (Figura 3) utilizando como base para su elaboración la ecuación de cinética de crecimiento ($\ln X_f/X_0 = \mu \cdot T_f - T_0$). A partir de la regresión lineal se obtuvo la μ , velocidad específica de crecimiento y el t_d , tiempo de duplicación, tal como se observa en la tabla 4.

Tabla 4. Cálculos de las variables cinéticas de crecimiento para *S. cerevisiae*

Muestra	Biomasa (g/L)	μ (h⁻¹)	Td (h)
Agar	2.8600	0.1242	5.58
Coco 100%	3.2800	0.1389	4.99
Coco/agua 1:1	1.1518	0.077	9.00
Coco/agua 1:2	0.3286	0.029	23.9
Coco/agua 1:10	0.4260	0.022	31.5

Los resultados de la tabla 4 muestran que el agua de coco puede utilizarse como un excelente medio de cultivo, si se considera que la biomasa producida por unidad de volumen y la velocidad específica a la cual crecen las levaduras es superior a los valores encontrados en un medio sintético de uso común en laboratorios. Otros autores han reportado valores diferentes en la producción de biomasa de *Saccharomyces* utilizando otros medios de cultivo como es el caso de Mohamed *et al.* (1984), obtuvieron una biomasa de 9.4 g/L en un tiempo de 24 h, utilizando un medio más complejo que contiene glucosa anhidra, extracto de levadura, NH_4Cl , Na_2HPO_4 , $7 \text{ H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 , ácido cítrico, citrato de sodio y un antiespumante. Choi (2002), reportó una biomasa de 7.4 g/L, utilizando un medio de jugo de col. En cambio, Kong *et al.* (2007), reportó una concentración de biomasa de 0.864 g/L, utilizando solamente extracto de levadura.

En cuanto al efecto de las diluciones del agua de coco sobre el crecimiento de las levaduras, se observó que conforme aumenta la dilución, la biomasa total producida es menor (Fig. 3). Por ejemplo, en la dilución 1:1 la biomasa total fue de 1.15 g/L, aproximadamente un 60% menos que la producida en 100% de agua de coco. Sin embargo, si consideramos la producción de la biomasa tomando como medida un litro de agua de coco, en la dilución 1:1 realmente se estarían produciendo 2.3 g por cada litro de agua de coco.

En la figura 4, figura 5 y tabla 5 se muestra que los resultados cambiaron cuando a los medios de cultivo se les adicionó un complejo vitamínico (Sukrolito®) como se muestra a continuación.

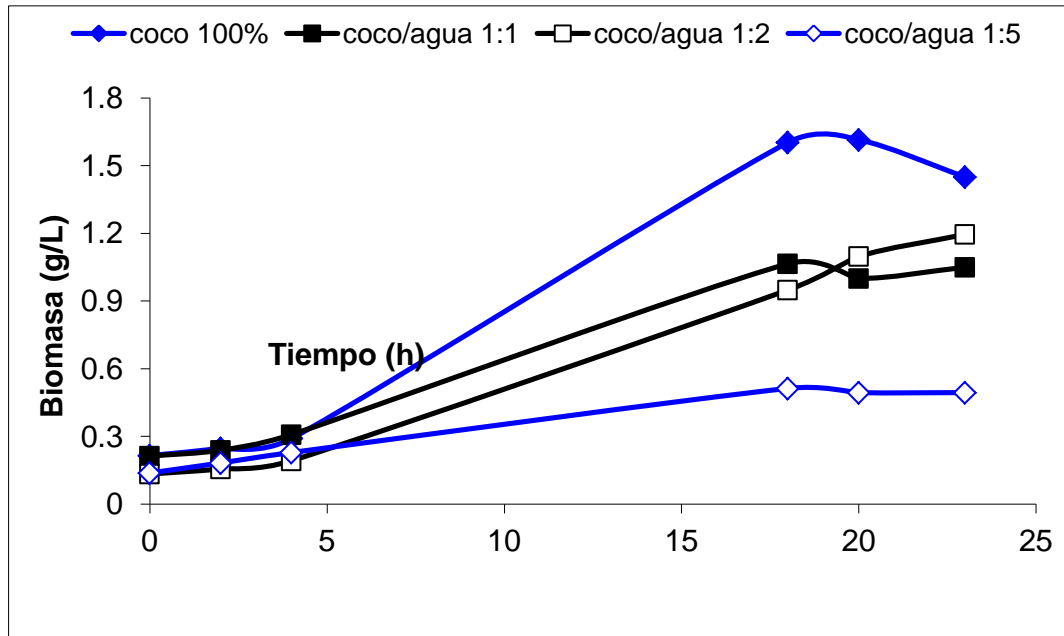


Figura 4. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* en diferentes medios con Sukrolito®.

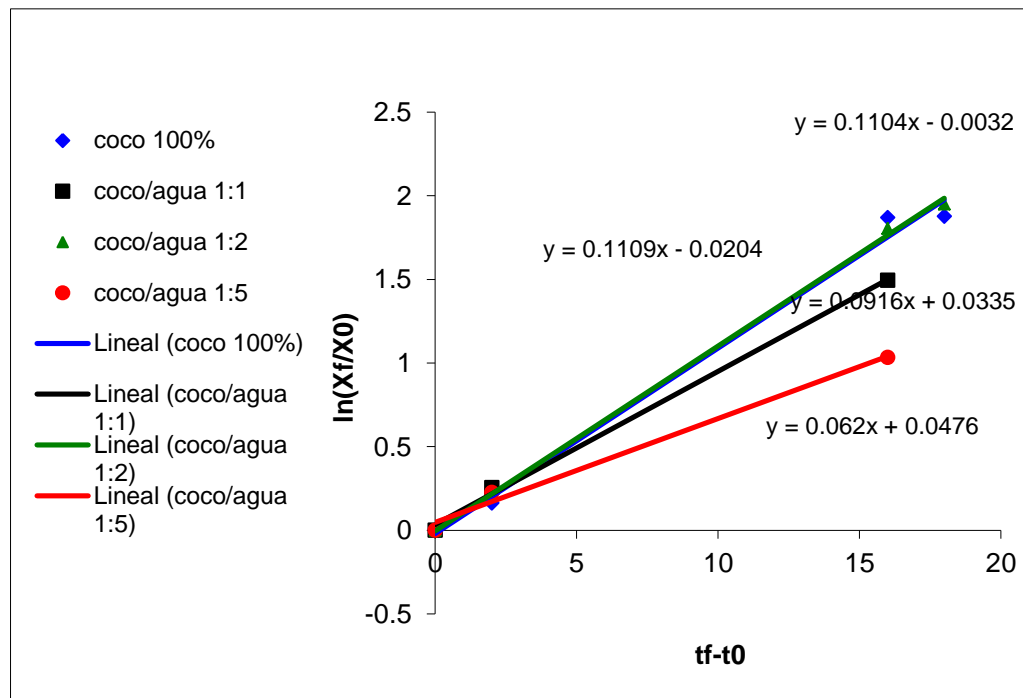


Figura 5. Regresión lineal de la cinética de *S. cerevisiae* en diferentes medios con Sukrolito®.

Tabla 5. Cálculos de las variables cinéticas de crecimiento para *S. cerevisiae* con el suplemento vitamínico (Sukrolito®).

Muestra	Biomasa (g/L)	μ (h ⁻¹)	Td (h)
Coco 100%	1.614	0.1109	6.25
Coco/agua 1:1	1.003	0.0916	7.56
Coco/agua 1:2	1.0975	0.1104	6.27
Coco/agua 1:5	0.4942	0.062	11.17

En estos resultados se aprecia, que el complejo vitamínico tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento en mayoría de las muestras. Sin embargo, se puede resaltar que con la adición del complejo vitamínico incremento la producción de biomasa en la dilución 1:2, siendo comparable con la dilución 1:1. Pero no comparables con lo encontrado en el medio de cultivo con agar y agua de coco 100%, sin Sukrolito® que fue superior a lo encontrado en éste experimento.

Finalmente, se muestran los resultados de las fermentaciones en las que se incluyó biotina, y se observa que se tuvieron efectos favorables en el crecimiento de *S. cerevisiae* (Figura 6, Figura 7 y Tabla 6).

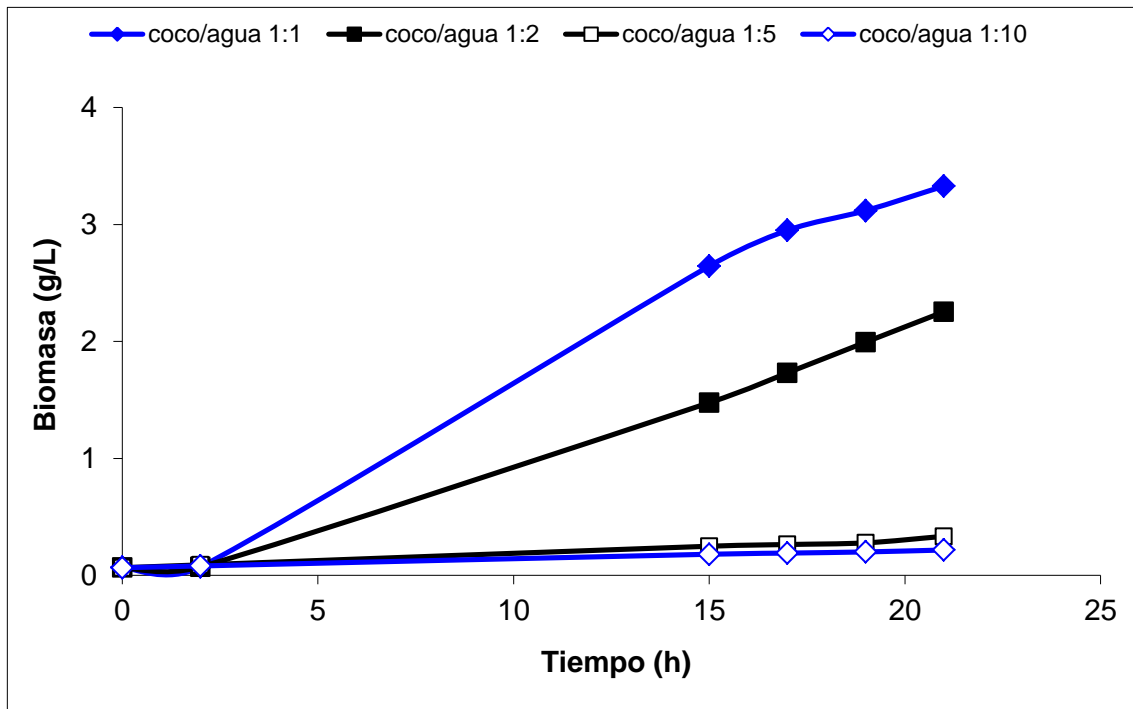


Figura 6. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* en diferentes medios de cultivo, dilución 1:1,1:2,1:5 y 1:10 adicionados con biotina.

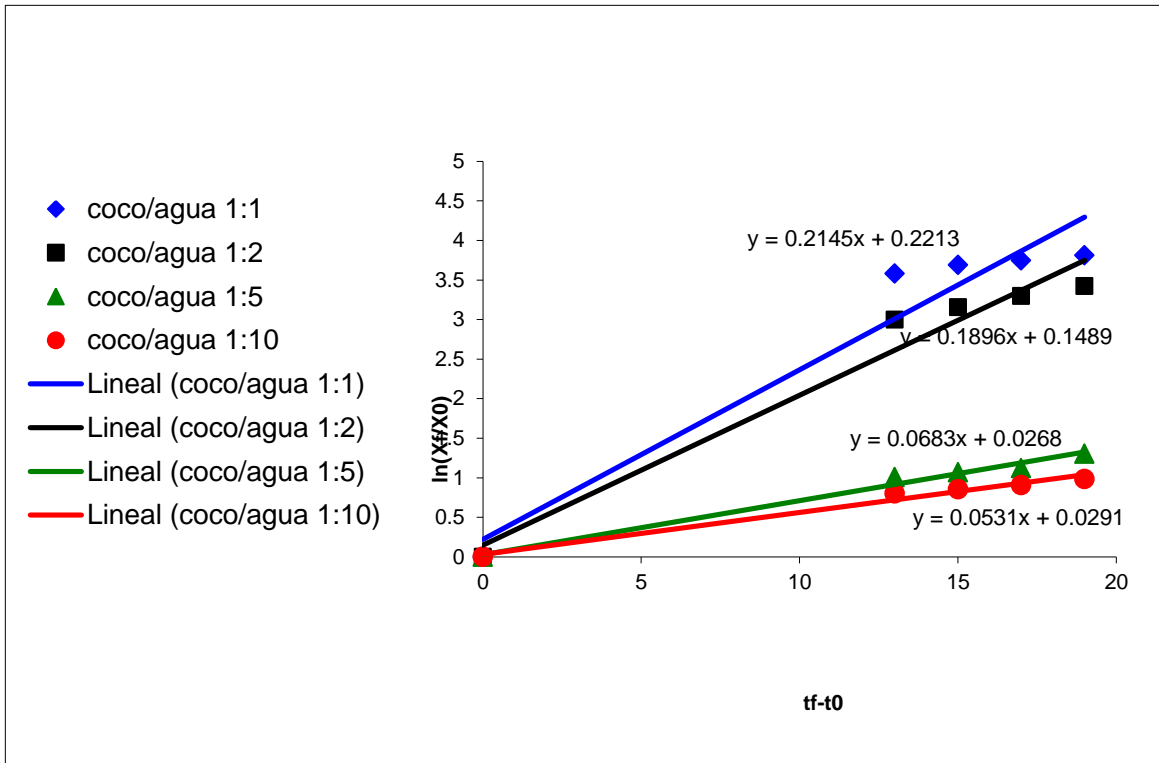


Figura 7. Regresión lineal de la cinética para *S. cerevisiae* en diferentes medios de cultivo adicionados con biotina.

Tabla 6. Cálculos de las variables cinéticas de crecimiento para *S. cerevisiae* con adición de biotina.

Muestra	Biomasa (g/L)	μ (h^{-1})	Td (h)
Coco/agua 1:1	3.3286	0.2145	3.23
Coco/agua 1:2	2.2545	0.1896	3.65
Coco/agua 1:5	0.3347	0.0683	10.14
Coco/agua 1:10	0.2176	0.0531	13.05

En los resultados contenidos en la tabla 6. se observó el efecto positivo de la biotina sobre el crecimiento de las levaduras (*S. cerevisiae*) Lo más importante que se puede mencionar es que con la dilución 1:2 se obtuvo una producción de biomasa de 2.25 g/L; pero, si consideramos como unidad base un litro de agua de coco, entonces la producción neta a partir de esta unidad de volumen sería de 6.75 g/L superior a la reportada para el agua de coco al 100% (3.28 g/L) (Tabla 4).

Con el objetivo de obtener más datos cinéticos de crecimiento, se realizó una cinética de consumo de sustrato con respecto al crecimiento de la levadura (Figura 8). Se muestra que la glucosa inicial (55 g/L) al tiempo 0 y hasta las 6 h se mantiene constante. Esto se debe a que en esta fase aún no hay crecimiento celular acelerado, por lo tanto la cantidad de azúcares permanece constante. Cuando empieza el crecimiento celular, empieza a bajar la concentración de azúcar en el medio hasta llegar a las 28 h. Podemos observar que el aumento de la biomasa hasta las 16 horas es de 3.15 g/L y que coincide con un consumo de sustrato hasta 42 g/L, consumiendo aproximadamente 13 g/L de sustrato. También, se puede observar en la gráfica, que el consumo con relación a la biomasa, las levaduras alcanzan su máximo crecimiento y que no se ha consumido todos los azúcares, ya que solamente ha consumido 13 g/L (Figura 8).

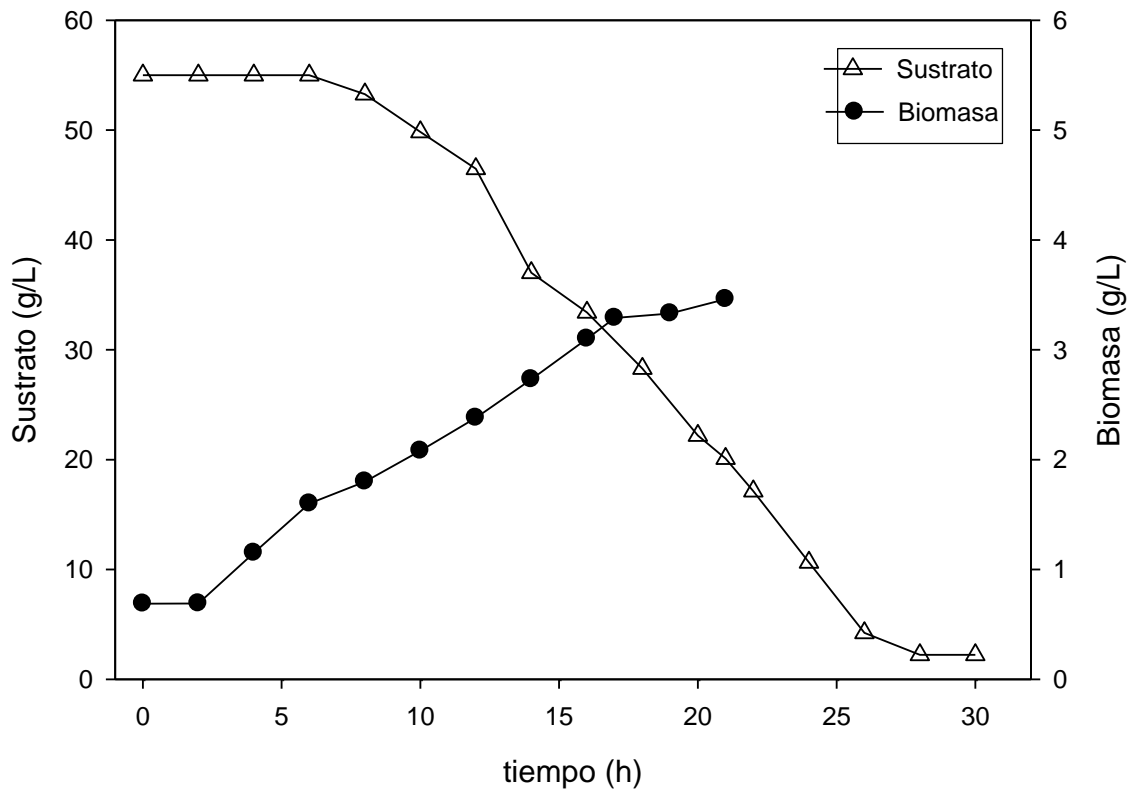


Figura 8. Consumo de sustrato de *S. cerevisiae* en agua de coco al 100%.

En la Tabla 7 se muestran los datos cinéticos obtenidos únicamente para las fermentaciones de mayor producción de biomasa obtenidas en éste trabajo (agar, coco 100%, coco 100% con Sukrolito®, coco/agua 1:1 con biotina, coco/agua 1:2 con biotina).

Tabla 7. Cálculos de las variables cinéticas de crecimiento en fermentaciones de mayor producción de biomasa (*S. cerevisiae*)

Muestra	Biomasa (g/L)	μ (h ⁻¹)	td (h)	Sustrato (g/L)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{s/x}$ (g/g)	q_s	q_x
Agar	2.86	0.1242	5.58	11	0.26	3.84	0.47	0.032
Coco 100%	3.28	0.1389	4.99	13	0.25	3.96	0.55	0.034
Coco 100% con Sukrolito ®	1.614	0.1109	6.25	6.5	0.24	4.02	0.44	0.026
Coco/agua 1:1 con biotina	3.3286	0.2145	3.23	13	0.25	3.9	0.83	0.053
Coco/agua 1:2 con biotina	2.2545	0.1896	3.65	10	0.22	4.43	0.83	0.041

Se muestra que en la fermentación utilizando la relación 1:1, la velocidad de crecimiento de las células (μ) es mayor, ya que se obtuvo un valor de 0.2145 h^{-1} , mientras que el tiempo de duplicación de las células (t_d) es menor indicando que las levaduras se reproducen más rápido en comparación con los otros tratamientos, obteniendo un rendimiento ($Y_{x/s}$) mayor (0.25 g/g). A mayor velocidad específica de crecimiento y rendimiento, el tiempo de duplicación es mucho menor. En comparación con otros autores, Mehaia (1984), quien utilizó un medio más complejo, obtuvo una velocidad específica de crecimiento de 0.22 h^{-1} ; y Kong *et al.* (2007), reportó una velocidad específica de crecimiento de 0.32 h^{-1} , utilizando un medio de extracto de levaduras (tabla 7).

Como se puede observar en la Tabla 7, la dilución 1:1 adicionada con biotina mostró valores significativamente iguales de producción de biomasa (3.32 g/L) comparada con agua de coco al 100%; sin embargo, la velocidad específica de crecimiento (0.21 h^{-1}) es superior en la dilución 1:1 y se obtuvo un menor tiempo de duplicación (3.2 h). Ojokoh (2005), encontró que el crecimiento de *S. cerevisiae* en un extracto de papaya preparado con 200 mL de agua destilada es mayor que con el extracto sin diluir; y en los tratamientos con mayor dilución (400 y 600 mL de agua destilada) el crecimiento fue menor. Ayanru (1985), encontró efectos similares utilizando un jugo de papaya. Estos resultados indicaron que el aumento en el crecimiento celular con la dilución se debe a una presión osmótica más favorable y la disminución del crecimiento en las diluciones más altas se debe a la

reducción de los azúcares disponibles, de otros nutrientes y de factores de crecimiento (Reade, 1975; Benbadis *et al.* 2009).

En otros trabajos, Smith (1976 a), reportó una μ de 0.11 h^{-1} cuando creció *S. fragilis* en un medio con sorbitol y una μ de 0.36 h^{-1} en un medio con glucosa. El mismo autor reportó una μ de 0.72 h^{-1} utilizando agua de coco al 100%; las diferencias con el presente proyecto pueden deberse a la levadura utilizada, ya que *S. fragilis* tiene una mayor capacidad de aprovechar los azúcares encontrados en el agua de coco (Smith, 1976 a). Además, *S. fragilis* es una levadura negativa al efecto Crabtree mientras que *S. cerevisiae* es positiva; esto significa que *S. fragilis* produce únicamente bajas concentraciones de etanol bajo condiciones aerobias (Johnson, et al. 1972). Su metabolismo respiratorio es normalmente más activo que su metabolismo fermentativo (Chassang *et al.* 1973).

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados de la presente investigación permiten obtener tres conclusiones principales:

Los nutrientes esenciales presentes en agua de coco permiten el crecimiento y metabolismo normal de *S. cerevisiae*, de ahí que sea una alternativa atractiva como un sustrato económico para fermentaciones.

En esta investigación, el efecto de las diluciones del agua de coco y la adición de biotina sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. Resultó que la dilución 1:1 adicionada con biotina ($\mu = 0.21 \text{ h}^{-1}$) y biomasa (3.32 g/L) fue suficiente para dar los requerimientos nutricionales a la cepa estudiada, en comparación con el agua de coco 100% ($\mu = 0.13 \text{ h}^{-1}$) y biomasa (3.28 g/L) y respecto al medio cultivo sintético ($\mu = 0.12 \text{ h}^{-1}$) con biomasa de 2.86 g/L.

En cambio, los nutrientes disponibles en diluciones 1:2 ($\mu = 0.18 \text{ h}^{-1}$) y biomasa (2.25 g/L), podrían ser considerados para estudios posteriores; no así, las diluciones 1:5 y 1:10 que son inadecuadas para el óptimo crecimiento de *S. cerevisiae*.

La recomendación sugiere, que para optimizar la producción de biomasa es necesario estandarizar la temperatura, pH, velocidad de agitación, aireación y los nutrientes que permitan el escalamiento del proceso.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Arancon, R. 1998. Young Tender Coconut. En: Cocioinfo Internacional. Asian Pacific Coconut Community (APCC). 5 (2):12-14. Jakarta, Indonesia. 45 p.
- ❖ Augstburger, F. 2000. Agricultura Orgánica en el Trópico y Subtrópico; Guías de 18 cultivos; Coco Asociación Naturland - 1ª edición. pp:1
- ❖ Ayanru, D. 1985. Effect of the quality and type of microorganism on ethanol production from pawpaw. *Energy* 10(9): 1009-1016.
- ❖ Badui, D.S. 2006. *Química de los Alimentos*. Editorial Pearson Addison Wesley. México. 384 p.
- ❖ Benbadis, L.; Cot, M.; Rigoulet, M. y Francois, J. 2009. Isolation of two cell populations from yeast during high-level alcoholic fermentation that resemble quiescent and nonquiescent cells from the stationary phase on glucose. *FEMS Yeast Res* 9: 1172–1186.
- ❖—Calaveras, J. 2004. *Tratado de Panificación y Bollería*. Editorial Mundi-Prensa. España. 140 p.
- ❖ Caplan, P. 1997. Food, Health, and Identity. Ed. Routledge. Great Britain. 172 p.
- ❖ Chassang, A.; Ladet, J.; Boze, H.; Galzy, P. 1973. Respiratory metabolism of *Kluyveromyces fragilis*. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* 13(3): 193-199.

- ❖ Dámaso, C.S. 2006. *Biogerontología*. Editorial Publicaciones de la Universidad de Cantabria. España.137 p.
- ❖ Falck, D.C.; Thomas, T.; Falck, T.M.; Tutuo, N.; Clem, K. 2000. The intravenous use of coconut water. *American Journal of Emergency Medicine* 18: 108-111.
- ❖ Frazier, W. C. y Westhoff. D.C. 2000. *Microbiología de alimentos*. Editorial. Acribia, S.A. España. 41-43p.
- ❖ García, G., Quintero, R. y López, M. 2004. *Biotecnología Alimentaria*. Editorial. Limusa. México. 267 p.
- ❖ Hernández, A. 2003. *Microbiología Alimentaria*. Editorial Euned. Costa Rica. 50 p.
- ❖ Hernández, S. 2008. Evaluación de la cinética de crecimiento y consumo de sustrato en la fermentación aerobia de *Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus spp.* utilizando agua de coco como sustrato en un fermentador de columna burbujeante. Tesis de Licenciatura. . ITSAT; Veracruz, México. 60 p.
- ❖ Jackson, J.C.; Gordon, A.; Wizzard, G.; McCook, K. Rolle, R. 2004. Changes in chemical composition of coconut (*Cocos nucifera*) water during maturation of the fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84(9):1049-1052.
- ❖ Johnson, B.; Nelson, S. J.; Brown, C.M. 1972. Influence of glucose concentration on the physiology and lipid composition of some yeast. *Antonie van Leeuwenhoek* 38(2): 129-136.

- ❖ Jorgensen- Hansen.1968. Microbiología de las fermentaciones industriales. Editorial. Acribia. España. 35p.
- ❖ Kong, Q.-X.; Cao, L.-M.; Zhang, A.-L. y Chen, X. 2007. Overexpressing GLT1 in *gpd1Δ* mutant to improve the production of ethanol of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiol Biotechnology* 73: 1382-1386.
- ❖ Madigan, M. T.; Martinko, J. M. y Parker, J. 2006. *Biología de los Microorganismos*. Editorial. Pearson Prentice Hall. España. 956 p.
- ❖ Magda, R.R (1992). Coco-soft drink: health beverage from coconut water. *Food Marketing & Technology* 6: 22-23.
- ❖ Marques, J.; Arres, G.; Wilane, R.; Sausa, E.; Rordrigues, S. 2007. Development of a blended beverage consisting of coconut water and cashew apple juice containing caffeine [electronic resource]. *International Journal of Food Science & Technology* 42(10): 1195-1200.
- ❖ Mohamed, A.; Munir C. 1984. Ethanol production in a hollow fiber bioreactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 20: 100-104.
- ❖ Ojokoh, A. 2005. Production of *Saccharomyces cerevisiae* biomass in papaya extract medium. *African Journal of Biotechnology* 4(11): 1281-1284.
- ❖ Oliveira, V. A.; Vicente, M. A.; Fietto, L. G.; Castro, I. M.; Coutrim, M. X.; Schüller, D.; Alves, H.; Casal, M.; Santos, J. O.; Araújo, L. D.; da Silva, P. H. A. y Brandão, R. L. 2008. Biochemical and Molecular Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Obtained from Sugar-Cane Juice

Fermentations and Their Impact in Cachaça Production. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (3): 693-701.

- ❖ Pascual, A.D. y Calderón, P.V. 2000. *Microbiología Alimentaria*. Editorial Diazdesantos. España. 142 p.
- ❖ Parés, R. y Juárez, A. 2002. *Bioquímica de los Microorganismos*. Editorial. Reverté. España. 40p.
- ❖ Parrotta, J. 1993. *Cocos nucifera* L. Coconut, coconut palm, palma de coco. SO-ITFSM-57. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 7 p.
- ❖ Pelczar, M. J., Reid, R. D. y Chan E. C. S. 1996. *Microbiología*. Editorial. McGraw-Hill. México. 273 p.
- ❖ Peixe, A. 2007. Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. *Scientia Horticulturae*. 113: 1-7.
- ❖ Pirt, S.J., 1975. *Principles of Microbes and Cell Cultivation*. 2da. Edición. Blackwell Scientific Corporation, London. 116 p.
- ❖ Reade, A. 1975. High temp, production of enriched feed from cassava by fungi. *Appl. Microbiol.* 30(6):897-903.
- ❖ Reddy, K.V.; Das, M.; Das, S.K. 2005. Filtration resistances in non-thermal sterilization of green coconut water. *Journal of food engineering* 69(3): 381-385.
- ❖ Ricabar, A. 2008. Evaluación de la cinética de crecimiento y consumo de sustrato en la fermentación aerobia de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando

- agua de coco como sustrato. Tesis de Licenciatura., ITSAT; Veracruz, México. 55 p.
- ❖ Sandhya, V. 2006. Beneficial effects of coconut water feeding on lipid metabolism in cholesterol-fed rats. *Journal of Medicinal Food* 9(3): 400-407.
 - ❖ Sasson, A. 1984. La biotecnología: desafíos y promesas. Centro de Investigaciones Biológicas. La Habana, Cuba. 33p.
 - ❖ Shivakumar, S. 2006. Production of exopolysaccharides by *Agrobacterium* sp. CFR-24 using coconut water - a byproduct of food industry. *Letters in Applied Microbiology* 42(5): 477-482.
 - ❖ Smith, M. 1976a. Studies of the utilization of coconut water waste for the production of the food yeast *Saccharomyces fragilis*. *Journal of Applied Bacteriology* 41: 81-95.
 - ❖ Smith, M. 1976b. Protein and other compositional analyses of *Saccharomyces fragilis* grown on coconut water waste. *Journal of Applied Bacteriology* 41: 97-107.
 - ❖ Sylianco, C. Y. ; Balboa, J.; Casareno, R.; Mallorca, R. Serrame, E. 1992. Antigenotoxic effects of coconut meat, coconut milk, and coconut water. *Philippine Journal of Science* 121: 231-253.
 - ❖ Walter, E. H. M; Kabuki, L. Y; Esper, L. M. R.; Sant'Ana, A. S. y Kuaye, A. Y. 2009. Modelling the growth of *Listeria monocytogenes* in fresh green coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Food Microbiology* 26(6): 653-657.

SITIOS WEB CONSULTADOS:

❖ www.sagarpa.gob.mx

Fecha de consulta: (15/02/2010)

❖ www.cervezadeargentina.com.ar/articulos/algosobrelevaduras.htm

Fecha de consulta: (16/02/2010)

❖ http://www.conacoco.com.mx/coco/nueva/consume_coco/consume_coc.htm

Fecha de consulta: (23/03/2010)

❖ http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/coco.htm

Fecha de consulta: (26/03/2010)