



## CAPÍTULO VI

### Métodos y Materiales

#### 6.1 MATERIA PRIMA Y MATERIALES DE TRABAJO

##### 6.1.1 Microorganismo

Se utilizará el microorganismo levadura *Candida utilis* obtenida del Departamento de Bioingeniería y Biotecnología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, clasificada en el catálogo de cultivos microbianos con 1-246 (*Torulopsis utilis* var. mayor). Con especificación de producción de proteína unicelular a partir de forraje. El microorganismo se propaga inicialmente en el medio YM (CINVESTAV, 1982) en tubo inclinado a temperatura de 37° C durante 48 hrs.

##### 6.1.2 Materia Prima

Se utilizará cascarilla de café obtenida como subproducto del proceso de producción en el proceso de beneficiado del mismo en el rancho “la Herradura” localizado en la región de Coatepec en el Edo. de Veracruz.

##### 6.1.3 Nutrientes

A un kilogramo de cascarilla de café se adicionan 14g de nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), los cuales serán utilizados como fuente de nitrógeno; 1g de fosfato diácido de potasio ( $\text{K}_2\text{PO}_4$ ) y 1 g de sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) como nutrientes disueltos en agua destilada.

##### 6.1.4 Sistema de Producción del Inóculo

Se desarrolla la levadura sobre caldo maltosa en matraces agitados manualmente a temperatura de 37° C proporcionada por una estufa; la homogenización y oxigenación del medio de cultivo son aportadas por el sistema de agitación. El proceso se da por terminado una vez que se alcanza la concentración celular máxima en un periodo de experimentación de 72 h para la producción a nivel laboratorio.



### 6.1.5 Sistema de Crecimiento de Levadura

Este proceso se realiza en bandejas plásticas de 0.1\*0.14\*0.07 m. Una vez que se han adicionado agua y los nutrimentos necesarios para el crecimiento celular se coloca el sustrato en las bandejas y se esteriliza. Ya esterilizado, se inocula el medio de cultivo con el microorganismo deseado en condiciones asépticas. El proceso de crecimiento del microorganismo se desarrolla en condiciones no asépticas y a temperatura ambiente, la homogenización y aireación del medio de cultivo se realiza en forma manual cada 12 hrs. El proceso se da por terminado al séptimo día de experimentación.

### 6.1.6 Medio YM

Se disuelven en un litro de agua destilada los siguientes compuestos:

Extracto de levadura	3.0 g
Extracto de malta	3.0 g
Peptona	5.0 g
Glucosa	10.0 g
Agar	2.5 %

### 6.1.7 Medio Caldo de Maltosa Sabouraud

En un litro de agua destilada se disuelven los siguientes compuestos:

Peptona de caseína	5.0 g.
Peptona de carne	5.0 g.
Maltosa	40.0 g.

El cual está especificado para el desarrollo de levaduras, mohos y bacterias acidófilas, así como para la investigación de levaduras y mohos en las pruebas de esterilidad. En este medio el crecimiento de mohos se parece a esferas de algodón más o menos grandes; se modifican y adoptan la forma de capas membranosas mientras que el crecimiento de levaduras o bacterias se manifiesta por turbidez homogénea que se reconoce por investigación microscópica (BioCen, 2006).



Para las pruebas en medio caldo maltosa enriquecido fueron agregados a la composición anterior los siguientes componentes: 0.1 g de extracto de levadura y 0.1 g de glucosa por litro de medio.

### 6.1.8 Medio Agar PDA (Papa-glucosa)

En un litro de agua destilada se disuelve:

Infusión de patata	4.0 g.
D(+)-glucosa	20.0 g.
Agar-agar	15.0 g.

Para identificación, cultivo y recuento de levaduras y hongos, como dice la Secretaría de salud (2004).

## 6.2 Métodos Analíticos

### 6.2.1 Determinación de Humedad

Para la determinación de la humedad se utilizará el método 30.006 reportado en el AOAC (1984). La preparación de los recipientes o bandejas de aluminio para la determinación de la humedad será la siguiente: una vez lavados los recipientes se les adiciona arena lavada y un bastón de vidrio, para luego colocarlos en la estufa a 110° C durante un periodo de 12 hrs., una vez transcurrido ese tiempo se colocan en un desecador por un tiempo promedio de 30 minutos, hasta alcanzar pesos constantes. Luego se agregan 2 g. aprox. de muestra triturada. Y se determina el peso inicial, la cual se mezcla con la arena con la ayuda del bastón de vidrio, y se introducen a la estufa durante 24 hrs; finalmente se introducen a un desecador hasta alcanzar peso constante, peso final. El porcentaje de humedad se calcula por la diferencia de peso, y se expresa en unidades de

$\frac{\text{g AGUA}}{\text{g MUESTRA}} \times 100$ , con la siguiente fórmula:

$$\% H = \frac{(w_i - w_f) * 100}{w_f}$$

Donde:

%H = porcentaje de humedad,

w<sub>i</sub> = peso inicial

w<sub>f</sub> = peso final



## 6.2.2 Cuenta Celular

El recuento celular se hace por la cuantificación de microorganismos mediante el número de viables en placa. Esta técnica se logra sembrando pequeñas alícuotas de diluciones adecuadas del cultivo original sobre placas de Petri con medio sólido, que en este caso es agar PDA, (patata glucosa), especificado para células de levaduras y hongos. Cada célula viable dará origen a una colonia visible después del tiempo adecuado de incubación, aproximadamente de 48 hrs. Contando las colonias visibles, teniendo en cuenta la dilución de la que proceden y el volumen de alícuota utilizado, se deduce el número de células viables en la suspensión original, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{No. células} = (\text{No. células en la caja petri}) * (\text{factor de dilución})$$

Para el recuento se eligen placas que contengan entre 30 y 400 colonias típicas.

### 6.2.2.1 Diluciones

Con el método mencionado de cuenta celular es necesario en la mayoría de puntos diluir la muestra. Es conveniente hacer varias diluciones decimales seriadas. Así para hacer una dilución de  $10^{-1}$  se mezclaría 1ml de cultivo con 9ml de diluyente (agua peptonada) cuyo factor de dilución es 1; si repetimos lo mismo con esta dilución obtendríamos una dilución de 100 veces, para este caso el factor de dilución es 2. De esta forma obtendremos valores más exactos y reales (Madigan, et al., 1999).

### 6.2.3 Determinación de pH

Se mide sobre una suspensión 1:1 de la muestra en agua destilada con ayuda de potenciómetro Beckman previamente calibrado.

### 6.2.4 Determinación de Azúcares Totales

Se utilizó el método volumétrico de Lane y Eynon descrito en el apartado 31.036 del AOAC (1984), el cual se basa en la determinación del volumen conocido de un reactivo alcalino de cobre. El punto final se determina por el uso de un indicador interno (azul de metileno), el cual es reducido a blanco de metileno por un exceso de azúcares reductores.



El procedimiento se divide en tres etapas básicas:

a. Clarificación: se toman 10 g de muestra y se colocan en un matraz volumétrico de 250 ml, se adicionan 100 ml de agua destilada y se agita vigorosamente, posteriormente se adicionan 2 ml de acetato de plomo al 45% y 1.7 ml de oxalato de potasio al 22%. La mezcla se agita perfectamente y se lleva a volumen. Finalmente la solución se filtra con ayuda del papel filtro de paso rápido.

b. Hidrólisis: se toma un alícuota de 100 ml de la solución obtenida en el proceso de clarificación y se colocan en un matraz volumétrico de 250 ml, luego se adicionan 5 ml de HCl concentrado y se realiza una agitación de la solución. Posteriormente se introduce un termómetro al matraz y se somete a la acción de un baño María en agua en ebullición, donde se debe mantener la temperatura de la solución a 63° C por 3 minutos al menos. Transcurrido el tiempo de hidrólisis se saca el matraz y se enfría al chorro de agua para después neutralizar el ácido agregado con sosa al 40%. Finalmente se agita la solución, se engría y se lleva a volumen. Neutralización del ácido: en cada uno de tres matraces Erlenmeyer se colocan 5 ml de ácido clorhídrico concentrado con ayuda de una pipeta volumétrica, se adicionan 20 ml de agua destilada y unas gotas de fenolftaleína al 0.1 % y se procede a titular con sosa al 40%. El promedio del volumen de sosa gastado para neutralizar el ácido es el que se adiciona para la neutralización después de la hidrólisis.

c. Titulación: se mezclan inmediatamente antes de usar 5ml de la solución Fehling A con el correspondiente volumen de la solución de Fehling B dentro de un matraz Erlenmeyer de 250 ml, se adicionan 50 ml de agua destilada y perlas de ebullición. Posteriormente se coloca el matraz sobre una parrilla de calentamiento hasta que se produzca una ebullición vigorosa, en este momento se principia la titulación con la solución obtenida de la hidrólisis con ayuda de una bureta, este proceso se realiza hasta que se forme un precipitado rojo y una ligera coloración azul, en ese momento se agregan 5 gotas de azul de metileno al 0.2% y se termina la titulación hasta llegara a la aparición de un precipitado rojo y la desaparición total de la tonalidad azul.

La primera titulación se realiza en forma tentativa, en la siguientes se adiciona casi todo el volumen gastado en la primera titulación y las gotas del indicador desde el inicio, cuando la solución empiece a ebullicir se termina de titular. Se deben realizar las titulaciones necesarias hasta que la diferencia entre cada uno de los volúmenes gastados no sea mayor de 0.2 ml. Por otra parte el gasto del titulante adecuado debe estar entre 15 y 50 ml, en caso de que el gasto sea



menor, se debe realizar una dilución de la solución titulante, por el contrario se el gasto es mayor, se deben tomar volúmenes de las soluciones de Fehling menores.

La concentración de azúcares presente en la muestra se cuantifica en g de azúcar/100 g de muestra y se calculan:

$$\% \text{ Azúcares} = \frac{(\text{Factor Fehling})(\text{Aforo 1})(\text{Aforo 2})(100)}{(\text{ml utilizados en titulación})(\text{peso muestra})(\text{ml solución clarificada})}$$

El factor de Fehling está en función del volumen utilizado de las soluciones A y B, las cuales deben ser agregadas en la misma proporción:

5 ml de las soluciones de Fehling A y B corresponden a 0.05 g de azúcares.

### 6.2.5 Determinación de Proteínas

En términos generales la técnica más utilizada para la determinación de la materia nitrogenada total en una muestra es el método Kjeldahl, por lo que es necesario utilizar la metodología previa a la cuantificación por este método para la separación del nitrógeno de origen proteínico del que no lo es.

#### 6.2.5.1 Separación del Nitrógeno Proteico y no Proteico.

El método de separación está basado en la solubilización del nitrógeno proteínico y su posterior precipitación con tungstato de sodio, con este método la proteína no soluble también es cuantificada, ya que existe una etapa de filtración en la cual se recuperan tanto la proteína precipitada como la no soluble. Reactivos: para la preparación de la solución precipitante se disuelven 5 g de tungstato de sodio y 1.51 g de fosfato ácido de sodio dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) en 20 ml de agua destilada, posteriormente se añaden 22 ml de HCl 2 N. Y se mezcla vigorosamente antes de aforar a 40 ml con agua destilada.

Procedimiento: se pesan 10 g de la muestra analizada finamente molida y se colocan en un vaso de precipitados de 250 ml, se agregan 50 ml de agua en ebullición y se agitan mecánicamente durante 15 min., a continuación se agregan los 50 ml de la solución precipitante y se suspende la agitación, se deja reposar la mezcla durante el tiempo necesario para que se realice la precipitación en forma completa y se presenten en forma evidente as dos fases. A



continuación se filtra la mezcla con ayuda de agua en ebullición y ligera succión para facilitar el proceso. En este momento el nitrógeno proteínico queda atrapado en el papel filtro, y por su parte el nitrógeno no proteínico se encuentra en el filtrado. Una vez separados ambos son cuantificados en forma independiente mediante el método Kjeldahl.

Este último consiste en la oxidación de los compuestos orgánicos por calentamiento con ácido sulfúrico, el carbono y el hidrógeno de la materia orgánica se oxidan a bióxido de carbono y agua, una parte del ácido sulfúrico se reduce a SO<sub>2</sub>, el cual a su vez reduce el material nitrogenado a amoníaco, éste a su vez reacciona con el ácido sulfúrico para formar sulfato de amonio, la cual es una sustancia de alto punto de ebullición, de tal manera que el nitrógeno queda atrapado. Este proceso se conoce con el nombre de digestión.

Posteriormente el amoníaco se libera del sulfato de amonio mediante la adición de grandes cantidades de álcali, y se separa mediante la adición de calor, el amoníaco destilado es atrapado en una solución de ácido que posteriormente es valorada.

Reactivos: la preparación de la mezcla digestora se logra homogenizando en las proporciones indicadas los siguientes reactivos: 88.89% sulfato de potasio, 8.89% sulfato de cobre pentahidratado y 2.22% de bióxido de selenio.

Procedimiento: se transfiere a la muestra analizada a un matraz Kjeldahl de 800 ml, el cual contiene 8 g de mezcla digestora y perlas de ebullición, se adiciona lentamente 35 ml de ácido sulfúrico concentrado haciéndolo resbalar por el cuello del matraz y se agita cuidadosamente. En seguida se enciende el extractor de vapores del aparato Kjeldahl y se coloca el matraz sobre la parrilla de calentamiento de tal manera que la boca del matraz quede dentro de uno de los orificios del extractor. Se enciende la parrilla de manera tal que se mantenga un calentamiento suave, durante el tiempo necesario para que la espuma formada desaparezca. Cuando esto haya ocurrido se procede a calentar vigorosamente la muestra hasta que ésta se aclare, a partir de ese momento el calentamiento se continua durante 30 min. Transcurrido este periodo se apaga la parrilla y se permite que se enfríe el matraz. Así se concluye la digestión.

A continuación se introduce la alargadera del refrigerante del aparato Kjeldahl en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, el cual contiene 50 ml de una solución de ácido bórico al 4% y tres gotas de rojo de metilo al 0.5% y se enciende la llave de paso de agua del refrigerante. Por otra parte se diluye el contenido del matraz Kjeldahl en 400 ml de agua destilada bajo el chorro de agua y se agregan unos cuantos gránulos de zinc. Posteriormente se adicionan 100 ml de una



solución de hidróxido de sodio al 45% también bajo el chorro de agua y se conecta el matraz a al trampa Kjeldahl, se mezcla el contenido y se calienta vigorosamente hasta que todo el amoníaco haya sido destilado (250 ml de destilado aprox.)

Finalmente el destilado obtenido se valora con una solución de ácido clorhídrico 0.3 N y el resultado se expresa en g NITRÓGENO/100g MUESTRA con base en:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(\text{ml HCl gastados en titulación})(\text{Normalidad})(0.014)(100)}{(\text{Peso de la muestra})}$$

En cada caso se debe correr en forma paralela una experiencia utilizando únicamente los reactivos, de tal manera que se aprecien modificaciones en la cuantificación provocadas por los mismos, y el valor final sea ajustado. Por otra parte, el porcentaje de proteínas se obtiene multiplicando el % de nitrógeno proteico por un factor 6.25, el cual involucra la hipótesis que la composición promedio de los aminoácidos constitutivos de la proteína estudiada contiene en promedio un 16% de nitrógeno en su estructura.