



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Producción de levadura de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*) en un medio de cultivo
formulado a base de melaza de caña de azúcar

Trabajo Especial de Grado
Presentado ante La Universidad Central de Venezuela
Br. Gabriel Alejandro Guia Feliche
para optar al Título: Licenciado en Biología
Tutor: Dr. Blas Dorta

Caracas, Marzo 2019

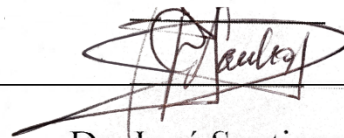
**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DEL Br. Gabriel Alejandro Guía Feliche**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. **Gabriel Alejandro Guía Feliche**, C.I: **21.131.163**, titulado “**PRODUCCIÓN DE LEVADURA DE PANIFICACIÓN (*Saccharomyces cerevisiae*) EN UN MEDIO DE CULTIVO FORMULADO A BASE DE MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR**”, para optar al título de Licenciado en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 5 días del mes de abril del año 2019.



Dr. Julio Vivas



Dr. José Santiago



Dr. Blas Dorta

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	I
ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
RESUMEN	VIII
ABREVIATURAS	X
INTRODUCCIÓN	1
1) SACCHAROMYCES CEREVISIAE.....	1
2) MEDIOS DE CULTIVO INDUSTRIALES.....	3
3) MELAZA COMO FUENTE DE CARBONO Y ENERGÍA	4
4) LA SACAROSA	5
5) ESTEQUIOMETRÍA DE LA FORMACIÓN DE BIOMASA DE LEVADURA A EXPENSAS DE SACAROSA.....	5
6) BIORREACTORES Y SISTEMAS DE CULTIVO	6
7) FASES DE UNA CURVA DE CRECIMIENTO TÍPICA.....	7
ANTECEDENTES	12
OBJETIVOS	16
8) OBJETIVO GENERAL	16
9) OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
1) MICROORGANISMO	17

2)	MEDIOS DE CULTIVO	17
2.1)	Agar Nutritivo Dextrosa Papa (ANDP).....	17
2.2)	Medio de producción.....	17
3)	CLARIFICACIÓN DE LA MELAZA.....	18
4)	DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE AZÚCARES REDUCTORES	18
4.1)	Preparación del DNS.....	18
4.2)	Hidrólisis ácida de la sacarosa	19
4.3)	Medidas colorimétricas	19
5)	PREPARACIÓN DEL INÓCULO	19
6)	CULTIVOS SUMERGIDOS	20
6.1)	Determinaciones de biomasa	20
6.2)	Determinación de azúcares remanentes	21
6.3)	Determinación del Oxígeno disuelto.....	21
6.4)	Medidas de pH	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		22
1)	CLARIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA MELAZA.....	23
2)	ESTUDIOS PRELIMINARES DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE CULTIVOS DE <i>S. CEREVISIAE</i> EN UN MEDIO BASAL DE MELAZA.....	27
3)	FORMULACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE PRODUCCIÓN.....	32
4)	PARÁMETROS CINÉTICOS DE <i>S. CEREVISIAE</i> EN EL MEDIO FORMULADO Y OPTIMIZADO	41
5)	MEDIDAS DE VARIABLES DE PROCESOS	43
6)	CULTIVO POR LOTES ALIMENTADO (<i>FEDBATCH</i>)	52
7)	CRITERIOS DE ESCALAMIENTO DEL PROCESO	53

CONCLUSIONES.....	59
BIBLIOGRAFÍA.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . (4)	1
Tabla 2. Características de <i>S. cerevisiae</i> . (18)	2
Tabla 3. Composición promedio de melaza de caña de azúcar.	4
Tabla 4 Parámetros cinéticos de <i>S. cerevisiae</i> y porcentaje de azúcares no consumidos (%ANC). La concentración de azúcares en el medio basal fue 3,73 g/L.....	30
Tabla 5. Concentraciones de los diferentes sustratos presentes en cada etapa del proceso de optimización, incluido las concentraciones de biomasa y rendimientos alcanzados.....	39
Tabla 6. Concentraciones de sustratos y biomasa esperada en el medio optimizado.	40
Tabla 7. Rendimientos obtenidos en diferentes medios de cultivo.....	41
Tabla 8. Variaciones en los parámetros cinéticos de un cultivo de <i>S. cerevisiae</i> en el medio basal y el medio optimizado.....	43
Tabla 9. Valores correspondientes a los porcentajes de Oxígeno disuelto durante la aplicación del método dinámico a un cultivo de <i>S. cerevisiae</i> creciendo en el medio optimizado.....	46
Tabla 10. Concentraciones de sustratos y volúmenes de medios utilizados en el cultivo.	53
Tabla 11. Concentraciones de biomasa, azúcares y tiempo de proceso de producción de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	56
Tabla 12. Contenido en gramos de N, P y K por kilogramo de fertilizante NPK 15,15,15.....	57
Tabla 13. Requerimientos de materia prima en base a el medio optimizado con sales puras.	57
Tabla 14. Requerimientos de materia prima por proceso de producción a escala de 350 L de volumen final	58
Tabla 15. Requerimientos para el escalamiento del proceso y kilogramos de biomasa a obtener en cada escala.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Esquematización de un cultivo en *batch*. T_o y T_f son los tiempos iniciales y finales; S_o y S_f son las concentraciones iniciales y finales del sustrato limitante; X_o y X_f son las concentraciones iniciales y finales del microorganismo. El volumen de medio se mantiene constante. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 2. Curva de crecimiento típica de un microorganismo. <https://www.lifeder.com/curva-crecimiento-bacteriano/> (Consultado: 22 de abril del 2018)..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 3. Esquema simplificado de un cultivo en *batch* alimentado y un cultivo continuo. V_o , X_o , S_o corresponden al volumen, concentración de células y concentración de sustrato en el biorreactor al inicio de la alimentación. V_f , X_f corresponden a las concentraciones de células y volumen final al hacer pasar todo el medio presente en el reservorio. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4. Valores de absorbancia de una solución de melaza a diferentes longitudes 24
- Figura 5. Curva de calibración de glucosa. La ecuación asociada a dicha curva es $y = 0,5173x - 0,0191$, con un $r^2 = 0,991$ 26
- Figura 6. Curva de calibración de sacarosa. La ecuación asociada a dicha curva es $y = 0,115x - 0,0145$ con un $r^2 = 0,994$ 26
- Figura 7. Curva de calibración de biomasa en base húmeda. En el eje de las abscisas se representaron las diferentes concentraciones de biomasa húmeda (X_h) en g/L, en el eje de las ordenadas se representó la absorbancia medida para cada concentración. La ecuación asociada a dicha curva es $y = 0,171x + 0,005$, con un $r^2 = 0,999$ 29

Figura 8. Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en medio basal de melaza.....	30
Figura 9. Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en el medio optimizado	42
Figura 10. Registro de las concentraciones de Oxígeno disuelto durante la aplicación del método dinámico empleado para la estimación de la velocidad específica de consumo de Oxígeno y el coeficiente volumétrico de transferencia.	46
Figura 11. Modelos de biorreactores Airlift. Tomado de: https://slideplayer.es/slide/11623917/	54

RESUMEN

La presente propuesta de investigación fue dirigida a la caracterización a escala de laboratorio de la producción, por vía fermentativa, de la levadura de panificación *Saccharomyces cerevisiae*, empleando melaza de caña de azúcar como fuente de carbono y energía. Si bien estos son procesos ampliamente difundidos a nivel global, muchos aspectos técnicos relacionados con la producción a gran escala no están disponibles en la bibliografía ya que han sido objeto de patentes o simplemente son guardados bajo reserva por los propios industriales. Tal es el caso de la composición de los medios de cultivo, el ajuste de algunas variables de proceso como el suministro de oxígeno, la disipación de calor metabólico, la dinámica de suministro de nutrientes en los cultivos por lotes alimentados (*fedbatch*), entre otros.

Se determinó que la melaza contiene un 40% p/p de azúcares, pero es deficiente en nitrógeno, fósforo, potasio y magnesio. A fin de obtener un medio balanceado, se empleó un biorreactor NewBrunswick BioFlo C30 operado bajo condiciones de cultivo continuo; empleando la técnica de incrementos discretos de sustrato limitante en el reservorio, se determinó que para preparar un medio a 1 g/L de melaza se requieren concentraciones de 0,054g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,05 g/L de K_2HPO_4 , 0,015 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0,9 mg/L de extracto de levadura. De este modo se obtuvo una concentración de biomasa seca de 0,292 g con un rendimiento de 0,73 g/g. Al crecer en el medio de melaza optimizado *S. cerevisiae* presentó una velocidad específica de consumo de oxígeno de 11,59 $\text{mg}_o/\text{g}_x\text{h}$ y una velocidad específica de crecimiento máxima de $0,3 \text{ h}^{-1}$ con un tiempo de generación de 2,31 h.

Se determinó un coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno de $91,76 \text{ h}^{-1}$, aplicando el método dinámico en un biorreactor NewBrunswick BioFlo III operado a 800 rpm, con un

suministro de aire de 4 vvm y utilizando el medio de cultivo optimizado. Bajo estas condiciones de trabajo se calculó que el valor máximo de biomasa seca que este equipo tolera es de 63,34 g/L.

Mediante el cultivo de *S. cerevisiae* en condiciones de *batch* alimentado, partiendo de una concentración de biomasa inicial de 3,21 g/L en un volumen 2,8 L y empleando un medio de alimentación con una concentración de azúcares de 109 g/L, 17,44 g/L de sulfato de amonio, 13,63 g/L de fosfato dibásico de potasio y 0,25 g/L de extracto de levadura. Se obtuvo una concentración final de biomasa de 13 g/L para un volumen final de 3,2 L.

ABREVIATURAS

X_0 : Biomasa inicial.

X_f : Biomasa final.

T_g : Tiempo generacional.

μ : Velocidad específica de crecimiento.

μ_{max} : Velocidad específica de crecimiento máxima.

$y_{x/s}$: Coeficiente estequiométrico de la biomasa.

$y_{p/s}$: Coeficiente estequiométrico del producto.

$y_{CO_2/s}$: Coeficiente estequiométrico del dióxido de carbono.

$Y_{x/s}$: Rendimiento global de la biomasa en base al sustrato consumido.

$Y_{p/s}$: Rendimiento global de los productos en base al sustrato consumido.

S_r : Concentración de sustrato en el reservorio.

S_0 : Concentración inicial de sustrato.

S_f : Concentración final de sustrato.

F : Flujo.

S.S: Solución salina.

k_s : Constante de afinidad por el sustrato.

ANDP: Agar nutritivo dextrosa-papa.

DNS: Acido 3,5-dinitrosalicilico.

Abs: absorbancia.

DO: densidad óptica.

LPF: Laboratorio de Procesos Fermentativos.

psi: Libras por pulgada cuadrada.

mL: Mililitros.

L: Litros.

AR: Azúcares reductores

Br: Biorreactor

R: Reservorio

K_{La} : Coeficiente de transferencia de oxígeno

X_h : Biomasa húmeda

X_s : Biomasa seca

N_a : Velocidad de suministro de aire

Q_o : Velocidad de consumo de oxígeno

q_o : Velocidad especifica de oxígeno

vvm: volumen de aire por volumen de medio por minuto

C_{AL} : Concentración de oxígeno en la fase líquida

C_{AL1} : Concentración de oxígeno en el tiempo 1 en la fase líquida

C_{AL2} : Concentración de oxígeno en el tiempo 2 en la fase líquida

C_{AL}^* : Concentración máxima de oxígeno en la fase líquida

\bar{C}_{AL} : Concentración de oxígeno en la fase estacionaria en la fase líquida

mM: mili molar

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad el trigo ha sido un alimento que ha estado íntimamente relacionado con el desarrollo de las civilizaciones. Es durante el desarrollo de la cultura egipcia donde se da el primer proceso de fermentación de la harina de trigo, dando origen al pan que hoy conocemos. La fermentación de la masa del trigo para producir el pan no sería posible sin la presencia de ciertos microorganismos fermentadores, siendo los más prominentes las llamadas levaduras.

1) *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es el modelo de levadura típica y más ampliamente utilizada en las industrias para la producción de pan, bebidas alcohólicas y otros elementos fermentados.

En la Tabla 1 se presenta la clasificación taxonómica de las levaduras.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*. (4)

Reino	Hongo
División	Amastogomycota
Clase	Ascomycetes
Subclase	Hemiascomycetidae
Orden	Endomycetales
Familia	Saccharomycetaceae
Subfamilia	Saccharomycetidae
Género	Saccharomyces
Especie	Cerevisiae.

Se estima que la producción anual de *S. cerevisiae* alcanza las 200.000 toneladas peso seco (10), dando esto cuenta de su importancia a nivel comercial. *S. cerevisiae* tiene la capacidad de utilizar diferentes carbohidratos como fuentes de carbono y energía, además puede llevar a cabo sus procesos metabólicos bajo condiciones aerobias y anaerobias (13). Esta capacidad de adaptarse a múltiples condiciones de oxígeno, fuente de carbono y su resistencia a presiones osmóticas variables, es lo que la ha convertido en uno de los microorganismos más utilizados para la producción de múltiples productos de consumo humano, fuente de proteína para alimentos de animales, etc. (20; 19).

La mayoría de los integrantes del género *Saccharomyces* son haploides, pero ciertas cepas de uso industrial pueden ser diploides o triploides (20). La reproducción de estos microorganismos es principalmente por vía asexual mediante gemación; sin embargo, bajo condiciones de laboratorio en las cuales el cultivo está limitado por nitrógeno, éste puede generar esporas a partir de un organismo diploide, en cuyo caso cada célula diploide formará un ascó que contendrá 4 esporas con carga genética haploide (13).

Tabla 2. Características de *S. cerevisiae*. (18)

Dimensiones (micras)	4 – 8
Tiempo generacional (horas)	1 – 3
Intervalo de pH óptimo	4,5 – 5,5
% Nitrógeno	7,5 – 8.5
% Ácidos nucleicos	6 – 12
% Carbohidratos	30 - 45

A escala industrial la producción de grandes cantidades de biomasa de *S. cerevisiae* presenta múltiples retos, debido a que a bajas concentraciones de oxígeno disuelto y/o a altas concentraciones de azúcares en el medio de cultivo, la mayor parte del carbono será destinado a la producción de alcohol y no de biomasa. Otro reto que se presenta en la industria, es ¿con qué sustratos se ha de trabajar? implicando esto que hay que considerar el costo, su adquisición y que permita obtener los mayores rendimientos.

La composición elemental de *S. cerevisiae* proporciona una pista sobre sus requerimientos nutricionales que esta presenta, encontrándose una composición promedio de C = 45%, H = 6.8%, N = 9.0% y O = 30,6% y con un contenido de sales (cenizas) de aproximadamente de 5%. Con estos valores es posible deducir su fórmula elemental utilizando el concepto de carbono mol (Roels, 1983) que permita analizar la estequiometría del proceso. Se ha reportado la formula promedio: $CH_{1,81}O_{0,51}N_{0,17}$ con un peso de 26,67g/c-mol (6).

2) Medios de cultivo industriales.

Los medios de cultivos para la producción a nivel industrial de levadura de panificación, son un secreto bien guardado por las compañías que se encargan de surtir al mercado dedicho producto. Sin embargo, con base en la composición elemental de *S. cerevisiae*, es posible aproximarse a un medio de cultivo que permita suplirsusrequerimientos nutricionales.

Existen publicaciones de posibles medios a base de subproductos de diferentes industrias que otorgan un indicio de cuáles son los posibles elementos y concentraciones necesaria, siendo el medio descrito por Sartorius Stedim Biotech, un punto de referencia en cuanto a las concentraciones de amonio, fosfatos, magnesio, etc.

3) Melaza como fuente de carbono y energía

Los subproductos de las centrales azucareras como son las melazas de caña de azúcar y de remolacha, constituyen buenas bases para la formulación de medios de cultivo por sus altos contenidos de azúcares y la presencia de vitaminas. La composición de la melaza de caña de azúcar se muestra en la Tabla 3:

Tabla 3. Composición promedio de melaza de caña de azúcar.

	%	Vitaminas.	(mg/Kg)
Materia seca	75	Biotina	1,2 – 3,2
Azúcares totales	40 – 56	Ácido fólico	0,04
Materia orgánica no azúcares	9 – 12	Inositol	6.000
Cenizas sulfatadas	10 – 15	Pantotenato de calcio	54 – 64
Calcio	0,8	Piridoxina	2,6 – 5
Fósforo	0,08	Riboflavina	2,5
Sodio	0,2	Tiamina	1,8
Potasio	2,4	Ácido nicotínico	30 – 800
Azufre	0,5	Colina	600 – 800

Los valores mostrados son los promedios reportados por Martin, en su trabajo al utilizar melaza de caña de azúcar como fuente de carbono y energía. Debido a las bajas concentraciones de fuentes de nitrógeno, fosfatos y potasio, los medios basados en melaza deberán ser suplementados con sales de estos elementos, a fin de permitir el óptimo desarrollo de *S. cerevisiae*.

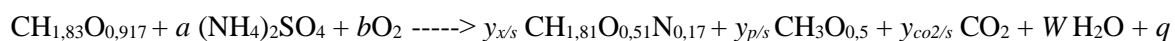
La melaza suele presentar un pH de entre 5.5-6.5, pero esto depende de la presencia de ácidos alifáticos y de los procesos de clarificación a los que pueda ser sometida en la industria (7; 13).

4) La sacarosa

Es un disacárido compuesto por una molécula de glucosa unida mediante un enlace glucosídico en conformación 1-2 a una molécula de fructosa (17). Este azúcar no presenta poder reductor ya que las moléculas que la conforman se encuentran unidas por sus carbonos anoméricos, lo que impide la apertura de la molécula de fructosa para conformar un hemiacetal. Este carbohidrato es obtenido principalmente de la caña de azúcar o de la remolacha al ser procesadas en las centrales azucareras a nivel mundial.

5) Estequiometría de la formación de biomasa de levadura a expensas de sacarosa

La principal fuente de carbono y energía presente en la melaza es la sacarosa, cuya fórmula elemental en base a un c-mol es $\text{CH}_{1,83}\text{O}_{0,917}$ y asumiendo que el principal producto extracelular liberado es etanol, cuya fórmula elemental en base a c-mol es $\text{CH}_3\text{O}_{0,5}$, se puede plantear una ecuación química que describe al proceso de conversión de la sacarosa y sales de amonio como fuente de nitrógeno a biomasa con la subsecuente liberación de CO_2 , agua y energía en forma de calor (q).



Los coeficientes estequiométricos $y_{x/s}$, $y_{p/s}$ y $y_{co2/s}$ expresan los c-moles de biomasa, etanol y CO_2 formados por cada c-mol de sacarosa consumida; así mismo, a y b respectivamente expresan los moles de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y O_2 consumidos por cada c-mol de sacarosa. Con estos coeficientes resulta

posible estimar teóricamente las cantidades de sustrato, fuente de nitrógeno y oxígeno necesario para obtener ciertos rendimientos.

Se puede definir al rendimiento en términos de biomasa seca ($Y_{x/s}$) como la cantidad de biomasa formada debido al consumo de una cierta cantidad de sustrato. Esta misma definición, puede ser aplicada a los productos extracelulares ($Y_{p/s}$) y al CO_2 ($Y_{CO_2/s}$), de esta forma se puede plantear una ecuación que permita su cálculo.

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{-\Delta S}$$

Donde ΔX y ΔS corresponden respectivamente a las cantidades de biomasa formada y sustrato consumido. El signo menos se debe a que la concentración final de sustrato será menor que la inicial.

6) **Biorreactores y sistemas de cultivo**

Todo proceso que involucre producción de biomasa, determinación de parámetros cinéticos de un microorganismo, obtención de un producto de interés comercial deberá ser realizado en recipientes apropiados, siendo estos conocidos como biorreactores o fermentadores. Estos equipos pueden ser utilizados para desarrollar diferentes sistemas de cultivos como lo son, el cultivo por lotes o *batch*, el cultivo continuo y el cultivo por lotes alimentados o *fedbatch*.

El cultivo en *batch* es definido como un sistema con un volumen fijo y sin recambio del medio (16). Este sistema de cultivo resulta de suma utilidad al momento de determinar los parámetros cinéticos de un microorganismo que crece en un cierto medio de cultivo bajo condiciones constantes de aireación, temperatura, pH, entre otros.

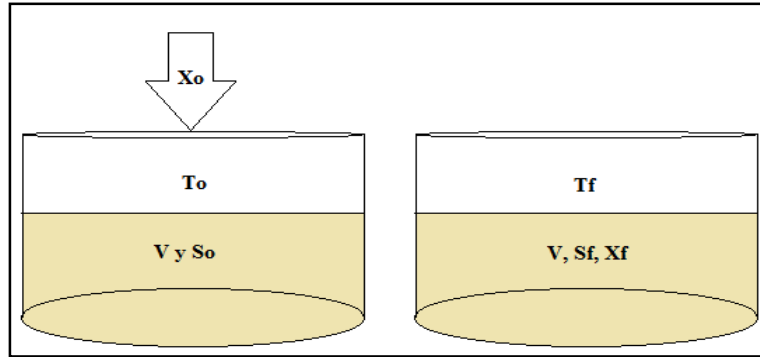


Figura 1. Esquemización de un cultivo en *batch*. T_0 y T_f son los tiempos iniciales y finales; S_0 y S_f son las concentraciones iniciales y finales del sustrato limitante; X_0 y X_f son las concentraciones iniciales y finales del microorganismo. El volumen de medio V se mantiene constante.

Si se toman muestras del cultivo y se determina el número de células presentes a un determinado tiempo mediante siembras en placas (contaje de unidades formadoras de colonias, #UFC), o se miden las variaciones de las densidades ópticas (variaciones en la absorbancia del medio), pueden construirse curvas que describen el comportamiento del cultivo en el tiempo con sus correspondientes fases (1). Estas curvas son de suma utilidad dado que permiten determinar los tiempos generacionales (t_g) y las velocidades específicas de crecimiento máximo (μ_{max}) que son características de cada organismo en un medio determinado.

7) Fases de una curva de crecimiento típica

- **Fase de latencia:** consiste en un período de adaptación del cultivo a las condiciones presentes en un medio fresco donde ha sido inoculado. En esta fase la velocidad de crecimiento (μ) es igual a cero, y no hay crecimiento neto en la población de células.

- **Fase exponencial:** se observa un rápido incremento en el número de células presentes en el medio, donde el sustrato se encuentra en concentraciones saturantes y no hay competencia por el nutriente, aunque la población aumenta. Bajo estas condiciones $\mu = \mu_{\max}$ y donde el crecimiento esta descrito por:

$$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu_{\max}$$

Al integrar la ecuación anterior, se obtiene una ecuación que describe el crecimiento en dicha fase:

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu_{\max} \cdot t$$

Siendo posible en esta fase determinar el tiempo generacional (t_g), definido como el tiempo requerido para que la concentración de biomasa se duplique ($X = 2X_0$). En esta fase el T_g es constante.

- **Fase de transición:** Esta fase marca la transición entre la fase exponencial y la estacionaria. Se caracteriza porque el sustrato que se encontraba en concentraciones saturantes pasa a ser limitante, μ va disminuyendo y el T_g comienza a aumentar.
- **Fase estacionaria:** aquí no se observa un crecimiento neto en la población de células, pero estas se encuentran metabólicamente activas. En esta fase el crecimiento del cultivo se detuvo por limitación en alguno de los sustratos o por acumulación de metabolitos secundarios, con una $\mu = 0$ y una $T_g = \infty$
- **Fase de muerte:** todo proceso metabólico se ha detenido y las células han comenzado a lisarse.

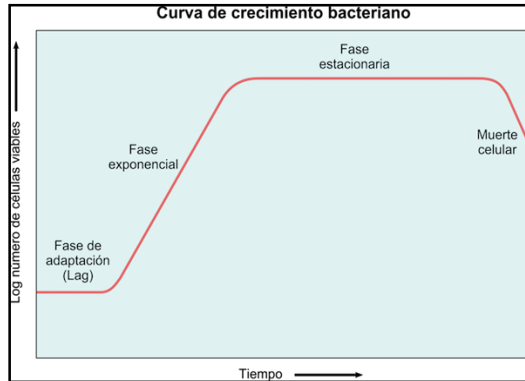


Figura 2. Curva de crecimiento típica de un microorganismo. <https://www.lifeder.com/curva-crecimiento-bacteriano/> (Consultado: 22 de abril del 2018).

La dependencia de μ con respecto al sustrato limitante fue descrita por Monod a través de la ecuación
$$\mu = \mu_{\max} \frac{s}{K_s + s}$$
 donde s es la concentración de sustrato limitante y K_s la concentración de sustrato limitante a la cual $\mu = \frac{\mu_{\max}}{2}$. K_s da una idea de la afinidad que posee el microorganismo por el sustrato, encontrándose que a menores valores de K_s , se requieren menores concentraciones de sustrato para que el microorganismo alcance la fase exponencial.

Si un cultivo por lote, al llegar a fase estacionaria se le agrega medio fresco con una concentración de sustrato (S_r) y a un flujo (F), este se convierte en un cultivo en *Batch* alimentado (donde el volumen aumenta en el tiempo), o alternativamente en un cultivo continuo (si el volumen permanece constante). Reed y Nagodawithana reportan, que el sistema de cultivo que permite obtener los mayores rendimientos en términos de biomasa sin presentar inhibición por acumulación de catabolitos es el sistema de cultivo en *batch* alimentado.

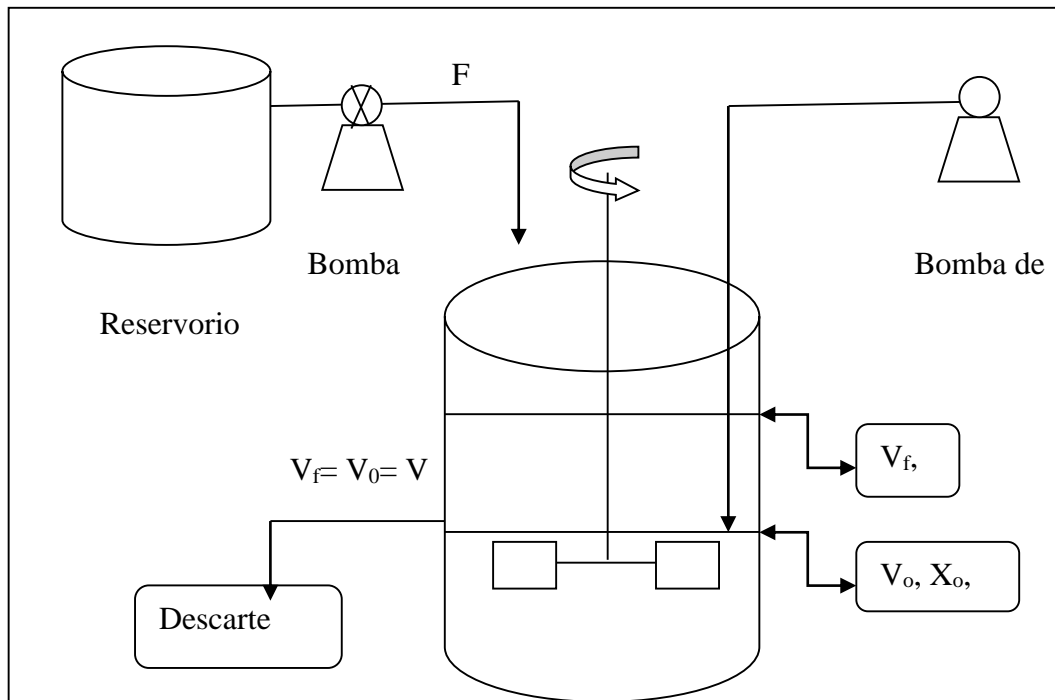


Figura 3. Esquema simplificado de un cultivo en *batch* alimentado y un cultivo continuo. V_o , X_o , S_o corresponden al volumen, concentración de células y concentración de sustrato en el biorreactor al inicio de la alimentación. V_f , X_f corresponden a las concentraciones de células y volumen final al hacer pasar todo el medio presente en el reservorio.

La Figura 3, muestra un esquema de un cultivo continuo si se permite la salida del exceso de medio entrante. Reed y Nagodawithana plantean que ajustar μ a valores menores o iguales a $0,2 \text{ h}^{-1}$ será un factor importante para obtener alta concentraciones de levadura. Esto es posible ya que, en estado estacionario la tasa de dilución (D) del cultivo será igual a μ . Además, en este estado la

concentración de sustrato y de biomasa en el biorreactor serán constantes $\left(\frac{dx}{dt} = 0, \frac{ds}{dt} = 0\right)$ y

vendrán dadas por:

$$\hat{S} = K_s \frac{D}{\mu_{\max} - D} \quad (1)$$

$$\hat{X} = Y_{x/s}(S_r - \hat{S}) \quad (2)$$

Donde \bar{S} corresponde a la concentración de sustrato y \bar{X} la concentración de biomasa en el biorreactor en estado estacionario.

Así mismo, se puede determinar el tiempo de retención (t_r)

$$t_r = \frac{1}{D} \quad (3)$$

El flujo de medio entrante vendrá dado por:

$$F = D V \quad (4)$$

Correspondiendo V al volumen de medio presente en el biorreactor el cual será constante.

De acuerdo con la Figura 3, si se cierra la salida del medio, el sistema estaría en condición de *batch* alimentado con una concentración de sustrato en el reservorio y un flujo constantes. En este sistema de cultivo, se pueden ajustar las condiciones de flujo y sustrato en el reservorio para obtener concentraciones finales de biomasa elevadas, evitando tener represiones por catabolito y la deriva del sustrato carbonado a la formación de etanol.

En este sistema se plantea que la variación de en la concentración del sustrato limitante en el biorreactor debe ser aproximadamente igual a cero y μ podrá ser ajustada en función de la tasa de dilución. De este, modo se tiene que la acumulación de sustrato vendrá dada por:

$$\frac{d(VS)}{dt} = FS_r - \frac{\mu X_o V_o}{Y_{x/s}}$$

Como la variación en la concentración del sustrato limitante es aproximadamente igual a cero, la ecuación anterior proporciona un límite superior para los valores de F y S_r , encontrándose que:

$$FS_r \leq \frac{\mu X_o V_o}{Y_{x/s}} \quad (5)$$

Esta ecuación permite determinar múltiples factores que son de interés para este sistema; como lo es, la variación de la biomasa en el tiempo en función del volumen:

$$\frac{d(XV)}{dt} = FS_r Y_{x/s}$$

Al integrarla dará una ecuación que permite determinar la concentración de sustrato en el reservorio requerido para obtener una concentración de biomasa de interés:

$$S_r = \frac{\Delta(XV)}{Y_{x/s}(\Delta V)} \quad (6)$$

La eficiencia con la cual el sistema de aireación puede transferir el oxígeno del aire al medio de cultivo se expresa como el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno k_{La} , donde k_L posee unidades de mM/h y a es el área de contacto entre las burbujas y el medio de cultivo por unidad de volumen (20). Reed y Nagodawithana reportan que uno de los factores más importantes para la producción de grandes cantidades de biomasa de *S. cerevisiae* es la aireación, por esta razón la velocidad de transferencia de oxígeno desde las burbujas al medio (k_1a) debe superar siempre a la velocidad de consumo de oxígeno por parte de la levadura.

ANTECEDENTES

Debido a la importancia comercial de *S. cerevisiae* se han realizado múltiples investigaciones a nivel nacional e internacional, sobre la formulación de posibles medios de cultivo para la producción biomasa de este microorganismo. Una característica que comparten todos estos medios es utilizar como fuente de carbono y energía subproductos agroindustriales como las

melazas, productos de descarte de empresas de bebidas no alcohólicas, residuos de pulpa de café, entre otros.

Reed, Nagodawithana en su libro titulado *Yeast Production*, plantean que a nivel industrial la principal fuente de carbono a utilizar para la producción de biomasa de *S. cerevisiae* son las melazas de caña de azúcar y/o de remolacha, debido a sus altos contenidos de azúcares y vitaminas, lo que las vuelve un buen sustrato para la formulación de medios de cultivos de bajo costo con altos rendimientos. Estos autores resaltan la necesidad de suplementar a los medios con sales de nitrógeno, fósforo, magnesio, calcio y potasio, para suplir las necesidades del microorganismo y que dichos elementos no sean limitantes del crecimiento.

En el año 2003 Gualtieri y Sanchez de Universidad de Los Andes, trabajaron utilizando los productos de desecho del empaçado de harina de maíz precocida. Así mismo, Gualtieri, Villalta, Díaz y col. en el 2007 utilizaron residuos de pulpa de café para la obtención de biomasa de este organismo. Estos investigadores reportaron que los medios formulados a base de estas dos fuentes de carbonos son funcionales y permiten obtener buenos rendimientos. En el caso del medio formulado a base de residuos de pulpa de café, concluyeron que los mejores rendimientos fueron obtenidos en el medio suplementado con 30g/L de melaza, obteniendo concentraciones finales de biomasa de 10 g/L. En ambos casos estos investigadores se vieron en la obligación de hidrolizar los sustratos con los cuales estaban trabajando puesto que los azúcares no estaban disponibles de primera mano para ser utilizados por *S. cerevisiae*.

Debido a las bajas concentraciones de fuentes de nitrógeno, fosfatos, etc., en la melaza, Martin 2005 plantea utilizar el agua de maceración del maíz como fuente de estos elementos. Este investigador, utilizó melaza de remolacha y agua de maceración de maíz como sustratos

fermentables en medios de producción de biomasa de *S. cerevisiae*. Por otro lado, plantea que uno de los factores que se deberá regular en todo momento será la aireación, para evitar la deriva de la fuente de Carbono a etanol y no a biomasa.

Al trabajar bajo condiciones de *batch* alimentado con aireación, este ajusta las condiciones de cultivo de tal forma que se puedan obtener altas concentraciones de biomasa (X) sin inhibiciones por catabolitos.

En el año 2007, Fajardo y Sarmiento en su Trabajo Especial de Grado, utilizaron melaza de caña de azúcar como fuente de Carbono, energía, vitaminas y minerales en cultivos operados por lotes, reportando un incremento en la concentración de biomasa al aumentar los porcentajes de melaza y ajustando la temperatura a 30 °C. En este trabajo, no se reportó si hubo limitación del crecimiento por un factor diferente a la fuente de Carbono. Estos investigadores determinaron que la temperatura optima del cultivo es de 30°C, obteniendo $Y_{x/s} = 0,857$ y concentraciones de biomasa de 21,3g/L, mientras que a temperaturas cercanas a los 37°C los rendimientos fueron menores $Y_{x/s} = 0,597$ con concentraciones de biomasa de 19,82g/L.

Matute y Galindo de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela en el 2016, realizaron trabajos de investigación sobre medios a base de subproductos de las industrias de bebidas no alcohólicas. Estos investigadores trabajaron con dos medios con diferentes porcentajes de azúcares, uno de ellos estaba compuesto por cola negra con un 12% de azúcares y el otro por agua carbonatada o una bebida isotónica con un 7% de azúcares. A partir de estos medios se obtuvieron concentraciones de biomasa de 15,4g/L y 12,8 g/L respectivamente. Con estos resultados concluyeron que estos medios permiten obtener altas concentraciones de biomasa de *S. cerevisiae*.

En el Laboratorio de Procesos Fermentativos del Instituto de Biología Experimental (IBE), Monsalve en 1999, formuló un medio de cultivo para el cultivo de *Candida utilis* a base de germen desgrasado del maíz, sometido a procesos de hidrólisis enzimática y clarificación mediante centrifugación. En este trabajo se utilizó un sistema de cultivo en *Batch* en un biorreactor de 1,5 L, obteniéndose concentraciones de biomasa de 27,8 g/L.

OBJETIVOS

8) **Objetivo general**

Caracterizar a escala de laboratorio la producción de biomasa de levadura de panificación *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando melaza de caña de azúcar como fuente de carbono y energía.

9) **Objetivos específicos**

1. Obtener, aislar y establecer un cepario de *Saccharomyces cerevisiae*, partiendo de una muestra comercial de levadura de panificación.
2. Formular partiendo de la composición elemental de *S. cerevisiae*, un medio de cultivo basal conteniendo melaza como fuente de carbono, energía y vitaminas, además de fuentes de nitrógeno, fósforo, azufre, magnesio y otros macroelementos esenciales que permitan obtener altos rendimientos en biomasa.
3. Determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos del crecimiento de *S. cerevisiae* en el medio optimizado: velocidad específica de crecimiento máximo, velocidades específicas de consumo de oxígeno, coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, rendimiento en biomasa referido a azúcares reductores.
4. Optimizar el medio de cultivo formulado, empleando condiciones de cultivos continuos utilizando la técnica de pulsos de nutrientes para identificar factores limitantes del crecimiento.
5. Incrementar la escala de trabajo hasta un volumen de 15 Litros y optimizar las variables de proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Microorganismo

Se empleó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* obtenida de un producto comercial de levadura de panificación marca Fleishmann, Fleishmann Foods S.A, Colombia. Se procedió a su purificación mediante resuspensión de una muestra representativa en solución salina, seguido de la siembra por agotamiento en placas de agar nutritivo dextrosa papa (ANDP) a fin de obtener colonias aisladas. Seguidamente, a partir de una colonia aislada se sembró un lote de tubos de agar inclinado (ANDP), los cuales se incorporaron a la colección de microorganismos del Laboratorio de Procesos Fermentativos y constituyeron el cepario que fue utilizado durante el desarrollo del trabajo.

2) Medios de cultivo

2.1) Agar Nutritivo Dextrosa Papa (ANDP)

Para la preparación de este medio se partió de una infusión de papa al 20 % (p/v) en agua destilada, para lo cual se emplearon 200 g de papas peladas y cortadas finamente, por cada litro de agua destilada seguido de su ebullición durante 15 minutos. A esta infusión se le agregó agar nutritivo y D (+)- glucosa para lograr concentraciones finales de 2 % (p/v) en cada caso. Seguidamente se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos y luego se procedió a su dispensado en placas de Petri o alternativamente en tubos de ensayo roscados.

2.2) Medio de producción

Para formular el medio de producción se empleó como componente básico melaza de caña de azúcar suministrada por el Central El Palmar, Estado Aragua, diluida a la concentración de 500 g/L. Esta preparación fue clarificada tal como se indica en el protocolo 3, constituyendo así el medio basal, a partir del cual se constituyeron los diferentes medios empleados en este estudio. Para ello, la solución basal fue suplementada con fuentes de nitrógeno, fósforo, magnesio, azufre, potasio y calcio, entre otros nutrientes, en las concentraciones descritas en cada experimento.

3) Clarificación de la melaza

Se preparó una solución de melaza a 500 g/L en agua destilada. Esta se acidificó con HCl hasta alcanzar pH 2 y seguidamente se calentó en baño de María por 45 minutos a 90 °C. Posteriormente, la preparación se centrifugó a 10.000g durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. Esta mezcla se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y fue almacenada a 4 °C hasta su uso.

4) Determinación de las concentraciones de azúcares reductores

Para la determinación de las concentraciones de azúcares reductores presentes en la melaza y/o en los medios de cultivo, se utilizó la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), de acuerdo con los tres pasos consecutivos que se describen a continuación.

4.1) Preparación del DNS

Se pesaron: 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), 150 g de tartrato sodio-potasio y 8 g de hidróxido de sodio. Se disolvió el hidróxido de sodio en 200 mL de agua destilada y se añadió lentamente el tartrato sodio-potasio. La preparación fue llevada a un volumen de 400 mL con agua destilada. Seguidamente, se agregó el DNS lentamente con agitación constante y se mantuvo bajo

esta condición durante 24 horas. Finalmente, la preparación se llevó a un volumen final de 500 mL, se filtró a través de papel Whatman N° 1 y se almacenó en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

4.2) Hidrólisis ácida de la sacarosa

Se tomaron 2 mL de una solución problema de sacarosa y se le agregó 2 mL de ácido clorhídrico al 37% v/v y se calentó durante 10 minutos a 92°C. Pasado este tiempo se detuvo la reacción en baño de agua con hielo. Transcurridos 5 minutos se ajustó el pH a 7 utilizando soluciones de hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico a las concentraciones de 12N, 1N y 0,1N según fue necesario. Para ello se empleó un medidor de pH Hanna, Hanna Instruments, Singapur.

4.3) Medidas colorimétricas

Se utilizó el método del DNS para la determinación de los azúcares reductores. Para esto se agregó 0,5 ml de cada una de las soluciones problema y 0,5 mL de DNS en tubos de ensayo. Las preparaciones fueron llevadas a ebullición durante 5 minutos, luego de lo cual se detuvo la reacción colocando los tubos en agua con hielo. Seguidamente se agregó 5 mL de agua destilada y se midió la absorbancia a 540 nm, empleando un espectrofotómetro Spectronic 20D+, Milton Roy Company, USA. Cada determinación se realizó por duplicado.

5) Preparación del inóculo

A partir de un tubo de agar inclinado del cepario de *S. cerevisiae* y mediante la utilización de un asa de platino se inocularon tubos de ensayo conteniendo 3 mL de medio de producción. Las preparaciones se incubaron a 30 °C durante 24 horas. Seguidamente fueron utilizadas como preinóculos para iniciar cultivos (inóculos) en matraces Erlenmeyer conteniendo 30 mL de medio

de producción, e incubados bajo las condiciones descritas. Estos fueron utilizados para iniciar los cultivos en los biorreactores.

6) Cultivos sumergidos

Los cultivos sumergidos fueron realizados utilizando biorreactores del tipo tanque agitado de mezcla completa NewBrunswick BioFlo C30 y BioFlo III, con volúmenes de trabajo de 0,380 L y 3,5 L respectivamente. El biorreactor BioFlo C30 fue operado por lotes (*batch*) y bajo condiciones de flujo continuo, con un suministro de aire de 2 vvm ζ ? y una agitación de 600 rpm. El biorreactor BioFlo III fue operado por lotes (*batch*) y por lotes alimentados (*fedbatch*) con una aireación de 4 vvm y una agitación de 800 rpm. En ambos biorreactores la temperatura se ajustó a 30 °C. Los procesos fueron iniciados con un volumen de inóculo que correspondió al 10% del volumen de trabajo. En el curso de las fermentaciones se hicieron determinaciones de las concentraciones de biomasa, azúcares, porcentaje de oxígeno disuelto y pH.

6.1) Determinaciones de biomasa

Para las determinaciones de biomasa se tomaron muestras de volúmenes conocidos de los cultivos y se las centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos. Los sedimentos fueron sometidos a tres ciclos de lavado con agua destilada y centrifugación bajo las mismas condiciones. Para la determinación de la concentración de biomasa húmeda los sedimentos fueron pesados en una balanza analítica Sartorius Bp 110 s, Goettingen, RFA, sobre platillos de aluminio prepesados. Para la determinación de la biomasa seca, las muestras contenidas en los platillos se secaron a 60 °C hasta alcanzar peso constante.

Alternativamente, durante el curso de los procesos se hicieron medidas indirectas de la concentración de la biomasa húmeda. Para ello, los sedimentos obtenidos por centrifugación y

lavado, fueron resuspendidos en agua destilada empleando volúmenes iguales a los de las muestras originales. Se hicieron diluciones seriadas a partir de cada muestra y se midió la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro Spectronic 20D+, Milton Roy Company, US. Con los datos obtenidos se realizaron regresiones lineales de DO contra el peso de la biomasa húmeda, a los efectos de estimar las concentraciones de ésta en forma indirecta.

6.2) Determinación de azúcares

Los azúcares remanentes correspondientes a cada proceso fueron determinados en los sobrenadantes obtenidos luego de la centrifugación de muestras de los cultivos a 10.000 g durante 10 minutos. Los sobrenadantes fueron diluidos convenientemente y sometidos a hidrolisis para liberar los azúcares reductores constituyentes de la sacarosa, cuyas concentraciones fueron determinadas mediante la aplicación del método del DNS.

6.3) Determinación del oxígeno disuelto

El porcentaje de oxígeno disuelto en los cultivos se midió utilizando un electrodo galvánico acoplado a un analizador-registrador NewBrunswick modelo D.O – 50. Para la calibración del electrodo a 0% de saturación se suministró al medio nitrógeno gaseoso a 2 vvm durante 45 minutos. Seguidamente, se procedió a calibrar a 100% de saturación suspendiendo el paso de nitrógeno y suministrando aire a 2 vvm. Durante los procesos se hicieron registros continuos del porcentaje de oxígeno disuelto.

6.4) Medidas de pH

Las medidas de pH fueron realizadas a diferentes tiempos en el curso de los procesos, en los sobrenadantes obtenidos luego de la centrifugación de muestras de los cultivos a 10.000 g durante 10 minutos. Para ello, se utilizó un analizador Hanna, Hanna Instruments, Singapur.

Resultados y discusión

Este estudio fue realizado con la finalidad de diseñar y caracterizar, a escala de laboratorio, la producción de levadura de panificación por vía fermentativa en cultivos sumergidos empleando melaza de caña de azúcar, como fuente de carbono y energía. Para ello, se planificó una secuencia de pasos dirigidos a la caracterización de la melaza, así como, la identificación de factores limitantes del crecimiento, la formulación y optimización de un medio de cultivo apropiado, la determinación de parámetros cinéticos y estequiométricos y el estudio de variables asociadas al proceso. Todo ello, con el propósito establecer las bases para el eventual escalamiento del proceso.

Los primeros pasos en este estudio giraron en torno a la caracterización de la melaza como. La melaza es un subproducto agroindustrial de naturaleza compleja, cuya composición depende de las condiciones de cultivo de la caña de azúcar, así como de los procesos a los que es sometida para la extracción de sacarosa. Estos procesos conllevan a la formación de sustancias insolubles que pueden agregarse y formar precipitados que a la larga interfieren en las mediciones de parámetros de interés. Por esta razón, se planteó como un primer paso en los estudios a realizar, la clarificación de la melaza para eliminar los elementos insolubles que esta contiene.

1) Clarificación y caracterización de la melaza

Para eliminar los sólidos insolubles de la melaza, fue necesario realizar modificaciones al protocolo de clarificación planteado por Cerrutti y Galvagno (s.f), para poder obtener medios basales bien clarificados. Estos autores proponen diluir la melaza en agua, realizar un ajuste de pH a 4,5 y calentar durante 45 minutos a 90 °C, posteriormente, enfriar la solución y centrifugarla a 6.800 g durante 10 minutos. Este protocolo permitió preparar medios basales, los cuales, al ser observados bajo el microscopio óptico no contenían sólidos en suspensión. Pero, al desarrollarse el crecimiento de *S. cerevisiae* en estos medios, ésta genera productos extracelulares que modifican el pH del medio acidificándolo, lo que causó la formación de agregados insolubles que interferían en las mediciones.

Para evitar la formación de estos agregados, se midió el pH de un medio inoculado 24 horas antes con *S. cerevisiae* y se lo utilizó para ajustar el pH de la solución de melaza a clarificar. El pH para la clarificación se fijó en 2 y el protocolo de centrifugación fue variado, ajustándolo a 10000 g durante 10 minutos. Con esto fue posible evitar la formación de precipitados insolubles luego de largados los cultivos.

Por otra parte la melaza clarificada presente en los medios de cultivo aportó a estos una coloración que podía interferir con las determinaciones de azúcares reductores presentes. Utilizando espectrofotometría, se buscó determinar si estas soluciones coloreadas presentaban valores máximos de absorbancia a 540 nm, ya que a esta longitud de onda los compuestos coloreados generados al reaccionar el DNS con los azúcares reductores tienen un máximo de absorción de la luz incidente.

Para esto, se construyó una curva de absorción de luz a diferentes longitudes de onda. Se utilizó un espectrofotómetro NewBrunswick 20D+ con el cual se determinaron las absorbancias de una solución de melaza a 5 g/L a diferentes longitudes. Las determinaciones fueron realizadas desde 430 nm hasta 730 nm.

En la Figura 4, se muestran los resultados obtenidos, donde se evidencia que la solución de melaza presenta un mínimo de absorbancia a 650 nm y no a 540 nm. Por esta razón, al determinar las concentraciones de azúcares en los cultivos, se restó la absorbancia del medio libre de células a los valores de absorbancia medidos a productos de la reacción colorimétrica del DNS con los azúcares presentes en las muestras. Para determinar la absorbancia debida al medio libre de células presente durante la determinación de los azúcares, se agregó 0,5 mL de dicho medio en un tubo de ensayo y se lo llevó a un volumen final de 6 mL con agua destilada; posteriormente se midió su absorbancia a 540 nm.

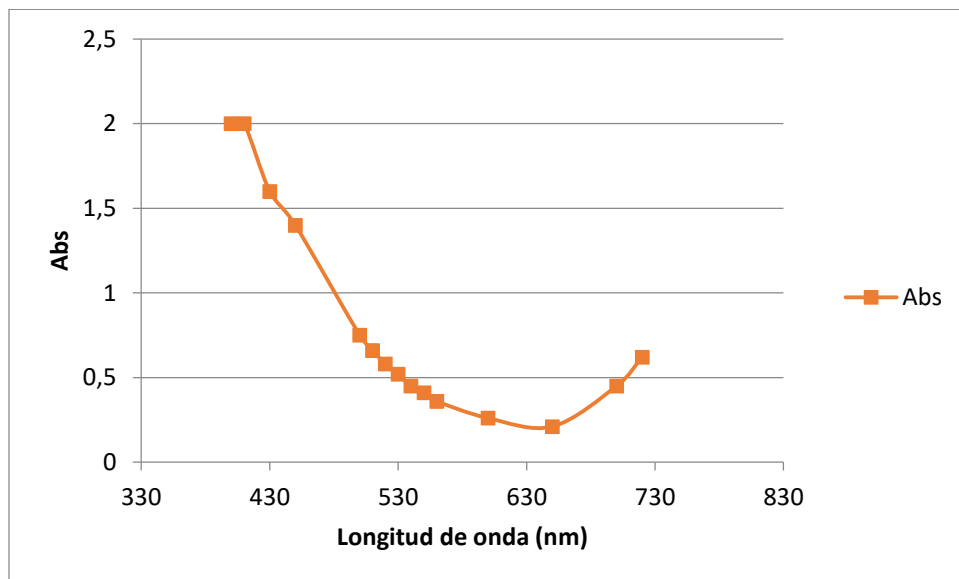


Figura 4. Valores de absorbancia de una solución de melaza a diferentes longitudes

La melaza de caña de azúcar es generada como un subproducto en el proceso de obtención de sacarosa en las centrales azucareras del país. Si bien durante este proceso se le remueve gran parte de la sacarosa, la melaza cuenta con un contenido de azúcares que pueden ser utilizados para diversos procesos.

Para la determinación de los azúcares presentes en la melaza, se construyeron curvas de calibración a base de soluciones madre de glucosa y sacarosa a 25 g/L y 60 g/L respectivamente. A estas soluciones madre se les realizó una serie de diluciones seriadas para obtener soluciones cuyo intervalo de concentraciones fuese de 0,25-2,5 g/L para la glucosa y 0,5-6 g/L para la sacarosa, en este rango los valores de absorbancia vs concentración tienen un comportamiento lineal. Dado que la sacarosa es un disacárido no reductor, se realizó una hidrólisis ácida a las soluciones en las que ésta estaba presente.

Seguidamente, se determinaron los valores de absorbancia en cada solución de estos dos azúcares utilizando el método del DNS y empleando agua destilada como solución blanco. A cada valor de absorbancia de las muestras se les restó la absorbancia del DNS. Las Figuras 5 y 6 muestran las curvas de calibración de glucosa y sacarosa respectivamente.



Figura 5. Curva de calibración de glucosa. La ecuación asociada a dicha curva es $y = 0,5173x - 0,0191$, con un $r^2 = 0,991$.

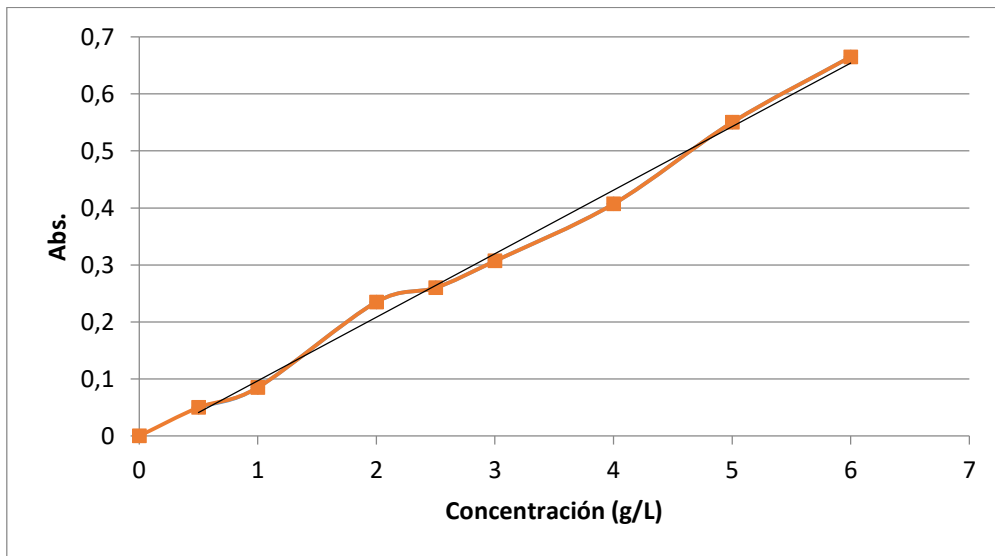


Figura 6. Curva de calibración de sacarosa. La ecuación asociada a dicha curva es $y = 0,115x - 0,0145$ con un $r^2 = 0,994$.

Para la determinación del contenido de azúcares de la melaza, se preparó una solución clarificada a una concentración de 5 g/L en agua destilada y se determinó la concentración de azúcares reductores disponibles sin hidrolizar y al hidrolizar la solución. Para esto, se utilizó agua

destilada como solución blanco, soluciones estándar de glucosa y sacarosa a 1 g/L y 3 g/L respectivamente y a cada valor de absorbancia de las muestras se les resta el valor de absorbancia del DNS y de la solución de melaza.

Se determinó que las soluciones de melaza no hidrolizadas presentaban una concentración de azúcares reductores de 0,05 g/L, mientras que las soluciones de melaza hidrolizada presentaban una concentración de azúcares reductores de 2 g/L. Estos valores indican que la melaza posee un 40 % de azúcares, correspondiendo el 39 % a oligosacáridos no reductores compuestos por dos o más monosacáridos que presentan en su estructura un enlace glucosídico en conformación 1-2 (17) y teniéndose tan solo un 1 % de sacáridos reductores.

El contenido de azúcares en la melaza depende de los procesos a los que se someta el jugo de caña de azúcar a fin de recuperar la mayor cantidad de sacarosa presente en este. En general, las melazas presentan un contenido de azúcares de entre 40 y 46% (13), quedando el porcentaje de azúcares presentes en la melaza utilizada en este trabajo, dentro del intervalo indicado en la bibliografía. Se ha reportado que la sacarosa es el carbohidrato presente en mayor proporción en la melaza (9); sin embargo, con los estudios realizados en este trabajo solo fue posible asumir esto como cierto, ya que el método colorimétrico empleado para la determinación del contenido de azúcares sólo discrimina entre azúcares reductores y no reductores.

2) Estudios preliminares de los parámetros cinéticos de cultivos de *S. cerevisiae* en un medio basal de melaza.

Los parámetros cinéticos de un microorganismo que crece en un medio de cultivo determinado, se ven afectados por factores físicoquímicos asociados al proceso durante el desarrollo del microorganismo. Si se mantienen constantes los factores físicos como la temperatura,

la aireación, la agitación, entre otros, el cultivo sólo se verá afectado por factores químicos tales como las concentraciones de fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, oxígeno, compuestos de excreción, inhibidores del crecimiento y sustancias tóxicas.

La melaza presenta en su composición macro y micronutrientes utilizables por ciertos microorganismos para su crecimiento y desarrollo. Pero, las concentraciones de los mismos pueden ser mucho menores que las requeridas, generándose limitaciones nutricionales que deberán ser subsanadas para el óptimo funcionamiento del sistema. Estas limitaciones tendrán un efecto negativo sobre la producción de biomasa y sobre los valores de rendimiento en términos de biomasa de *S. cerevisiae* ($Y_{x/s}$).

Para iniciar los estudios del crecimiento de *S. cerevisiae* en medios formulados a base de melaza y determinar el incremento de la biomasa en el tiempo, se construyó una curva de calibración de biomasa. Para esto, se inició un cultivo en un biorreactor NewBrunswick BioFlo C30 operado por lote (*batch*), el cual contenía un medio basal de melaza con una concentración de azúcares de 40 g/L. Una vez transcurridas 24 horas, se siguió el protocolo descrito en 6.1 y se relacionaron las diferentes concentraciones de biomasa húmeda con sus respectivos valores de absorbancia. En la Figura 7 se muestra la gráfica construida con estos valores. El intervalo de concentraciones de biomasa a los que se les midió la absorbancia estaba comprendido desde 0,02 g/L hasta 4,5 g/L de biomasa húmeda (X_h).

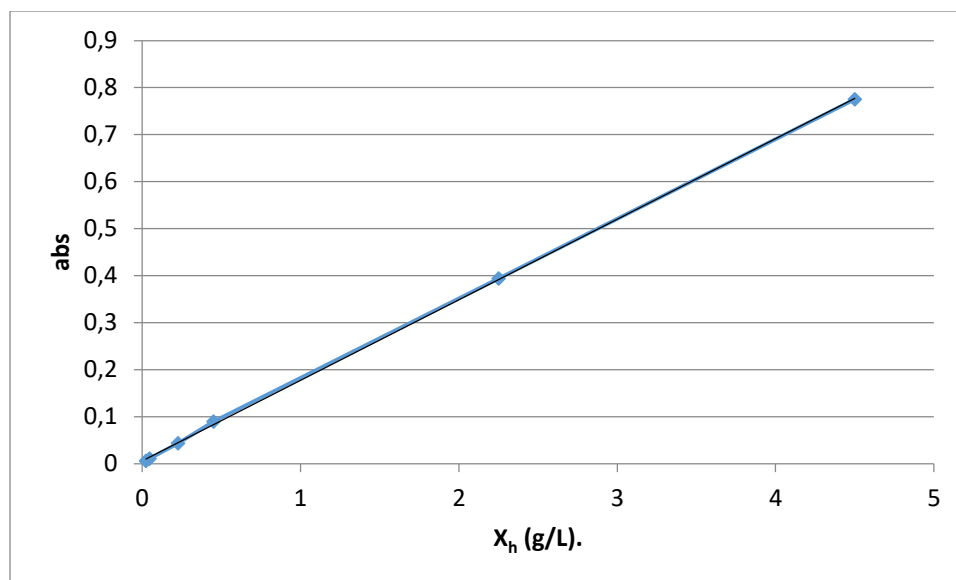


Figura 7. Curva de calibración de biomasa en base húmeda. En el eje de las abscisas se representaron las diferentes concentraciones de biomasa húmeda (X_h) en g/L, en el eje de las ordenadas se representó la absorbancia medida para cada concentración. La ecuación asociada a dicha curva es $y = 0,171x + 0,005$, con un $r^2 = 0,999$.

Se determinó que el contenido de humedad presente en la biomasa de *S. cerevisiae* es del 77,5% (con un contenido de sólidos de 22,5%). Se ha reportado que el contenido de humedad de esta levadura representa entre el 70% y 80% del peso total, siendo esto una característica de cada cepa y de las condiciones en la cuales se desarrolle el cultivo.

Para determinar los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en un medio basal de melaza con un contenido de azúcares de 3,73 g/L, se desarrolló un cultivo en un biorreactor NewBrunswick BioFlo C30 operado por lote (*batch*). Se tomaron muestras a tiempo cero y cada 2 horas durante 8 horas, a las cuales se les aplicó el protocolo descrito en 6.1, reservando los sobrenadantes recuperados luego de inocular el biorreactor y al cumplirse las 8 horas, para determinaciones posteriores de su contenido de azúcares. Para ello, se emplearon las curvas de calibración de la biomasa y sacarosa mostradas arriba. Con las concentraciones de biomasa determinadas se construyó una curva de crecimiento para el cultivo de *S. cerevisiae* y se

determinaron los parámetros cinéticos en la fase exponencial del crecimiento. En la Figura 8, se muestra la curva de crecimiento construida.

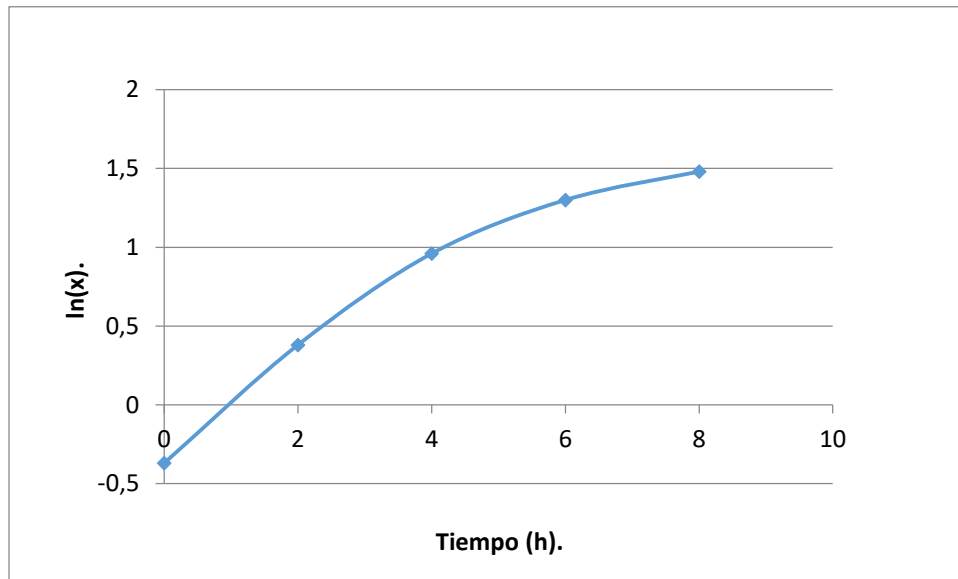


Figura 8. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* en medio basal de melaza.

De la Figura 8, se puede observar que el cultivo no presentó fase de latencia y que la fase estacionaria fue alcanzada a las 8 horas. La ausencia de esta fase de latencia se debió a que el preinóculo se encontraba en fase exponencial de crecimiento, por lo que al inocular el biorreactor se inició de inmediato el crecimiento del cultivo. La Tabla 4, muestra los valores de velocidades específicas máximas de crecimiento, tiempo generacional y rendimiento obtenidos para el medio basal de melaza.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* y porcentaje de azúcares no consumidos (%ANC).

La concentración de azúcares en el medio basal fue 3,73 g/L

μ_{\max} (h ⁻¹)	tg (h)	$Y_{x/s}$ (g _x /g _s)	% ANC
0,33	2,08	0,265	55,5

El tiempo generacional determinado indicó que se requieren 2 horas aproximadamente, para que se duplique la biomasa presente en el medio, siendo este tiempo casi el doble del reportado para medios definidos a base de glucosa y fructosa (13). En estos medios los tiempos generacionales son aproximadamente de 1 hora con 40 minutos; mientras que, para medios a base de sacarosa se han reportado tiempos generacionales de 2 horas (13). *S. cerevisiae* deberá romper el enlace glucosídico que une a la molécula de glucosa y fructosa que conforman a la sacarosa para poder aprovecharla como fuente de carbono y energía. Esto incrementa el número de pasos metabólicos, aumentando el tiempo de proceso (17).

Los valores de velocidad específica de crecimiento máximo y tiempo generacional, varían dependiendo de la cepa de *S. cerevisiae* estudiada. Se han reportado velocidades específicas de crecimiento máximas de diferentes cepas de este microorganismo, las cuales van desde 0,0782 h⁻¹ hasta 0,447 h⁻¹ (9; 13) en medios basales de melaza. Las cepas salvajes comúnmente presentan velocidades específicas de crecimiento menores que las cepas comerciales. Estas diferencias entre cepas pueden deberse a la eficiencia de *S. cerevisiae* para consumir los sustratos presentes en el medio, o alternativamente a condiciones de limitación en oxígeno o efectos inhibitorios del crecimiento microbiano producto de altas concentraciones de azúcares en el medio.

Los valores de rendimientos obtenidos en procesos de producción de biomasa de *S. cerevisiae* a nivel industrial, utilizando medios a base de melaza suplementados con sales usualmente son de 0,5 g/g (20). Es de esperar que el rendimiento obtenido en medios basales de melaza, presente valores menores que los obtenidos en medios suplementados con sales. Esto se debe a que el cultivo puede encontrarse limitado en algún sustrato necesario para su crecimiento. Se han reportado valores de rendimiento en biomasa, en medios a base de melaza de caña de azúcar sin suplemento de sales que van desde 0,213 hasta 0,343 (9; 13). En el presente estudio se

determinó que el rendimiento en biomasa obtenido con un medio basal de melaza fue de 0,33 g/g, estando este valor dentro del intervalo de rendimientos esperados. La concentración de azúcares no consumidos en el biorreactor luego de transcurridas las 8 horas fue de 2,07 g/L, lo que indica que solo el 44,51 % de los azúcares presentes en el medio fueron consumidos, consecuentemente se puede inferir que el factor limitante del crecimiento, no fue la fuente de carbono sino algún otro constituyente de la melaza presente en bajas concentraciones.

Estos parámetros cinéticos están indicando que la melaza sirve como una buena fuente de carbono y energía, para el crecimiento de *S. cerevisiae*, pero debe ser suplementada con fuentes inorgánicas de iones, junto con fuentes de vitaminas para producir rendimientos óptimos.

3) Formulación y optimización del medio de producción

A nivel nacional existe una alta demanda de *S. cerevisiae* por sus diferentes usos en: la industria panadera, la producción de bebidas alcohólicas y como fuente de proteína unicelular, entre otros. Esta condición le otorga un interés económico a este trabajo ya que existe un vacío en la producción nacional de biomasa de *S. cerevisiae*, a lo que se suma una alta demanda de este microorganismo.

Para lograr obtener un medio de producción donde el crecimiento de *S. cerevisiae* dependiese de la fuente de carbono y energía y no de otros elementos, fue necesario dar una serie de pasos. El primero de ellos fue determinar que el cultivo no se encontraba limitado por la fuente de carbono y energía presente en el medio basal de melaza. Un segundo paso fue identificar a aquellos compuestos que limitan al proceso y que pueden o no estar presentes en el medio basal. Por último, un tercer paso que consistió en determinar las concentraciones necesarias de los

compuestos limitantes del proceso, para así suplementar al medio basal y obtener concentraciones máximas de biomasa de *S. cerevisiae*.

El proceso de optimización fue iniciado al instalar un cultivo utilizando un medio basal de melaza como fuente de todos los sustratos requeridos por *S. cerevisiae*. Para esto se utilizó un biorreactor NewBrunswick BioFlo C30 operado inicialmente bajo condiciones de *batch*, con el propósito de determinar los parámetros cinéticos μ_{\max} y tiempo generacional (t_g) empleando un medio basal de melaza con una concentración de azúcares de 3,73 g/L. En la Figura 8, se muestra la correspondiente curva de crecimiento. Con los datos obtenidos durante la fase exponencial se realizó la regresión lineal del ln de la concentración de biomasa contra el tiempo, lo que permitió calcular la velocidad específica de crecimiento máximo (μ_{\max}), con un valor de 0,33 h⁻¹, lo que a su vez hizo posible el cálculo del tiempo generacional $t_g=2,08$ h.

Una vez alcanzada la fase estacionaria, el biorreactor pasó a ser operado bajo condiciones de cultivo continuo, con un flujo de medio entrante de 0,9 mL/min, para proporcionar una tasa de dilución de 0,14 h⁻¹; la temperatura fue ajustada a 30 °C.

El tiempo de retención del cultivo bajo estas condiciones fue de 7,35 horas, requiriéndose 29,44 h para que el cultivo llegase a estado estacionario. Una vez alcanzado este estado, se determinaron las concentraciones de azúcares, biomasa seca y el porcentaje de Oxígeno disuelto en el biorreactor, utilizando para esto los protocolos correspondientes. Estos valores pasaron a conformar las condiciones iniciales del proceso de optimización, donde las concentraciones de azúcares y biomasa seca medidas en estado estacionario fueron 2,07 g/L y 0,44 g/L respectivamente.

Independientemente del valor de la concentración de sustrato carbonado en el reservorio y si éste hubiese estado en condiciones limitantes, al estar el sistema operado a una tasa de dilución de $0,14 \text{ h}^{-1}$, que corresponde alrededor del 50% de la μ_{\max} , debería esperarse que la concentración de sustrato en el biorreactor fuese cercana al K_s , con un valor para *S. cerevisiae* cercano a $0,025 \text{ g/L}$ creciendo a expensas de glucosa (3). Haciendo el cálculo con más precisión se tiene que la concentración de sustrato limitante en el biorreactor en estado estacionario viene dada por:

$$\tilde{S} = K_s \frac{D}{\mu_{\max} - D}$$

Considerando los valores de $K_s=0,025 \text{ g/L}$; $D=0,14 \text{ h}^{-1}$ y $\mu_{\max}=0,33 \text{ h}^{-1}$, se esperaba una concentración de $0,018 \text{ g/L}$ de azúcares, en el supuesto de que la fuente de Carbono estuviese en condiciones limitantes. Sin embargo, la concentración de sustrato en el biorreactor medida en estado estacionario fue $2,07 \text{ g/L}$, 71,38 veces superior al valor esperado, lo que indica que en el medio basal ensayado, el sustrato carbonado estaba en condiciones saturantes.

Los compuestos utilizados en este estudio para la optimización del medio de cultivo fueron: sulfato de amonio, fosfato dibásico de potasio, extracto de levadura y cloruro de magnesio hexahidratado. Como referencia de las concentraciones requeridas en cada caso, se utilizó la composición del medio Sartorius (21). En cada caso, el sustrato limitante a ser agregado en el reservorio era preparado en el medio basal de melaza para evitar diluir la concentración de azúcares. Luego de cada incremento en la concentración de alguno de los sustratos, se determinaron las concentraciones de azúcares presentes en el reservorio utilizando el protocolo descrito en el apartado 6.2, a fin de conocer la concentración real de azúcares.

Es importante resaltar que al ser el medio basal una dilución de la melaza, las concentraciones de todos sus constituyentes deben mantener la misma proporción

independientemente del factor de dilución; lo que significa que, si la fuente de carbono y energía está presente en condiciones saturantes, entonces algún otro constituyente necesario para el crecimiento (fuentes de Nitrógeno, Fósforo, Magnesio, Potasio, entre otros) debe estar en condiciones limitantes. Partiendo de esta premisa se procedió a optimizar el medio de cultivo basal de melaza mediante el agregado secuencial de sales de los elementos antes señalados. Para ello, se cultivó *S cerevisiae* bajo flujo continuo en medio basal, en las condiciones descritas arriba. Una vez alcanzado el estado estacionario se comenzó a suplementar el medio en el reservorio, teniendo en cuenta que el agregado de cada sal podía conducir a dos tipos de respuestas alternativas por parte del cultivo:

Respuesta 1

Si el elemento agregado estaba presente en condiciones limitantes en el medio basal, entonces el incremento en su concentración en el reservorio debía conducir a un incremento proporcional en la concentración de biomasa en estado estacionario, de acuerdo con la ecuación:

$$\hat{X} = Y_{x/s}(S_r - \hat{S})$$

Paralelamente la concentración del elemento en el biorreactor debía permanecer inalterada, ya que ésta no depende la concentración en el reservorio sino de la tasa de dilución, de acuerdo con la ecuación:

$$\hat{S} = K_s \frac{D}{\mu_{\max} - D}$$

Respuesta 2

Si el elemento agregado estaba presente en condiciones saturantes en el medio basal, entonces de acuerdo con las dos ecuaciones anteriores debía esperarse que la concentración de biomasa permaneciera inalterada, mientras que la concentración del elemento en el biorreactor debía aumentar en la misma magnitud en que fue incrementada en el reservorio, ya que al estar en condiciones saturantes no habría consumo por parte de la levadura.

El primer sustrato ensayado fue la fuente de Nitrógeno, suministrándose en este caso sulfato de amonio para lograr una concentración en el reservorio de 0,25 g/L. Una vez alcanzado el estado estacionario, se observó que la concentración biomasa incrementó hasta el valor de 0,73 g/L, mientras que la concentración de azúcares disminuyó hasta 1,78 g/L (Tabla 5, renglón 2).

Este resultado concuerda con lo indicado por la ecuación que describe la concentración de biomasa en estado estacionario (\hat{X}). \hat{X} aumentó al incrementar la concentración del sustrato limitante en el reservorio (S_{Nr}). Este incremento en la concentración de biomasa, causó un aumento en el consumo de azúcares por lo que su concentración disminuyó. Con base en este análisis, se concluyó que el cultivo estaba limitado por Nitrógeno. La concentración de este elemento en el estado estacionario en el biorreactor (\widehat{S}_N) se mantuvo constante tanto en el medio basal como en el suplementado con sulfato de amonio por dos razones:

- Por encontrarse el Nitrógeno en condición limitante, todo el Nitrógeno presente en el medio era consumido por la levadura.
- De la ecuación 1 se deduce que \widehat{S}_N debe permanecer constante ya que, su valor no depende de la S_{Nr} sino de la tasa de dilución, la cual permaneció constante a lo largo del experimento.

Seguidamente se incrementó la concentración de sulfato de amonio a 0,27 g/L. Con este incremento no se observó respuesta por parte del cultivo, ya que la concentración de biomasa y azúcares en el biorreactor se mantuvo constante, indicando que el Nitrógeno se hizo saturante y que el cultivo pasó a estar limitado por otro sustrato. Este análisis fue repetido durante todo el proceso de optimización para determinar si un sustrato era o no limitante y determinar cuándo había pasado a estar en concentraciones saturantes.

El segundo sustrato ensayado fue la fuente de Fósforo y Potasio, mediante la suplementación del medio en el reservorio con fosfato dibásico de potasio a una concentración de 0,23 g/L. Al realizar este incremento, aumentó la concentración de biomasa y en consecuencia el cultivo pasó a estar limitado por Oxígeno. Esta respuesta indicó que el crecimiento de *S. cerevisiae* estaba limitado por Fósforo o Potasio y que la demanda de Oxígeno del cultivo había superado la capacidad del equipo para suministrárselo. Por esta razón se decidió comenzar un nuevo cultivo continuo con una concentración de azúcares en el reservorio de 1,87 g/L, ajustando las concentraciones de sales a 0,13 g/L de sulfato de amonio y 0,12 g/L de fosfato dibásico de potasio para garantizar que la concentración de biomasa en estado estacionario no fuese tan elevada y por consiguiente el cultivo no se limitara por Oxígeno. En este nuevo cultivo se mantuvo la tasa de dilución a $0,14 \text{ h}^{-1}$.

Una vez alcanzado el estado estacionario se determinó que el porcentaje de azúcares no consumidos había disminuido de 47,3% a 41,71 %. La concentración de azúcares y biomasa determinada fue de: 0,78 g/L y 0,63 g/L respectivamente (Tabla 5, renglón 3). Los valores porcentuales de los azúcares no consumidos fueron un indicativo claro del aumento en el consumo de azúcares, permitiendo visualizar de manera rápida el avance del proceso de optimización, sin importar las variaciones en las concentraciones de los azúcares presentes en el reservorio.

Empleando los mismos análisis realizados anteriormente para \hat{X} y \hat{S} se concluyó que el cultivo bajo esta última condición estaba limitado en Fósforo o Potasio. Por esta razón se decidió incrementar nuevamente la concentración de fosfato dibásico de potasio, pero no se obtuvo respuesta por parte del cultivo, concluyéndose que algún otro sustrato lo limitó.

Seguidamente se decidió ajustar las concentraciones sulfato de amonio junto con fosfato dibásico de potasio a 0,27 g/L y 0,25 g/L respectivamente. Bajo estas condiciones las concentraciones de biomasa y azúcares en el biorreactor en estado estacionario fueron 1,1 g/L y 0,4 g/L respectivamente. Esto permitió concluir que el cultivo se había limitado en Nitrógeno, pero el agregado de sulfato de amonio conjuntamente con la sal de Fósforo, no solo permitió superar esta limitación, sino que evitó la aparición de nuevas restricciones en Fósforo o Potasio (Tabla 5, renglón 4)

Incrementos posteriores en la concentración de sulfato de amonio no tuvieron efecto sobre las concentraciones de biomasa y azúcares. Mientras que el incremento en la concentración de fosfato dibásico de potasio, generaron disminución en las concentraciones de biomasa e incremento en la concentración de azúcares, producto de un efecto tóxico de este sobre el cultivo. Se concluyó que el cultivo ya estaba saturado en fuentes de Nitrógeno y Fósforo o Potasio, por lo que se decidió suplementar al medio con fuentes de Magnesio.

Para ello, se agregó cloruro de Magnesio hexahidratado en el reservorio para una concentración de 0,075 g/L. La concentración de azúcares presentes en el reservorio fue de 1,87 g/L. Al alcanzarse el estado estacionario se registró una caída en la concentración de azúcares hasta 0,2 g/L y un incremento en la concentración de biomasa hasta 1,07 g/L. En la Tabla 5, renglón 5

se muestra que el porcentaje de azúcares no consumidos disminuyó en un 6,6 % pasando de 17,3 % a 10,7%. Con estos resultados se concluyó que el cultivo estaba limitado en Magnesio.

Incrementos posteriores en las concentraciones de las fuentes de Nitrógeno, Fósforo, Potasio y Magnesio no generaron respuestas por parte del cultivo. Por esta razón se decidió aumentar la concentración de las vitaminas en el medio utilizando para esto extracto de levadura. La concentración de extracto de levadura en el reservorio fue ajustada a 4,5 mg/L y una vez alcanzado el estado estacionario se determinó que la biomasa aumentó a 1,12 g/L y una concentración de azúcares se redujo a 0,18 g/L. Este incremento en el consumo de la fuente de carbono, se reflejó en una disminución del porcentaje de azúcares no consumidos de 10,7 % a 9 % (Tabla 5, renglón 6).

Posteriormente, se incrementó la concentración de extracto de levaduras, sin obtenerse un incremento en la concentración de biomasa o una caída en la concentración de la fuente de carbono. Por lo que se decidió probar con las sales anteriormente utilizada, para determinar si el cultivo había quedado limitado nuevamente por alguna de ellas. Ya que no se obtuvo ningún efecto con el suministro de mayores concentraciones de sales y extracto de levadura, se concluyó que el medio estaba optimizado.

Tabla 5. Concentraciones de los diferentes sustratos presentes en cada etapa del proceso de optimización, incluido las concentraciones de biomasa y rendimientos alcanzados.

Azúcares reservorio (g/L)	Azúcares biorreactor (g/L)	Azúcares no consumidos (%)	X _s (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	K ₂ HPO ₄ (g/L)	MgCl ₂ *6H ₂ O (g/L)	Extracto Levadura (mg/L)	Y _{x/s}
3,73	2,07	55,5	0,44	0	0	0	0	0,265
3,70	1,78	47,3	0,73	0,25	0	0	0	0,380
1,87	0,78	41,71	0,63	0,13	0,12	0	0	0,578
2,3	0,40	17,3	1.1	0,27	0,25	0	0	0,555

1,87	0,2	10,7	1,07	0,27	0,25	0,075	0	0,5
2	0,18	9	1,12	0,27	0,35	0,075	4,5	0,615

Al incrementar las concentraciones de los sustratos limitantes del cultivo, el rendimiento en biomasa fue aumentando desde 0,265 en el medio basal hasta 0,615 en el medio optimizado, los valores de rendimiento para cada paso del proceso de optimización se muestran en la Tabla 5. La ecuación para el rendimiento:

$$Y_{x/s} = \frac{(X_f - X_o)}{-(S_f - S_o)}$$

indica que cualquier incremento en el consumo de los azúcares traería como consecuencia un aumento proporcional en la concentración de biomasa, por lo que el rendimiento se debería mantener constante. Durante el crecimiento microbiano se generan diferentes productos metabólicos y biomasa. Al optimizar un medio de cultivo con fines de producción de *S. cerevisiae*, se buscan favorecer aquellas condiciones que permitan maximizar la cantidad de biomasa generada minimizando la formación de productos metabólicos extracelulares. Por esta razón el rendimiento fue aumentando al irse favoreciendo la formación de biomasa durante el proceso de optimización del medio de cultivo.

En la Tabla 6, se muestran las concentraciones requeridas de sales y extracto de levadura por cada litro de medio de optimizado a una concentración de 1 g/L en melaza. También se muestra la concentración de azúcares que poseerá el medio y la concentración de biomasa que podría obtenerse.

Tabla 6. Concentraciones de sustratos y biomasa esperada en el medio optimizado.

Melaza (g/L)	Azúcares (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	K ₂ HPO ₄ (g/L)	MgCl ₂ *6H ₂ O (g/L)	Extracto Levadura (mg/L)	Xs (g/L)
1	0,4	0,054	0,05	0,015	0,9	0,224

Ya que *S. cerevisiae* es un microorganismo de alta demanda a nivel comercial, se han realizado múltiples estudios relacionados con la formulación de medios a base de diferentes fuentes de carbono. La Tabla 7 muestra los rendimientos reportados en la bibliografía y determinados en este trabajo para diferentes medios de producción.

Tabla 7. Rendimientos obtenidos en diferentes medios de cultivo.

MM0(DG)	MO (DG)	MAM(M)	P(MG)	G(MG)
0,265	0,7298	0,444	0,311	0,308

MM0(DG): medio melaza basal Dorta-Guía; MO(DG): medio optimizado Dorta-Guía; MAM(M): medio melaza con agua de maceración de maíz Martín; P(MG): cola negra Matute-Galindo; G(MG): bebida isotónica Matute-Galindo.

De la tabla anterior se puede destacar que los medios formulados a base de productos de descarte de industrias de bebidas no alcohólicas (14), presentaron rendimientos similares a los obtenidos en medios a base de melaza sin suplementos de sales. Aquí resulta evidente que el uso de la melaza suplementada con sales representa una muy buena fuente de sustratos asimilables por la levadura, obteniéndose los mayores rendimientos.

4) Parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en el medio formulado y optimizado

Si bien el medio que se optimizó posee la misma fuente de carbono y energía que el medio basal de melaza, a este se le agregó una serie de sales y extracto de levaduras que modifican las proporciones originales de iones y vitaminas presentes en el medio basal. Esto trajo como consecuencia que los parámetros cinéticos determinados al inicio de este estudio sufrieran alteraciones, debido a las nuevas condiciones presentes en el medio optimizado. Por esta razón, estos parámetros fueron determinados nuevamente y se los comparó con los iniciales.

Para determinar los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* en el medio se desarrolló un cultivo en un biorreactor NewBrunswick BioFlo III operado por lote (*batch*) a una concentración de azúcares de 4,42 g/L. Para ello se emplearon las curvas de calibración de la biomasa y sacarosa mostradas arriba. En la Figura 9, se muestra la curva de crecimiento construida.

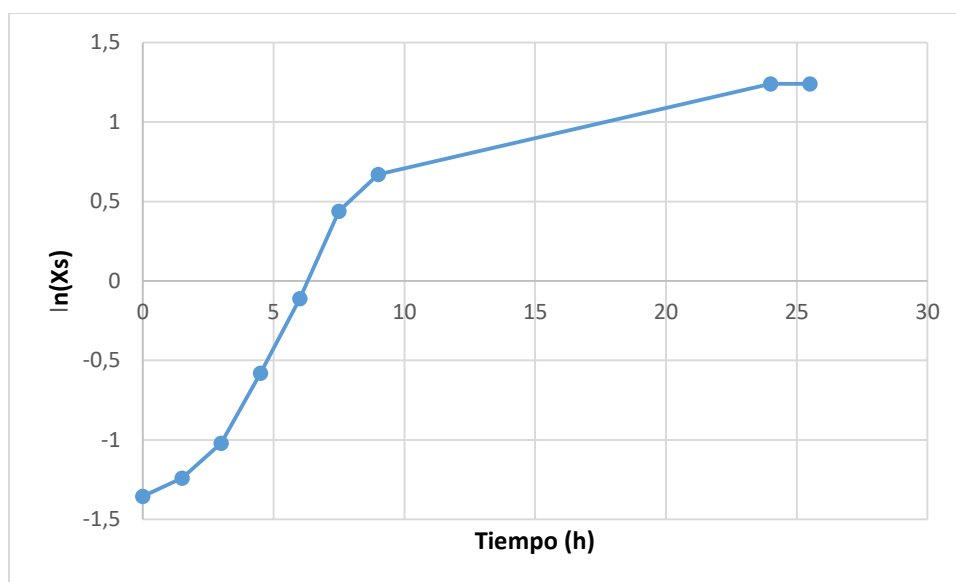


Figura 9. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* en el medio optimizado

En la Tabla 8, se muestran los valores de velocidades específicas de crecimiento máximo, tiempos generacionales y rendimientos determinados tanto en el medio basal como en el medio optimizado.

Tabla 8. Variaciones en los parámetros cinéticos de un cultivo de *S. cerevisiae* en el medio basal y el medio optimizado.

	Medio basal	Medio optimizado
μ_{\max} (h^{-1})	0,33	0,32
t_g (h)	2,08	2,16
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,265	0,73

Al utilizar el biorreactor BioFlo III se logró obtener un mayor rendimiento en biomasa. Esto se debió a este biorreactor, a diferencia del BioFlo C30 posee una mayor capacidad para suministrar Oxígeno desde las burbujas de aire al medio de cultivo, garantizando que la velocidad de transferencia de Oxígeno superaba a la velocidad de consumo por parte de la levadura. Bajo estas condiciones se obtuvo un aumento en la concentración de biomasa a 3,22 g/L y una disminución de la concentración de azúcares no consumidos a 0,048 g/L.

5) Medidas de variables de procesos

La velocidad a la que un cultivo consume el oxígeno disponible en el medio, determinará la velocidad a la cual este deberá ser transferido (8). Tal como se mencionó en el apartado 3, la disponibilidad de oxígeno disuelto en el medio fue un factor crucial en el proceso de producción de biomasa al igual que las concentraciones apropiadas de sustratos limitantes en el medio. Por esta razón resultó importante medir las variables del proceso que están asociadas con la transferencia de Oxígeno desde la fase gaseosa a la fase líquida. Estas variables son el coeficiente volumétrico de transferencia (k_La) y la velocidad de suministro de Oxígeno (N_a). Al medir estas variables de proceso se puede estimar la concentración máximas de biomasa (X_{\max}) que el biorreactor BioFlo

III puede tolerar, operado bajo las condiciones de operación anteriormente mencionadas. Además, durante este proceso se determinaron la velocidad de consumo de Oxígeno disuelto (Q_{O_2}) y la respectiva velocidad específica de consumo (q_{O_2}).

Las mediciones de las variables de proceso y las velocidades de consumo de oxígeno de un cultivo de *S. cerevisiae* fueron realizadas utilizando el método dinámico de medición (8). Este método consistió en graficar las variaciones del porcentaje de oxígeno disuelto en el tiempo, en un medio que contenía un cultivo de *S. cerevisiae* en fase exponencial de crecimiento. Luego conociendo la solubilidad máxima del oxígeno en el medio optimizado, se calcularon las respectivas concentraciones en términos de mg_o/L .

Como primer paso en éste proceso, se determinó la solubilidad máxima del oxígeno en el medio de cultivo optimizado. Para ello se tomó como referencia, la solubilidad del Oxígeno en agua destilada a las mismas condiciones de presión y temperatura. Estas medidas fueron realizadas en un biorreactor NewBrunswick BioFlo C30 operado bajo condiciones de cultivo continuo, provisto de un electrodo de Oxígeno disuelto acoplado a un analizador-registrador. Inicialmente el tanque del biorreactor fue llenado con agua destilada, mientras que el reservorio contenía el medio optimizado y la temperatura fue ajustada a 30 °C.

Con el agua presente en el biorreactor, se calibró un electrodo de Oxígeno tal como se describe en el protocolo 6.3. Seguidamente se permitió el paso de medio proveniente del reservorio con un flujo de 2 mL/min para un tiempo de retención de 3,17 horas. Esta condición se mantuvo durante toda la noche para asegurar un recambio completo de la solución presente en el biorreactor y que el electrodo de oxígeno se estabilizara. Se midió el porcentaje de Oxígeno disuelto, cuyo

valor era del 80 % con respecto al agua, tomando como referencia 10 mg/L, por lo que la concentración máxima del Oxígeno en el medio optimizado obtenida fue de:

$$C^*_{AL} = 8 \frac{mg}{L}$$

Una vez obtenido el valor de la solubilidad máxima del Oxígeno en el medio optimizado, se desarrolló un cultivo de *S. cerevisiae* en un biorreactor NewBrunswick BioFlo III operado por lotes, bajo las condiciones descritas en el protocolo 6 y con una concentración de azúcares de 4,42 g/L. Además, este equipo contaba con un electrodo de oxígeno acoplado a un analizador-registrador. Se monitoreó el avance del cultivo, determinando las concentraciones de biomasa cada 2,3 horas siguiendo el protocolo descrito en el protocolo 6.1. A las 7 horas de iniciado el cultivo el porcentaje de Oxígeno disuelto fue 92%. A partir de ese momento se cerró la entrada de aire al biorreactor durante 5,5 minutos, lo que trajo como consecuencia una caída lineal en la concentración de Oxígeno disuelto hasta alcanzar el valor de 76 % (Figura 10), como consecuencia, su consumo por parte de la levadura, siendo la velocidad de suministro igual a cero. Seguidamente se permitió el paso de aire lo que causó un incremento paulatino en el porcentaje de Oxígeno disuelto, ya que en esta fase opera tanto el suministro como el consumo por parte de la levadura. Transcurridos 8,73 minutos de haber iniciado este experimento el sistema alcanzo un estado estacionario, en el cual la velocidad de consumo se igualó a la velocidad de suministro de Oxígeno y se registró un valor porcentual constante de Oxígeno disuelto.

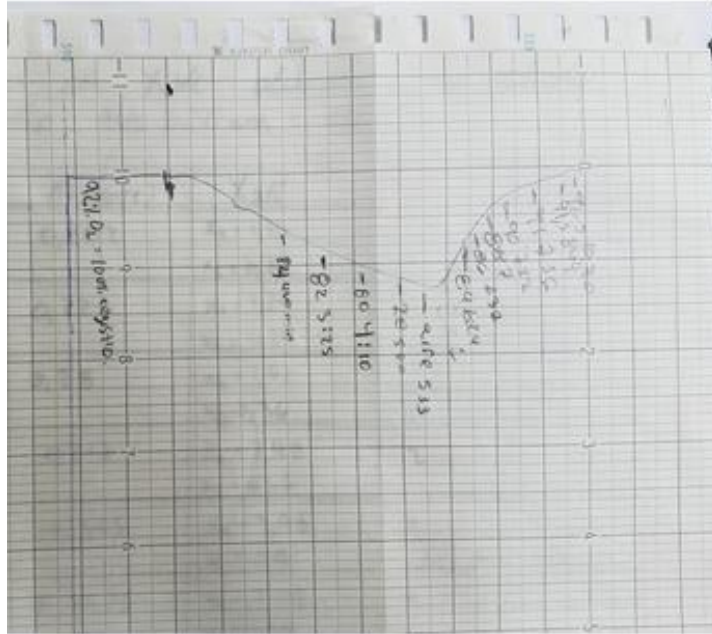


Figura 10. Registro de las concentraciones de Oxígeno disuelto durante la aplicación del método dinámico empleado para la estimación de la velocidad específica de consumo de Oxígeno y el coeficiente volumétrico de transferencia.

En la Tabla 9 se muestran los valores porcentuales y las respectivas concentraciones de Oxígeno, así como la concentración de biomasa obtenida una vez alcanzado el estado estacionario. Para determinar la velocidad de consumo de Oxígeno, se seleccionaron las concentraciones correspondientes a la fase de caída luego del cierre del suministro de aire y para determinar el coeficiente volumétrico de transferencia de Oxígeno se seleccionaron las concentraciones correspondientes a la fase de incremento luego de la apertura del suministro de aire.

De la Tabla 9 se seleccionaron las concentraciones de Oxígeno disuelto a los $t_1 = 2,5$ min y $t_2 = 3,42$ min para determinar la velocidad de consumo de Oxígeno (Q_{O_2}), los porcentajes de Oxígeno disuelto fueron transformados a concentraciones en mg/L.

Tabla 9. Valores correspondientes a los porcentajes de Oxígeno disuelto durante la aplicación del método dinámico a un cultivo de *S. cerevisiae* creciendo en el medio optimizado.

Condiciones	Concentraciones (mgO ₂ /L)	[X _s] (g/L)
-------------	---------------------------------------	-------------------------

Tiempo (min)	Sin aireación (%O)	Con aireación (%O)	Sin aireación	Con aireación	
0	92	-----	7,36	-----	
2,5	84	-----	6,72	-----	
3,42	82	-----	6,56	-----	
5,55	76	-----	6,08	-----	
6,4	-----	84	-----	6,72	0,9
6,62	-----	86	-----	6,88	
7,37	-----	90	-----	7,2	
8,73	-----	91	-----	7,28	
10,5	-----	91	-----	7,28	

Para determinar este parámetro del cultivo, se aplicó la siguiente ecuación:

$$Q_{O_2} = \frac{-(C_{AL2} - C_{AL1})}{t_2 - t_1} \quad (7)$$

Donde C_{AL2} y C_{AL1} corresponden a las concentraciones de Oxígeno disuelto en el medio en los tiempos t_2 y t_1 , siendo sus valores $C_{AL1} = 6,72$ mgO/L y $C_{AL2} = 6,56$ mgO/L. De este modo al sustituir los valores, se obtuvo que la velocidad de consumo de Oxígeno era de:

$$Q_O = 10,43 \frac{mg_O}{Lh}$$

La velocidad de consumo de Oxígeno, es un parámetro cinético que depende de la concentración de biomasa del cultivo al momento de su medición. Por esta razón, se la dividió entre la concentración de biomasa seca determinada, a fin de obtener la velocidad específica de consumo de Oxígeno del cultivo (q_{O_2}):

$$q_o = 11,59 \frac{mg_o}{g_x h}$$

Para calcular el coeficiente volumétrico de transferencia de Oxígeno, se aplicó la siguiente ecuación:

$$k_L a = \frac{\ln\left(\frac{\overline{C_{AL}} - C_{AL1}}{C_{AL} - C_{AL2}}\right)}{t_2 - t_1} \quad (8)$$

En donde $\overline{C_{AL}}$ corresponde a la concentración de Oxígeno en el estado estacionario, siendo esta de 7,28 mgO₂/L. C_{AL2} y C_{AL1} corresponden a las concentraciones de Oxígeno disuelto en el medio en los tiempos t_2 y t_1 respectivamente. Para este cálculo se seleccionaron los tiempos $t_1= 6,4$ min y $t_2= 6,62$ min, con valores de $C_{AL1}= 6,72$ mgO/L y $C_{AL2}=6,88$ mgO/L. Sustituyendo los valores en la ecuación anterior, tenemos que:

$$k_L a = 91,7652 h^{-1}$$

Para determinar la velocidad de suministro, se utilizó la siguiente ecuación:

$$N_a = k_L a (C^*_{AL} - \overline{C_{AL}}) \quad (9)$$

y al sustituir los valores, se obtuvo:

$$N_A = 74,56 \frac{mg_o}{Lh}$$

Para determinar la biomasa máxima que el equipo puede mantener en condiciones aerobias, se planteó un estado estacionario, en el cual la velocidad de consumo se iguala a la velocidad de suministro y la concentración de Oxígeno en estado estacionario es cero, ya que todo el Oxígeno

disponible en el medio sería consumido por la biomasa presente. De este modo la siguiente ecuación plantea como calcular esta concentración de biomasa seca.

$$X_{max} = \frac{k_L a \times C^*_{AL}}{q_{O_2}}$$

Sustituyendo los valores correspondientes, el valor de biomasa máximo fue de:

$$X_{max} = 63,341 \frac{g_x}{L}$$

En cultivos discontinuos la demanda de Oxígeno varía en función de la fase en la que se encuentra el cultivo, teniéndose que la velocidad específica de consumo de Oxígeno será máxima en los primeros instantes del cultivo (8). Este parámetro dependerá del estado metabólico de las células y del sustrato fermentable disponible en el medio, siendo mayor la demanda de Oxígeno al utilizar glucosa que al utilizar sacarosa. Al encontrarse el cultivo bajo condiciones en las cuales la concentración de Oxígeno disuelto es saturante, la velocidad específica de consumo de Oxígeno será independiente de su concentración y alcanzará un valor constante y máximo. Pero, bajo condiciones en las cuales la concentración de Oxígeno es menor a un valor crítico, la velocidad específica de consumo dependerá de su concentración. Si se compararan los valores de la velocidad de consumo con la velocidad de suministro de Oxígeno, resulta evidente que el suministro de Oxígeno fue mayor que el consumo, por lo tanto, bajo estas condiciones de trabajo la concentración de Oxígeno disuelto en el medio no llegó a valores menores al valor crítico y la velocidad específica de consumo fue constante y máxima.

Tanto el coeficiente volumétrico de transferencia de Oxígeno como la velocidad de suministro son variables que dependen de las condiciones a las cuales se ajuste el biorreactor, siendo estos afectados por la velocidad de agitación, la velocidad de suministro de aire, las

dimensiones de las burbujas, la turbulencia generada en el medio, entre otros. Por esta razón las variables de proceso solo serán reproducibles si se replican las mismas condiciones del sistema. Del mismo modo ocurrirá con la biomasa máxima por su relación directa con estas variables.

El coeficiente volumétrico de transferencia de Oxígeno (k_La) relaciona dos parámetros en primer lugar, al coeficiente de transferencia de materia de la fase líquida (k_L) y el área de contacto entre las burbujas de aire y el medio presente en el biorreactor (a). k_L indica a qué velocidad se transfiere el Oxígeno a la fase líquida, mientras que a indica la superficie o área de contacto total entre la fase gaseosa y la líquida por volumen de medio presente en el biorreactor. Mientras mayor sea la superficie total de contacto, mayor será la velocidad de transferencia de oxígeno. Por lo tanto, el coeficiente volumétrico de transferencia de Oxígeno aumentará al disminuir el tamaño de las burbujas en el medio, dado que aumenta el área de contacto entre las dos fases.

Bajo condiciones de temperatura y presión constantes en un biorreactor la solubilidad del Oxígeno en el medio se mantendrá inalterada mientras no varíe su composición. Por tal razón, el k_La se ve afectado también por la solubilidad del Oxígeno en una solución. Pero, bajo condiciones de presión y temperatura constantes, su valor se verá afectado en mayor medida por el área de contacto entre la fase líquida y la gaseosa. Utilizando estos principios, se decidió verificar si el valor de solubilidad máxima del Oxígeno determinado era correcto. De serlo, el k_La determinado utilizando los valores porcentuales o las concentraciones debería ser el mismo.

La aseveración anterior se fundamenta en que: al analizar la ecuación 8 el valor de k_La sólo variará si cambia el valor del \ln , siendo este dependiente del valor de la resta entre $\overline{C_{AL}}$ y C_{AL1} y C_{AL2} . Por lo que, si estas diferencias se mantienen constantes, \ln tendrá el mismo valor al calcularlo utilizando valores porcentuales o concentraciones.

El valor de k_{LA} determinado utilizando los porcentajes y las concentraciones de Oxígeno disuelto fue el mismo, por lo que se concluyó que la metodología implementada para la determinación de la solubilidad máxima del Oxígeno en el medio era correcta.

Si bien el sistema puede tolerar una biomasa seca máxima de 63,34 g_x/L, al utilizar medios cuya concentración de glucosa sea superior a 9 g/L, el medio tendrá un efecto inhibitorio de la formación de biomasa de levadura conocido como efecto Crabtree (2). Este consiste en que bajo condiciones en las cuales se tiene un alto contenido de azúcares, *S. cerevisiae* destinará la mayor parte de los carbonos consumidos, a la producción de etanol y no de biomasa. Si se realiza una gráfica donde se coloca en el eje las abscisas el tiempo de desarrollo del cultivo y en el eje de las ordenadas las velocidades específicas de consumo de Oxígeno (q_o) y de consumo de sacarosa (q_s), los valores máximos de ambas velocidades son alcanzadas a diferentes tiempos del cultivo. Esto trae como consecuencia que $q_{o\max}$ es insuficiente para oxidar por completo la sacarosa que está siendo consumida del medio cuando se alcanza $q_{s\max}$ (13).

Se define como q_{scri} , a la velocidad de consumo de glucosa a la cual q_o alcanza su valor máximo. Este valor corresponde a 1/7 de $q_{s\max}$, al superarse este valor crítico de consumo de sustrato carbonado, la etapa oxidativa del metabolismo, se satura y para regenerar el exceso de NADH y FADH₂ que no puede ser restituido en la cadena respiratoria, parte del piruvato producido en la glucólisis es reducido a etanol, dándose lugar a la ruta fermentativa del metabolismo. Mediante este proceso se tiene un menor rendimiento ATP/glucosa que en el proceso respiratorio, por lo que se tendrá una menor producción de biomasa del consumo de glucosa (13).

Debido a esto, si se desean obtener altas concentraciones de biomasa en un medio se deberán utilizar sistemas de cultivos que permitan evitar este efecto. Un sistema de cultivo

comúnmente utilizado para esto son los cultivos por lotes alimentados o *fedbatch* por su nombre en inglés.

6) Cultivo por lotes alimentado (*fedbatch*)

Los cultivos por lotes alimentados o *fedbatch* son herramientas muy útiles en bioprocesos por permitir trabajar con altas concentraciones de sustrato y obtener altas concentraciones de biomasa. En el presente estudio se utilizó este sistema de cultivo en un biorreactor NewBrunswick BioFlo III, operado bajo las condiciones descritas en el protocolo 6.

El cultivo se inició con un *batch* utilizando el medio optimizado a una concentración de azúcares de 4,4 g/L y con un volumen de medio de 2,8 L. Para diseñar la fase de alimentación se tomó como referencia la concentración de biomasa obtenida en el *batch* previo, con un valor de 3,21 g/L y se fijó la concentración de biomasa final, luego de la alimentación, en 13 g/L.

Se determinó la concentración de azúcares en el reservorio y el flujo de alimentación que eran necesarios para obtener esta concentración de biomasa fijada. La alimentación fue realizada con un volumen de medio de 0,4 L y se fijó el valor de la velocidad específica de crecimiento en $0,15 \text{ h}^{-1}$.

Para determinar la concentración de sustrato se aplicó la ecuación 6. Los valores de concentraciones, volúmenes y rendimientos utilizados fueron los siguientes: $X_f = 13 \text{ g/L}$, $X_o = 3,21 \text{ g/L}$, $V_f = 3,2 \text{ L}$, $V_o = 2,8 \text{ L}$ y $Y_{x/s} = 0,7298$. Al sustituir estos valores, se obtuvo que la concentración de azúcares necesaria era de:

$$S_r = 109 \text{ g/L}$$

Para determinar el flujo de medio entrante se aplicó la ecuación 5, obteniéndose el valor de:

$$f = 0,31 \text{ mL/min}$$

En la Tabla 10, se muestran las concentraciones de azúcares, sales y volúmenes de medios utilizados para este proceso.

Tabla 10. Concentraciones de sustratos y volúmenes de medios utilizados en el cultivo.

	Azucres (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	K ₂ HPO ₄ (g/L)	MgCl ₂ *6H ₂ O (g/L)	E. Levadura (g/L)	Vol. Medio (L)
batch	4,4	0,64	0,5	0,14	9x10 ⁻³	2,8
Alimentación	109	17,44	13,63	3,82	0,25	0,4

Con el flujo utilizado se requirieron 22 horas para completar la alimentación del cultivo. Luego de transcurrido este tiempo, se determinó que la concentración de biomasa presente en el cultivo era de 13 g/L, lográndose así obtener la biomasa esperada durante el desarrollo del proceso.

Si bien el proceso fue diseñado para obtener una concentración de biomasa de 13 g/L, es evidente que de acuerdo con el valor de k_{LA} medido para el biorreactor empleado, se pudo haber trabajado fijando una concentración final de biomasa 4,9 veces superior. Sin embargo, de haber fijado esta condición, se hubiesen presentado problemas colaterales relacionados con la generación de espuma y la disipación del calor metabólico, que eran de difícil solución con el equipo utilizado.

7) Criterios de escalamiento del proceso

Por ser el medio optimizado y el sistema de cultivo utilizado, herramientas proyectadas a la producción a escala industrial, resulta importante darle continuidad a este trabajo, extrapolando los datos obtenidos a escala de laboratorio, a una escala de producción mayor. Estos datos pueden ser aplicados para llevar el proceso a la escala de interés, siempre que se mantengan constantes ciertos parámetros. Pasando estos a conformar los criterios de escalamiento del proceso.

El k_{La} de cada fermentador resulta un factor determinante en el proceso de producción de levadura. Por esta razón si se desea incrementar la escala de trabajo, se debe garantizar que el k_{La} del fermentador a ser utilizado debe ser igual o mayor al determinado para el biorreactor con el que trabajó. De esta manera se mantendrán los valores de N_a y X_{max} y el sistema será extrapolable a múltiples escalas.

A escala industrial no es común el uso de biorreactores que cuenten con sistemas de agitación propulsados mediante motores. En su lugar, la agitación del medio viene dada por el desplazamiento de las burbujas provenientes del aire que se les suministra. Estos biorreactores son conocidos como Airlift.

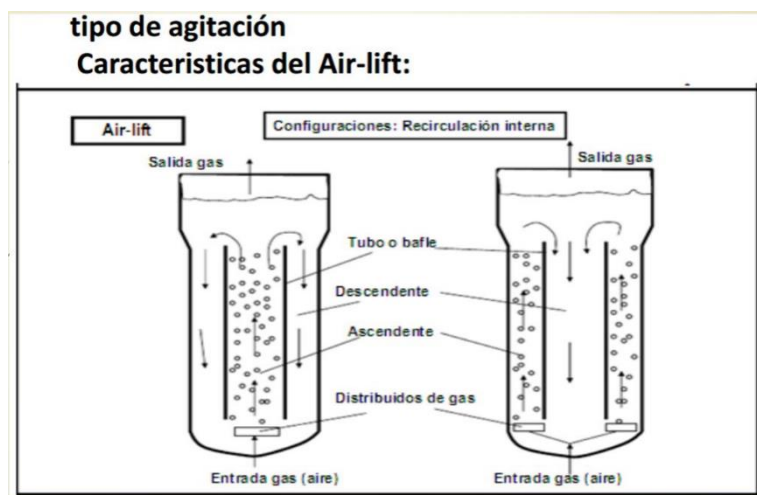


Figura 11. Modelos de biorreactores Airlift. Tomado de: <https://slideplayer.es/slide/11623917/>

Esto trae como consecuencia la necesidad de ajustar el tamaño de las burbujas mediante difusores y el agregado de diferentes elementos que permitan maximizar la transferencia de Oxígeno al medio y permitiendo la circulación del medio, evitando la formación de gradientes de concentración.

A escala industrial el uso de sales puras resulta demasiado costoso; por esta razón es común el uso de fertilizantes agrícolas como fuente de estas sales. Una vez conocidas las concentraciones de N, K, P, Mg que requiere *S. cerevisiae*, resulta posible calcular las cantidades de fertilizantes requerido por peso de melaza y de este modo poder formular un medio cuyo uso sea rentable a gran escala.

El sistema de cultivo por lotes alimentados, permite obtener altas concentraciones de biomasa, sin tener que utilizar medios cuyas concentraciones de azúcares iniciales causen inhibiciones tipo Crabtree. A continuación, se plantea el desarrollo de un proceso de producción de levadura, utilizando como medio cultivo un medio optimizado a base de melaza suplementado con fertilizantes.

En este proceso productivo entra en juego una relación tiempo/rendimientos/costos, es decir mientras menor sea la concentración de biomasa al momento de iniciar la alimentación, mayores serán los tiempos requeridos para completar los procesos. En este ensayo que se está proyectando, se fija una concentración de biomasa inicial de 20 g/L y una concentración final a 60 g/L. En este sentido, se plantea el uso de un biorreactor cuyo volumen inicial de medio sea de 300 L operado en *batch* y luego, se procederá a la alimentación con 50 L de medio concentrado.

La Tabla 11, muestra las concentraciones de azúcares en el *batch* ($[A]_0$) y en el medio de alimentación ($[A]_a$), las concentraciones de biomasa seca al inicio ($[X_s]_0$) y final de la alimentación

($[X_s]_f$) y el tiempo total de proceso (t_p) el cual se encuentra dividido en dos partes, el tiempo requerido para completar el *batch* inicial (t_b) y el tiempo de alimentación (t_a) en horas. Además, se muestra el flujo de alimentación.

Tabla 11. Concentraciones de biomasa, azúcares y tiempo de proceso de producción de *S. cerevisiae*.

$[A]_0$ (g/L)	$[X_s]_0$ (g/L)	$[A]_a$ (g/L)	$[X_s]_f$ (g/L)	t_p (h)	Flujo (L/h)
27,41	20	411,07	60	28	3,13

$$t_b = 12 \quad t_a = 16$$

Se requerirá 70 L de solución madre a 411 g/L de azúcares con sus correspondientes concentraciones de sales por proceso productivo. De esta se destinará 50 L para el medio de alimentación y 20 L para la preparación del medio de cultivo a utilizar en el *batch*, para lo cual se deberá completar con 280 L de agua a fin de obtener los 300 L requeridos para el *batch* inicial.

Comercialmente existen muchos fertilizantes que pueden suplir las necesidades de iones que se requieren para este proceso. Pero uno de los más rentables, que se produce en el país y que no posee restos de elementos que puedan causar inhibiciones, es el NPK. De este existen en Venezuela múltiples presentaciones, pero una de las más comunes es el NPK 15,15,15. Este cuenta con un 15% de nitrógeno, 15% de pentóxido de fósforo (P_2O_5) y un 15% de óxido de potasio (K_2O). La tabla 12 muestra los gramos (g) de nitrógeno, fósforo y potasio por kilogramo (kg) de NPK 15,15,15.

Tabla 12. Contenido en gramos de N, P y K por kilogramo de fertilizante NPK 15,15,15.

g de iones por kg de NPK	
N	150
P	65,52
K	124,52

Si bien con este no se suple las necesidades en magnesio, se deberá probar el rendimiento obtenido bajo estas condiciones, ya que las variantes del mismo que contienen magnesio son más difíciles de conseguir comercialmente y los fertilizantes que lo poseen en altas concentraciones son importados.

En la Tabla 13, se muestran los requerimientos en concentraciones de azúcares y sales, los kilogramos de melaza y sales puras, para preparar los 70 L de solución madre. Además se muestran los equivalentes en kilogramos de cada ion de interés presente en cada sal.

Tabla 13. Requerimientos de materia prima en base a el medio optimizado con sales puras.

	Concentraciones (g/L)	Melaza y sales (Kg)	Iones (kg)	
Azúcares	411	71,93	-----	
(NH₄)₂SO₄	59,74	4,18	0,88	
K₂HPO₄	46,35	3,24	K=1,45	P=0,575

Una vez conocidas las cantidades necesarias de cada ion, se puede determinar cuánto NPK será necesario para preparar la solución madre. La Tabla 14, muestra los requerimientos de melaza

y NPK necesarios por proceso de producción a 350 L y la Tabla 15, muestra los requerimientos de materia prima y biomasa a obtener a diferentes escalas.

Tabla 14. Requerimientos de materia prima por proceso de producción a escala de 350 L de volumen final.

Melaza (kg)	NPK (kg)
71,93	11,68

Tabla 15. Requerimientos para el escalamiento del proceso y kilogramos de biomasa a obtener en cada escala.

Vol. Trabajo (L)	Vol. Batch (L)	Vol. Alim. (L)	Vol. Sol. Madre (L)	Melaza (kg)	NPK (kg)	K_{La}	X_s (kg)
350	300	50	70	71,93	11,68	$\geq 91,77$	21
3.500	3.000	500	700	719,3	116,8	$\geq 91,77$	210
35.000	30.000	5000	7000	7193	1168	$\geq 91,77$	2100

Conclusiones

- Se determinó que la melaza contiene un 40 % p/p de azúcares, por lo que resultó una buena fuente de carbono y energía.
- Se determinó que los cultivos de *S. cerevisiae* en medios basales de melaza no estuvieron limitados por la fuente de carbono y energía, sino por las fuentes de Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Magnesio y vitaminas.
- La suplementación de los medios a base de melaza con sales de estos elementos condujo a la formulación de un medio balanceado, requiriéndose por cada gramo de melaza por litro de medio concentraciones de: 0,054 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,05 g/L de K_2HPO_4 ; 0,015 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,9 mg/L de extracto de levaduras.
- Los parámetros cinéticos del cultivo de *S. cerevisiae* en el medio optimizado fueron $\mu_{\text{Max}}=0,32 \text{ h}^{-1}$; $t_g= 2,16 \text{ h}$; $q_{\text{O}_2}= 11,39 \text{ mg}_o/\text{g}_x\text{h}$, mientras que el rendimiento obtenido fue $Y_{x/s}=0,73 \text{ g/g}$.
- El coeficiente volumétrico de transferencia de Oxígeno en el biorreactor NewBrunswick BioFlo III, operado con el medio optimizado a una velocidad de agitación de 800 rpm y una aireación de 4 vvm fue de $91,76 \text{ h}^{-1}$. Se calculó que la concentración máxima de biomasa que podía soportar el equipo bajo estas condiciones era de 63,34 g/L.
- Mediante el cultivo de *S. cerevisiae* en condiciones de *batch* alimentado, partiendo de una concentración de biomasa inicial de 3,21 g/L en un volumen 2,8 L y empleando un medio de alimentación con una concentración de azúcares de 109 g/L, se obtuvo la concentración de final de biomasa 13 g/L para un volumen final de 3,2 L.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Altamiro, C., 2013. Optimización de un método para la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada en la etapa de Fermentación del mosto de cerveza, desde un nivel de laboratorio a una planta piloto. Tesis de para optar al título de Ingeniero Químico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química, Ingeniería Química e Ingeniería Agroindustrial. Lima, Peru.
- 2) Arango, R., Peña, C. 2008. Evaluación de la producción de etanol utilizando cepas recombinantes de *saccharomyces cerevisiae* a partir de melaza de caña de azúcar. Corporación para Investigaciones Biológicas-CIB, investigador Unidad Biotecnología Vegetal.
- 3) Bioprocesos. Efecto de algunos factores sobre la velocidad de Crecimiento. [En línea] Consultado en marzo 2019. [Disponible en:
<http://www.tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/5822/Capitulo5.pdf>]
- 4) Carballo, F. 2000. Microbiología industrial: microorganismos de interés industrial. Editorial Acribia. España. Citado por: Fajardo, E., Sarmiento, S. 2007. Evaluación de melaza de caña de azúcar como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de grado. Pontifica Universidad Javeriana.
- 5) Cerrutti, P., Galvagno, M. Aumento de la actividad panificante de levaduras comerciales por aplicación de condiciones de estrés durante su propagación. Depto. de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, UBA, Ciudad Universitaria, Pabellón de Industrias, 1428 Buenos Aires, Argentina.

- 6) Cooney, C.L., Wang, D.C.I. 1977. Computer-aided material balancing for production of fermentation parameters. *Biotechnol. Bioeng.* Citado por: Reed, G., Nagodawithana, T., 1991. *Yeast Production*. AVI book, Segunda edición. Nueva York, Estados Unidos de América.
- 7) C+E Analítica. Ficha técnica de la melaza de caña. [En línea] 2008. Consultado en abril 2018 [disponible en: <http://www.cmaseanalitica.com/pdf/melaza.pdf>]
- 8) Doran, P. 1998. *Principios de Ingeniería de los Bioprocesos*. Zaragoza, España.
- 9) Fajardo, E., Sarmiento, S. 2007. Evaluación de melaza de caña de azúcar como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana.
- 10) FAO. Single cell Protein. [En línea] 2008. Consultado abril de 2018. [Disponible <http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/AFRIS/Data/734.htm>]
- 11) Gualtieri, M., Sanchez, J. A. 2003. Producción de proteína unicelular de levaduras crecidas en desechos de Harina de maíz precocida (*Zea mays*). Universidad de los Andes, Merida, Venezuela.
- 12) Gualtieria, M., Villalta, Carolina., Díaz, L., Medina, G., Lapenna, E., Rondón, M. 2007. Producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* usando residuos de pulpa de *Coffea arabica L.* Laboratorio de Productos Naturales, Universidad de los Andes, Merida, Venezuela.
- 13) Martin, A., 2005. Control del metabolismo de *Saccharomices crevisiae* en la síntesis de glutatión. Universidad de Granadas, Departamento de Ingeniería Química.

- 14) Matute, L., Galindo, Y., Delahais, I. 2016. Evaluación de productos de descarte de una empresa de bebidas no alcohólicas para ser usados como sustrato fermentable por *Saccharomyces cerevisiae*. Laboratorio de Biotecnología Agroindustrial, Instituto de Química y Tecnología, Facultad de Agronomía Universidad Central de Venezuela. Aragua, Venezuela.
- 15) Miller, G. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. Analytic Chemistry.
- 16) Muñoz, M., Catrilaf, G. 2013. Estimación de parámetros cinéticos de *Saccharomyces cerevisiae* en sistema de fermentación Batch bajo distintas condiciones de crecimiento.
- 17) Nelson, D., Cox, M., 2009. Lehninger Principios de Bioquímica. Editorial Omega. Quinta Edición.
- 18) Ospina, A., Palacios, M. 1994. Efecto del cultivo de levaduras sobre carga orgánica de los efluentes de Sucromiles S.A. tesis de pregrado microbiología. Facultad de ingeniería, Universidad del Valle. Cale, Colombia. Citado por: Fajardo, E., Sarmiento, S. 2007. Evaluación de melaza de caña de azúcar como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de grado. Pontifica Universidad Javeriana.
- 19) Rivas, J., Díaz, T., Hahn, M., Bastidas, P. 2008. Efecto de la suplementación con *Saccharomyces cerevisiae* sobre la producción de leche al inicio de la lactancia en vacas lecheras. Departamento de producción animal, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Veterinarias, Maracay, Aragua, Venezuela.

20) Reed, G., Nagodawithana, T. 1991. Yeast Production. AVI book, Segunda edicion.
Nueva York, Estados Unidos de América.

21) Sartorius stedim Biotech. 2009. *Saccharomyces cerevisiae*. [En línea] 2009. Consultado:
abril del 2018. [disponible en:
http://www.sartorius.com/mediafile/Appl_BIOSTAT_AplusRecipes]

22) Universidad de Quilmes, Batch alimentado. [En línea]. Consultado: abril del 2018.
[Disponible en:
<http://bioprocesos.unq.edu.ar/Biopro%20I/TP%20Batch%20alimentado.pdf>]

23) Monsalve, W. 1999. Optimización de la producción de *Torulopsis utilis* (Henneberg) para
la elaboración de una formulación atrayente de la mosca del mango *Anastrepha obliqua*
(Macquart) (Diptera: Tephritidae). Trabajo especial de grado, Universidad central de
Venezuela, Facultad de Ciencias, Caracas.