

**EVALUACIÓN DE MELAZA DE CAÑA COMO SUSTRATO PARA LA
PRODUCCIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae***

**ERIKA ESPERANZA FAJARDO CASTILLO
SANDRA CONSTANZA SARMIENTO FORERO**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ, D.C
AGOSTO DE 2007**

**EVALUACIÓN DE MELAZA DE CAÑA COMO SUSTRATO PARA LA
PRODUCCIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae***

**ERIKA ESPERANZA FAJARDO CASTILLO
SANDRA CONSTANZA SARMIENTO FORERO**

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para obtener el título de**

Microbiólogo Industrial

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
Bogotá, D.C.
Agosto de 2007**

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946.

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Agradecemos a Dios por permitirnos vivir este momento en el cual se refleja todo el esfuerzo y dedicación que hemos tenido a lo largo de nuestra carrera profesional. A nuestros padres y hermanos que con su amor y apoyo nos han formado e inculcado los valores de disciplina y respeto y que con constante sacrificio nos forjaron el camino para seguir adelante. A la Doctora Andrea Aguirre y a la Ingeniera Balkys Quevedo por su conocimiento, paciencia, compromiso, apoyo y amistad. A los amigos y compañeros del laboratorio de Biotecnología Aplicada por su colaboración brindada. Y a todas aquellas personas que no mencionamos gracias por ayudarnos para que esta investigación se llevara a cabo con éxito.

TABLA DE CONTENIDO

Pág

RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 CAÑA DE AZÚCAR.....	3
2.1.1 Características generales.....	3
2.1.2 Subproductos.....	3
2.1.2.1 Mielés.....	3
2.1.2.2 Cachaza.....	3
2.1.2.3 Bagazo de Caña.....	4
2.2 MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR.....	4
2.2.1 Definición.....	4
2.2.2 Proceso de Obtención.....	6
2.2.2.1 Almacenamiento.....	6
2.2.2.2 Preparación y Extracción del Jugo.....	6
2.2.2.3 Clarificación.....	7
2.2.2.4 Evaporación.....	7
2.2.2.5 Cristalización.....	8
2.2.2.6 Centrifugación.....	8
2.2.3 Clasificación.....	9
2.2.4 Composición.....	10
2.2.4.1 Azúcares.....	10
2.2.4.2 No Azúcares.....	11
2.2.4.3 Cenizas.....	11
2.2.4.4 Compuestos nitrogenados.....	11
2.2.4.5 Ácidos.....	12

	Pág
2.2.4.6 Vitaminas.....	12
2.2.4.7 Fenoles y Compuestos volátiles.....	12
2.2.5 Valor nutricional.....	13
2.2.6 Propiedades fisicoquímicas.....	14
2.2.6.1 Viscosidad.....	14
2.2.6.2 pH	15
2.2.6.3 Calor específico y Conductividad Térmica.....	15
2.2.6.4 Densidad.....	16
2.2.7 Microorganismos de la melaza.....	16
2.2.8 Aprovechamiento de la melaza.....	16
2.2.9 Almacenamiento de la melaza.....	18
2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
2.3.1 Requerimientos nutricionales.....	21
2.3.2 Requerimientos físico-químicos.....	22
2.3.3 Composición química.....	22
2.4 PROCESO DE FERMENTACIÓN.....	23
2.4.1 Fermentación a escala industrial.....	23
2.4.2 Fermentación discontinua.....	24
2.4.2.1 Condiciones que deben medirse y controlarse durante una fermentación discontinua.....	24
2.4.2.1.1 Temperatura.....	25
2.4.2.1.2 pH.....	25
2.4.2.1.3 Nutrientes.....	25
2.4.2.1.4 Aireación.....	26
2.4.2.1.5 Productividad.....	26
2.4.2.2 Mecanismo de transformación de azúcar en biomasa.....	27
2.5 TÉCNICAS Y MÉTODOS UTILIZADOS.....	27
2.5.1 Técnica de hidrólisis de la sacarosa.....	27
2.5.2 Técnica del Ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS).....	28

	Pág
2.5.3 Método Ecométrico.....	29
3. JUSTIFICACIÓN.....	32
4. OBJETIVOS.....	33
4.1 Objetivo general.....	33
4.2 Objetivos específicos.....	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
5.1 MEDIO DE CULTIVO UTILIZADO	
5.2 MICROORGANISMOS.....	35
5.3 CONSERVACIÓN DE CEPAS.....	35
5.4 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES TOTALES.....	35
5.4.1 Hidrólisis de la sacarosa.....	36
5.4.2 Técnica del Ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS).....	36
5.5 DETERMINACIÓN DE BIOMASA.....	37
5.6 PRUEBAS DE CRECIMIENTO EN AGAR Y CALDO MELAZA EN 10%, 20% Y 30% (p/v) A NIVEL DE ERLLENMEYER.....	37
5.7 PRUEBAS DE TEMPERATURA.....	37
5.7.1 Preparación del inóculo.....	38
5.7.2 Fermentación discontinua.....	38
5.8 CURVA DE CRECIMIENTO CONTROL DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEPA A Y CEPA B EN CALDO YPG.....	39
5.8.1 Preparación del inóculo.....	39
5.8.2 Fermentación discontinua.....	39
5.9 EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MELAZA DE CAÑA A NIVEL DE ERLLENMEYER (ETAPA INICIAL).....	40
5.10 CURVAS DE CRECIMIENTO EN FERMENTADOR DE 1,5 LITROS (SEGUNDA ETAPA).....	40

	Pág
5.10.1 Preparación del inóculo.....	40
5.10.2 Fermentación discontinua.....	41
5.11 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS.....	41
5.12 PRUEBAS DE PRODUCTIVIDAD Y SELECTIVIDAD MEDIANTE EL MÉTODO ECOMÉTRICO.....	42
5.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	43
5.13.1 Cepa A. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
5.13.2 Cepa B. <i>Saccharomyces boulardii</i>	44
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
6.1 CONSERVACIÓN DE CEPAS.....	45
6.2 DETERMINACIÓN DE LA CURVA PATRÓN DE SACAROSA.....	46
6.3 PRUEBAS DE CRECIMIENTO EN AGAR Y CALDO MELAZA EN 10%, 20% Y 30% (p/v) A NIVEL DE ERLNMEYER.	47
6.4 PRUEBAS DE TEMPERATURA	49
6.5 CURVA DE CRECIMIENTO CONTROL DE <i>Saccharomyces</i> CEPA A Y CEPA B EN CALDO YPG.....	50
6.6 EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MELAZA DE CAÑA A NIVEL DE ERELNMEYER (ETAPA INICIAL).....	54
6.6.1 Cepa A. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
6.6.2 Cepa B. <i>Saccharomyces boulardii</i>	59
6.7 SELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ADECUADA DE MELAZA.....	64
6.7.1 Cepa A. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64
6.7.2 Cepa B. <i>Saccharomyces boulardii</i>	66
6.8 FERMENTACIONES EN BIORREACTOR 1,5L.....	68
6.9 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS CON LA CONCENTRACIÓN SELECCIONADA.....	72
6.9.1 Fermentación en erlenmeyer a la concentración de (20% (p/v)).....	72

	Pág
6.9.2 Fermentación en biorreactor de 1,5L a la concentración de (20% (p/v)).....	75
6.10 MÉTODO ECOMÉTRICO.....	80
CONCLUSIONES.....	83
RECOMENDACIONES.....	84
BIBLIOGRAFÍA.....	85
ANEXOS.....	92

INDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Proceso de obtención de las melazas.....	9
Figura 2. Vista macroscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio YPG.....	20
Figura 3. Vista microscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
Figura 4. Estructura del anillo antes y después de ser sometido a un proceso de calentamiento.....	29
Figura 5. Reacción del ácido 3,5 -dinitrosalicílico.....	30
Figura 6. Valores de UFC/mL en función de los controles realizados cada dos meses.....	46
Figura 7. Pruebas de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en agar melaza. Vista macroscópica.....	48
Figura 8. Coloración de Gram de la cepa A. a partir de colonias en agar melaza.....	50
Figura 9. Biomasa y Sustrato residual en función del tiempo. Curva control en caldo YPG con adición de ampicilina (300mg/L). Cepa A y cepa B.....	53
Figura 10. Fermentación en erlenmeyer. Melaza 10%, 20% y 30% (p/v). Cepa A.....	57
Figura 11. Fermentación en erlenmeyer. Melaza 10%, 20% y 30% (p/v). Cepa B.....	61
Figura 12. Montaje de biorreactor 1,5L. Medio melaza 20% (p/v), 37°C, 150rpm, 1vvm.	68
Figura 13. Fermentación en biorreactor 1,5L. Melaza 20% (p/v). Cepa A y Cepa B.....	69
Figura 14. Concentración g/L en función del Tiempo. <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> en erlenmeyer. Medio melaza 20% (p/v). Cepa A.....	72

	Pág
Figura 15. Velocidad específica de crecimiento de <i>Saccharomyces</i> <i>boulardii</i> en erlenmeyer. Medio melaza 20% (p/v). Cepa B.....	73
Figura 16. Concentración g/L en función del Tiempo. <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> en biorreactor. Medio melaza 20% (p/v). Cepa A...	76
Figura 17. Velocidad específica de crecimiento de <i>Saccharomyces</i> <i>boulardii</i> en biorreactor. Medio melaza 20% (p/v). Cepa B	77
Figura 18. Caja Método Ecométrico. Cepa A. ICA =3.....	80
Figura 19. Caja Método Ecométrico. Cepa B. ICA =3.....	80

INDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Composición de la melaza de caña de azúcar.....	5
Tabla 2. Aprovechamiento de la melaza de caña.....	17
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
Tabla 4. Características generales de las levaduras.....	20
Tabla 5. Composición química de las levaduras.....	23
Tabla 6. Valores de producción de biomasa y consumo de sustrato a temperaturas de 30°C y 37°C. Cepa A.....	50
Tabla 7. Valores de biomasa y consumo de sustrato. Fermentación en erlenmeyer. Melaza 10%, 20% y 30% (p/v). Cepa A.....	59
Tabla 8. Valores de biomasa y consumo de sustrato. Fermentación en erlenmeyer. Melaza 10%, 20% y 30% (p/v). Cepa B.....	62
Tabla 9. Datos de media y varianza entre las concentraciones 10% y 20% (p/v). Cepa A.....	64
Tabla 10. Datos de media y varianza entre las concentraciones 20% y 30% (p/v). Cepa A.....	65
Tabla 11. Datos de media y varianza entre las concentraciones 10% y 20% (p/v). Cepa B.....	66
Tabla 12. Datos de media y varianza entre las concentraciones 20% y 30% (p/v). Cepa B.....	66
Tabla 13. Valores de biomasa y consumo de sustrato. Fermentación en biorreactor 1,5L. Melaza 20% (p/v). Cepa A y Cepa B.....	71
Tabla 14. Datos de fase exponencial. Fermentación en erlenmeyer. Melaza 20% (p/v). Cepa A.....	72
Tabla 15. Datos de fase exponencial. Fermentación en erlenmeyer. Melaza 20% (p/v). Cepa B.....	73

	Pág
Tabla 16. Parámetros Cinéticos. Fermentación en erlenmeyer. Melaza 20% (p/v). Cepa A y Cepa B.....	74
Tabla 17. Datos de fase exponencial. Fermentación en biorreactor 1,5L. Melaza 20% (p/v). Cepa A.....	75
Tabla 18. Datos de fase exponencial. Fermentación en biorreactor 1,5L. Melaza 20% (p/v). Cepa B.....	76
Tabla 19. Parámetros Cinéticos. Fermentación en biorreactor 1,5L. Melaza 20% (p/v). Cepa A y Cepa B.....	77

INDICE DE ANEXOS

	Pag.
ANEXO A.	Ficha técnica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>91
ANEXO B.	Preparación de Reactivos de trabajo.92
	B1. Hidróxido de Sodio (NaOH 25%).
	B2. Acido Clorhídrico (HCl 50%).
	B3. Acido Clohídrico (HCl 5%).
ANEXO C.	Técnica de DNS. (Ácido 3-5 dinitrosalisílico).93
ANEXO D.	Composición y preparación de medios de cultivo utilizados.94
	D1. Medio de cultivo YPG (p/v).
	D2. Medio de cultivo Baird Parker. (p/v).
ANEXO E.	Conservación de Cepas.95
	Tabla 1. Control del banco de cepas. Cepa A y Cepa B.
ANEXO F.	Curva Patrón de sacarosa.96
	Tabla 1. Datos absorbancia sacarosa. Promedio tres replicas.
	Figura 1. Curva patrón de sacarosa y ecuación lineal.

		Pag.
ANEXO G.	Curva control en medio YPG adicionado de ampicilina (300 mg/l). Cepa A y Cepa B.	97
	Tabla 1. Datos de producción de biomasa y consumo de sustrato por parte de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Cepa A) y <i>Saccharomyces boulardii</i> (Cepa B).	
ANEXO H.	Análisis estadístico <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Cepa A.	98
	H1. Estadística de prueba distribución t- student. (10% Y 20% (p/v)).	
	Tabla 1. Estadística t-Student para 10% y 20% (p/v). Cepa A.	
	H2. Estadística de prueba distribución t- student. (20% y 30% (p/v)).	99
	Tabla 2. Estadística t-Student para 20% y 30% (p/v). Cepa A.	
ANEXO I.	Análisis estadístico <i>Saccharomyces boulardii</i> . Cepa B.....	100
	I1. Estadística de prueba distribución t- student. (10% Y 20% (p/v)).	
	Tabla 1. Estadística t-Student para 10% y 20% (p/v). Cepa B.	
	I2. Estadística de prueba distribución t- student. (20% y 30% (p/v)).	101
	Tabla 2. Estadística t-Student para 20% y 30% (p/v). Cepa B.	

RESUMEN

Los probióticos, son microorganismos vivos que agregados como suplemento alimenticio, benefician al huésped aumentando el balance microbiano intestinal y previniendo el desarrollo de patógenos, por lo que son de gran importancia al ser adicionados a un alimento en altas concentraciones. Actualmente, el género *Saccharomyces* ha sido utilizado para el tratamiento y prevención de desordenes intestinales tanto en animales como en humanos. En esta investigación se determinaron las condiciones necesarias para obtener una alta concentración de biomasa con el fin de evaluar posteriormente su capacidad probiótica.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*, cepa nativa (cepa A), comparándola con una cepa comercial reconocida como probiótico utilizada en este estudio como cepa control (cepa B). Se realizaron cultivos en erlenmeyer utilizando diferentes concentraciones de melaza de caña (10%, 20% y 30% (p/v)) con el fin de determinar la concentración adecuada para obtener la mayor concentración de biomasa. Se determinó el consumo de sustrato por medio de la técnica de DNS con previa hidrólisis de la sacarosa. La biomasa obtenida se cuantificó por medio de la técnica de absorbancia y peso seco. Se evaluó viabilidad del microorganismo por medio de recuentos en placa en agar YPG. Se obtuvo mayor crecimiento de biomasa a una concentración del 20% (p/v) de melaza de caña, con un pH inicial de 5.0, temperatura de 30°C, 150rpm, durante 20 horas. Estas condiciones fueron llevadas a fermentaciones en biorreactor de 1.5L.

Adicionalmente, se establecieron parámetros cinéticos ajustados a modelos matemáticos que permitieran escoger las mejores condiciones de crecimiento tanto en erlenmeyer como en biorreactor; los mejores datos en cuanto a

producción de biomasa levaduriforme así como los valores de rendimiento en biomasa fueron los obtenidos por la cepa A en una concentración de melaza al 20% (p/v), arrojando resultados en erlenmeyer de $Y_{x/s}$ (0,213 g/g), Td (2,835 h) y productividad ($1,680 \text{ gL}^{-1}/\text{h}$) y para biorreactor de $Y_{x/s}$ (0,612 g/g), Td (1,411 h) y productividad ($2,769 \text{ gL}^{-1}/\text{h}$). Finalmente, se realizó el método ecométrico el cual demostró que el medio melaza es medianamente productivo para *Saccharomyces cerevisiae* y altamente selectivo para *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Probiotics, are alive microorganisms that added as nourishing supplement, they benefit to the guest increasing the microbial intestinal balance and preventing the development of pathogens, for that reason, they are of great importance when have been added to food in high concentrations. Nowadays, the genus *Saccharomyces* has been used for the treatment and prevention of intestinal disorders both animals and human beings. In this research, the necessary conditions were determined to obtain a high concentration of biomass, in order to evaluate its probiotic capacity later.

The main objective of the present work was to evaluate the cane molasses as substratum for the production of *Saccharomyces cerevisiae*, (strain A), comparing with a commercial strain recognized like probiotic used in this study as strain control (strain B). Cultures were carried out in flasks using different concentrations of cane molasses (10 %, 20 % and 30 % (p/v)) in order to determine the right concentration and to obtain the high concentration of biomass. The consumption of substratum was determined by means of technique of DNS with previous hydrolysis of saccharose. The obtained biomass was quantified by means of technique of absorbance and dry weight. The viability of the microorganism was evaluated by means of plate count in agar YPG. High growth of biomass was obtained to a concentration of 20 % (p/v) of cane molasses, with initial pH: 5.0, temperature: 30°C, 150rpm, for 20 hours. These conditions were taken to fermentations in biorreactor of 1.5L.

Additionally, kinetic parameters were established to mathematical models that allowed choosing the best conditions both flasks and bioreactor. The best data of production yeast biomass as well as the values of yield in biomass were obtained by the strain A, throwing results in flasks of $Y_{x/s}$ (0,213 g/g), Td

(2,835 h) and productivity ($1,680 \text{ gL}^{-1}/\text{h}$) and for biorreactor de $Y_{x/s}$ (0,612 g/g), Td (1,411 h) and productivity ($2,769 \text{ gL}^{-1}/\text{h}$). Finally, the ecometric method was carried out which demonstrated that the average molasses is moderately productive for *Saccharomyces cerevisiae* and highly selective for *Stapylococcus aureus*.

INTRODUCCIÓN

Desde hace algún tiempo, Colombia se ha caracterizado por las cosechas de caña de azúcar a lo largo del año, lo que hace importante aprovechar al máximo materias primas como la melaza para la producción de biomasa y para la obtención de diferentes productos biotecnológicos por vías fermentativas. Se prefiere el uso de melaza ya que esta presenta ventajas económicas y nutricionales frente a otros medios de cultivo comerciales como el caldo YPG (Extracto de levadura, Peptona y Glucosa), el cual es utilizado normalmente para la obtención de biomasa levaduriforme.

En la actualidad se ha venido mejorando la salud nivelando la carga microbiana intestinal mediante la inclusión de microorganismos vivos como los probióticos, los cuales regulan la microflora intestinal, aumentan la asimilación de los alimentos, reducen niveles de colesterol y estimulan el desarrollo del sistema inmune entre otras características. Es por esta razón, que especies de *Saccharomyces* han sido frecuentemente utilizadas en la industria, por lo que la producción de biomasa a gran escala se convierte en un factor primordial para el desarrollo biotecnológico del país.

En Colombia, el uso de la melaza como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae* es una alternativa válida ya que reduce costos para industrias nacionales y además evita el frecuente uso de productos importados que incrementan costos en procesos biotecnológicos. Este proyecto se plantea en dos etapas. En la primera, se evaluaron diferentes concentraciones de melaza a nivel de erlenmeyer para obtener la mayor cantidad de biomasa levaduriforme, realizando paralelamente un seguimiento de la viabilidad y el consumo de sustrato. En la segunda etapa, se determinaron parámetros cinéticos evaluados por medio de fermentaciones con la concentración de melaza escogida a nivel de erlenmeyer y biorreactor

de 1.5L en términos de ($Y_{x/s}$) rendimiento de biomasa en sustrato, (μ_x) velocidad específica de crecimiento, (T_d) tiempo de duplicación y Productividad.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 CAÑA DE AZÚCAR

2.1.1 Características generales

La Caña de Azúcar es una gramínea tropical, un pasto gigante emparentado con el sorgo y el maíz, en cuyo tallo se forma y acumula un jugo rico en sacarosa, compuesto que al ser extraído y cristalizado forma el azúcar.

Forma espiguillas pequeñas agrupadas en rosetas y rodeadas por largas fibras sedosas. Se conocen diversas variedades cultivadas que se diferencian por el color y la altura de los tallos. El tallo de la caña es el que contiene el tejido esponjoso y dulce del cual se extrae el azúcar (ICA, 1981).

2.2.2 Subproductos

2.2.2.1 Mieles

La miel o también llamada melaza, es un líquido denso y viscoso de color oscuro, es producto final de la fabricación o refinación de la sacarosa procedente de la Caña de Azúcar. Este subproducto se usa para alimentos concentrados para animales y como suplemento alimenticio para el hombre. (Leeson y Summers, 2000).

2.2.2.2 Cachaza

Residuo que se elimina en el proceso de clarificación del jugo de caña durante la fabricación del azúcar. Es un material rico en fósforo, calcio,

nitrógeno y materia orgánica, pero pobre en potasio. Se usa principalmente como abono, ya que mejora algunas propiedades físicas y ácidas del suelo, aunque también se emplea en alimentación de ganado vacuno y en la obtención de ceras y aceites (Leeson y Summers, 2000).

2.2.2.3 Bagazo de Caña

Desecho que queda después de la molienda de la Caña de Azúcar. Está formado por un conjunto de partículas de diferentes tamaños cuyo promedio oscila alrededor de 2 a 2.5mm el resto consta de sólidos solubles e insolubles. Es utilizado normalmente como combustible en las calderas que le dan energía a los ingenios (Leeson y Summers, 2000).

2.3 MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR

2.3.1 Definición

Las melazas, mieles finales o melazas “blackstrap”, suelen ser definidas, por muchos autores como los residuos de la cristalización final del azúcar de los cuales no se puede obtener más azúcar por métodos físicos.

La Norma ICONTEC 587 de 1994, define como miel final o melaza (no cristalizable) al jarabe o líquido denso y viscoso, separado de la misma masa cocida final y de la cual no es posible cristalizar más azúcar por métodos usuales (ICONTEC, 1994).

La denominación melaza se aplica al efluente final obtenido en la preparación del azúcar mediante una cristalización repetida. El proceso de evaporación y cristalización es usualmente repetido tres veces hasta el punto en el cual el

azúcar invertido y la alta viscosidad de las melazas ya no permitan una cristalización adicional de la sacarosa (Swan y Karalazos, 1990).

La melaza es una mezcla compleja que contiene sacarosa, azúcar invertido, sales y otros compuestos solubles en álcali que normalmente están presentes en el jugo de caña localizado, así como los formados durante el proceso de manufactura del azúcar. Además de la sacarosa, glucosa, fructosa y rafinosa los cuales son fermentables, las melazas también contienen sustancias reductoras no fermentables (Tabla 1). Estos compuestos no fermentables reductores del cobre, son principalmente caramelos libres de nitrógeno producidos por el calentamiento requerido por el proceso y las melanoidinas que si contienen nitrógeno derivadas a partir de productos de condensación de azúcar y aminocompuestos (Honig, 1974).

Tabla 1. Composición de la melaza de caña de azúcar.

COMPONENTES	CONSTITUYENTES	CONTENIDO (p/p)
Componentes mayores	Materia seca	78%
	Proteínas	3%
	Sacarosa	60 - 63 % p/p
	Azúcares reductores	3 - 5 % p/p
	Sustancias disueltas (diferentes azúcares)	4 - 8 % p/p
	Agua	16%
	Grasas	0,40%
	Cenizas	9%
Contenido de minerales	Calcio	0,74%
	Magnesio	0,35%
	Fósforo	0,08%
	Potasio	3,67%
Contenido de aminoácidos	Glicina	0,10%
	Leucina	0,01%
	Lisina	0,01%
	Treonina	0,06%
	Valina	0,02%
	Colina	600 ppm
	Niacina	48,86 ppm

Contenido de Vitaminas	Acido Pantoténico	42,90 ppm
	Piridoxina	44 ppm
	Riboflavina	4,40 ppm
	Tiamina	0,88 ppm

Fuente: Tellez, 2004 ; Yopez, 1995.

2.3.2 Proceso de Obtención

Las melazas se obtienen como un subproducto final en la elaboración del azúcar de caña. Una breve reseña de los principales pasos del proceso, se encuentran resumidos en la Figura 1.

Sin entrar en mayores detalles, brevemente se explica en que consiste cada uno de los pasos que llevan a la obtención de la melaza de caña de azúcar.

2.3.2.1 Almacenamiento

La caña después de ser cortada es llevada a patios de almacenamiento en el ingenio. Este almacenamiento no debe ser muy prolongado, puesto que los efectos del sol disminuyen el rendimiento del jugo, lo mismo que su calidad; por este motivo, debe pasarse a la molienda en el menor tiempo posible después de haber sido cortada; dentro de lo posible debe procurarse que este tiempo no sobrepase las 48 horas para evitar pérdidas (Swan y Karalazos,1990).

2.3.2.2 Preparación y Extracción del Jugo

Estas dos operaciones se llevan a cabo en una forma continua, por lo cual generalmente se conoce bajo el nombre de “Extracción del jugo”. Este proceso, se lleva a cabo en una serie de “cuchillas desmenuzadoras y molinos extractores”. La caña es desmenuzada en preparación para la

molienda con cuchillas giratorias y desmenuzadoras para facilitar una mejor extracción del jugo (Ospina y Palacios,1994).

La caña desmenuzada pasa a los molinos donde se efectúa el proceso de extracción del jugo; luego, esta caña es rociada con agua y jugos claros a medida que sale de cada molino, en esta forma se diluye el azúcar que queda en el bagazo a la salida de cada molino y se obtiene un mayor rendimiento en la extracción. En esta forma, se extrae mas del 90% del azúcar que hay en la caña, quedando una parte remanente en el bagazo, el cual va a las calderas como combustible (Ospina y Palacios,1994).

2.3.2.3 Clarificación

El jugo es bombeado de los molinos a los clarificadores por medio de bombas centrífugas hechas de materiales resistentes a la abrasión y a los ácidos. La clarificación se lleva a cabo por medio de cal y calor. La acidez del jugo es neutralizada con cal y luego se eleva la temperatura hasta su punto de ebullición. El precipitado que se forma por acción de la cal y el calor, se deja sedimentar en los tanques clarificadores continuos y el jugo clarificado es decantado de la espuma, barro y desperdicios y es llevado a la estación evaporadora (Ospina y Palacios,1994).

2.3.2.4 Evaporación

El jugo clarificado pasa a un evaporador de efecto múltiple sin ningún tratamiento previo. Los evaporadores consisten en una serie de techos de vacío, de tal manera que se logre la ebullición a temperatura más baja (Ospina y Palacios,1994).

2.3.2.5 Cristalización

Se hace en tanques de vacío de efecto simple a presión reducida. El jarabe o las aguas madres de cristalizaciones anteriores (melazas), se evaporan hasta su saturación de azúcar; en este punto, los granos son separados de la masa en ebullición y sirven como núcleo para la formación de cristales. El tanque es cargado a medida que el agua se evapora y su contenido de azúcar es depositado sobre los cristales presentes sin la formación de cristales adicionales. En este punto, la mezcla de cristales y jarabe, constituye una masa densa denominada “Templa” (Ospina y Palacios,1994).

2.3.2.6 Centrifugación

La Templa es derramada sobre un mezclador y de allí pasa a centrífugas verticales de alta velocidad. Los cristales de azúcar son retenidos en la centrífuga y pueden ser lavados con agua si se desea. Las aguas madres que se separan, se denominan melazas de primera. Completada la centrifugación, se remueve el azúcar quedando la máquina lista para una nueva carga (Ospina y Palacios,1994).

El azúcar obtenido pasa a los depósitos para su despacho, mientras que las melazas se envían a un nuevo evaporador y de ahí a la centrífuga “B”, donde se obtiene el azúcar y las melazas de segunda. Estas melazas se someten a un proceso similar a los anteriores, obteniéndose en esta oportunidad azúcar de semilla y melazas finales. Estas melazas finales, han sido consideradas en los ingenios como producto sobrante y al cual son muy pocos los usos que se le dan (Ospina y Palacios,1994).

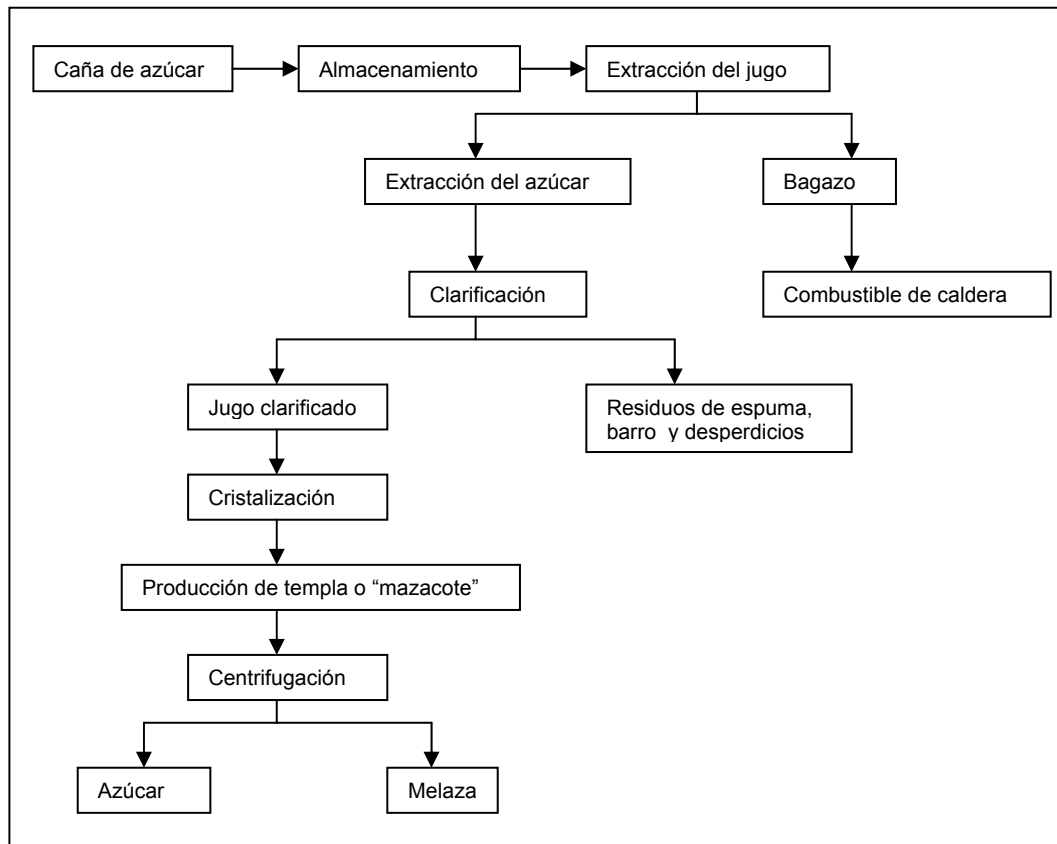


Figura 1. Proceso de obtención de las melazas (Ariza y Gonzalez 1997).

2.3.3 Clasificación

La Asociación Americana de Control Oficial de Alimentos (AAFCO), recomienda diferentes clasificaciones para las melazas, según el azúcar total y el contenido de humedad, así:

- Melaza Superior Blackstrap: Melaza de caña que contiene 23.4% de agua o menos, y 53.5% o más de azúcares totales.
- Melaza Blackstrap: Melaza compuesta por 23.5% a 26.4% de agua y 48.5% a 53.5% de azúcares totales (Castro, 1993).

Otra clasificación de las melazas, se da por el porcentaje de materia sólida en peso, o grados Brix, de la siguiente manera:

- Melaza Blackstrap: Es el subproducto de la elaboración del azúcar, cuyo porcentaje de materia sólida en peso (grados Brix), diluido con igual peso de agua es de 42.5 grados Brix.
- Melaza de Caña Alimenticia: Es la melaza blackstrap diluida con agua, hasta una concentración en grados Brix, no menor de 39.75; a este producto no se le ha especificado un valor de concentración de azúcares.
- Melaza High Test o Jarabe Invertido: Es el producto obtenido por la concentración del jugo clarificado, hasta un porcentaje de materia sólida en peso de 85% e invertido con ácido o con invertasa (Castro, 1993).

2.3.4 Composición

La composición de las melazas es muy heterogénea y puede variar considerablemente dependiendo de la variedad de caña de azúcar, suelo, clima, período de cultivo, eficiencia de la operación de la fábrica, sistema de ebullición del azúcar, tipo y capacidad de los evaporadores, entre otros. Por otro lado, la melaza de caña se caracteriza por tener grados Brix ó sólidos disueltos de 68- 75% y un pH de 5.0- 6.1% (Castro, 1993).

2.3.4.1 Azúcares

Los principales azúcares en la melaza son la sacarosa (60% - 63% en peso), la glucosa o dextrosa (6% - 9% en peso), y la fructosa o levulosa (5% - 10% en peso); estas dos últimas constituyen la mayor porción de los azúcares reductores encontrados en los análisis. La fructosa puede sufrir transformaciones al igual que la glucosa, debido a reacciones dependientes de la temperatura. El contenido de glucosa y fructosa en las melazas puede

variar a causa de la hidrólisis de la sacarosa, a valores de pH ácido y a temperaturas altas (Castro, 1993).

2.3.4.2 No azúcares

Los no azúcares están compuestos por 33% de sustancias inorgánicas (Fe^{+++} , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , As^{3+} , Cd^{2+} , Hg^+ , Pb^+ y Cl^- , NO_3^- , SO_2^-); el 42% corresponde a sustancias nitrogenadas (aminoácidos, péptidos, colorantes); y el 25% a sustancias orgánicas libres de nitrógeno (ácidos carboxílicos, alcoholes, fenoles, ésteres, vitaminas, gomas y dextranos) (Castro, 1993).

2.3.4.3 Cenizas

En general la composición de las cenizas de las melazas, es cualitativamente similar a la del jugo, del cual se obtiene éstas. Casi todos los análisis publicados, muestran que el contenido de potasa varía alrededor de 40% del peso del carbono total de la ceniza; el contenido de cal es de 10% al 20%, el de sulfatos varía entre el 10% y el 20%, y las sales de magnesio, sodio, aluminio, la sílice, los cloruros, fosfatos y los óxidos de hierro, completan el resto del contenido de cenizas (Castro, 1993).

2.3.4.4 Compuestos nitrogenados

Están constituidos principalmente por aminoácidos mono y dibásicos, amidas ácidas, betaínas y pequeñas cantidades de peptonas y nitratos. Cuando los azúcares reductores, glucosa y fructosa, son sometidos a los procesos de clarificación, en el tratamiento subsiguiente, se producen varias reacciones, siendo la más importante la de los aminoácidos con estos azúcares, en la cual se forman productos coloreados como las melanoidinas y los residuos

fermentables a los cuales se les ha encontrado un contenido aproximado de 68% de nitrógeno combinado, en melazas.

El Nitrógeno total de las melazas, varía entre 0.4% y 1.5% del peso total de la melaza. La proteína cruda frecuentemente se determina como porcentaje en peso del contenido de nitrógeno (Castro, 1993).

2.3.4.5 Ácidos

El ácido aconítico, es el más abundante de los ácidos orgánicos presentes en la caña que se acumula en las melazas, representando aproximadamente el 6% del peso de sólidos en la melaza. Los ácidos málico y cítrico están presentes en cantidades apreciables en las melazas. El ácido Fórmico está presente como producto de descomposición; la mayoría de estos ácidos son metabolizados por los microorganismos, como fuente de carbono y no presentan problemas de inhibición de crecimiento (Castro, 1993).

2.3.4.6 Vitaminas

Aquellas vitaminas resistentes a la acción del calor y de los álcalis, aparecen encontradas en las melazas. La niacina, ácido pantoténico y riboflavina, importantes para el crecimiento microbiano, pueden estar presentes en cantidades significativas y otras vitaminas lo están en cantidades muy pequeñas (Castro, 1993).

2.3.4.7 Fenoles y Compuestos volátiles

Los fenoles presentes en las mieles finales, provienen de la parte fibrosa de la caña, éstos se derivan de los ácidos hidroxicinámico y parahidroxibenzóico.

Es necesario tener en cuenta, que desde el punto de vista de la fermentación, algunos fenoles son indeseables, por presentar actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los microorganismos, a concentraciones de 0.5g/L. Los ácidos fenólicos que mayor actividad bacteriostática han demostrado son el cloragénico, el p-cumárico y el telúrico; estos dos últimos son capaces de inhibir totalmente el crecimiento de algunas bacterias (Castro, 1993).

2.3.5 Valor nutricional

Aunque hay muchos reportes sobre el valor nutritivo de las melazas, como ingredientes de las raciones para rumiante, parece haber poca concordancia entre los resultados obtenidos por los diversos investigadores. Aunque algunos de ellos llegan a la conclusión de que el valor nutritivo de las melazas es equivalente aproximadamente al 85% del maíz en grano (Tocagni, 1981).

Cuando las melazas son suministradas como alimento a novillos de engorde en proporción del 10%, éstas suministran una energía neta relativamente alta (EN). Sin embargo, cuando el nivel es incrementado a 25 y 40%, la EN se reduce en casi 100% (Olsen y Allermann, 1991).

La melaza es portadora de energía de fácil aprovechamiento por el animal, la cual representa del 70 al 75% del valor energético del maíz (Olsen y Allermann, 1991).

2.3.6 Propiedades fisicoquímicas

2.3.6.1 Viscosidad

Las relaciones entre concentración y viscosidad para soluciones de azúcar pura son igualmente válidas para las melazas. La viscosidad de las soluciones saturadas de azúcar impuro, aumenta rápidamente con el contenido de impurezas debido al incremento de la concentración de sólidos. El efecto de las sales minerales sobre la viscosidad de las soluciones de azúcar es variable. Un enriquecimiento de iones Ca^{2+} aumenta la viscosidad, mientras que un incremento de iones K^+ , la disminuye (Swan y Karalazos, 1990).

Los compuestos orgánicos no azúcares, tienen un profundo efecto sobre la viscosidad, pues los componentes de alto peso molecular pueden incrementarla considerablemente (Swan y Karalazos, 1990).

La aireación influye marcadamente sobre la viscosidad aparente de las soluciones de azúcar, y si se disminuye el contenido de aire en las melazas, disminuye la viscosidad (Swan y Karalazos, 1990).

El efecto de las variaciones del pH sobre la viscosidad de las soluciones de azúcar es insignificante, excepto cuando el pH es superior a 11; en este caso, la viscosidad aumenta. El efecto de la concentración y la temperatura sobre la viscosidad de las melazas, tiene importancia práctica en la cantidad de melaza que fluye por las tuberías y bombas, así como la descarga por gravedad natural, o el desplazamiento por fuerza centrífuga. Si se considera que la viscosidad de las melazas decrece a una temperatura dada, con una disminución de la concentración, y también cuando la concentración es constante y la temperatura aumenta (Swan y Karalazos, 1990).

La región de viscosidad crítica en la melaza de caña, está en un intervalo de concentraciones en grados Brix entre 81 y 85. Esto significa que un aumento de solo algunas décimas en el valor de la concentración, determina un incremento notable en la viscosidad (Swan y Karalazos, 1990).

2.3.6.2 pH

Las melazas de caña son ligeramente ácidas, tienen un pH entre 5.5 y 6.5; un pH bajo es atribuible a la presencia de ácidos alifáticos y al bajo pH de la clarificación, si es ácida (Swan y Karalazos, 1990).

El pH de las melazas cambia con la temperatura y depende también de la naturaleza y de la cantidad de material estabilizador del pH que posea (Swan y Karalazos, 1990).

La acción estabilizadora del pH tiene efecto sobre la melaza para resistir la adición de ácidos o álcalis, sin cambiar su naturaleza ácida o básica. En la melaza la acción estabilizadora depende del contenido de no azúcares y de las características de la melaza (Swan y Karalazos, 1990).

La estabilización del pH en las melazas de caña tiene un patrón uniforme, es decir, no existen variaciones irregulares debidas a relaciones de cambio de peso entre las sustancias que intervienen, por lo tanto la actividad estabilizadora se modifica (Swan y Karalazos, 1990).

2.3.6.3 Calor específico y Conductividad Térmica

En las soluciones de azúcar, el calor específico depende de la temperatura, de la concentración y de la composición. Se ha comprobado, que el calor específico disminuye al aumentar la concentración de las soluciones impuras

de azúcar; es necesario, conocer el calor específico de las melazas para calcular la transferencia de calor durante el calentamiento o enfriamiento (Swan y Karalazos, 1990).

2.3.6.4 Densidad

En la práctica, la densidad se determina mediante equivalencia con la concentración en grados Brix. Además, para su determinación se usan tres instrumentos densimétricos: el hidrómetro, la balanza de Westphal y el picnómetro, de los cuales el primero es el más utilizado (Swan y Karalazos, 1990).

2.3.7 Microorganismos de la melaza

Mediante ensayos adecuados con soluciones diluidas de melazas, se ha demostrado que éstas, a pesar de su bajo contenido de fósforo, constituyen un buen medio nutritivo para muchos microorganismos, tales como levaduras, hongos y bacterias (Ariza y González, 1997).

Se considera importante la presencia de microorganismos mesófilos y termófilos dentro de la melaza. Los organismos mesófilos se desarrollan bien durante la dilución de las melazas (Ariza y González, 1997).

2.3.8 Aprovechamiento de la melaza

La melaza ha sido suministrada al ganado de carne y de leche por muchos años, principalmente como aditivo para incrementar la gustosidad o facilitar la reducción a comprimidos de las raciones convencionales mezclados en seco.

También ha sido utilizada como vehículo en varios tipos de alimentos líquidos; como suplemento para el ganado en pastoreo solo o adicionado con otros componentes como urea y ácido fosfórico. Igualmente ha sido común como ingrediente alimenticio para pollos y cerdos, en donde constituye un subproducto de primer orden para su alimentación, ya que puede ser utilizada a niveles hasta de 40%, logrando alimentación adecuada en los animales (Ariza y González, 1997).

Por otro lado, se usa como fertilizante para suelos, mezclada con bagazo y otros componentes, en casos especiales de abundancia. También es frecuentemente utilizada como combustible, para la preparación de pavimentos. Los diferentes usos de la melaza se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Aprovechamiento de la melaza de caña

UTILIZACIÓN	GENERALIDADES
Alimentos	Alimentación rica
Animales	Alimentación menos rica: desecados sobre pulpas, mezcla con diversos alimentos, pulverizado de forrajes, suplemento de ensilajes.
Recuperación de líquidos desazucarados	Vinazas para la obtención de ácido glutámico. Lejías finales como alimento animal y para la obtención de aminoácidos.
Fermentación	Levaduras para panificación. Levaduras para alimentación humana y animal: aditivo para piensos, extractos e hidrolizados de levadura, fuente de enzimas, vitaminas y ácidos nucleicos. Además es el sustrato utilizado en la producción de proteína unicelular. Grasas de levadura. Alcohol etílico. Productos colaterales de fermentación alcohólica.

Fuente: (Ariza y González, 1997)

2.3.9 Almacenamiento de la melaza

Los principales cambios notados durante el almacenamiento son: pérdida de sacarosa, ganancia de azúcares reductores, incremento del porcentaje de compuestos orgánicos no azúcares, pérdida de sólidos totales, y gran incremento de color (Honig, 1974).

La descomposición se atribuye principalmente a la reacción de las sustancias orgánicas inestables, con los azúcares reductores, formándose impurezas coloidales coloreadas, con alto contenido de carbono. Estos productos llegan a contener entre un 15 y 50% del nitrógeno total de la melaza, en forma no asimilables por los microorganismos (Honig, 1974).

Para reducir la probabilidad de cambios químicos originados por las altas temperaturas (climas tropicales), la melaza recién centrifugada debe enfriarse, a la menor temperatura posible, antes de ser almacenada. La cantidad de melaza almacenada y la duración del período de almacenamiento, son factores que deben considerarse en las medidas de seguridad (Honig, 1974).

La pérdida de sacarosa, azúcares reductores y azúcares totales está acompañada de un aumento de las sustancias reductoras no fermentables. Normalmente, el aumento de éstas últimas, es más rápido durante los tres primeros meses de almacenamiento. La formación de estos productos va acompañada de desprendimiento de anhídrido carbónico y además está en relación inversa con la magnitud de la temperatura de almacenamiento (Honig, 1974).

Es necesaria la limpieza periódica de los tanques de almacenamiento, ya que los sólidos sedimentables se adhieren y se compactan con facilidad, principalmente en el fondo, siendo necesario removerlos con elementos cortantes (Honig, 1974).

2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es la especie de levaduras utilizada por excelencia para la obtención de etanol a nivel industrial debido a que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo, tolera altas concentraciones de etanol, en la fermentación produce bajos niveles de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar altas concentraciones de azúcares, presenta alta viabilidad celular para el reciclado y características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior (Carballo, 2000). La clasificación taxonómica de la levadura se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Clasificación Taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*.

Reino	Hongo
División	<i>Amastogomycota</i>
Clase	<i>Ascomycetes</i>
Subclase	<i>Hemiascomycetidae</i>
Orden	<i>Endomycetales</i>
Familia	<i>Sacchaomycetaceae</i>
Subfamilia	<i>Saccharomycetaidae</i>
Género	<i>Saccharomyces</i>
Especie	<i>Cerevisiae</i>

Fuente: (Carballo, 2000).

Las levaduras, son organismos eucarióticos unicelulares, por lo tanto sus estructuras se encuentran formadas por pared celular, núcleo diferenciado y organelos como ribosomas y mitocondrias; la formación de una cápsula de polisacaridos, la ausencia o presencia de vacuolas y el desarrollo de las

mitocondrias dependen de las condiciones fisicoquímicas y de la edad del cultivo (Tuite y Oliver 1991). Las características generales de las levaduras se resumen en la Tabla No. 4.

Tabla 4. Características generales de las levaduras

CARACTERISTICAS	LEVADURAS
Dimensiones (micras)	4 - 8
Tiempo de duplicación (horas)	1 - 3
Ph (rango óptimo)	4,5 - 5,5
Nitrógeno (%)	7,5 - 8,5
Proteína (%)	35 - 45
Acidos nucleicos (%)	6 - 12
Carbohidratos (%)	30 - 45

Fuente: Ospina y Palacios, 1994.

Saccharomyces cerevisiae es una levadura cuya colonia es de color crema o blanco, apariencia húmeda y brillante, de bordes irregulares (Figura 2). La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30°C. Puede producir ascosporas cuando hay requerimientos nutricionales adecuados.



Figura 2. Vista macroscópica de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPG
Fuente: Manual de Medios de Cultivo. Merk. 2000.

Sus dimensiones son: 2.5 – 10 micras de ancho y 4.5 – 21 micras de largo. Microscópicamente se observan redondas y ovoides, elipsoides, a veces cilíndricas y filamentosas. Fermenta glucosa, galactosa, sacarosa y maltosa y no fermenta lactosa. Asimila galactosa, sacarosa, maltosa y rafinosa. La aireación óptima es de 0.6 – 0.9 vvm (Ariza y González, 1997).

El nombre de *Saccharomyces* significa azúcar de hongos. Producen una fermentación vigorosa y es conocida como la levadura de la cerveza, sirve como fuente de enzimas (invertasa), como extracto de levadura autolisado para sustituir los sabores naturales del extracto de carne, hace fermentar la masa del pan, interviene en la fabricación del vino y como fuente de proteína, vacunas, ácidos grasos y aceites (Ariza y González, 1997).

Saccharomyces pertenece al género de las levaduras de la familia *Saccharomycetaceae*; las células son esferoidales, elipsoidales o cilíndricas (Figura 3): La reproducción vegetativa ocurre por mecanismos multilaterales: los pseudomicelios pueden ser formados por algunas especies, pero presenta ausencia de hifas verdaderas. En presencia del O_2 las cepas pueden metabolizar oxidativamente sustratos como glicerol, etanol y lactato (Yepez, 1995).

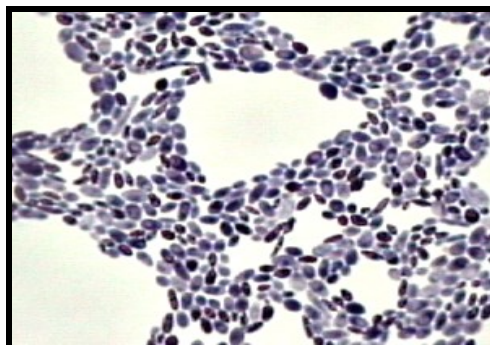


Figura 3. Vista Microscópica de *Saccharomyces cerevisiae* (http://www.n-t.ru/tp/nr/mk_p02.jpg).

Saccharomyces cerevisiae y otras especies de levaduras en general, realizan fermentación alcohólica, en la cual el etanol es formado a partir de la D-glucosa; éste azúcar es convertido en piruvato por la vía de Embden-Meyerhof Parnas en la cual el piruvato es descarboxilado a acetaldehído por la piruvato descarboxilasa y la tiamina pirofosfato y el acetaldehído reducido finalmente a etanol (Halasz y Laszlity, 1991).

2.3.1 Requerimientos nutricionales

Saccharomyces cerevisiae requiere ciertos nutrientes y condiciones ambientales para su apropiado crecimiento y reproducción. Algunos elementos son básicamente necesarios como por ejemplo carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo (Ospina y Palacios, 1994).

El carbono sirve como fuente de energía y como material constitutivo de la masa celular. El nitrógeno se encuentra en la célula formando parte esencial de las proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos; el fósforo se encuentra en los ácidos nucleicos, en la lecitina y en diversos compuestos fosforilados que participan activamente en los procesos de degradación oxidativa y de intercambio energético (ATP, ADP, AMP, NADP). Para que las fuentes de Nitrógeno, Fósforo y Carbono presentes en el sustrato sean aprovechados por la levadura se requiere que se encuentren en forma asimilable (Ospina y Palacios, 1994).

2.3.2 Requerimientos físico-químicos

El crecimiento de *S. cerevisiae* se ve favorecido por un pH próximo a 4.0 – 5.0 y no se desarrollan bien en medio alcalino a menos que se hayan adaptado al mismo. A pesar de la tolerancia bastante amplia de esta levadura para las variaciones de pH a partir de los sustratos habitualmente

usados en los medios de cultivo forman productos en especial ácidos que influyen en el crecimiento celular, producción enzimática y utilización de glucosa. Así por ejemplo, algunas investigaciones han observado que con un pH inicial del medio a valores entre 4.0 y 4.5 se obtiene mejor crecimiento y utilización de glucosa, mientras que la máxima producción de enzima se observa a un pH de 3.0 (Tuite y Oliver, 1991).

2.3.3 Composición química

Las levaduras contienen un 75% de agua y un 25% de materia seca aproximadamente. La composición de la materia seca de la levadura se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición química de las levaduras.

COMPONENTES	PORCENTAJE (%)
Ceniza	7
Carbohidratos	43
Proteína	48
Grasa	2

Fuente: Haehn, 1991.

Las sustancias minerales de las levaduras representan por lo general un 5 – 9% del peso seco. Los componentes principales son ácido fosfórico, alrededor del 50% y potasio del 30% (Haehn, 1991).

Las sustancias nitrogenadas de la levadura representan unas dos terceras partes de su peso seco (30 – 75%), contienen entre 5 y 12% de Nitrógeno (Castellanos, 1991). Estas sustancias se reparten en un 64% de proteína, 10% de peptonas y aminoácidos, 8% de amonio, 10% de purina y el resto consiste en pirimidinas y vitaminas. El contenido normal de aminoácidos

depende de la alimentación, de la cantidad de oxígeno, de la temperatura del cultivo, etc. (Tuite y Oliver, 1991).

2.4 PROCESO DE FERMENTACIÓN

2.4.1 Fermentación a escala industrial

A través del tiempo se han introducido diferentes modelos de fermentación tales como los sistemas discontinuos y sistemas continuos.

La mayoría de las fermentaciones son procesos discontinuos, cuya cinética propia permite que los equipos sean operados en intervalos. Al final de dicho tiempo, se procede a la recuperación de la levadura por centrifugación. Es un sistema que presenta facilidad en sus operaciones, ya que disminuye los requerimientos para obtener su completa esterilización, evitando así, el riesgo de pérdidas financieras y facilitando el manejo de materias primas. Como desventaja de este sistema, se muestra la decreciente productividad en la fermentación debido al largo tiempo de rotación y retraso en el crecimiento inicial (Quintero, 1981).

2.4.2 Fermentación discontinua

Llamados también procesos en “Batch” o lote, son de gran importancia comercial para su amplio uso. Las técnicas de instalación de los cultivos discontinuos, van a depender de si el proceso es aerobio o anaerobio (Doran, 1998).

Una fermentación discontinua “Batch” puede considerarse como un “sistema cerrado”. A tiempo cero (t_0), la solución esterilizada de nutrientes se inocula con microorganismos y se permite que se lleve a cabo la incubación en

condiciones óptimas de fermentación. A lo largo de toda la fermentación no se adiciona nada, excepto oxígeno (en forma de aire), un agente antiespumante y ácidos o bases para controlar el pH. La composición del medio de cultivo, la concentración de la biomasa y la concentración de metabolitos, cambia generalmente en forma continua como resultado del metabolismo de las células (Doran, 1998).

2.4.2.1 Condiciones que deben medirse y controlarse durante una fermentación discontinua

Una vez que un microorganismo y un sustrato han sido seleccionados es necesario encontrar las condiciones de operación más adecuadas y que optimicen el sistema. Desde el punto de vista de la operación es muy importante decidir las siguientes variables: temperatura, pH y productividad entre otras. Unas de estas variables se miden de manera continua, mientras que otras se miden a intervalos de tiempo. Las variables que se deben medir continuamente son: temperatura, pH, aireación, adición de nutrientes, y las variables mediadas de manera intermitente son: biomasa, producto y consumo de sustrato (Quintero, 1981).

2.4.2.1.1 Temperatura

La temperatura óptima de crecimiento de las levaduras especialmente de *Saccharomyces cerevisiae* es de 30 a 35°C. La temperatura afecta el crecimiento de manera notable, principalmente porque los microorganismos de una especie dada solo pueden crecer en un rango restringido de temperaturas, esto afecta de manera importante el crecimiento microbiano (Quintero, 1981).

2.4.2.1.2 pH

El pH es la medida de la concentración de iones hidrógeno y tiene un marcado efecto en la velocidad de crecimiento y el rendimiento. También el pH es óptimo para algunas especies como la de las levaduras que comprende un rango de 4.0 a 6.0. Un cambio en el valor de pH del medio puede afectar su composición y la naturaleza de la superficie microbiana al disociarse ácidos y bases. Este último, puede afectar la floculación de la biomasa o su adhesión al vidrio. El pH tiene una gran influencia en los productos finales del metabolismo anaeróbico (Quintero, 1981).

2.4.2.1.3 Nutrientes

Un medio de cultivo debe tener todos los elementos necesarios para el crecimiento microbiano, pero es conveniente señalar que las relaciones entre ciertos elementos son de particular importancia. Según investigaciones realizadas, se ha encontrado que en un cultivo para levaduras en melazas la relación carbono/nitrógeno debe ser 1:1 para que la productividad celular sea máxima. También la relación fósforo/oxígeno es relevante en lo que refiere a la eficiencia de conversión energética y a la respiración (Quintero, 1981).

2.4.2.1.4 Aireación

La ausencia o abundancia de oxígeno permite una selección tanto de microorganismos como de productos del metabolismo. Cuando el cultivo se produce en presencia de oxígeno molecular, la fermentación se denomina aeróbica y cuando éste carece de oxígeno anaeróbica. Si la fermentación es anaeróbica, la mayor parte del carbono se emplea como energía y sólo el 2% se asimila como material celular. *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura que posee alta actividad metabólica, por lo que en un proceso fermentativo

en fase aerobia se caracteriza por la producción de biomasa y en fase anaerobia generalmente por la producción de etanol (Owen, 1991).

2.4.2.1.5 Productividad

La productividad se define como la producción de biomasa por unidad de volumen, por unidad de tiempo del cultivo, dado en concentración de biomasa (g/L) en función del tiempo (h). Esta depende del diseño del fermentador, ya que afecta la transferencia de oxígeno que se ve reflejada en el rendimiento obtenido al final de la fermentación (Quintero, 1981). Un microorganismo adecuado para su utilización industrial debe producir la sustancia de interés, pero hay muchos otros aspectos a considerar. Es preciso disponer del organismo en cultivo axénico (puro), debe ser genéticamente estable, y debe crecer en cultivo a gran escala (Stanbury *et al.*, 1995).

2.4.2.2 Mecanismo de transformación de azúcar en biomasa

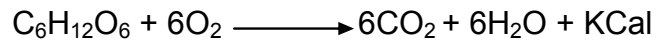
La levadura obtiene la energía a través de dos tipos de metabolismo:

1. Asimilación: En el cual la levadura toma las sustancias nutritivas que necesita del medio en que se desarrolla.
2. Desasimilación: En el cual, se degradan los hidratos de carbono incorporados a la célula (Jorgensen, 1990).

Se distinguen dos formas de desasimilación, la respiración y la fermentación. La primera se define como un proceso metabólico que conduce a una oxidación total de los hidratos de carbono incorporados bajo formación de dióxido de carbono, agua y energía, generando biomasa (Ecuación 1). Esta vía se presenta como ruta catabólica de glucosa; la mayoría de las células que convierten glucosa en piruvato pasan al ciclo del ácido tricarbóxico,

donde se convierte en dióxido de carbono y agua. Lo anterior se presenta en la siguiente ecuación (Jorgensen, 1990):

Ecuación 1:

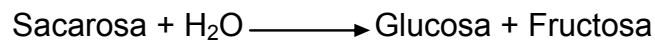


2.5 TÉCNICAS Y MÉTODOS UTILIZADOS

2.5.1 Técnica de Hidrólisis de la sacarosa

La sacarosa es un disacárido que no posee carbonos anoméricos libres por lo que carece de poder reductor. Dado que es común utilizar este azúcar en procesos fermentativos su determinación por el método de DNS requiere de hidrólisis ácida (HCl) ó enzimática para la obtención de glucosa y fructosa que son azúcares reductores. Este proceso se denomina inversión de la sacarosa y se puede observar en la siguiente ecuación (Godoy, 2002):

Ecuación 2:



2.5.2 Técnica del Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Es una técnica de oxido-reducción que se basa en la capacidad de la glucosa para reducir el ácido 3,5-dinitrosalicílico bajo determinadas condiciones; esta reducción produce una coloración que se hace más intensa a medida que aumenta la concentración de azúcares reductores. Se

evidencia por medio de la lectura de la absorbancia en espectrofotómetro, lo que conlleva a la aplicación de la Ley de Beer- Lambert (Miller, 1959).

El fundamento de esta técnica consiste en la oxidación de la glucosa, sin embargo, la glucosa en solución acuosa se encuentra en su forma cíclica que es muy estable y por lo tanto, no reacciona. Por esta razón, es necesario calentar la muestra para que el anillo se abra dejando expuesto el aldehído dando lugar a una reacción de oxidación como se observa en la Figura 4 (Routh *et al.*, 1990).

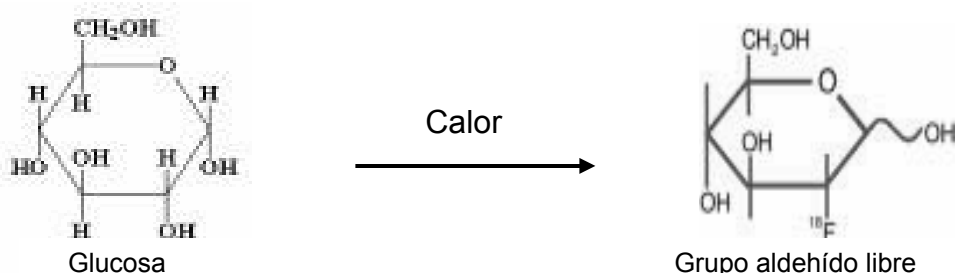


Figura 4. Estructura del anillo antes y después de ser sometido a un proceso de calentamiento (http://www.infoagro.com/viticultura/vino/analisis_vinos5.asp).

Para que se de la reacción también es necesario proporcionar un medio alcalino; esto es posible gracias a la adición de NaOH el cual es una base fuerte. En solución acuosa se ioniza liberando Na^+ y OH^- al medio, el cual se alcaliniza, permitiendo la oxidación de la glucosa; en esta oxidación, el carbono del grupo aldehído se convierte en un ácido carboxílico por la pérdida de hidrógenos y la ganancia de oxígeno, obteniéndose de esta forma el ácido glucónico; por otro lado, el ácido 3,5 dinitrosalicílico es reducido gracias a la acción del tartrato de sodio y potasio y de la oxidación de la Glucosa. El ácido pierde una de sus configuraciones 3 ó 5, principalmente la 3 por ser más reactiva, quedando ácido 3-amino-5-nitrosalicílico el cual produce una coloración amarilla (Figura 5). La

coloración es proporcional a la concentración de glucosa (Routh *et al.*, 1990).

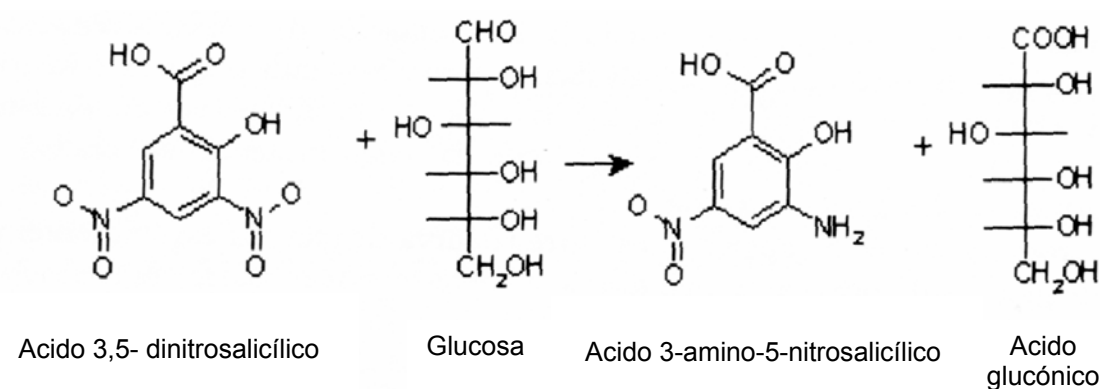


Figura 5. Reacción del Ácido 3,5- dinitrosalicílico (http://www.infoagro.com/viticultura/vino/analisis_vinos5.asp).

Luego se frena la reacción con hielo haciendo que la molécula de glucosa se cierre y adquiera de nuevo su configuración piranosa (Routh *et al.*, 1990).

2.5.3 Método Ecométrico

El Método Ecométrico es una técnica sencilla en la cual se siembran por estría de modo secuencial inóculos de prueba, que producen unidades formadoras de colonia (UFC) siempre decrecientes. Esta técnica valora tanto la sensibilidad de los medios a la colonización por los microorganismos buscados como también la resistencia a la colonización por las cepas que interfieren (Mosell, 2003).

En este método, el comportamiento de un medio determinado se valora inoculando seis placas. Tres de ellas se siembran por estría con la cepa de prueba, la cual es de esperar que crezca en el medio y forme colonias. Las otras tres placas se siembran con el microorganismo interferente, por lo tanto, se espera que no se presente crecimiento en el medio a evaluar. Las

placas testigo o control se siembran de modo similar y deben permitir el crecimiento de ambos grupos de microorganismos. Idealmente las placas control deben tener la misma composición que el medio prueba, pero sin incorporar agentes selectivos (Mosell, 2003).

Un parámetro útil para interpretar los resultados ecométricos es el índice de crecimiento absoluto (ICA). Este índice denota el último sector de la placa en el que ha habido un crecimiento significativo. Para evaluar el índice de crecimiento absoluto (ICA) para el microorganismo de prueba, se efectúan las lecturas de las cajas después de la incubación teniendo en cuenta que cada estría tiene un valor de 0.2 y la central de 1.0. Posteriormente, se verifica en cuales estrías se observa el crecimiento y se multiplica por el valor correspondiente para cada estría. Si se observa crecimiento en las cinco estrías de cada cuadrante y en la central, el ICA es igual a 5. El ICA debe ser evaluado para el medio de prueba con el microorganismo de prueba y para el medio de prueba con el microorganismo interferente. Se realiza la misma operación con el medio de referencia (Mosell, 2003).

Después de la incubación apropiada, las lecturas se expresan como índice de crecimiento relativo (ICR). Esto es la relación o cociente del ICA en la placa selectiva con respecto al medio testigo o control (Mosell, 2003).

A nivel industrial se busca desarrollar medios de cultivo que sean altamente productivos y en lo posible selectivos, cuando la segunda condición no se logra obtener mediante la formulación, se entran a implementar otras medidas a nivel de control de proceso para evitar la presencia de microorganismos indeseables (Mosell, 2003).

La productividad o rendimiento se define como el número de colonias de los microorganismos buscados en superficie del medio selectivo sobre el número

de colonias de los microorganismos buscados en superficie del medio control no selectivo. Esta se evalúa en el medio de prueba con el microorganismo de prueba y pueden encontrarse los siguientes resultados: ICA = 5: Medios altamente productivos; ICA = 2.5 – 5.0: Medios medianamente productivos; ICA= Menor De 2.5: Medios poco productivos; ICA = 0: Medios no productivos (Mosell, 2003).

La selectividad se define como el número de colonias de los microorganismos interferentes no buscados en superficie del medio selectivo sobre el número de colonias de los microorganismos interferentes no buscados en superficie del medio control. Esta se evalúa en el medio de prueba con el microorganismo interferente. El ICA del medio evaluado con el microorganismo interferente no debe ser mayor de 2 y se pueden obtener los siguientes resultados: ICA = 0: Medios Altamente selectivos; ICA = 0-2: Medios medianamente selectivos; ICA = Mayor De 2: Medios no selectivos (Mosell, 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

El medio YPG (Extracto de levadura, Peptona y Glucosa) es utilizado como sustrato para la obtención de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*; es un medio sintético, comercial, procesado y enriquecido con fuentes de carbono como glucosa, fuentes de nitrógeno como extracto de levadura y peptona. Sin embargo, debido a los componentes del medio YPG principalmente el extracto de levadura, resulta ser un medio costoso cuando se pretende obtener biomasa a gran escala, por lo que es de gran utilidad obtener un sustrato económico y de fácil consecución para fines biotecnológicos.

Teniendo en cuenta lo anterior, mediante este proyecto se pretende sustituir la producción de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPG por la utilización de medio melaza de caña, la cual tiene ventajas económicas y nutricionales como sales y minerales fundamentales para el crecimiento de la levadura. Además la melaza de caña, posee compuestos que favorecen el desarrollo de la biomasa como altos contenidos de carbohidratos (sacarosa), proteínas, grasas, calcio, fósforo, aminoácidos y vitaminas entre otros.

Con la utilización de este sustrato, se pretende minimizar los costos de producción a mayor escala y hacer buen uso de subproductos de los procesos de la industria azucarera, los cuales son actualmente utilizados para la producción de etanol y ácido cítrico entre otros.

La producción de biomasa levaduriforme a partir de la fermentación de la melaza de caña se realiza con el fin de incrementar el rendimiento de biomasa a partir sustrato $Y_{x/s}$ (g/g) y disminuir costos para cumplir con la segunda etapa del proyecto “*Evaluación de la capacidad probiótica in vitro de una cepa nativa de Saccharomyces cerevisiae*”, que se desarrolló en el laboratorio de biotecnología aplicada de la Pontificia Universidad Javeriana.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar diferentes concentraciones de melaza de caña con el fin de seleccionar la más adecuada para la producción de biomasa levaduriforme.
- Calcular parámetros cinéticos de rendimiento de biomasa a partir de sustrato $Y_{x/s}$ (g/g), velocidad específica de crecimiento μ_x (h^{-1}), tiempo de duplicación t_d (h) y productividad (gL^{-1}/h) de la cepa en estudio y de una cepa control.
- Comparar los parámetros cinéticos de la cepa en estudio (Cepa A) con la cepa control (Cepa B), usando la concentración de melaza seleccionada.
- Evaluar la productividad y selectividad del medio melaza de caña a la concentración seleccionada por medio del Método Ecométrico.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI). Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana.

5.1 MEDIO DE CULTIVO UTILIZADO

La melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae* se obtuvo de manera comercial, ya que es un subproducto de la industria azucarera que actualmente se comercializa para el engorde de animales.

Para realizar las curvas de crecimiento se llevó a cabo un tratamiento a la melaza de caña, con el fin de remover contaminantes e impurezas presentes que pudieran interferir con el crecimiento óptimo de *Saccharomyces cerevisiae*. El tratamiento se realizó de la siguiente manera:

La concentración de melaza de caña seleccionada se pesó y disolvió en agua estéril, calentando y agitando hasta diluirla totalmente. Posteriormente, se centrifugó tres veces con el fin de retirar gran parte de impurezas y contaminantes; se esterilizó por 20 minutos a 20 libras de presión. Por último, se adicionó ampicilina a una concentración de (300 mg/L) (Pedroza, 2006) y se procedió a realizar las curvas de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.

5.2 MICROORGANISMOS

La cepa utilizada en este estudio fue previamente aislada de cultivos de caña de azúcar, pertenece al género *Saccharomyces*, especie *cerevisiae* y fue denominada Cepa A (Anexo A), y como un control se utilizó la cepa que pertenece al género *Saccharomyces*, especie *boulardii*, denominada en este estudio Cepa B, la cual es un producto comercial liofilizado utilizado como probiótico y restaurador de flora intestinal.

5.3 CONSERVACIÓN DE CEPAS

Las cepas fueron conservadas en un Banco de Células Primario mantenidas en glicerol 30%(v/v) a -70°C (Aguirre, 2003).

A los bancos se les realizó control de calidad durante ocho meses con muestreos cada dos meses; el tamaño total del banco fue de 100 viales de los cuales el 50% correspondió al Banco de Células de Trabajo (BCT) y el resto correspondió al Banco de Células de Reserva (BCR); El control de calidad se realizó de la siguiente manera: Se tomaron cuatro viales del banco de trabajo, cada vial se vertió en un erlenmeyer con relación 1/5 de caldo YPG; posteriormente, se incubaron a una temperatura de 30°C 150 rpm, durante 12 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se llevaron a cabo pruebas de pureza y finalmente se realizaron diluciones seriadas con posteriores siembras en superficie en medio YPG.

5.4 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES TOTALES

Teniendo en cuenta que el medio de cultivo está compuesto por sacarosa, se hizo necesario realizar hidrólisis ácida previa a la cuantificación de azúcares

reductores mediante la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959).

5.4.1 Hidrólisis de la sacarosa

Inicialmente, se realizó la curva patrón de sacarosa preparando una concentración Stock de 6 g/L. A partir de esta solución se prepararon diferentes concentraciones para obtener la curva patrón. Posteriormente, se tomaron 2ml de cada una de las concentraciones y se adicionaron 2ml de HCl al 37% (v/v) con dilución 1/2 (Anexo B). Los tubos fueron agitados en vórtex y calentados a 92°C durante 10 minutos. La reacción se frenó en hielo. Posteriormente, se adicionaron tres gotas de fenofaleína a cada una de las muestras, luego NaOH al 25% (p/v) (aproximadamente 2.02ml) hasta obtener un tono ligeramente rosado. Por último, se adicionó HCl al 5% (v/v) (aproximadamente 0.6ml) y se agitó nuevamente en vórtex (Godoy, 2002; ICONTEC, 1994).

5.4.2 Técnica del Ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS)

Después de la etapa de hidrólisis, se procedió con el protocolo para llevar a cabo la técnica de determinación de azúcares reductores por el método de DNS para lo cual a 0.25 ml de la solución hidrolizada se agregaron 0.25 ml del reactivo DNS, los tubos fueron calentados en ebullición durante 5 minutos. Posteriormente, se frenó la reacción con hielo. Se adicionaron 2.5ml de agua destilada, se agitó en vórtex y se realizó la lectura de densidad óptica (D.O) a 540nm para cada tubo (Miller, 1959). Esta técnica se describe en detalle en el Anexo C.

5.5 DETERMINACIÓN DE BIOMASA

La biomasa se determinó mediante la técnica de peso seco, la cual fue realizada previamente. Para llevar a cabo la lectura de la biomasa obtenida en las curvas de crecimiento se realizaron tres lavados con solución salina estéril al 0.85% (p/v), con el fin de retirar cualquier interferente proveniente de la melaza de caña que pudiera afectar en la lectura en espectrofotómetro a 620nm. Además, se verificó la viabilidad de la cepa por medio de recuentos en placa en agar YPG (Ver composición en el Anexo D1) al inicio y al final de cada fermentación tanto en erlenmeyer como en biorreactor.

5.6 PRUEBAS DE CRECIMIENTO EN AGAR Y CALDO MELAZA EN 10%, 20% Y 30% (p/v) A NIVEL DE ERLLENMEYER

Para evidenciar el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en caldo y agar melaza, se prepararon tres concentraciones (10%, 20% y 30% (p/v)). Se realizó una siembra masiva para cada una de las concentraciones, las cajas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. Para el caldo melaza se prepararon las tres concentraciones con 15 mL, inoculadas con 1,5 mL de una suspensión celular obtenida del banco de células de trabajo (BCT). Posteriormente se incubaron a 37°C durante 24 horas.

5.7 PRUEBAS DE TEMPERATURA

Debido a que la ficha técnica de esta levadura reporta temperatura de crecimiento en 37°C, y por literatura se tiene que la temperatura óptima está entre 25°C y 30°C, se plantearon pruebas preliminares para comparar el crecimiento de la levadura a 30°C y 37°C, esto con el fin de asegurar la obtención de mayor cantidad de biomasa. Esta prueba se realizó por triplicado durante 16 horas con muestreos en la hora 0, 8 y 16 y se tomó en

cuenta la concentración de melaza al 10% (p/v) ya que esta es una concentración frecuentemente utilizada.

5.7.1 Preparación del inóculo

Se realizó un preinóculo en erlenmeyer con relación 1/5 de caldo melaza en el cual se inoculó una suspensión celular obtenida del banco de células de trabajo de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa A), adicionando ampicilina con una concentración de (300 mg/L) (Pedroza, 2006) y se incubó a una temperatura de 30°C, 150 rpm, durante 12 horas. Se realizó recuento inicial y final en placa y absorbancia ($_{620\text{nm}}$). Los muestreos fueron analizados por triplicado.

Este cultivo se utilizó para inocular dos erlenmeyer con concentración de melaza al 10% (p/v) con relación 1/5, los cuales fueron llevados a diferente temperatura (30°C y 37°C). Posteriormente, se midió la biomasa hasta obtener una absorbancia ($_{620\text{nm}}$) de 1,0 diluyéndolo con solución salina estéril al 0.85% (p/v).

5.7.2 Fermentación discontinua

Para la fermentación en erlenmeyer se guardó la relación 1/5 tomando 10% de inóculo. Se adicionaron en erlenmeyer con caldo melaza al 10% (p/v) adicionando ampicilina (300 mg/L) a un pH inicial de 5.0. Los erlenmeyer se incubaron a 30°C y 37°C, 150 rpm, durante 16 horas. Posteriormente, se realizaron muestreos cada 8 horas midiendo absorbancia($_{620\text{nm}}$) de biomasa y sustrato residual con previa hidrólisis de la sacarosa por triplicado. Adicionalmente se verificó la viabilidad sembrando en superficie en placas de agar YPG adicionado de Cloramfenicol 0,1% (p/v) a la hora 0 y la hora 16.

5.8 CURVA DE CRECIMIENTO CONTROL DE *Saccharomyces* CEPA A Y CEPA B EN CALDO YPG.

Se realizó la curva control para las cepas A y B en erlenmeyer con el fin de comparar la producción de biomasa en caldo YPG con la producción de biomasa obtenida en la fermentación con caldo melaza.

5.8.1 Preparación del inóculo

Se realizó en un erlenmeyer con relación 1/5 de caldo YPG en el cual se adicionó una suspensión celular de *Saccharomyces cerevisiae* Cepa A y *Saccharomyces boulardii* Cepa B obtenidas del banco de cepas de trabajo, adicionando ampicilina (300 mg/L). Se incubó a 30°C, 150 rpm, durante 12 horas. Se realizó recuento inicial en placa por duplicado para verificar viabilidad de la cepa, determinación de azúcares reductores por la técnica de DNS. Se midió la biomasa hasta obtener una absorbancia_(620 nm) de 1.0 diluyéndola con solución salina estéril al 0.85% (p/v).

5.8.2 Fermentación discontinua

Para las fermentaciones se guardó la relación 1/5. Se tomó 10% del inóculo y se vertió en el erlenmeyer de 500mL con caldo YPG adicionando ampicilina (300 mg/L). Posteriormente, se agitó a 150 rpm a 30°C durante 20 horas. Se realizaron muestreos con intervalos de una hora desde la hora 0 hasta la hora 6 y de dos horas desde la hora 8 hasta la hora 20. En cada muestreo se midió biomasa a una absorbancia_(620 nm) y se determinaron los azúcares reductores mediante la técnica de DNS por triplicado a 540 nm. Se verificó viabilidad sembrando en la hora 0 y en la hora 20 en agar YPG adicionado de cloramfenicol 0,1% (p/v).

5.9 EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MELAZA DE CAÑA A NIVEL DE ERLNMEYER (ETAPA INICIAL)

Se realizaron fermentaciones discontinuas en erlenmeyer manteniendo la relación de 1/5 del volumen del cultivo y tamaño del recipiente con el fin de favorecer la aireación. El medio de cultivo utilizado fue melaza a diferentes concentraciones (10%, 20% y 30% (p/v)). Las condiciones de fermentación manejadas fueron temperatura de 30°C, agitación de 150 rpm, durante 20 horas adicionando ampicilina (300mg/L) con pH inicial de 5.0. Se realizaron muestreos con intervalos de una hora desde la hora 0 hasta la hora 6 y cada dos horas de la hora 8 a la hora 20. Se realizó la lectura de la absorbancia_(620nm) con previos lavados de células con solución salina estéril 0.85% (p/v), los datos obtenidos se transformaron a concentración celular g/L por medio de curvas de peso seco previamente determinadas para cada cepa (Buitrago y Tenjo, 2007; Aguirre, 2003). El sustrato residual fue evaluado mediante la técnica de DNS con previa hidrólisis de la sacarosa. Los experimentos se realizaron por triplicado tanto para la cepa en estudio (cepa A) como para la cepa control (cepa B).

5.10 CURVAS DE CRECIMIENTO EN FERMENTADOR DE 1.5 LITROS (SEGUNDA ETAPA)

Una vez seleccionada la concentración de melaza de caña adecuada para ambas cepas en términos de concentración de biomasa (g/L), se procedió a realizar fermentaciones discontinuas en fermentador de 1.5L.

5.10.1 Preparación del inóculo

Se realizó en un erlenmenyer con relación 1/5 de caldo melaza al 10% (p/v) en el cual se adicionó una suspensión celular de *Saccharomyces cerevisiae*

cepa A y *Saccharomyces boulardii* Cepa B, adicionado de ampicilina (300mg/L) con pH inicial de 5.0 y se incubó a 30°C, 150 rpm, durante 12 horas. Se realizó recuento inicial en placa por duplicado para verificar viabilidad de la cepa, determinación de azúcares reductores por la técnica de DNS con previa hidrólisis de la sacarosa y se midió la biomasa hasta obtener una absorbancia_(620nm) de 1.0 diluyéndola con solución salina estéril al 0.85% (p/v).

5.10.2 Fermentación discontinua

Para las fermentaciones en biorreactor de 1.5L se guardó la relación 1/2. Se tomó el 10% del inóculo y se adicionó en cada biorreactor a la concentración de melaza escogida en erlenmeyer adicionando ampicilina (300 mg/L) con un pH inicial de 5.0. Se incubó a una temperatura de 30°C, 150 rpm, 1vvm durante 20 horas (Aguirre, 2003). Posteriormente, se realizaron muestreos con intervalos de una hora desde la hora 0 hasta la hora 6 y de dos horas desde la hora 8 hasta la hora 20. En cada muestreo se midió biomasa a una absorbancia_(620nm) y se determinaron los azúcares reductores mediante la técnica de DNS con previa hidrólisis de la sacarosa a una absorbancia_(540nm). Se verificó viabilidad sembrando en superficie la hora 0 y la hora 20 en placas de agar YPG adicionado de cloramfenicol al 0,1% (p/v). Se realizó coloración de Gram para verificar pureza. Cada técnica fue realizada por triplicado.

5.11 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS

Con los datos obtenidos de las curvas de crecimiento en erlenmeyer y en fermentador de 1.5L, se determinaron parámetros cinéticos como rendimiento de biomasa a partir de sustrato $Y_{x/s}$ (g/g), velocidad específica de

crecimiento μ_x (h^{-1}), tiempo de duplicación t_d (h) y productividad (Doran, 1998).

5.12 PRUEBAS DE PRODUCTIVIDAD Y SELECTIVIDAD MEDIANTE EL MÉTODO ECOMÉTRICO

Estas pruebas se realizaron con el objetivo de evaluar la productividad y selectividad del medio melaza de caña a la concentración seleccionada en la primera etapa.

Inicialmente, se tomaron dos cajas con el medio a investigar (medio melaza a la concentración seleccionada) y una caja de agar YPG adicionado de cloramfenicol al 0.1% (p/v) como medio de referencia. El microorganismo a evaluar fue *Saccharomyces cerevisiae* (cepa A) y el microorganismo interferente fue *Staphylococcus aureus*.

Para realizar el método ecométrico, inicialmente se tomó una suspensión celular de 1.5mL de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Staphylococcus aureus* mantenidas a $-70^{\circ}C$ en el banco de trabajo y se sembraron en cajas de agar YPG adicionado de cloramfenicol al 0.1% (p/v) y Baird Parker (Ver composición en el anexo D2) respectivamente; A partir de esta siembra se realizó un inóculo en solución salina estéril al 0.85% (p/v) de cada microorganismo con una concentración del tubo 5 patrón de Mac Farland.

Posteriormente, se tomó con el asa curva calibrada una muestra del inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* y se sembró en el medio a investigar melaza de caña. Esta siembra se realizó trazando en la superficie del agar cinco estrías paralelas por cuadrante y una estría central, sin tomar nueva muestra. Las cajas fueron incubadas a $30^{\circ}C$ durante 48 horas. Así mismo, se tomó

otra caja del medio a investigar y se sembró el microorganismo interferente *Staphylococcus aureus* (Mosell, 2003).

5.13 ANALISIS ESTADISTICO

Para la presentación e interpretación de resultados, se utilizaron las medias estadísticas como la Media Aritmética, Desviación Estándar, Coeficiente de Variación, Porcentaje de Variación y Presentaciones gráficas.

Por consiguiente, para la discusión de resultados obtenidos a lo largo del proyecto, se utilizó la prueba T-student para establecer cual de las tres concentraciones estudiadas es la más adecuada para la mayor producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Adicionalmente, estos datos se tabularon mediante el programa estadístico SPSS versión 14 para observar la dispersión de los datos y así verificar la confiabilidad del estudio.

5.13.1 CEPA A. *Saccharomyces cerevisiae*

- Hipótesis General:

La producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 10% no difiere a la producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 20%.

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_i: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

- Hipótesis General:

La producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 20% no difiere a la producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 30%.

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_i: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

5.13.2 CEPA B. *Saccharomyces boulardii*

- Hipótesis General:

La producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 10% no difiere a la producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 20%.

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_i: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

- Hipótesis General:

La producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 20% no difiere a la producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 30%.

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_i: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 CONSERVACIÓN DE CEPAS

La conservación de cepas es una herramienta esencial en la biotecnología, ya que es necesario contar con una fuente pura y viable del microorganismo de interés en cualquier bioproceso, teniendo en cuenta que los problemas de viabilidad y de pureza en los cultivos son frecuentes y comunes. Con el fin de evitar la pérdida de cualquier microorganismo tanto de interés industrial como investigativo, es necesaria la implementación de un banco de células, el cual es definido como “un conjunto de alícuotas homogéneas de un cultivo microbiológicamente puro que se almacena bajo condiciones que garanticen la estabilidad y la viabilidad genética” (González, 2002).

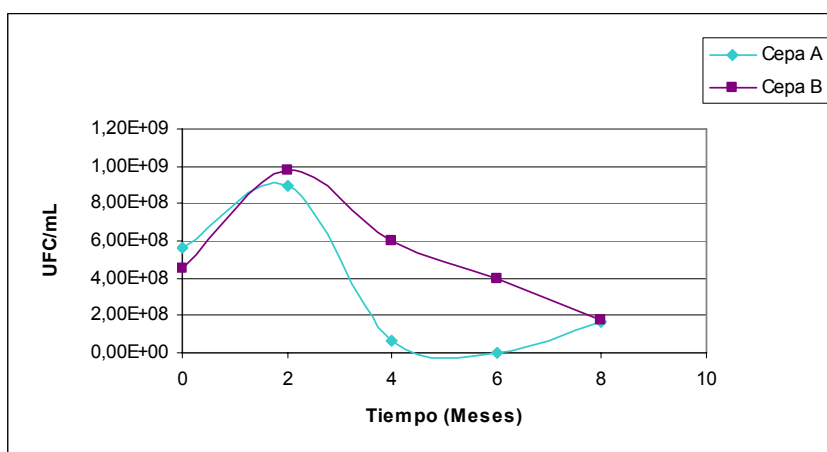


Figura 6. Valores de UFC/mL en función de los controles realizados cada dos meses.

A lo largo del control de calidad del banco de cepas, se observó que el recuento inicial fue de 10^8 para ambas cepas (Figura 6). Sin embargo, en el mes 4 la cepa nativa comenzó a perder viabilidad disminuyendo un ciclo logarítmico; en el sexto mes se obtuvo un recuento de 10^5 , lo que indicó que

la cepa se estaba muriendo debido a un manejo inadecuado de la temperatura ya que al comienzo el banco se conservó a una temperatura de -70°C y posteriormente se cambió a una temperatura de -20°C ; lo que indica que esta temperatura no es la ideal para la conservación de bancos. Al observar esta pérdida se recuperó la concentración de células para que quedara en un exponente de 10^8 por medio de inóculos en medio YPG. La viabilidad de la cepa B estuvo estable a lo largo del estudio. Los datos se observan en el Anexo E.

Existen muchos compuestos que se pueden utilizar como crioprotectantes, pero el que se utiliza con más frecuencia es el glicerol, a una concentración del 15% al 30% (v/v). Estas sustancias protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación a temperaturas inferiores a cero grados centígrados, a la que el agua se congela. De esta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida no hay crecimiento (González, 2002). Lo anterior afirma, que el cambio brusco de temperatura que tuvieron las cepas afectó la viabilidad debido a que al utilizar como crioprotectante el glicerol inicialmente a una temperatura de -70°C y luego pasar a -20°C se formaron cristales, los cuales afectaron la pared celular de las células; por lo tanto, es mejor que las variaciones de la temperatura sean rápidas tanto para la congelación como para la descongelación.

6.2 DETERMINACIÓN DE LA CURVA PATRÓN DE SACAROSA

Al realizar la técnica de DNS con previa hidrólisis de la sacarosa se realizó la curva patrón en la cual se obtuvo la siguiente ecuación (Los datos obtenidos se encuentran en el Anexo F):

Ecuación 3:

$$Y = mx + b$$
$$Y = 0.1463x + (-0.066)$$
$$R^2 = 0.9979$$

Curva patrón sacarosa
Fuente: Autores

6.3 PRUEBAS DE CRECIMIENTO EN AGAR Y CALDO MELAZA EN 10%, 20% Y 30% (p/v) A NIVEL DE ERLLENMEYER

Luego de sembrar el microorganismo en agar y caldo melaza a las tres concentraciones estudiadas 10%, 20% y 30% (p/v), se observó el desarrollo metabólico del microorganismo al utilizar como fuente de carbono la sacarosa y otros azúcares reductores presentes en menor cantidad (Figura 7).

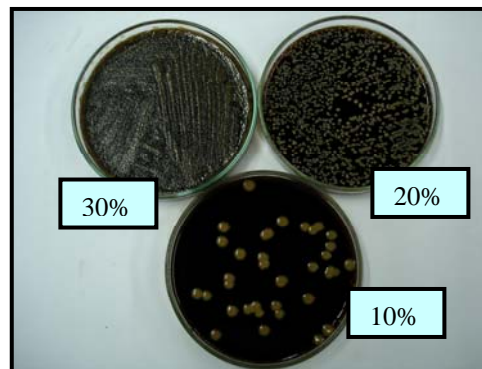


Figura 7. Pruebas de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en agar melaza. Vista macroscópica. Fuente: Autores.

Posterior a la siembra, se observaron colonias características de *Saccharomyces cerevisiae* en agar melaza y notable turbidez en los caldos melaza a las tres concentraciones. Sin embargo, al realizar la prueba de

pureza mediante coloración de Gram se observó en los caldos contaminación por Bacilos esporulados Gram positivos y Bacilos Gram negativos en contraste al agar melaza en el cual se evidenciaron solamente levaduras (Figura 8); Dado que la melaza de caña es un medio muy enriquecido gracias a la alta concentración de carbohidratos los cuales pueden ser utilizados como fuente de carbono por gran variedad de microorganismos, además la melaza contiene compuestos tales como calcio, magnesio, fósforo y potasio indispensables para el funcionamiento celular.

Teniendo en cuenta que la melaza es un residuo de la industria azucarera y que tiene impurezas y contaminantes en su composición, se tomó la decisión de centrifugar la melaza tres veces, además de esterilizarla a 20lb de presión durante 20 minutos y adicionar ampicilina a una concentración de (300 mg/L) como inhibidor de la flora acompañante (Pedroza, 2006), mediante ensayos con melazas, se ha demostrado que éstas, a pesar de su bajo contenido en nitrógeno y fósforo, constituyen un buen medio nutritivo para muchos microorganismos, como hongos y bacterias. En base a esto, se utilizó un antibiótico beta-lactámico como la ampicilina ya que es una penicilina semisintética que posee un amplio espectro en el que se incluyen bacterias Gram negativas; este antibiótico actúa inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose a unas proteínas específicas llamadas PBPs (*Penicillin-Binding Proteins*) localizadas en la pared celular. Al impedir que la pared celular se construya correctamente, la ampicilina ocasiona la lisis de la bacteria y su muerte (Carballo, 2000).

El uso de antibióticos como inhibidores de microorganismos o flora acompañante en las fermentaciones industriales y la influencia de la penicilina y ampicilina han sido favorables como agentes controladores de la contaminación de la melaza de caña en procesos biotecnológicos (Calderón, 2007).

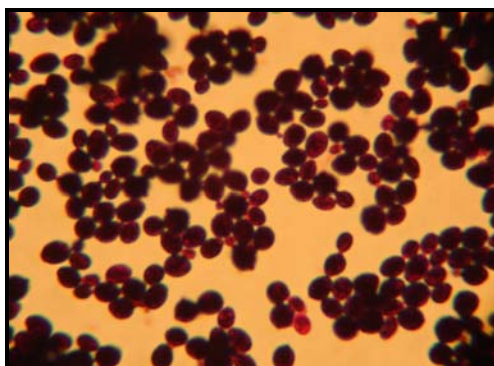


Figura 8. Coloración de Gram de la Cepa A. a partir de colonias en agar melaza.
Fuente: Autores.

6.4 PRUEBAS DE TEMPERATURA

En la tabla 6, se muestra que el consumo de sacarosa en melaza 10% (p/v), a una temperatura de 37°C es mayor que a 30°C; sin embargo, se obtuvo la mayor cantidad de biomasa a 30°C (21,3 g/L) en comparación a la obtenida a 37°C (19,82 g/L), además al determinar el rendimiento de biomasa en sustrato, se obtuvo a la temperatura de 30°C un $Y_{x/s}$ (0,857 g/g) y a 37°C un $Y_{x/s}$ (0,597 g/g) indicando que la temperatura adecuada para la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* es a 30°C.

Tabla 6. Valores de producción de biomasa y consumo de sustrato a temperaturas de 30°C y 37°C. Cepa A.

Tiempo	BIOMASA (g/L)		SUSTRATO RESIDUAL (g/L)	
	30°C	37°C	30°C	37°C
0	1,353	0,896	39,68	46,78
8	15,17	15,7	31,09	23,15
16	21,3	19,82	16,43	15,13

Teniendo en cuenta que se partió de un mismo inóculo, en esta parte se observa que a la hora 0 la biomasa en 30°C y en 37°C presenta diferencias en los valores. Esto puede deberse a que se realizó un preinóculo para asegurar la concentración inicial de biomasa a una temperatura de 30°C, posteriormente se realizó un segundo preinóculo para cada una de las temperaturas con esta concentración de biomasa obtenida para iniciar las curvas de crecimiento.

Por otro lado, al analizar el sustrato residual se observa que los valores a 30°C y 37°C de la hora 0 presentan diferencias en cuanto al sustrato inicial teórico (sacarosa 60g/L). Esto puede atribuirse a dos razones: la primera, que al centrifugar la melaza para retirar los sólidos presentes en ella pudo haber disminuido la cantidad de sustrato; y la segunda, el tiempo de esterilización pudo excederse de 20 minutos a 20lb de presión, lo cual puede conllevar a una disminución en la concentración de los carbohidratos presentes. A pesar de esto, se observó un consumo de sustrato lógico ya que la concentración (g/L) disminuye notablemente a las dos temperaturas de manera similar; sin embargo, se observó que el sustrato no se agota en su totalidad en 16 horas de fermentación, esto indica que para que el sustrato se agote totalmente debe transcurrir un tiempo mayor en el cual seguramente el microorganismo entraría en fase estacionaria.

6.5 CURVA DE CRECIMIENTO CONTROL DE *Saccharomyces* CEPA A Y CEPA B EN CALDO YPG.

Estas curvas se realizaron con el fin de comparar el crecimiento de las cepas A y B en el medio YPG adicionado de ampicilina (300mg/L), con la melaza de caña y de esta forma conservar las mismas condiciones de crecimiento del microorganismo. En estudios realizados por Buitrago y Tenjo, 2007, la adición de un antibiótico como la ampicilina a este medio no tiene ningún

efecto secundario sobre el crecimiento de *Saccharomyces*, ya que se produjo crecimiento adecuado por parte de la levadura en medio YPG con ampicilina y sin ampicilina.

Tras 20 horas de fermentación en caldo YPG, se observó que la cepa A consume la fuente de carbono que es en este caso la glucosa desde la hora 0 hasta la hora 8 y a partir de esta hora el sustrato se agota en su totalidad, resultados que corroboran lo mencionado anteriormente en las pruebas realizadas a 30°C y 37°C, teniendo en cuenta que la glucosa es un sustrato de fácil asimilación. En la Figura 9, se observa que la producción de biomasa de la cepa A se obtiene desde la hora 0 hasta la hora 14 siendo esta la fase logarítmica o exponencial, sin tener una fase de adaptación. Desde la hora 16 hasta la hora 20 la levadura entra en fase estacionaria (Anexo G). Los datos obtenidos en este estudio coinciden con lo reportado por Pérez *et al.*, 2005 y Aguirre, 2003 quienes utilizaron el medio YPG para la obtención de biomasa levaduriforme, ya que la levadura al ser cultivada a 30°C no presentó fase de adaptación y la fase estacionaria inició desde la hora 12 - 14 hasta la hora 20 luego de 20 horas de fermentación.

En cuanto a la cepa B, el consumo de sustrato se obtuvo desde la hora 0 hasta la hora 8, y desde la hora 10 a la hora 20 se observa el agotamiento de la glucosa (Figura 9). Por otra parte, la producción de biomasa en la cepa B arroja como resultado una fase de adaptación que va desde la hora 0 a la hora 2 y con una fase logarítmica o exponencial desde la hora 3 hasta la hora 14 para luego entrar a fase estacionaria. Los datos obtenidos se observan en el Anexo G.

Al analizar el comportamiento del sustrato residual tanto de la cepa A como de la cepa B, se observa que en la hora 0 hay un incremento en el valor del sustrato experimental en comparación con el sustrato teórico (20g/L) como

se observa en el Anexo G. Esto puede deberse a que generalmente cuando el tiempo de esterilización se excede, los azúcares tienden a caramelizarse y concentrarse, razón por la cual se pueden encontrar valores experimentales superiores al sustrato inicial teórico.

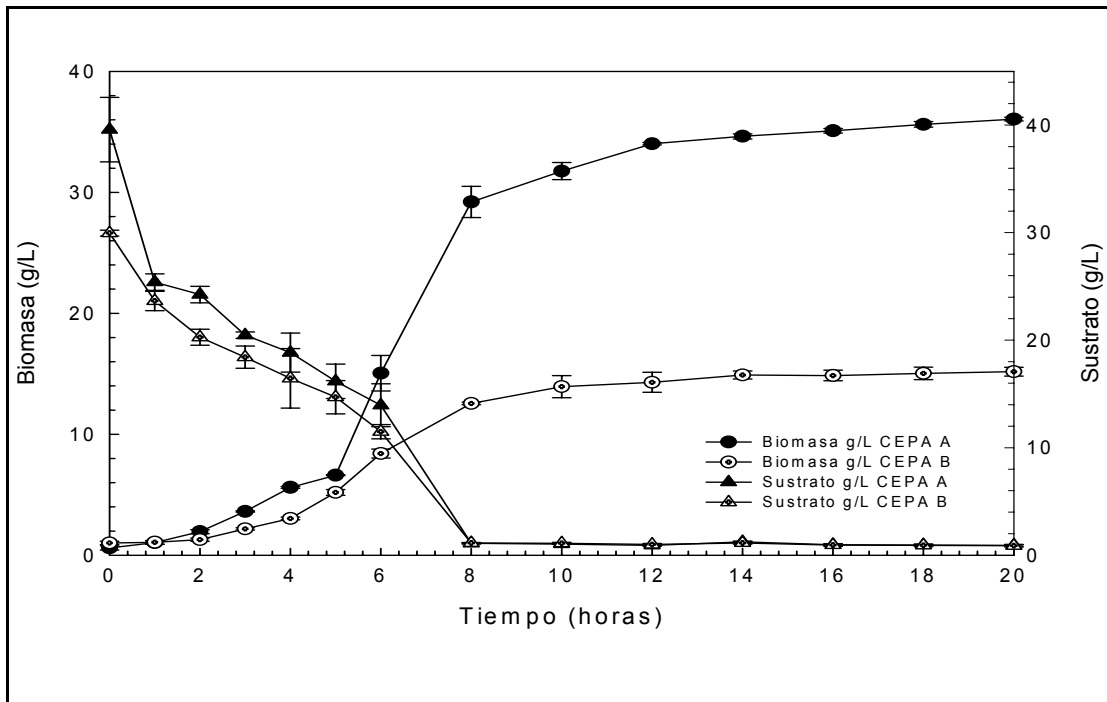


Figura 9. Biomasa y Sustrato residual en función del tiempo. Curva control en caldo YPG con adición de ampicilina (300mg/L). Cepa A y cepa B.

Los resultados de producción de biomasa fueron convertidos a concentración (g/L) con la siguiente ecuación de peso seco para la Cepa A:

Ecuación 4:

$$Y = mx + b$$

$$Y = 0,2625x + 0,0717$$

$$R^2: 0,9803$$

Peso seco Cepa A. (Buitrago y Tenjo, 2007)

Los resultados de sustrato residual fueron convertidos a concentración (g/L) con la siguiente ecuación utilizada para la técnica de DNS.

Ecuación 5:

$$\begin{aligned} Y &= mx + b \\ Y &= 0.4398x + (-0,262) \\ R^2 &: 0,9979 \end{aligned}$$

Consumo de sustrato. Técnica de DNS.
Fuente: Autores.

Los resultados de producción de biomasa fueron convertidos a concentración (g/L) con la siguiente ecuación de peso seco para la Cepa B:

Ecuación 6:

$$\begin{aligned} Y &= mx + b \\ Y &= 1.7039x + (-0,210) \\ R^2 &: 0,98 \end{aligned}$$

Peso seco Cepa B. (Aguirre, 2003).

Los valores de sustrato residual para la cepa B fueron convertidos a concentración g/L con la ecuación descrita anteriormente para la técnica de DNS.

6.6 EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MELAZA DE CAÑA A NIVEL DE ERLLENMEYER (ETAPA INICIAL).

6.6.1 Cepa A. *Saccharomyces cerevisiae*.

Al realizar las fermentaciones con melaza de caña 10% (p/v) (Figura 10, Panel A), se presentó fase de adaptación desde la hora 0 hasta la hora 5 y una fase exponencial desde la hora 6 hasta la hora 16, lo que afirma que el microorganismo creció en el medio melaza. Sin embargo, al analizar el comportamiento del sustrato residual se presentan algunos incrementos (horas 1,2,3,4 y 5) a lo largo de las horas de fermentación (Tabla 7), esto se debe a la presencia de la enzima invertasa. Esta enzima hace que el microorganismo consuma sustrato a medida que actúa sobre la sacarosa produciendo glucosa y fructosa que son azúcares reductores, los cuales son más simples y la levadura puede asimilarlos con mayor facilidad (Kazuhiko y Rozo, 1995). En esta parte, podría afirmarse que se lleva a cabo el proceso conocido como inversión de la sacarosa; la presencia de esta enzima depende de las concentraciones de glucosa en el medio de cultivo, es decir, que a mayor concentración de glucosa a una temperatura de 30°C, se evidencia con mayor facilidad la actividad de la enzima invertasa y a valores óptimos de pH y temperaturas afecta la actividad probablemente debido a que esta enzima esta situada cerca de la superficie de la célula (Zech y Görisch, 1995). El pH óptimo para la formación de biomasa en levaduras está en un rango de 4.0 – 5.0, razón por la cual en el presente estudio se preparó el medio melaza a pH 5.0.

En la Figura 10, Panel A; se observa que al utilizar la melaza al 20% (p/v), se presentó una fase de adaptación por parte del microorganismo, esto permite deducir que el incremento en la concentración de melaza hace que el microorganismo necesite producir enzimas tipo invertasa que le permitan metabolizar el sustrato y para lograrlo tarda mayor tiempo; en la hora 8 comienza la fase exponencial y en la hora 16 empieza la fase estacionaria. En cuanto al sustrato residual, se presenta un comportamiento esperado debido a la presencia de la enzima invertasa, como se puede ver claramente en la Figura 10, Panel B.

Así mismo se observa en la Figura 10, Panel A; el comportamiento de la cepa A en medio melaza al 30% (p/v). En esta concentración hubo fase de adaptación igual a la concentración de 20% (p/v). La fase exponencial se presentó de la hora 8 hasta la hora 16, hora en la cual inicia la fase estacionaria. La hidrólisis arrojó diferentes incrementos en los resultados al igual que en las dos concentraciones anteriores debido a la producción de azúcares reductores de fácil asimilación para la levadura en estudio; sin embargo, se observa que la levadura alcanzó la fase estacionaria antes de consumir la totalidad del sustrato, posiblemente porque la concentración de melaza era muy alta como se observa en la Figura 10, Panel B. Echeagaray y colaboradores, 2000, analizó los efectos de la concentración de melaza en la producción de biomasa y consumo de sustrato y logró concluir que altas concentraciones de melaza favorecen la acumulación de sustrato residual en cultivos continuos o fed - batch.

En este estudio se realizó un cultivo discontinuo o batch, en el que el sustrato se adiciona solo al comienzo de la fermentación y la producción de biomasa es dependiente de la concentración de sustrato.

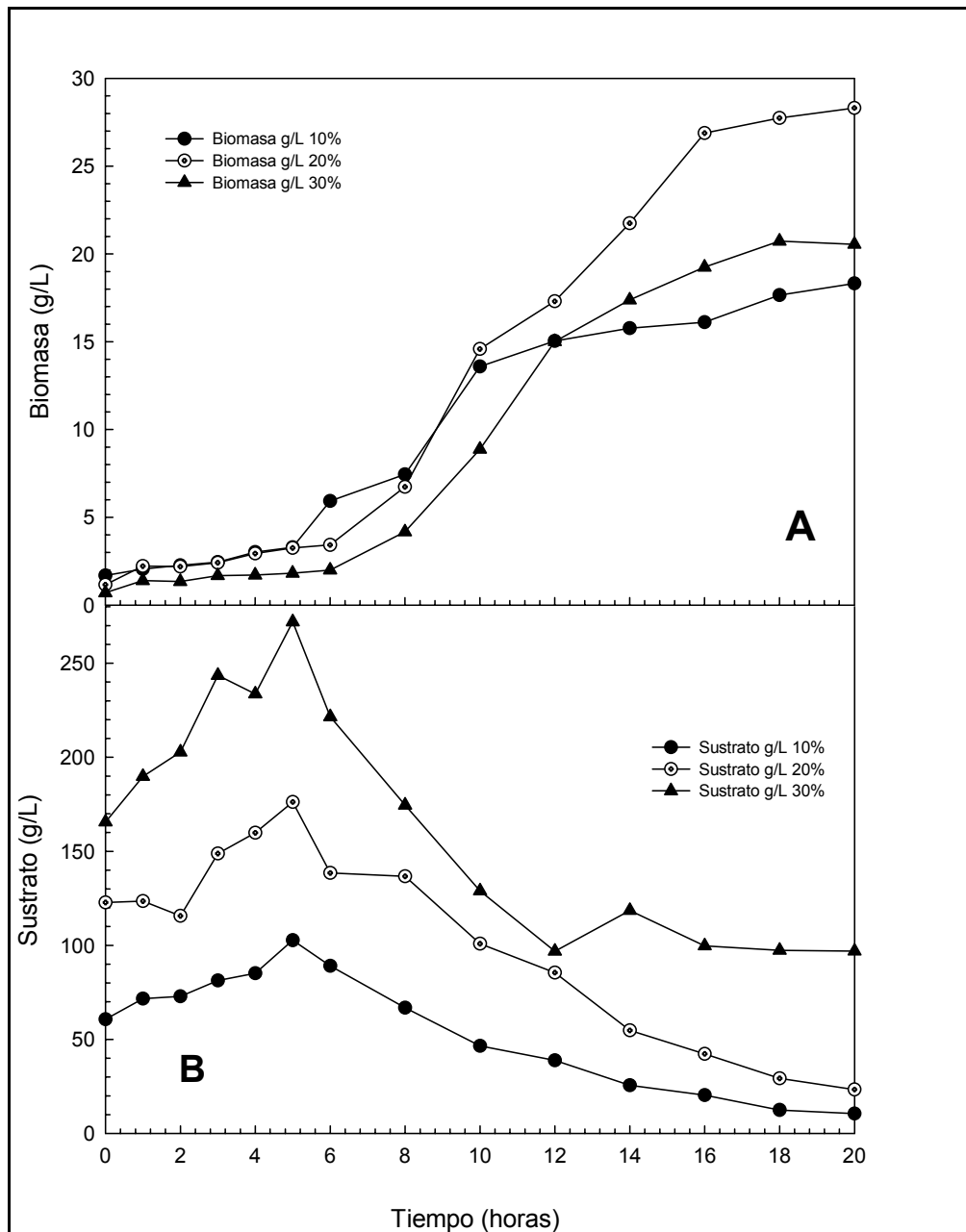


Figura 10. Fermentación en erlenmeyer. Melaza 10%, 20% y 30% (p/v). Cepa A.

Al analizar el comportamiento del sustrato residual se observó que la fermentación a la concentración de melaza al 10% inició con una concentración 60g/L, la del 20% con una concentración de 122g/L y la del 30% con una concentración de 165g/L debiendo comenzar cada fermentación con una concentración de 60g/L, 120g/L y 180g/L de sacarosa respectivamente (Tabla 7). En la concentración de 30% (p/v) se observa que se inició con un sustrato experimental menor al sustrato teórico, lo que se atribuye a las dos razones previamente mencionadas; ya que al centrifugar la melaza para retirar los sólidos presentes en ella pudo haber disminuido la cantidad de sustrato y el tiempo de esterilización tal vez se excedió de 20 minutos a 20lb de presión lo cual hizo que se disminuyera el sustrato inicial experimental.

Al evaluar la producción de biomasa en las tres concentraciones de melaza de caña, se observó al final de cada fermentación una alta producción de biomasa, lo cual es satisfactorio ya que indica que la levadura a estudiar se acopla rápidamente a las condiciones dadas por el medio melaza si hay una adecuada reconstitución de la cepa al momento del preinóculo (Tabla 7). De esta manera, en la hora 16 se obtuvo el máximo crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* teniendo en cuenta que los valores obtenidos en la hora 18 son muy cercanos, obteniendo una concentración g/L de 16,107 en 10% (p/v); 26,881 en 20% (p/v) y 28,869 en 30% (p/v) como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 7. Valores de biomasa y consumo de sustrato. Fermentación en erlenmeyer. Melaza 10%, 20% y 30% (p/v). Cepa A.

CEPA A						
Tiempo (Horas)	10%		20%		30%	
	Biomasa g/L	Sust. Residual g/L	Biomasa g/L	Sust. Residual g/L	Biomasa g/L	Sust. Residual g/L
0	1,686	60,680	1,159	122,792	1,053	165,539
1	2,057	71,626	2,213	123,469	2,083	189,826
2	2,257	72,838	2,193	115,628	2,009	202,733
3	2,449	81,359	2,415	148,736	2,508	243,518
4	3,010	85,163	2,937	159,812	2,565	233,679
5	3,288	102,650	3,252	176,190	2,721	271,924
6	5,923	89,070	3,423	138,479	2,990	221,501
8	7,441	66,855	6,730	136,720	6,253	174,529
10	13,587	46,510	14,583	100,864	13,311	128,899
12	15,041	38,816	17,301	85,492	22,507	96,842
14	15,764	25,579	21,751	54,732	26,069	118,509
16	16,107	20,375	26,881	42,252	28,869	99,702
18	16,202	12,479	26,920	29,256	29,010	97,352
20	16,506	10,539	27,010	23,346	29,200	96,904

6.6.2 Cepa B. *Saccharomyces boulardii*.

Al momento de realizar las fermentaciones con melaza al 10% (p/v) a la cepa B, se observó una fase de adaptación de la hora 0 a la hora 6, lo cual indica que *Saccharomyces boulardii*, no se adapta tan fácil a los componentes del medio melaza. La fase exponencial se ve claramente de la hora 8 hasta la hora 16; Sin embargo, la producción de biomasa es notablemente baja en contraste a la cepa A (16,10g/L), ya que se obtiene solo una concentración de (2,505g/L) en la hora 16 de fermentación (Tabla 8). En cuanto al consumo de sustrato, se observan ciertas variaciones ya que a medida que el microorganismo crece se hidroliza la sacarosa para producir azúcares reductores y asimismo el microorganismo los consume lo cual se observa en la Figura 11, Panel B, como incrementos a lo largo de las 20 horas de fermentación.

Al analizar los resultados arrojados con la melaza al 20% en la cepa B (Figura 11, Panel A), se observó que el microorganismo se adaptó al medio de la hora 0 a la hora 6 y presenta la fase exponencial desde la hora 8 a la hora 14 obteniendo una concentración de biomasa de 2,902g/L (Tabla 8), por lo que fue muy baja en comparación a la cepa A (26,88g/L). El consumo de sustrato presenta los incrementos característicos de la hidrólisis de la sacarosa y por ende de la presencia de la enzima invertasa como se había mencionado anteriormente.

En medio melaza al 30% (p/v), se observa adaptación al medio por parte del microorganismo de la hora 0 a la hora 6 al igual que las concentraciones 10% y 20% (p/v) (Figura 11, Panel A). La fase exponencial o logarítmica se ve claramente de la hora 8 a la hora 14 obteniendo una concentración de biomasa de 3,090 g/L (Tabla 8), lo que afirma que definitivamente en las tres concentraciones de melaza trabajadas con la cepa B, se obtiene una muy baja cantidad de biomasa en comparación a la cepa A.

Por otro lado, se observa que en el transcurso de la fermentación de la cepa B la fase exponencial o logarítmica va desde la hora 8 hasta la hora 14, teniendo una fase de adaptación a las tres concentraciones. De esta manera se obtuvo el máximo crecimiento de *Saccharomyces boulardii*, obteniendo una concentración de 2,505 g/L en 10% (p/v) en la hora 16; 2,902 g/L en 20% (p/v) y 3,090 g/L en 30% (p/v) en la hora 14 (Tabla 8).

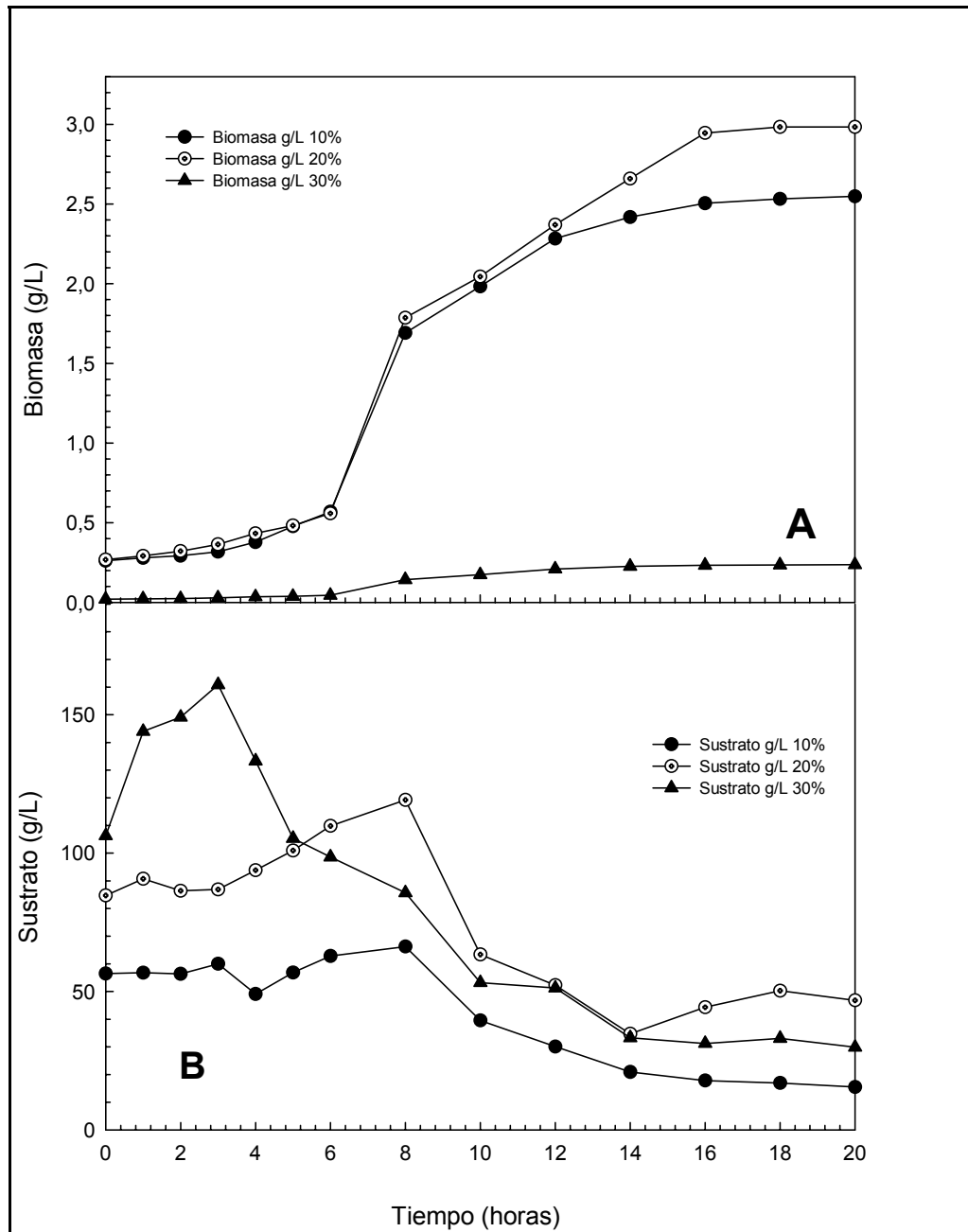


Figura 11. Fermentación en erlenmeyer. Melaza 10%, 20% y 30% (p/v). Cepa B.

Los resultados obtenidos anteriormente permiten deducir que tal vez la variedad *boulardii* sea más susceptible a sustratos complejos como melaza, variaciones del pH, fuentes de nitrógeno entre otras, ya que el

comportamiento en caldo YPG fue muy similar a la cepa A, teniendo en cuenta que la glucosa es una fuente de fácil asimilación.

Tabla 8. Valores de biomasa y consumo de sustrato. Fermentación en erlenmeyer. Melaza 10%, 20% y 30% (p/v). Cepa B.

CEPA B						
Tiempo (Horas)	10%		20%		30%	
	Biomasa g/L	Sust. Residual g/L	Biomasa g/L	Sust. Residual g/L	Biomasa g/L	Sust. Residual g/L L
0	0,262	56,495	0,268	84,726	0,271	106,336
1	0,280	56,804	0,292	90,731	0,299	144,007
2	0,293	56,381	0,322	86,370	0,324	149,144
3	0,318	60,000	0,364	86,872	0,395	160,868
4	0,379	49,110	0,433	93,813	0,480	133,276
5	0,478	56,849	0,482	100,925	0,523	105,342
6	0,569	62,831	0,559	109,840	0,615	98,607
8	1,691	66,233	1,786	119,247	1,944	85,696
10	1,983	39,521	2,045	63,379	2,377	53,242
12	2,283	30,126	2,370	52,329	2,860	51,279
14	2,418	20,947	2,902	34,703	3,090	33,288
16	2,505	17,842	2,946	44,338	3,184	31,233
18	2,532	16,963	2,984	50,320	3,208	33,082
20	2,548	15,502	2,984	46,804	3,229	29,886

Según los datos obtenidos anteriormente, se encuentra similitud entre la cepa A y la cepa B en cuanto al comportamiento en las concentraciones de melaza. Con concentraciones de 20% y 30% (p/v) de melaza de caña no hay una gran diferencia en la producción de biomasa para la cepa A como se observa en la Tabla 7 y además la máxima obtención de biomasa es de 26,881 g/L y 28,869 g/L a 20% y 30% (p/v) respectivamente, notándose que un aumento del 10% (p/v) en la concentración de melaza no implicó un cambio importante en la producción de biomasa. Esto se observa también para la cepa B (Tabla 8), donde la obtención máxima es 3g/L en 20% y 30% (p/v) de melaza.

Por lo anterior, se deduce que la melaza es un medio apto para la producción de *Saccharomyces cerevisiae* ya que tiene fuentes de carbono disponibles y otros componentes que facilitan que el microorganismo los metabolice; por esto se dice que el medio melaza tiene un valor nutricional alto para el microorganismo. Las melazas pueden ser satisfactoriamente utilizadas como sustrato, sin embargo, Brandberg *et al.*, 2006 y Folch *et al.*, 2004, analizaron que para microorganismos más exigentes es necesario el suplemento con ciertos aminoácidos libres o sulfato de amonio que le sirvan de fuente de nitrógeno y sugieren controlar el pH para que las muestras de melaza se conviertan en un excelente sustrato para las fermentaciones microbianas.

Para las fermentaciones en erlenmeyer a las concentraciones de 10%, 20% y 30% (p/v) se utilizó la técnica del ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) con previa hidrólisis de la sacarosa para la cuantificación de azúcares reductores. En cada gráfica se observan incrementos en el sustrato a lo largo de la fermentación, lo cual indica que el microorganismo utiliza la poca glucosa presente en el medio mientras que la enzima hidroliza la sacarosa en glucosa y fructosa haciendo que aumente la concentración de glucosa.

Al comparar el consumo de sustrato entre la cepa A y la cepa B, se observó que la cepa B consumió menos sustrato que la cepa A; esto se debe probablemente a que la cepa nativa (cepa A) al ser extraída directamente de la caña de azúcar está habituada a las altas concentraciones de azúcar, por lo que al realizar las fermentaciones en melaza de caña no le afectan estas condiciones en comparación a la cepa B que es una levadura comercial liofilizada para fines probióticos.

6.7 SELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ADECUADA DE MELAZA

Los datos obtenidos fueron tabulados por el programa estadístico SPSS versión 14. El análisis estadístico realizado para cada cepa se presenta a continuación.

6.7.1 Cepa A. *Saccharomyces cerevisiae*

Los datos fueron tabulados por el programa estadístico SPSS versión 14 y se realizó la prueba T-student para dos muestras (10% y 20% (p/v)) suponiendo varianzas desiguales y se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 9. Datos de media y varianza entre las concentraciones 10% y 20% (p/v). Cepa A.

	Concentración 10% (p/v)	Concentración 20% (p/v)
Media	8,89	11,49
Varianza	45,07	117,16

Según la primera hipótesis planteada para esta cepa al inicio de la investigación, se observa que hay diferencia significativa entre la media y la varianza obtenida entre la concentración del 10% y 20% (p/v); por otro lado, la $P(T \leq t)$ de dos colas que se obtuvo fue de 0,45 que por ser $p < 0.5$ se rechaza la hipótesis nula (H_0) y se acepta la hipótesis alterna (H_i), ya que la producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 10% (p/v) difiere a la producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 20% (p/v), obteniendo mejores resultados en esta última concentración. (Anexo H1).

En la fermentación realizada en erlenmeyer se obtuvo una producción de biomasa de 26.88 g/l a la hora 16 con una concentración de melaza al 20%

(p/v) y una producción de biomasa de 28.869 g/l a la hora 16 con una concentración de melaza al 30% (p/v). Al comparar las concentraciones g/l obtenidas en las concentraciones de melaza 20% y 30% (p/v) se observó que hubo un pequeño incremento en la producción de biomasa al 30% (p/v); sin embargo, los datos al ser tabulados por el programa estadístico y al realizar la prueba T-student para dos muestras suponiendo varianzas desiguales se obtuvo los siguientes datos:

Tabla 10. Datos de media y varianza entre las concentraciones 20% y 30% (p/v). Cepa A.

	Concentración 20% (p/v)	Concentración 30% (p/v)
Media	11,49	12,49
Varianza	117,16	154,45

Según la segunda hipótesis planteada para esta cepa al inicio de la investigación no hay diferencia significativa entre la media obtenida entre la concentración del 20% y 30% (p/v); por otro lado, la $P(T \leq t)$ de dos colas que se obtuvo fue de 0,82 que por ser $p > 0.5$ se acepta la hipótesis nula (H_0) y se rechaza la hipótesis alterna (H_i), es decir que las concentraciones del 20% y 30% (p/v) de melaza de caña no muestran diferencias estadísticas ya que la producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 20% (p/v) no difiere a la producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 30% (p/v) (Anexo H2).

6.7.2 Cepa B. *Saccharomyces boulardii*

En los datos obtenidos anteriormente, se observó que la mayor producción de biomasa se obtuvo a la concentración del 20% (p/v); sin embargo, los datos fueron tabulados por el programa estadístico SPSS versión 14 y se realizó la prueba T-student para dos muestras suponiendo varianzas desiguales y se obtuvo los siguientes datos:

Tabla11. Datos de media y varianza entre las concentraciones 10% y 20% (p/v). Cepa B.

	Concentración 10% (p/v)	Concentración 20% (p/v)
Media	1,32	1,48
Varianza	1,03	1,40

Como se observa, no hay diferencia significativa entre la media y la varianza obtenida entre la concentración del 10% y 20% (p/v); por otro lado, la $P(T \leq t)$ de dos colas que se obtuvo fue de 0,71 que por ser $p > 0.5$ se acepta la hipótesis nula (H_0) y se rechaza la hipótesis alterna (H_i), ya que la producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 10% (p/v) no difiere a la producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 20% (p/v). Por esta razón, entre estas dos concentraciones se escogió la del 20% (p/v) porque se obtuvo una concentración de biomasa mayor que la del 10% (p/v). (Anexo I1).

En la fermentación realizada en erlenmeyer se obtuvo una producción de biomasa de 2.90 g/l a la hora 14 con una concentración de melaza al 20% (p/v) y una producción de biomasa de 3.09 g/l a la hora 16 con una concentración de melaza al 30% (p/v). Al comparar las concentraciones g/l obtenidas en las concentraciones de melaza 20% y 30% (p/v) se observó que hubo un pequeño incremento en la producción de biomasa al 30% (p/v); sin embargo, los datos al ser tabulados por el programa estadístico y al realizar la prueba T-student para dos muestras suponiendo varianzas desiguales se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 12. Datos de media y varianza entre las concentraciones 20% y 30% (p/v). Cepa B.

	Concentración 20% (p/v)	Concentración 30% (p/v)
Media	1,48	1,62
Varianza	1,40	1,70

Como se observa, no hay diferencia significativa entre la media y la varianza obtenida entre la concentración del 20% y 30% (p/v); por otro lado, la $P(T \leq t)$ de dos colas que se obtuvo fue de 0,75 que por ser $p > 0.5$ se acepta la hipótesis nula (H_0) y se rechaza la hipótesis alterna (H_i), ya que la producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 20% (p/v) no difiere a la producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 30% (p/v). De esta manera se afirma, que al no haber una diferencia significativa entre las tres concentraciones se decidió tomar la concentración del 20% (p/v). (Anexo I2).

De acuerdo con las fermentaciones realizadas anteriormente y al llevar los datos al programa estadístico SPSS versión 14, se analizaron las tres concentraciones 10%, 20% y 30% (p/v) tanto en la cepa A como en la cepa B y se dedujo por datos obtenidos como son la media, la varianza, porcentaje de variación, coeficiente de variación y la prueba T-student $P(T \leq t)$ para dos muestras suponiendo varianzas desiguales, que la concentración a seleccionar es del 20% (p/v), ya que en la producción de biomasa no existe una diferencia significativa con la obtenida en 30% (p/v) y esto hace innecesario gastar 10% (p/v) mas de melaza lo cual implicaría costos y energía.

6.8 FERMENTACIONES EN BIORREACTOR 1,5L.

Luego de haber escogido la concentración adecuada de melaza (20% (p/v)) en la cual se observó mayor producción de biomasa según los análisis estadísticos arrojados por las fermentaciones realizadas en erlenmeyer, se llevaron a cabo las fermentaciones en biorreactor (Figura 12).



Figura 12. Montaje de biorreactor 1.5L.
Medio melaza 20% (p/v), 37°C, 150rpm,
1vvm. Fuente: Autores.

Los resultados obtenidos se observaron en la figura 13 en donde se puede evidenciar que en la cepa A no hay fase de adaptación y su fase exponencial llega hasta la hora 14 a diferencia de la cepa B que tiene una fase de adaptación de la hora 0 a la hora 3 empezando su fase exponencial en la hora 4 hasta la hora 14.

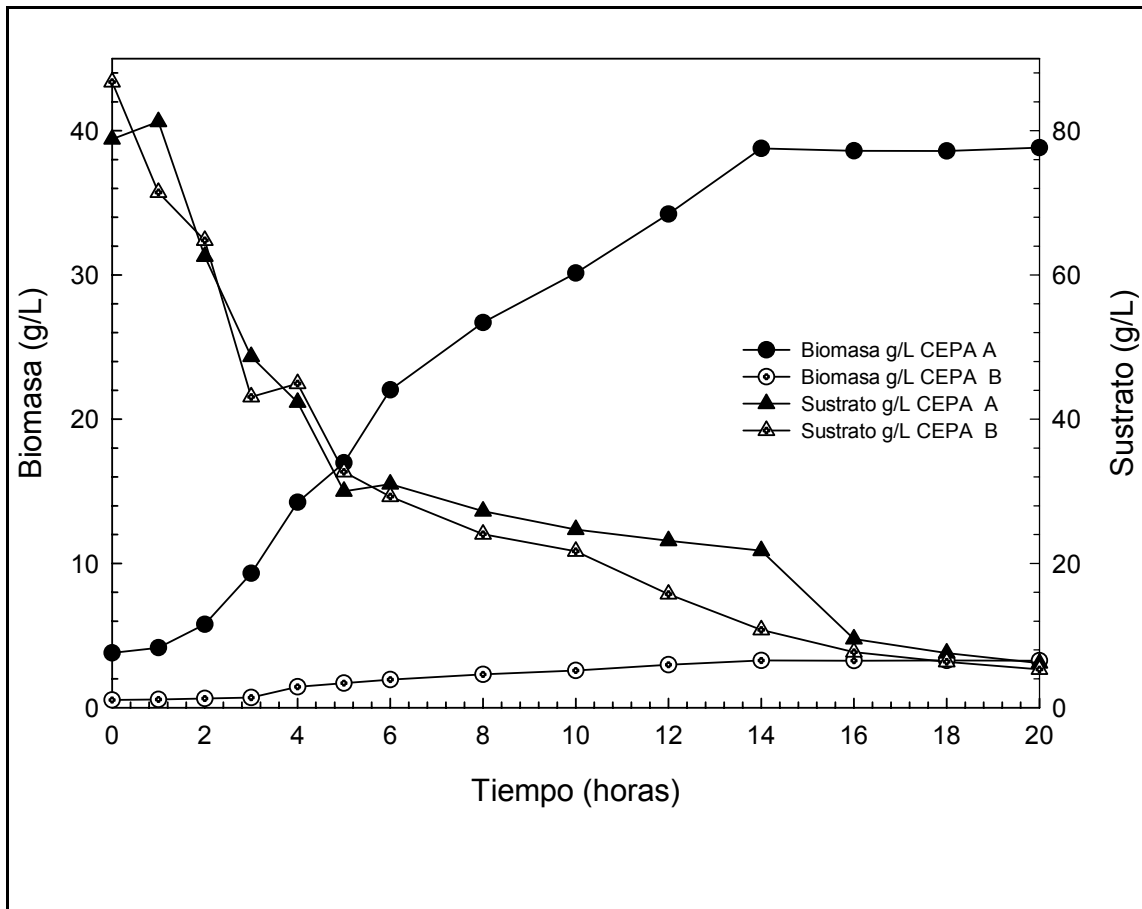


Figura 13. Fermentación en biorreactor 1,5L. Melaza 20% (p/v). Cepa A y cepa B.

Inicialmente se trabajó con un volumen efectivo de trabajo (VET) del 75% (aproximadamente 1L de medio), con el cual se presentaron problemas por la cantidad de espuma generada, afectando la oxigenación a lo largo de la fermentación. Nahvi *et al.*, 2002 comprobaron que la generación de espuma es un interferente en el crecimiento del microorganismo por influir en las condiciones aerobias del proceso, razón por la cual decidieron utilizar un antiespumante como la silicona, obteniendo de esta manera mejores resultados al final de su investigación; por lo tanto, una de las soluciones era adicionar un antiespumante, sin embargo en esta investigación, se decidió disminuir el volumen efectivo de trabajo (VET) al 50% con las mismas condiciones controladas de temperatura 30°C, agitación 150 rpm y aireación

1 vvm para mejorar el proceso ya que la adición de antiespumantes genera mayores costos y el objetivo de esta investigación fue producir mayor cantidad de biomasa en un sustrato económico. Este cambio en el volumen de los fermentadores hizo que luego de 16 horas se obtuvieran resultados de 38,6g/L en la cepa A y de 3,2g/L en la cepa B al final de la fase exponencial (Tabla 13), resultados que mejoraban notablemente en cuanto a la cantidad de biomasa comparada con los resultados obtenidos en las fermentaciones hechas en los erlenmeyer para la cepa A (Figura 13).

Lo anterior indica que la biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* producida en biorreactor logra mejores resultados de biomasa a lo largo de la fermentación; Los factores que se le atribuyen para la mejor producción de biomasa en biorreactor son el suministro de aire (1vvm) y la agitación por turbina Rushton, lo que proporciona mayor homogenización al medio, mayor transferencia de masa y oxígeno, en comparación a las fermentaciones hechas en erlenmeyer las cuales tienen agitación sin turbina. Esto influyó para que el medio melaza sirviera como un sustrato ideal para la producción de *Saccharomyces* en biorreactor. Skontzou *et al.*, 2003 evidenciaron en su investigación que las condiciones de oxígeno suministradas en las fermentaciones realizadas en biorreactor y en medios tan ricos en azúcares como la melaza son de vital importancia para la obtención de biomasa levaduriforme, ya que gracias a que suministraron 1vvm obtuvieron una concentración de 30g/L de crecimiento de levadura luego de 30 horas de fermentación; la oxidación completa de la fuente de carbono a CO₂ y H₂O presenta una producción celular óptima, donde el oxígeno es el aceptor final de electrones en la fosforilación oxidativa durante la respiración (Otterstedt *et al.*, 2004).

Tabla 13. Valores de biomasa y consumo de sustrato. Fermentación en biorreactor 1,5L. Melaza 20% (p/v). Cepa A y Cepa B.

Tiempo (Horas)	CEPA A		CEPA B	
	Biomasa g/L	Sust. Residual g/L	Biomasa g/L	Sust. Residual g/L
0	3,801	78,836	0,530	86,747
1	4,158	81,233	0,578	71,438
2	5,777	62,586	0,638	64,795
3	9,310	48,682	0,703	43,082
4	14,244	42,329	1,447	44,932
5	16,972	29,983	1,701	32,688
6	22,030	30,993	1,949	29,281
8	26,697	27,235	2,308	24,067
10	30,126	24,709	2,574	21,687
12	34,221	23,159	2,978	15,745
14	38,774	21,764	3,268	10,800
16	38,603	9,531	3,263	7,709
18	38,589	7,568	3,275	6,366
20	38,817	6,178	3,253	5,322

Al analizar el consumo de sustrato se observó que la fermentación a la concentración de melaza al 20% inició con una concentración 78g/L para la cepa A y de 86 g/L para la cepa B debiendo iniciar en una concentración de 120g/L de sacarosa (Tabla 13). Esto se debe a que al centrifugar la melaza se disminuyó la cantidad de sustrato y el tiempo de esterilización se excedió de 20 minutos a 20lb de presión lo cual hizo que se disminuyera el sustrato inicial experimental.

6.9 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS CON LA CONCENTRACIÓN SELECCIONADA.

Los parámetros a determinar en este estudio fueron μ_x Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}), $Y_{x/s}$ Rendimiento de biomasa a partir de sustrato (g/g), t_d Tiempo de duplicación (h) y productividad (gL^{-1}/h).

6.9.1 Fermentación en erlenmeyer a la concentración de (20% (p/v))

Para determinar los parámetros cinéticos en la fermentación llevada a cabo en erlenmeyer para la cepa A, se aplicó la cinética de orden 1, sin embargo esta cinética arrojó un valor de R^2 inferior a 0,90, por lo que no se logró determinar la velocidad específica de crecimiento; por lo tanto, se procedió a aplicar cinética de orden 0 para esta serie de datos. Se tomó la fase exponencial de la hora 8 a la hora 16 (Tabla 14), posteriormente se graficó la concentración g/L en función del tiempo (Figura 14) y en base a esto se estableció la ecuación en el gráfico: $Y = 2,3736x - 11,033$ con un R^2 de 0,977.

Tabla 14. Datos de Fase exponencial. Fermentación en erlenmeyer. Melaza 20% (p/v). Cepa A.

CEPA A			
Tiempo (h)	Prom X	X/X0	Ln X/X0
8	6,730	1,000	0,000
10	14,583	2,167	0,773
12	17,301	2,571	0,944
14	21,751	3,232	1,173
16	26,881	3,994	1,385

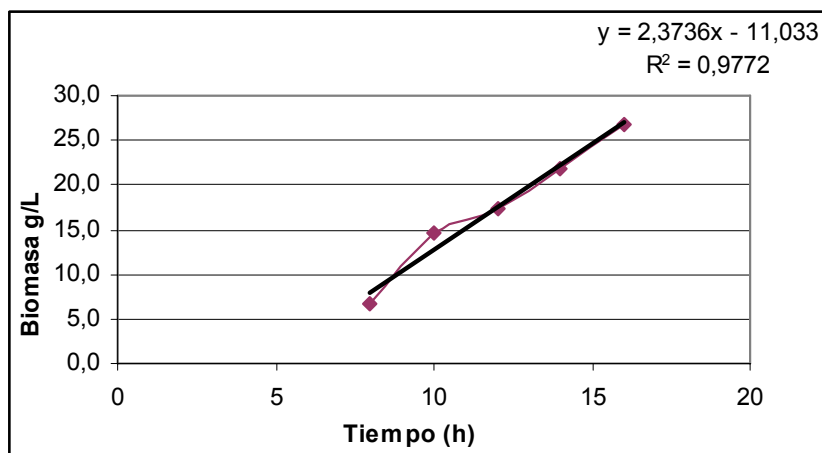


Figura 14. Concentración g/L en función del Tiempo. *Saccharomyces cerevisiae* en erlenmeyer. Medio melaza 20% (p/v). Cepa A.

Al analizar la fase exponencial de la cepa B en fermentaciones en erlenmeyer (Hora 8 a 14) como se puede observar en la tabla 15, y aplicar cinética de orden 1 se obtiene la siguiente ecuación: $Y = 0,0802x - 0,6561$ con un R^2 de 0,9906. (Figura 15).

Tabla 15. Datos de Fase exponencial. Fermentación en erlenmeyer. Melaza 20% (p/v). Cepa B.

CEPA B			
Tiempo (h)	Prom X	X/X0	Ln X/X0
8	1,786	1,000	0,000
10	2,045	1,145	0,135
12	2,370	1,327	0,283
14	2,902	1,625	0,485

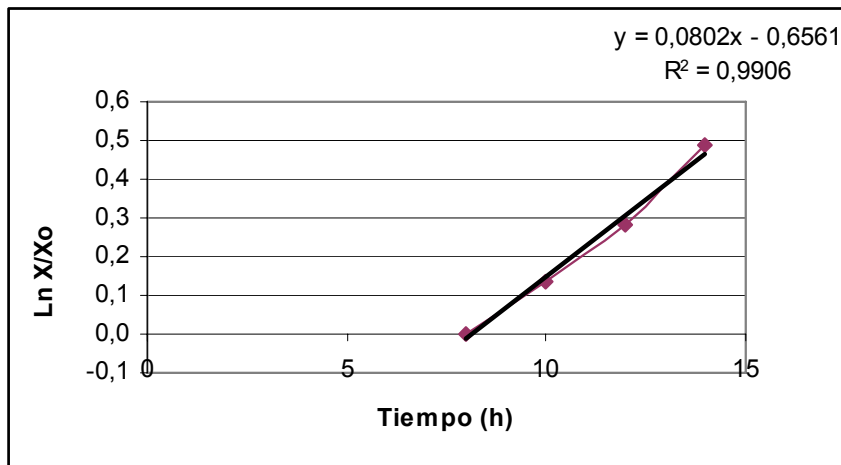


Figura 15. Velocidad específica de crecimiento de *Saccharomyces boulardii* en erlenmeyer. Medio melaza 20% (p/v). Cepa B.

En la Tabla 16, se muestran los resultados de los parámetros cinéticos nombrados anteriormente:

Tabla 16. Parámetros Cinéticos. Fermentación en erlenmeyer. Melaza 20% (p/v). Cepa A y Cepa B.

	ERLENMEYER 20% (p/v)	
	CEPA A	CEPA B
μ_x (h ⁻¹)	ND	0,0802
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,213	0,010
Td (h)	2.835	8,664
P (gL ⁻¹ / h)	1,680 gL ⁻¹ / h	0,207 gL ⁻¹ / h

ND: No determinado

La factibilidad económica de algunos procesos biotecnológicos depende básicamente del costo de la materia prima. En la práctica, la selección de un microorganismo con elevado rendimiento de sustrato en biomasa favorece la productividad del proceso. Generalmente, cuando el sustrato es el factor limitante del crecimiento, la cantidad de biomasa producida es proporcional a la cantidad de fuente de carbono consumida (Duarte, 1998).

Al analizar los datos obtenidos de rendimientos de biomasa en sustrato que se muestran en la tabla 16, se observa claramente que la cepa A presentó un mejor rendimiento en comparación a la cepa B, lo que se ve reflejado en los datos de productividad ya que son directamente proporcionales. En cuanto al tiempo de duplicación se presentó gran diferencia entre las dos cepas. Se obtuvo una alta producción de biomasa de la cepa nativa ya que al ser extraída directamente de la caña de azúcar está habituada a las altas concentraciones de azúcar, por lo que al realizar las fermentaciones en melaza de caña no le afectan estas condiciones en comparación a la cepa comercial que es una levadura liofilizada para fines probióticos.

Por otro lado se comparó el rendimiento de biomasa en sustrato ($Y_{x/s}$) obtenido por parte de *Saccharomyces* en el medio YPG con las fermentaciones hechas en melaza. Para la cepa A se obtuvieron valores de 0,430 g/g en YPG y de 0,23 g/g en medio melaza y para la cepa B se obtuvieron valores de 0,774 g/g en YPG y de 0,04 g/g en melaza. Lo que

afirma que el medio melaza es un sustrato más complejo rico en nutrientes pero pobre en requerimientos nutricionales como fuentes de nitrógeno necesarios para la formación de biomasa.

6.9.2 Fermentación en biorreactor de 1,5L a la concentración de (20% (p/v)).

Para determinar los parámetros cinéticos en la fermentación llevada a cabo en biorreactor de 1,5L para la cepa A, se aplicó la cinética de orden 1, sin embargo esta cinética arrojó un valor de R^2 inferior a 0,90, por lo que no se logró determinar la velocidad específica de crecimiento; por lo tanto, se procedió a aplicar cinética de orden 0 para esta serie de datos. Se tomó la fase exponencial de la hora 0 a la hora 14 (Tabla 17), posteriormente se graficó la concentración g/L en función del tiempo (Figura 16) y en base a esto se estableció la ecuación en el gráfico: $Y = 2,6934x + 2,822$ con un R^2 de 0,980.

Tabla 17. Datos de Fase exponencial. Fermentación en biorreactor 1,5L. Melaza 20% (p/v). Cepa A.

CEPA A			
Tiempo (h)	Prom X (g/L)	X/X0	Ln X/Xo
0	3,801	1,000	0,000
1	4,158	1,094	0,090
2	5,777	1,520	0,419
3	9,310	2,449	0,896
4	14,244	3,747	1,321
5	16,972	4,465	1,496
6	22,030	5,796	1,757
8	26,697	7,024	1,949
10	30,126	7,926	2,070
12	34,221	9,003	2,198
14	38,774	10,201	2,322

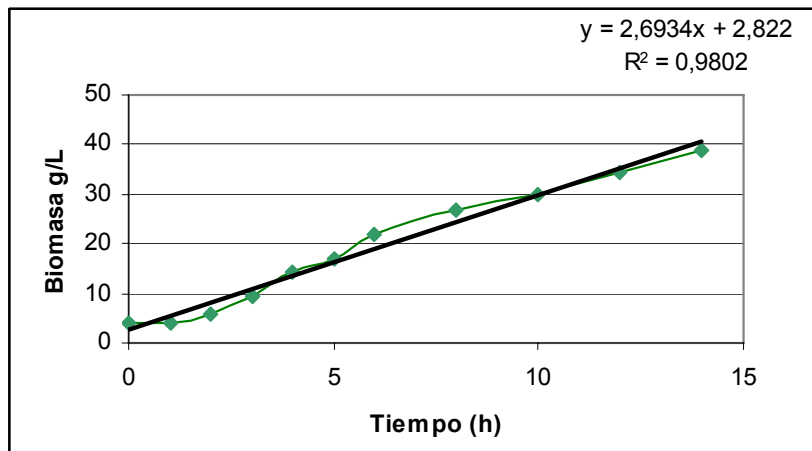


Figura 16. Concentración g/L en función del Tiempo. *Saccharomyces cerevisiae* en biorreactor. Medio melaza 20% (p/v). Cepa A.

Al analizar la fase exponencial de la cepa B en fermentaciones en biorreactor (Hora 4 a 14) como se puede observar en la tabla 18, y aplicar cinética de orden 1 se obtiene la siguiente ecuación: $Y = 0,0782x + 0,7801$ con un R^2 de 0,965. (Figura 17).

Tabla 18. Datos de Fase exponencial. Fermentación en biorreactor 1,5L. Melaza 20% (p/v). Cepa B.

CEPA B			
Tiempo (h)	Prom X (g/L)	X/X0	Ln X/Xo
4	14,244	3,747	1,321
5	16,972	4,465	1,496
6	22,030	5,796	1,757
8	26,697	7,024	1,949
10	30,126	7,926	2,070
12	34,221	9,003	2,198
14	38,774	10,201	2,322

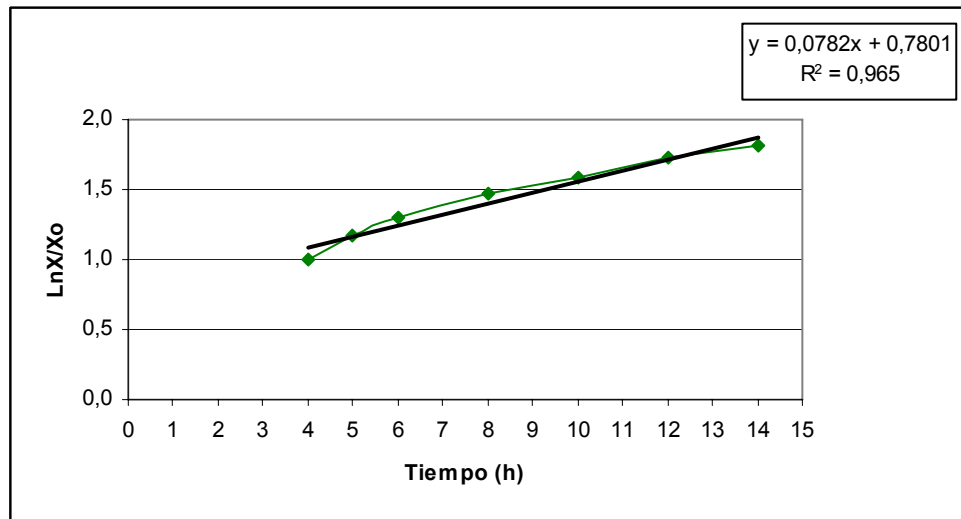


Figura 17. Velocidad específica de crecimiento de *Saccharomyces boulardii* en biorreactor. Medio melaza 20% (p/v). Cepa B.

En la Tabla 19, se muestran los resultados de los parámetros cinéticos nombrados anteriormente:

Tabla 19. Parámetros Cinéticos. Fermentación en biorreactor 1.5L. Melaza 20% (p/v). Cepa A y Cepa B.

	BIORREACTOR 20% (p/v)	
	CEPA A	CEPA B
μ_x (h ⁻¹)	ND	0,0782
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,612	0,05
Td (h)	1,411	8,86
P (gL ⁻¹ / h)	2,769 gL ⁻¹ / h	0,233 gL ⁻¹ / h

ND: No determinado

Al analizar los datos obtenidos de rendimientos de biomasa en sustrato que se muestran en la tabla 19, se observa claramente que la cepa A presentó un mejor rendimiento en comparación a la cepa B, lo que se ve reflejado en los datos de productividad al igual que en los parámetros cinéticos en erlenmeyer.

En la tabla 19, se observa que la cepa A presentó un tiempo de duplicación de 1,411 horas lo que se ve reflejado a lo largo de las fermentaciones

realizadas en biorreactor, ya que esta cepa nativa al tener un menor tiempo de duplicación obtuvo mayor producción de biomasa alcanzando la fase estacionaria a la hora 14 al igual que la cepa B. Sin embargo, esta última al ser una cepa comercial y al no estar adaptada a concentraciones altas de azúcar presenta un tiempo de duplicación mas prolongado de 8,86 horas lo que se ve reflejado en una menor producción de biomasa.

Al comparar los parámetros cinéticos de fermentaciones realizadas en erlenmeyer y biorreactor de 1.5L, se observa que en la cepa A hay un rendimiento más alto en biorreactor que en erlenmeyer en comparación con la cepa B que no mostró ninguna diferencia, lo que se puede corroborar con la relación directa que existe entre la productividad y los rendimientos. Estas diferencias observadas de la cepa A con la cepa B tanto en erlenmeyer como en biorreactor pudo deberse a los factores en el laboratorio mencionados anteriormente en cuanto a las condiciones manejadas en el biorreactor.

Por literatura la respiración libera más energía que la fermentación, además es el proceso preferido por las levaduras. Algunas especies de *Saccharomyces cerevisiae* son sensibles a la glucosa y su respiración es reprimida a concentraciones de mas de 1g/L. Bajo estas condiciones se disminuye la biomasa (Treybal, 1988).

Los niveles altos de oxígeno disuelto no afectan la fermentación, indicando que los niveles cercanos al 20% de saturación son necesarios para el mantenimiento de las células y su crecimiento. Por otro lado, la alta concentración de azúcares es también un efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular, aunque hay algunas cepas más tolerantes que otras. En fermentaciones oxigénicas la tasa de crecimiento específico de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* ha demostrado que disminuye a medida que la concentración de azúcar aumenta (Fiechter *et al.*, 1981). En cultivos de

Saccharomyces es importante que la concentración inicial de azúcar en el medio de cultivo no sea alta ya que puede inhibir el crecimiento de las células debido a la alta concentración de sustrato, por lo que la mayoría de veces, el citoplasma celular posee una mayor concentración de solutos que el medio exterior de modo que el agua difunde hacia el interior celular; sin embargo, cuando una célula está en un ambiente con baja actividad de agua, existe una tendencia de salida del agua intracelular. Cuando una célula se introduce en una solución con baja actividad de agua, tal como una disolución de azúcar, pierde agua y se produce plasmólisis (Carballo, 2000).

De esta manera, se resalta que la concentración de melaza no puede ser tan alta porque puede inhibir el crecimiento como se observa al comparar la cepa A con la cepa B, indicando que la cepa A es más resistente a las altas concentraciones de sustrato debido a que es una cepa nativa extraída de la melaza de caña; mientras que la cepa B al ser una cepa comercial liofilizada no está adaptada a altas concentraciones de azúcar, lo que influyó para que la producción de biomasa fuera menor. En esta parte es claro que el pH del medio y la temperatura no influyeron en la producción de biomasa de la cepa B, ya que esta cepa al ser probiótica debe ser tolerante a pH ácidos y a temperaturas hasta de 37°C. Mantener el pH en el rango que el cultivo normalmente experimente durante la fermentación es lo mas adecuado y generalmente esta en el rango de 4.0 a 5.0 (Fuller, 1992).

6.10 MÉTODO ECOMÉTRICO

Esta técnica se realizó para el medio melaza como medio de prueba a la concentración seleccionada (20% (p/v)). Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura de las cajas y se determinó inicialmente el ICA, índice de crecimiento absoluto; Este índice denota el último sector de la placa en el que hubo un crecimiento significativo. Con el microorganismo de prueba se

presentó un ICA de 3, tanto en la cepa A (Figura 18) como en la cepa B (Figura 19), teniendo en cuenta que hubo un notable crecimiento por parte de *Saccharomyces cerevisiae* en 15 de las líneas sembradas. Lo anterior contrasta con el resultado obtenido por el microorganismo interferente ya que la bacteria no se desarrolló en este agar, lo cual se debió a que *Staphylococcus aureus* toma como principal fuente de carbono el piruvato y la glicocola que están ausentes en este medio melaza y por lo tanto no asimila la sacarosa ya que este azúcar no es simple; además la bacteria carece de la enzima invertasa.



Figura 18. Caja de Método ecométrico. Cepa A. ICA = 3. Fuente: Autores.



Figura 19. Caja de Método ecométrico. Cepa B. ICA = 3. Fuente: Autores.

Al comparar el medio melaza con el medio YPG se esperaba obtener un medio altamente productivo con el fin de sustituirlo para reducir costos y aprovechar este residuo de la industria azucarera; En esta parte se logra afirmar que el medio melaza a una concentración del 20%(p/v) es medianamente productivo, teniendo en cuenta los valores de referencia de ICA. Esto se debe a la baja concentración de elementos necesarios para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* la cual necesita fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo presentes en el sustrato y que se encuentren de forma asimilable.

El medio control que en este caso fue YPG arrojó un ICA de 5, resultado que se esperaba debido a que este medio tiene los requerimientos nutricionales necesarios para el óptimo crecimiento de la levadura. Posteriormente fue determinado el índice de crecimiento relativo (ICR) comparando el ICA del medio evaluado con el ICA del medio de referencia arrojando un resultado de 0.6, lo cual indica que el medio melaza comparado con el medio YPG requiere de suplementos nutricionales como fuentes de nitrógeno y fósforo (Brandberg *et al.*, 2006; Folch *et al.*, 2004).

Como se observó en el transcurso de las curvas de crecimiento en medio melaza, se obtuvo una alta producción de biomasa indicando que el medio líquido es apropiado para este proceso; Sin embargo, al realizar el método ecométrico se obtuvo un comportamiento medianamente productivo en medio sólido, debido a la casi nula separación intermolecular de la masa celular, ya que los nutrientes, el oxígeno, el agua y demás componentes de la melaza de caña tienen poca movilidad a lo largo de la materia, por lo tanto al microorganismo se le dificulta tomar con facilidad estos nutrientes.

En cuanto a la selectividad del medio melaza, se puede afirmar que es un medio altamente selectivo ya que el ICA fue igual a 0 cuando se utilizó *Staphylococcus aureus* como microorganismo interferente. Esto indica que la formulación del medio es apropiada para evitar el crecimiento de posible flora acompañante que no pueda tomar como fuente principal de energía la sacarosa presente.

CONCLUSIONES

- Se determinó que 20% (p/v) fue la concentración adecuada de melaza de caña como un medio de fermentación para la producción de *Saccharomyces cerevisiae* arrojando rendimientos de biomasa a partir de sustrato $Y_{x/s}$ (0,612 g/g), Td (1,411 h) y productividad (2,769 gL⁻¹/ h).
- Al comparar estadísticamente la producción de biomasa al 20% y 30% (p/v) en erlenmeyer, se observó que no hay diferencia significativa entre estas dos concentraciones por lo que la producción de biomasa obtenida al 20% no difiere a la obtenida en la concentración del 30%.
- La melaza de caña requiere de un pre-tratamiento adecuado para ser utilizada como sustrato en procesos biotecnológicos, debido a las impurezas presentes por ser un producto agro industrial.
- Se comprobó que *Saccharomyces* posee la enzima invertasa la cual hidroliza la sacarosa y es asimilada con mayor facilidad.
- Se estableció que la ampicilina es un buen agente control en las fermentaciones ya que inhibió la flora acompañante en la melaza y la levadura no fue afectada en la producción de biomasa.
- Se comprobó que el medio melaza de caña al 20% (p/v) es un medio medianamente productivo y altamente selectivo para *Staphylococcus aureus*.

RECOMENDACIONES

- Evaluar el medio melaza con adición de fuentes de nitrógeno como Urea, Fosfato y Sulfato de Amonio a la melaza de caña para optimizar la producción de biomasa en fermentaciones a mayor escala debido a su bajo porcentaje de nitrógeno.
- Evaluar la producción de biomasa con niveles de oxígeno diferentes a 1vvm en medio melaza.
- Evaluar diferentes tratamientos para la utilización de la melaza como la clarificación y floculación para retirar la mayor cantidad de sólidos suspendidos y proporcionar un medio de fermentación menos turbio.
- Utilizar técnicas más exactas como la cromatografía líquida de alta resolución HPLC para la determinación del contenido de azúcares totales en la melaza de caña, ya que por métodos convencionales como la hidrólisis de la sacarosa se puede ver afectado por el color del medio y por la manipulación de las muestras.
- Evaluar la capacidad probiótica con pruebas como la tolerancia a sales biliares, el crecimiento a diferentes pH, diferentes temperaturas, adherencia frente a patógenos y prueba de antagonismo con la biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* obtenida a partir de una concentración de 20% de melaza.

BIBLIOGRAFÍA

Aguirre, A. 2003. Obtención de un biopreparado a partir de cepas nativas de levaduras para ser empleado como probiótico. Tesis de Maestría Microbiología. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 27-30p.

Anónimo. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). 1981. Industrialización de la Caña de Azúcar. Compendio No. 42. Bogotá, Colombia.

Anónimo. Instituto Colombiano de Normas Técnicas (ICONTEC). 1994. Industrias Alimentarias e Industriales de bebidas. Melaza de Caña NTC.587. Bogotá, Colombia.

Ariza, B. y Gonzalez, L. 1997. Producción de Proteína Unicelular a partir de levaduras y melaza de caña de azúcar como sustrato. Tesis de pregrado Bacteriología. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Bacteriología. Bogotá. Colombia. 22-27p.

Buitrago, J. y Tenjo, D. 2007. Evaluación de un sustrato vegetal obtenido a partir de residuos vegetales de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) con un consorcio celulítico. Tesis de pregrado Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá. Colombia.

Brandberg, T. Gustafsson, I. Franzen, C. 2006. The impact of severe nitrogen limitation and microaerobic conditions on extended continuous cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* with cell recirculation. Enzyme and Microbial Technology. Volumen 40: 585-593p.

Calderón, M. 2007. Evaluación del uso de antibióticos como mecanismo para el control de contaminantes bacterianos en la fermentación para la producción de alcohol etílico. Tesis de pregrado Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá, Colombia.

Carballo, F. 2000. Microbiología industrial: microorganismos de interés industrial. Editorial Acribia. España. 20-31p.

Castellanos, C. 1991. Estudio de levaduras de fermentación industrial. Revista Alimentaria. Edición 33. Volumen 7. Noviembre – Diciembre. 18-25p.

Castro, M. 1993. Estudio de la melaza de caña como sustrato de la fermentación Acetobutílica. Tesis Pregrado Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Bogotá, Colombia. 3-35p.

Doran, P. 1998. Principios de Ingeniería de los bioprocesos. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 289-291p.

Duarte, A. 1998. Introducción a la Ingeniería Bioquímica. Unidad de Publicaciones de la Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 528p.

Echagaray, O. Carvalho, A. Fernandez, S. Sato, E. Aquarone, M. 2000. Fed-Batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugar-cane blackstrap molasses: Inveratse activity of intact cells in ethanol fermentation. Biomass and Bioenergy. Volumen 19 (2000) 39-50p.

Fiechter, A., Fuhrmann, G. y Kappeli, C. 1981. Regulation of glucose metabolism in growing yeast cell. *Adv. Microbial Physiology*. Volumen 22. 123– 183p.

Folch, J., Garay, A., Iledías, F y Cavarrubias, A. 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista latinoamericana de Microbiología*. Volumen 46. 24p.

Fuller, R. 1992. Probiotics. The scientific basis. Chapman & Hall. Cambridge. Great Britain. 398p.

Godoy, R. 2002. Método DNS para la determinación de azúcares reductores totales en melaza, sustrato de fermentación y vinos. *Manual de Métodos Analíticos*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Bogotá, Colombia. 1 -3p.

Gonzalez, R. 2002. Evaluación de la estabilidad del método de Criopreservación en glicerol para el establecimiento de un banco de cepas. Tesis de pregrado Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá. 118 p.

Haehn, H. 1991. *Bioquímica de las fermentaciones*. Editorial Aguilar. España. 42- 48p.

Halasz, A. y Laszlity, R. 1991. Use of Yeast biomass in food production. CRS Press. Boca Raton Ann Arbor. Boston, Estados Unidos. 18-29p.

Honig, P. 1974. *Principios de Tecnología Azucarera*. Segunda Edición. Compañía Editorial Continental. México. 23- 54p.

Jorgensen, A. 1990. Microbiología de las fermentaciones industriales. Séptima Edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 22-25p.

Kazuhiko, T. y Kozo, T. 1995. Factors affecting the ethanol productivity of yeast in molasses. Journal of fermentation and Bioengineering, Vol. 79, No. 5. 449-452p.

Leeson, S. y Summers, J. 2000. Nutrición Aviar Comercial. Editorial Le'Print Club Express Ltda. Bogotá, Colombia. 43-45p.

Merck. Manual de Microbiología. 2000. CD Room.

Miller, G. 1959. Use of Dinitrosalisyc Acid Reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31: 426 – 428.

Mossel, D. 2003. Microbiología de los alimentos. Fundamentos Ecológicos para garantizar y comprobar la integridad (Inocuidad y Calidad) microbiológica de los alimentos. Segunda Edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 392-394p.

Nahvi, I. Emtiazi, G. Alkabi, L. 2002. Isolation of a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* and investigation of its performance in the fermentation of beet molasses to ethanol. Biomass and Bioenergy. Volumen 23 (2002) 481-486p.

Olsen, J. y Allermann, K. 1991. La biomasa microbiana como fuente de Proteína. Biotecnología Básica. Editorial Acribia. España. 65-72p.

Ospina, A. y Palacios, M. 1994. Efecto del cultivo de levaduras sobre la carga orgánica de los efluentes de SUCROMILES S.A. Tesis pregrado Microbiología. Facultad de Ingeniería. Universidad del Valle. Cali, Colombia. 23-29p.

Otterstedt, K. Larsson, C. Bill, R. Ståhlberg, A. Boles, E. Hohmann, S y Gustafsson, L. 2004. Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. European Molecular Biology Organization. Vol 5 number 5: 532 – 537.

Owen, P. 1991. Biotecnología de la Fermentación. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 27-36p.

Pedroza, A. 2006. Tratamiento de aguas residuales en la industria papelera mediante un sistema secuencial: Hongos ligniolíticos y un proceso fotocatalítico nanoestructurado de TiO₂/RuXSeY. Tesis de doctorado. Centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Zacatecno. México D.F. 217p.

Perez, R. Bruno, J. Matallana, E. 2005. Monitoring Stress-Related Genes during the Process of Biomass Propagation of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Used for Wine Making. Applied and environmental Microbiology. Nov. Vol 71. No 11. 6831-6837p.

Quintero, R. 1981. Ingeniería Bioquímica. Primera Edición. Editorial Alambra. México. 33-37p.

Routh, J. Eyman, D. Burton, D. 1990. Compendio Esencial de Química General, Orgánica y Bioquímica, tomos I Y II. Segunda Edición. Editorial Reverté. Bogotá, Colombia. 78-81p.

Skountzou, P. Soupioni, M. Bekatorou, A. Kanellaki, M. Koutinas, A. Marchant, R. Banat, I. 2003. Lead(II) uptake during baker's yeast production by aerobic fermentation of molasses. *Process Biochemistry*. Volumen 38. 1479-1482p.

Stanbury, P. Whitaker, A. Hall, S. 1995. *Principles of Fermentation Technology*. Segunda Edición. Editorial Butterworth Heinemann. Oxford, Estados Unidos. 3-5p.

Swan, H. y Karalazos, A. 1990. Las melazas y sus derivados. *Revista Tecnología*. Geplacea. No. 19. España. 78-82p.

Tellez, D. 2004. Caracterización de las melazas empleadas en el proceso fermentativo de la destilería San Martín- Industria de Licores del Valle. Universidad del Valle. Tesis pregrado Bacteriología. Facultad de salud. Escuela de Bacteriología y Laboratorio clínico. Santiago de Cali. Cali, Colombia. 79p.

Tocagni, H. 1981. *La caña de Azúcar*. Editorial Albatros. Argentina. 56-58p.

Treybal, R. 1988. *Operaciones de Transferencia de Masa*. Mc.Graw-Hill, 2a. Edición. México. 406-407p.

Tuite, M. y Oliver, S. 1991. *Saccharomyces*. Editorial Plenum Press. New York, Estados Unidos. 272p.

Yopez, Y. 1995. Selección de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* con alta productividad de etanol y que tolere mayores niveles de azúcar que los usados en la Planta Alcoquímica Sucromiles S.A. Tesis de maestría.

Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.
34-48p.

Zech, M. y Görisch, H. 1995. Invertase from *Saccharomyces cerevisiae*: Reversible Inactivation by components of industrial molasses media. *Enzyme Microbial and Technology*. Jan. Vol 17. 41-46p.

Recursos Electrónicos

http://www.n-t.ru/tp/nr/mk_p02.jpg. Consultado 16 junio del 2006.

http://www.infoagro.com/viticultura/vino/analisis_vinos5.asp. Consultado 29 junio del 2006.

ANEXOS

ANEXO A

FICHA TÉCNICA DE *Saccharomyces cerevisiae*. Cepa A.

COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA – PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA			
Responsable: Alba Alicia Trespacios Rangel			
Número	CMDM - PUJ	213	
Microorganismo		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Fuente	Laboratorio de Biotecnología	Origen	Melaza
Almacenamiento	Glicerol 20%	Historial PUJ	Abril 2006.
Nivel de seguridad	1	Conservación	Criopreservación – 70°C
Condiciones de crecimiento		Anaeróbico facultativo. Temperatura 37°C	
Pruebas Bioquímicas	Glucosa: Positiva Glicerol: Negativo 2-cetogluconato de calcio: Negativo L-arabinosa: Negativa D-Xilosa: Negativa Adonitol: Negativo Xilitol: negativo D-galactosa: Postiva Inositol: negativo D-Sorbitol: negativo	Metil – alfa- glucopiranosida: negativo N- acetilglucosamina: negativo D- Celobiosa: negativo D- Lactosa: negativo D- Maltosa: Positivo D- Sacarosa: Positiva D-trealosa: Negativa D-Melesitosa: Negativa D- Rafinosa: Postiva	
Reacciones atípicas			
Observaciones		Identificación con API 20C AUX. % ID: 99.0%	

ANEXO B

PREPARACIÓN REACTIVOS DE TRABAJO

B1. Hidróxido de Sodio (NaOH 25%)

- Pesar 25,46g de NaOH y disolver en 100mL de agua destilada.
- Mezclar
- Almacenar en Frasco Ambar.

B2. Acido Clorhídrico (HCl 50%)

- Medir 50 mL de HCl y disolver en 50mL de agua destilada.
- Mezclar
- Almacenar en Frasco Ámbar.

B3. Acido Clorhídrico (HCl 5%)

- Medir 13,69 mL de HCl y disolver en 100mL de agua destilada.
- Mezclar
- Almacenar en Frasco Ámbar.

ANEXO C

TÉCNICA DE DNS (Ácido 3,5 Dinitrosalisílico)

A partir de cada una de las soluciones hidrolizadas de sacarosa y en tubos protegidos por la luz, se procede con el siguiente protocolo:

- Se toman 0,25mL de la solución hidrolizada de sacarosa y 0,25mL del blanco y se le adiciona a cada uno de los tubos 0,25mL del reactivo DNS.
- Agitar los tubos en vórtex.
- Llevar a ebullición a 92°C durante 5 minutos.
- Frenar la reacción con hielo durante 5 minutos.
- Adicionar 2,5mL de agua destilada a cada uno de los tubos.
- Realizar determinaciones de absorbancia_(540nm) ajustando el 0 de absorbancia con el blanco de la prueba.

ANEXO D

COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

D1. Medio de cultivo YPG (p/v).

Extracto de levadura	(1%)
Peptona	(2%)
Glucosa	(2%)
Agar – Agar	(1.5%)

Preparación (1L): Pesar (10g) de Extracto de levadura, (20g) de Peptona, (20g) de Glucosa y (15g) de agar - agar. Mezclar y disolver en (1L) de agua destilada. Esterilizar a 15lb de presión por 15 minutos.

D2. Medio de cultivo Baird Parker. (p/v).

Peptona de Caseína	(10%)
Extracto de carne	(5%)
Extracto de levadura	(1%)
Piruvato sódico	(10%)
Glicina	(12%)
Cloruro de Litio	(5%)
Agar- Agar	(1.5%)

Preparación (1L): Pesar (100g) de Peptona de Caseína, (50g) de Extracto de carne, (10g) de Extracto de levadura, (100g) de Piruvato Sódico, (120g) de Glicina, (50g) de Cloruro de Litio y (15g) de agar - agar. Mezclar y disolver en (1L) de agua destilada. Esterilizar a 15lb de presión por 15 minutos.

ANEXO E

CONSERVACIÓN DE CEPAS

Recuento UFC/mL		
Control	Cepa A	Cepa B
1	5,60E+08	4,50E+08
2	9,00E+08	9,80E+08
3	6,50E+07	6,00E+08
4	5,00E+05	4,00E+08
5	1,70E+08	1,80E+08

Tabla 1. Control del banco de cepas. Cepa A y cepa B.

ANEXO F

CURVA PATRÓN DE SACAROSA

Curva utilizada para conocer la concentración de azúcares reductores totales obtenidos en la hidrólisis de la melaza de caña.

Concentración de Sacarosa g/L	Absorbancia a 540 nm
1.3	0.163
2.0	0.234
2.8	0.337
3.6	0.466
4.0	0.516
4.4	0.568
4.8	0.658
5.6	0.744
6.0	0.811

Tabla 1. Datos absorbancia de sacarosa. Promedio tres replicas.

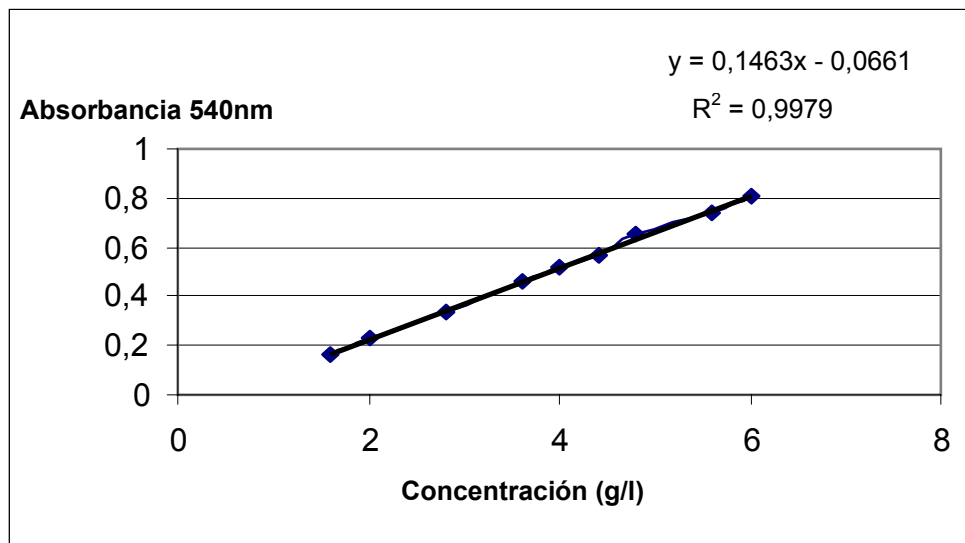


Figura 1. Curva patrón de sacarosa y ecuación lineal.

ANEXO G

CURVA CONTROL EN MEDIO YPG ADICIONADO DE AMPICILINA (300 mg/L) CEPA A Y CEPA B

Tiempo (h)	CEPA A		CEPA B	
	Biomasa (g/L)	Sustrato (g/L)	Biomasa (g/L)	Sustrato (g/L)
0	0,603	39,585	1,011	29,959
1	1,033	34,628	1,065	23,653
2	1,947	32,157	1,287	20,273
3	3,615	20,467	2,180	18,420
4	5,609	18,845	3,036	16,450
5	6,617	16,177	5,192	14,699
6	15,049	13,949	8,405	11,486
8	29,208	1,094	12,545	1,136
10	31,760	1,036	13,942	1,109
12	34,020	0,915	14,297	0,997
14	34,630	1,235	14,894	1,144
16	35,087	0,968	14,856	0,939
18	35,620	0,945	15,034	0,913
20	36,052	0,922	15,173	0,878

Tabla 1. Datos de producción de biomasa y consumo de sustrato por parte de *Saccharomyces cerevisiae* (Cepa A) y *Saccharomyces boulardii* (Cepa B).

ANEXO H

ANÁLISIS ESTADÍSTICO *Saccharomyces cerevisiae*. Cepa A.

H1. Estadística de prueba distribución t- student. (10% y 20% (p/v)).

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	Concentración 10%	Concentración 20%
Media	8,89	11,49
Varianza	45,07	117,16
Observaciones	14,00	14,00
Diferencia hipotética de las medias	0,00	
Grados de libertad	22,00	
Estadístico t	-0,76	
P(T<=t) una cola	0,22	
Valor crítico de t (una cola)	1,71	
P(T<=t) dos colas	0,45	
Valor crítico de t (dos colas)	2,07	

Tabla 1. Estadística t-Student para 10% y 20% (p/v). Cepa A.

Hipótesis General:

La producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 10% no difiere a la producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 20%.

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_i: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

H2. Estadística de prueba distribución t- student. (20% y 30% (p/v)).

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	Concentración 20%	Concentración 30%
Media	11,49	12,49
Varianza	117,16	154,45
Observaciones	14,00	14,00
Diferencia hipotética de las medias	0,00	
Grados de libertad	26,00	
Estadístico t	-0,22	
P(T<=t) una cola	0,41	
Valor crítico de t (una cola)	1,70	
P(T<=t) dos colas	0,82	
Valor crítico de t (dos colas)	2,05	

Tabla 2. Estadística t-Student para 20% y 30% (p/v). Cepa A.

Hipótesis General:

La producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 20% no difiere a la producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 30%.

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_i: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

ANEXO I

ANALISIS ESTADISTICO *Saccharomyces boulardii*. Cepa B.

I1. Estadística de prueba distribución t- student (10% y 20% (p/v)).

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	Concentración 10%	Concentración 20%
Media	1,32	1,48
Varianza	1,03	1,40
Observaciones	14,00	14,00
Diferencia hipotética de las medias	0,00	
Grados de libertad	25,00	
Estadístico t	-0,37	
P(T<=t) una cola	0,35	
Valor crítico de t (una cola)	1,70	
P(T<=t) dos colas	0,71	
Valor crítico de t (dos colas)	2,05	

Tabla 1. Estadística t-Student para 10% y 20% (p/v). Cepa B.

Hipótesis General:

La producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 10% no difiere a la producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 20%.

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_i: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

12. Estadística de prueba distribución t- student (20% y 30% (p/v)).

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	Concentración 20%	Concentración 30%
Media	1,48	1,62
Varianza	1,40	1,70
Observaciones	14,00	14,00
Diferencia hipotética de las medias	0,00	
Grados de libertad	26,00	
Estadístico t	-0,31	
P(T<=t) una cola	0,37	
Valor crítico de t (una cola)	1,70	
P(T<=t) dos colas	0,75	
Valor crítico de t (dos colas)	2,05	

Tabla 2. Estadística t-Student para 20% y 30% (p/v). Cepa B.

Hipótesis General:

La producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 20% no difiere a la producción de biomasa obtenida a la concentración de melaza al 30%.

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

$$H_i: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$