



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Dirección de Postgrado**

**Maestría en Biotecnología Industrial**

**Producción de biomasa de levaduras para alimentación animal  
mediante fermentaciones en bioreactor de tanque agitado.**

**María Luján Aguirre Ferreira**

**Orientador: Dr. Diego Gabriel Nosedá**

**Co-orientador: Walter Sandoval**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,  
Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención  
del Grado de Magíster en Biotecnología Industrial

**SAN LORENZO – PARAGUAY**

**Abril – 2021**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Dirección de Postgrado**

**Maestría en Biotecnología Industrial**

**Producción de biomasa de levaduras para alimentación animal  
mediante fermentaciones en bioreactor de tanque agitado**

**María Luján Aguirre Ferreira**

**Orientador: Dr. Diego Gabriel Nosedá**

**Co-orientador: Walter Sandoval**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,  
Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención  
del Grado de Magíster en Biotecnología Industrial

**SAN LORENZO – PARAGUAY**

**Abril – 2021**

Datos Internacionales de Catalogación en la Publicación (CIP)  
DE LA BIBLIOTECA DE LA FACEN – UNA

Dejar en blanco ésta página que será destinada para el registro del depósito de la tesis en la biblioteca de la FACEN.

**Producción de biomasa de levaduras para alimentación animal mediante fermentaciones en bioreactor de tanque agitado**

María Luján Aguirre Ferreira

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Biotecnología Industrial.

Fecha de aprobación:    de                    de 2021.

**MESA EXAMINADORA**

**MIEMBROS:**

**Prof. Dr. xxxxxxxxxxxxxxxxx**

*Universidad Autónoma de Barcelona, España*

**Prof. Dra. xxxxxxxxxxxxxxxxx**

*Universidad Nacional de la Pampa, Argentina*

**Prof. Dr. xxxxxxxxxxxxxxxxx**

*Universidad Nacional de Asunción, Paraguay*

**Prof. Dr. xxxxxxxxxxxxxxxxx**

*Universidad Nacional de Asunción, Paraguay*

**Prof. MSc. xxxxxxxxxxxxxxxxx**

*Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina*

**Prof. MSc. xxxxxxxxxxxxxxxxx**

*Universidad Nacional de Asunción, Paraguay*

Aprobado y catalogado por la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, en fecha    de                    de 2019.

**Prof. MSc. Andrea Weiler**  
Director de Postgrado, FACEN – UNA

A mis padres  
César Rubén Aguirre y Aurelia Ferreira de Aguirre.

A mi abuela  
María Adela Gutiérrez Q.E.P.D

## AGRADECIMIENTOS

A Dios y a mamá María, que en todo mi caminar y durante todas mis luchas estuvieron presentes en mi día a día, dándome la fortaleza para no desistir y perseguir mis anhelos. Les agradezco infinitamente por la vida de mis padres y mis hermanos, quienes me acompañaron en cada larga y agotadora noche de desvelos y porque confiaron siempre en mis proyectos de vida.

Mami, gracias por ser mi puerto seguro, mi pedacito de cielo en la tierra donde siempre puedo acudir y refugiarme bajo tu amparo maternal, a ti no te debo solo la vida sino todo lo que soy.

A Chris y a Brayan, la ayuda que me brindaron fue sumamente importante para mí, gracias por estar a mi lado (incluso en la distancia) en mis momentos más difíciles porque bien saben que no fue sencillo culminar este proyecto de tesis y ustedes fueron mi soporte y mi alegría, me ayudaron hasta donde les fue posible y mucho más.

A mis compañeros de maestría que hicieron más divertidos y llevaderos los estudios, clases y las largas horas de laboratorio. En especial a Estela (mi conciencia querida), a Giselle (conciencia II), Yolie (mi osita cariñosa), Lauri y Naya que siempre me ayudaron con alguna taza de café, un consejo, risas e incluso en mi trabajo de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – CONACYT por la financiación de la Maestría.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción FACEN – UNA por desarrollar la Maestría en Biotecnología Industrial.

A mi tutor, el Dr. Diego Gabriel Nosedá, por su dirección y orientación durante toda la realización de mi tesis.

A mi co-tutor, el Dr. Walter Sandoval, por su ayuda, en especial con las fermentaciones en bioreactor.

A todos los que de alguna manera me hicieron llegar su apoyo, muchas gracias.

# **Producción de biomasa de levaduras para alimentación animal mediante fermentaciones en bioreactor de tanque agitado**

Autor: **MARÍA LUJÁN AGUIRRE FERREIRA.**

Orientador: **DR. DIEGO GABRIEL NOSEDA.**

Co-orientador: **Walter Sandoval**

## **RESUMEN**

El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar uno de los residuos principales de la industria azucarera: la melaza de caña en pos de utilizarla como sustrato alternativo en la producción de biomasa de levaduras. Se evaluó la producción de biomasa y el consumo de sustrato de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Kluyveromyces marxianus* DSM 11554 realizando cultivos en frascos *Erlenmeyer* con el medio YPD y con el medio alternativo de melaza de caña. La biomasa obtenida mediante este procedimiento fue cuantificada por la técnica de absorbancia y peso seco y posteriormente se escaló la producción en biorreactor de tanque agitado escala laboratorio.

Con la levadura *S. cerevisiae* ATCC 9763 en medio complejo YPD se obtuvo un rendimiento de 0,22 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub> y una productividad máxima de 0,93 g<sub>x</sub>/L h. En la fermentación realizada en medio a base de melaza de caña, el rendimiento fue alcanzó 0,51 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub> y una productividad volumétrica máxima de biomasa igual a 1,02 g<sub>x</sub>/L h. Sin embargo, el máximo nivel de biomasa obtenido en medio de cultivo a base de melaza de caña (44,06 g/L) fue mucho mayor en comparación al obtenido en medio YPD (19,16 g/L), esto debido al mayor contenido de azúcares reductores en medio con melaza de caña. Por otra parte, en la fermentación realizada en el medio YPD de la levadura *K. marxianus* DSM 11554 se consiguió un rendimiento de 0,44 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub> y una productividad volumétrica máxima de biomasa de 1,55 g<sub>x</sub>/L h. Mientras que, en la fermentación realizada en medio a base de melaza de caña, los valores de rendimiento y productividad volumétrica máxima de biomasa de *K. marxianus* DSM 11554 dieron un valor de 0,26 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub> y 1,08 g<sub>x</sub>/L h respectivamente, estos resultados fueron mayores que los obtenidos con el medio YPD. Asimismo, el máximo nivel de biomasa alcanzado en medio a base de melaza de caña (52,18 g/L) fue mayor que obtenido en medio YPD (48,11 g/L).

**Palabras claves:** *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, biomasa, melaza, biorreactor.

## **Production of yeast biomass for animal feed by fermentations in stirred tank bioreactor**

Author: MARÍA LUJÁN AGUIRRE FERREIRA

Advisor: DR. DIEGO GABRIEL NOSEDA

Co-advisor: Walter Sandoval

### **SUMMARY**

The objective of this research work was to evaluate one of the main residues of the sugar industry: cane molasses in order to use it as an alternative substrate in the production of yeast biomass. Biomass production and substrate consumption of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 and *Kluyveromyces marxianus* DSM 11554 were evaluated by performing *Erlenmeyer* cultures with the YPD medium and with the alternative medium of cane molasses. The biomass obtained by this procedure was quantified by the absorbance and dry weight technique and subsequently the production was scaled up in a laboratory-scale stirred tank bioreactor.

With the yeast *S. cerevisiae* ATCC 9763 in YPD complex medium, a yield of 0.22 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub> and a maximum productivity of 0.93 g<sub>x</sub>/Lh was obtained. In the fermentation carried out in a medium based on cane molasses, the yield was reached 0.51 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub> and a maximum volumetric productivity of biomass equal to 1.02 g<sub>x</sub>/Lh. However, the maximum biomass level obtained in cane molasses-based culture medium (44.06 g/L) was much higher compared to that obtained in YPD medium (19.16 g/L), this due to the higher reducing sugar content in the middle with cane molasses. On the other hand, in the fermentation carried out in the YPD medium of the yeast *K. marxianus* DSM 11554 a yield of 0.44 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub> and a maximum volumetric productivity of biomass of 1.55 g<sub>x</sub>/Lh was achieved. While, in the fermentation carried out in a medium based on cane molasses, the yield values and maximum volumetric productivity of biomass of *K. marxianus* DSM 11554 gave a value of 0.26 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub> and 1.08 g<sub>x</sub>/Lh respectively, these results were higher than those obtained with the YPD medium. Likewise, the maximum level of biomass reached in a medium based on cane molasses (52.18 g/L) was higher than that obtained in a YPD medium (48.11 g/L).

**Keywords:** *S. cerevisiae*, *K marxianus*, biomass, molasses, bioreactor.



|           |                                                                                                                                                                      |           |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.</b> | <b>ÍNDICE</b>                                                                                                                                                        |           |
| <b>2.</b> | <b>INTRODUCCIÓN</b>                                                                                                                                                  | <b>1</b>  |
| 2.1.      | Planteamiento del problema                                                                                                                                           | 2         |
| 2.2.      | Pregunta de investigación                                                                                                                                            | 2         |
| 2.3.      | Justificación                                                                                                                                                        | 2         |
| 2.4.      | Objetivos                                                                                                                                                            | 4         |
| 2.4.1.    | Objetivo General                                                                                                                                                     | 4         |
| 2.4.2.    | Objetivos Específicos                                                                                                                                                | 4         |
| 2.5.      | Hipótesis                                                                                                                                                            | 4         |
| <b>3.</b> | <b>MARCO TEÓRICO</b>                                                                                                                                                 | <b>5</b>  |
| 3.1.      | Residuos o subproductos agroindustriales                                                                                                                             | 5         |
| 3.1.1.    | Generalidades                                                                                                                                                        | 5         |
| 3.2.      | Caña de azúcar                                                                                                                                                       | 5         |
| 3.2.1.    | Características generales de la caña de azúcar                                                                                                                       | 5         |
| 3.2.2.    | Producción a nivel mundial                                                                                                                                           | 6         |
| 3.2.3.    | Producción en Paraguay                                                                                                                                               | 7         |
| 3.3.      | Subproductos de la caña de azúcar                                                                                                                                    | 8         |
| 3.4.      | Melaza de caña de azúcar                                                                                                                                             | 9         |
| 3.5.      | Producción de biomasa de microorganismos                                                                                                                             | 10        |
| 3.6.      | Bioreactores: Generalidades                                                                                                                                          | 10        |
| 3.6.1.    | Tipos de Bioreactores                                                                                                                                                | 12        |
| 3.6.2.    | Bioreactor de tanque agitado                                                                                                                                         | 13        |
| 3.7.      | Generalidades de las levaduras                                                                                                                                       | 14        |
| 3.7.1.    | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                                                                                                                                      | 15        |
| 3.7.2.    | <i>Kluyveromyces marxianus</i>                                                                                                                                       | 16        |
| 3.7.3.    | Empleo de levaduras como probióticos                                                                                                                                 | 16        |
| 3.7.4.    | Producción de biomasa de levaduras                                                                                                                                   | 18        |
| <b>4.</b> | <b>METODOLOGÍA</b>                                                                                                                                                   | <b>19</b> |
| 4.1.      | Cepas y medios de cultivo                                                                                                                                            | 19        |
| 4.2.      | Puesta a punto y validación de los métodos analíticos                                                                                                                | 19        |
| 4.2.1.    | Ensayo de Linealidad                                                                                                                                                 | 19        |
| 4.2.2.    | Ensayo de Precisión                                                                                                                                                  | 20        |
| 4.2.3.    | Ensayo de Veracidad                                                                                                                                                  | 20        |
| 4.3.      | Método de cuantificación de glucosa                                                                                                                                  | 24        |
| 4.4.      | Método de cuantificación de azúcares reductores                                                                                                                      | 25        |
| 4.5.      | Determinación de la relación entre densidad óptica y peso seco de la biomasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 y <i>Kluyveromyces marxianus</i> DSM 11954 | 26        |

|           |                                                                                                                                                                                        |           |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.6.      | Evaluación del crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 y <i>Kluyveromyces marxianus</i> DSM 11954 en medio YPD .....                                                  | 27        |
| 4.7.      | Adaptación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 y <i>Kluyveromyces marxianus</i> DSM 11954 en medio de cultivo alternativo .....                                               | 28        |
| 4.8.      | Evaluación del crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 y <i>Kluyveromyces marxianus</i> DSM 11954 en medio de cultivo alternativo .....                               | 28        |
| 4.9.      | Fermentaciones en bioreactor de tanque agitado escala laboratorio .....                                                                                                                | 29        |
| <b>5.</b> | <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>                                                                                                                                                    | <b>32</b> |
| 5.1.      | Puesta a punto y validación de métodos analíticos de cuantificación.....                                                                                                               | 32        |
| 5.2.      | Método de cuantificación de glucosa .....                                                                                                                                              | 32        |
| 5.3.      | Método de cuantificación de azúcares reductores.....                                                                                                                                   | 33        |
| 5.4.      | Determinación de la relación entre densidad óptica y peso seco de la biomasa de las cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 y <i>Kluyveromyces marxianus</i> DSM 11954..... | 35        |
| 5.5.      | Evaluación del crecimiento de las levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 y <i>Kluyveromyces marxianus</i> DSM 11954 en medio complejo YPD.....                            | 36        |
| 5.6.      | Evaluación del crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 y <i>Kluyveromyces marxianus</i> DSM 11954 en medio de cultivo alternativo con melaza de caña .....            | 43        |
| 5.7.      | Escalado de la producción de biomasa de levaduras mediante fermentaciones en biorreactor de tanque agitado .....                                                                       | 50        |
| 5.8.      | Fermentaciones en bioreactor de tanque agitado escala laboratorio .....                                                                                                                | 50        |
| 5.8.1.    | Producción de biomasa de <i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763 mediante fermentación en bioreactor con medio YPD.....                                                                         | 50        |
| 5.8.2.    | Producción de biomasa de <i>K. marxianus</i> DSM 11954 mediante fermentación en bioreactor con medio YPD.....                                                                          | 53        |
| 5.8.3.    | Producción de biomasa de <i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763 mediante fermentación en bioreactor con medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña.....                             | 55        |
| 5.8.4.    | Producción de biomasa de <i>K. marxianus</i> DSM 1195 mediante fermentación en bioreactor con medio alternativo a base de melaza de caña.....                                          | 58        |
| <b>6.</b> | <b>CONCLUSIONES.....</b>                                                                                                                                                               | <b>61</b> |
| <b>7.</b> | <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>                                                                                                                                                               | <b>63</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Composición nutricional de la caña de azúcar.....                                                                                                                                                                                                                                                | 6  |
| <b>Figura 2:</b> Producción de global de azúcar.....                                                                                                                                                                                                                                                              | 6  |
| <b>Figura 3:</b> Principales departamentos productores de caña de azúcar del Paraguay.....                                                                                                                                                                                                                        | 7  |
| <b>Figura 4:</b> Composición química de distintos subproductos de la caña de azúcar.....                                                                                                                                                                                                                          | 9  |
| <b>Figura 5:</b> Partes de un biorreactor de tanque agitado.....                                                                                                                                                                                                                                                  | 13 |
| <b>Figura 6:</b> Esquema de un modelo de ajuste lineal.....                                                                                                                                                                                                                                                       | 21 |
| <b>Figura 7:</b> Esquema de la distribución de residuos. ....                                                                                                                                                                                                                                                     | 21 |
| <b>Figura 8:</b> Variación esperada según la concentración de analito evaluada .....                                                                                                                                                                                                                              | 22 |
| <b>Figura 9:</b> Distribución normal de valor medio (Campana de Gauss). ....                                                                                                                                                                                                                                      | 23 |
| <b>Figura 10:</b> Recuperación esperada según la concentración de analito evaluada. ....                                                                                                                                                                                                                          | 23 |
| <b>Figura 11:</b> Esquema de las reacciones del método de cuantificación de glucosa .....                                                                                                                                                                                                                         | 24 |
| <b>Figura 12:</b> Soluciones correspondientes al método de cuantificación de glucosa.....                                                                                                                                                                                                                         | 25 |
| <b>Figura 13:</b> Esquema de la reacción del método de cuantificación de azúcares reductores .....                                                                                                                                                                                                                | 26 |
| <b>Figura 14:</b> Soluciones correspondientes al método de cuantificación de azúcares reductores. ....                                                                                                                                                                                                            | 26 |
| <b>Figura 15:</b> Bioreactor de tanque agitado <i>BioFlo 120</i> de <i>Eppendorf</i> .....                                                                                                                                                                                                                        | 29 |
| <b>Figura 16:</b> Ensayo de Linealidad aplicado al método de cuantificación de glucosa .....                                                                                                                                                                                                                      | 32 |
| <b>Figura 17:</b> Gráfico de control de valor medio correspondiente al método de cuantificación de glucosa.....                                                                                                                                                                                                   | 33 |
| <b>Figura 18:</b> Ensayo de Linealidad aplicado al método de cuantificación de azúcares reductores. ....                                                                                                                                                                                                          | 34 |
| <b>Figura 19:</b> Gráfico de control de valor medio correspondiente al método de cuantificación de azúcares reductores .....                                                                                                                                                                                      | 34 |
| <b>Figura 20:</b> A) Curva de calibración entre la densidad óptica medida a 600 nm y el peso seco de biomasa (g/L) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 B) Curva de calibración entre la densidad óptica medida a 600 nm y el peso seco de biomasa (g/L) de <i>Kluyveromyces marxianus</i> DSM 11954..... | 36 |
| <b>Figura 21:</b> Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 en medio complejo YPD .....                                                                                                                                                                                                                | 37 |
| <b>Figura 22:</b> Linealización de la fase exponencial de la curva de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 aplicando logaritmo natural .....                                                                                                                                                  | 38 |
| <b>Figura 23:</b> A) Linealización aplicando logaritmo natural a la curva de consumo de glucosa en función del tiempo de incubación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763. B) Linealización                                                                                                                |    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| aplicando logaritmo natural a la curva de consumo de azúcares reductores en función del tiempo de incubación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763.....                                                                                                                                                                                                  | 39 |
| <b>Figura 24:</b> Variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 en medio YPD .....                                                                                                                                                                               | 39 |
| <b>Figura 25:</b> Cultivo de <i>Kluyveromyces marxianus</i> DSM 11954 en medio complejo YPD .....                                                                                                                                                                                                                                                               | 40 |
| <b>Figura 26:</b> Linealización de la fase exponencial de la curva de crecimiento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> DSM 11954 aplicando logaritmo natural .....                                                                                                                                                                                                 | 41 |
| <b>Figura 27:</b> A) Linealización aplicando logaritmo natural a la curva de consumo de glucosa en función del tiempo de incubación de <i>Kluyveromyces marxianus</i> DSM 11954. B) Linealización aplicando logaritmo natural a la curva de consumo de azúcares reductores en función del tiempo de incubación de <i>Kluyveromyces marxianus</i> DSM 11954..... | 42 |
| <b>Figura 28:</b> Variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de cultivo de <i>Kluyveromyces marxianus</i> DSM 11954 en medio YPD .....                                                                                                                                                                                | 42 |
| <b>Figura 29:</b> Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 en medio con melaza de caña .....                                                                                                                                                                                                                                                        | 44 |
| <b>Figura 30:</b> Linealización de la fase exponencial de la curva de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 aplicando logaritmo natural .....                                                                                                                                                                                                | 45 |
| <b>Figura 31:</b> A) Linealización aplicando logaritmo natural a la curva de consumo de glucosa en función del tiempo de incubación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763. B) Linealización aplicando logaritmo natural a la curva de consumo de azúcares reductores en función del tiempo de incubación de <i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763.....          | 45 |
| <b>Figura 32:</b> Variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 en medio con melaza de caña .....                                                                                                                                                                | 46 |
| <b>Figura 33:</b> Cultivo de <i>Kluyveromyces marxianus</i> DSM 11954 en medio con melaza de caña. ....                                                                                                                                                                                                                                                         | 47 |
| <b>Figura 34:</b> Linealización de la fase exponencial de la curva de crecimiento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> DSM 11954 aplicando logaritmo natural .....                                                                                                                                                                                                 | 48 |
| <b>Figura 35:</b> A) Linealización aplicando logaritmo natural a la curva de consumo de glucosa en función del tiempo de incubación de <i>Kluyveromyces marxianus</i> DSM 11954 B) Linealización aplicando logaritmo natural a la curva de consumo de azúcares reductores en función del tiempo de incubación de <i>K. marxianus</i> DSM 11954.....             | 48 |
| <b>Figura 36:</b> Variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de cultivo de <i>K. marxianus</i> DSM 11954 en medio con melaza de caña .....                                                                                                                                                                            | 49 |
| <b>Figura 37:</b> Registro de parámetros de la fermentación de <i>S. cerevisiae</i> en biorreactor con medio YPD. ....                                                                                                                                                                                                                                          | 51 |

|                                                                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 38:</b> Fermentación de <i>S. cerevisiae</i> en biorreactor con medio de cultivo YPD .....                                                                                                        | 52 |
| <b>Figura 39:</b> Variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de fermentación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 en medio YPD .....                      | 52 |
| <b>Figura 40:</b> Fermentación de <i>K. marxianus</i> DSM 11954 en biorreactor con medio de cultivo YPD .                                                                                                   | 53 |
| <b>Figura 41:</b> Fermentación de <i>K. marxianus</i> DSM 11954 en biorreactor con medio de cultivo YPD.....                                                                                                | 54 |
| <b>Figura 42:</b> Variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de fermentación de <i>K. marxianus</i> DSM 11954 en medio YPD .....                                  | 55 |
| <b>Figura 43:</b> Registro de parámetros de la fermentación de <i>S. cerevisiae</i> en biorreactor con medio alternativo con melaza de caña .....                                                           | 56 |
| <b>Figura 44:</b> Fermentación de <i>S. cerevisiae</i> en biorreactor con medio de cultivo alternativo con melaza de caña .....                                                                             | 57 |
| <b>Figura 45:</b> Variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de fermentación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 en medio a base de melaza de caña ..... | 57 |
| <b>Figura 46:</b> Registro de parámetros de la fermentación de <i>K. marxianus</i> en biorreactor con medio alternativo con melaza de caña .....                                                            | 58 |
| <b>Figura 47:</b> Fermentación de <i>S. cerevisiae</i> en biorreactor con medio de cultivo alternativo melaza de caña .....                                                                                 | 59 |
| <b>Figura 48:</b> Variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de fermentación de <i>K. marxianus</i> DSM 1195 en medio a base de melaza de caña .....              | 60 |

## LISTA DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1:</b> Condiciones de operación en la etapa de cultivo batch de las fermentaciones realizadas en biorreactor con medio YPD y medio alternativo .....                                                               | 31 |
| <b>Tabla 2:</b> Condiciones de operación en la etapa de cultivo fed-batch de las fermentaciones realizadas en biorreactor con medio YPD y medio alternativo .....                                                           | 31 |
| <b>Tabla 3:</b> Resultados de los ensayos de validación de las metodologías de cuantificación de glucosa y azúcares reductores. Para cada ensayo de validación se indica el criterio de aceptación .....                    | 43 |
| <b>Tabla 4:</b> Valores de los parámetros cinéticos de acuerdo a los resultados obtenidos en medio YPD de <i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763 y <i>K. marxianus</i> DSM 11954:.....                                              | 49 |
| <b>Tabla 5:</b> Valores de los parámetros cinéticos de acuerdo a los resultados obtenidos en medio melaza de caña de <i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763 y <i>K. marxianus</i> DSM 11954.....                                    | 47 |
| <b>Tabla 6:</b> Parámetros de las fermentaciones de <i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763 y <i>K. marxianus</i> DSM 11954 realizadas en biorreactor de tanque agitado con medio YPD y medio alternativo con de melaza de caña..... | 60 |

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

|                                 |                                                                           |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| <b>YPD</b>                      | Yeast extract Peptone Dextrose                                            |
| <b>ATCC</b>                     | American Type Culture Collection                                          |
| <b><math>Y_{x/s}</math></b>     | Rendimiento de biomasa en sustrato                                        |
| <b><math>\mu_x</math></b>       | Velocidad específica de crecimiento                                       |
| <b><i>S. cerevisiae</i></b>     | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                                           |
| <b><i>K. marxianus</i></b>      | <i>Kluyveromyces marxianus</i>                                            |
| <b>FAO</b>                      | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura |
| <b>MS/ha/día</b>                | Cantidad de Materia seca de un pasto en una hectárea por día              |
| <b>P</b>                        | Fósforo                                                                   |
| <b>Zn</b>                       | Zinc                                                                      |
| <b>Fe</b>                       | Hierro                                                                    |
| <b>Co</b>                       | Cobalto                                                                   |
| <b>Mo</b>                       | Molibdeno                                                                 |
| <b>DDGS</b>                     | Granos secos de destilería con solubles                                   |
| <b><math>\mu\text{m}</math></b> | micrometros                                                               |
| <b>TCA</b>                      | Ciclo del ácido tricarboxílico                                            |
| <b>CO<sub>2</sub></b>           | Dióxido de carbono                                                        |
| <b>LOD</b>                      | Límite de detección                                                       |
| <b>LOQ</b>                      | Límite de cuantificación                                                  |
| <b>m</b>                        | metro                                                                     |
| <b>cm</b>                       | centímetro                                                                |
| <b>g/L</b>                      | gramos por litro                                                          |
| <b>mg.g<sup>-1</sup></b>        | miligramos por gramo                                                      |
| <b>mg.L<sup>-1</sup></b>        | miligramos por litro                                                      |
| <b>mL</b>                       | mililitro                                                                 |
| <b>ATP</b>                      | Adenosina trifosfato                                                      |
| <b>GRAS</b>                     | Generally recognized as safe                                              |
| <b>FDA</b>                      | Food and Drug Administration                                              |
| <b>SCFA</b>                     | Ácidos grasos de cadena corta                                             |
| <b>Desv. Std</b>                | Desviación estándar                                                       |
| <b>pH</b>                       | Potencial de Hidrógeno                                                    |
| <b>R<sup>2</sup></b>            | Coeficiente de correlación                                                |
| <b><math>\mu\text{L}</math></b> | microlitro                                                                |
| <b>°C</b>                       | Grados Celsius                                                            |
| <b>rpm</b>                      | Revoluciones por minuto                                                   |

## 2. INTRODUCCIÓN

Los avances en biotecnología industrial ofrecen innumerables oportunidades potenciales para la utilización de sustratos residuales agroindustriales como por ejemplo la melaza de caña de azúcar, la cual puede ser utilizada como sustrato para la producción de distintos bioinsumos de interés. El principal subproducto proveniente de la industria azucarera: la melaza de caña, presenta grandes ventajas nutricionales, gran abundancia y escaso costo económico en comparación con otros sustratos. Por tal motivo, la melaza de caña puede ser utilizada como sustrato alternativo para la producción de biomasa de microorganismos, en particular biomasa de distintas levaduras, destinada a la nutrición animal, ya sea bovina, ovina o porcina (Fajardo y Sarmiento, 2007).

La producción de biomasa de distintas especies de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus*, cultivadas en condiciones adecuadas y a partir de sustratos económicos enriquecidos con otros nutrientes, podría convertirse en un factor que contribuya al desarrollo biotecnológico del Paraguay. Cabe destacar, que la importancia de la producción de biomasa de levaduras radica principalmente en que la misma puede ser utilizada en la alimentación animal debido sus capacidades nutricionales y probióticas.

Entre los microorganismos que cuentan con un gran potencial probiótico se encuentran algunas especies bacterianas y de levaduras. El papel de ciertas levaduras, particularmente de *S. cerevisiae*, como probiótico para aves y cerdos, ha recibido la atención de muchos investigadores, con resultados prometedores basados en ciertos efectos probióticos, como ser la exclusión competitiva de patógenos (Nurmi y Rantala, 1973). En rumiantes mediante el suministro de levaduras inactivas y/o levaduras vivas se han registrado aumentos en el consumo, la ganancia de peso, la producción y mejoras en la composición de la leche.

Así, en este trabajo de tesis se llevó a cabo la evaluación y comparación del crecimiento y producción de biomasa de las levaduras *S. cerevisiae* ATCC 9763 y *K. marxianus* DSM 11954 a partir de un medio de cultivo tradicional como el medio YPD y un medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña de azúcar. De esta manera, se realizó la determinación de distintos parámetros cinéticos y estequiométricos como la cantidad de biomasa generada por ambas levaduras, el consumo de sustratos, el rendimiento de biomasa en base al sustrato consumido ( $Y_{x/s}$ ), la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_x$ ), el tiempo de duplicación ( $T_d$ ) y la productividad volumétrica de biomasa ( $P_v$ ).



## **2.1. Planteamiento del problema**

En Paraguay, la actividad ganadera bovina de carne se desarrolla generalmente sobre pasturas naturales y los requerimientos nutricionales del ganado varían con la edad, peso, estado corporal, entre otros. Sin embargo, durante el invierno y junto con el cambio climático, las pasturas presentan variaciones en el valor nutritivo lo cual afecta principalmente a la ganancia de peso del animal forzando a los productores a buscar otros medios alternativos de suplementación nutritiva de modo a evitar pérdidas económicas.

También se ha visto que en muchos países la prohibición del uso de antibióticos en dietas para animales ha contribuido con la creciente aparición en el mercado de varios productos diseñados para reemplazarlos y en la actualidad la mayor parte está siendo centrada hacia los productos de carácter prebiótico, probiótico y simbiótico. Con la inclusión de estos en las dietas se pretende aumentar la actividad y el número de especies microbianas benéficas en la microbiota intestinal, reducir parcial o totalmente el uso de antibióticos y favorecer el rendimiento animal. Sin embargo, estos nuevos productos son generalmente de elevado costo económico lo que limita su uso en los sistemas de producción animal.

En nuestro país, el uso de subproductos agroindustriales, como la melaza de caña como sustrato para la producción de biomasa de levaduras puede ser una alternativa válida ya que reduciría los costos para industrias nacionales y además evitaría el frecuente uso de productos importados que incrementan costos en procesos biotecnológicos.

## **2.2. Pregunta de investigación**

¿Utilizar subproductos agroindustriales en la composición de medios de cultivos produce un interesante rendimiento de biomasa de levaduras?

## **2.3. Justificación**

La ganadería en nuestro país tiene un alto valor social y económico, de ella dependen aproximadamente 168 mil productores, quienes en conjunto cuentan con aproximadamente 14,5 millones de cabezas de ganado, lo que permite que Paraguay se sitúe como uno de los más importantes productores de carne y sexto mayor exportador de carne vacuna en el mundo.

Los retos y desafíos que actualmente enfrenta el sector agropecuario son varios, tales como el cambio climático, pero al mismo tiempo se cuenta con numerosas herramientas para hacerles frente, tales como la investigación y la capacitación en adopción de nuevas tecnologías para incrementar su

producción y productividad en forma eficiente, sustentable y competitiva, ante una realidad, donde los productores deben producir alimentos inocuos para los consumidores que cada día exigen con mayor calidad.

El medio YPD compuesto por extracto de levadura, peptona y glucosa, es utilizado habitualmente como sustrato para la obtención de biomasa de levaduras a escala laboratorio. Es un medio de cultivo complejo y rico, que aporta fuentes de carbono y fuentes de nitrógeno para el crecimiento de microorganismos. Sin embargo, el medio YPD es sumamente costoso debido al elevado precio de la peptona y extracto de levadura. Por lo tanto, la utilización de este medio de cultivo para la producción de biomasa a gran escala no resulta un proceso económicamente rentable. Por tal motivo sería de gran importancia disponer de un sustrato económico para conseguir que dicho proceso de producción sea efectivamente rentable.

Por tal motivo, mediante este proyecto se plantea sustituir el medio YPD en la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus*, por la utilización de un medio alternativo a base de melaza de caña, la cual presenta ventajas económicas y nutricionales para el crecimiento de levaduras.

Con la utilización de la melaza de caña de azúcar, se pretende minimizar los costos de producción a mayor escala y hacer un buen uso de un subproducto de gran importancia a nivel industrial.

Así, en este trabajo de Tesis se realiza la producción de biomasa de levaduras a partir de un medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña, con el propósito de incrementar el rendimiento de biomasa en función del sustrato consumido  $Y_{x/s}$  (g/g) y disminuir los costos de producción a gran escala.

## **2.4. Objetivos**

### **2.4.1. Objetivo General**

Evaluar la producción de biomasa de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Kluyveromyces marxianus* DSM 11954 utilizando un medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña, mediante cultivos en frascos *Erlenmeyer* y fermentaciones en bioreactor de tanque agitado.

### **2.4.2. Objetivos Específicos**

- a) Evaluar la producción de biomasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 en frascos *Erlenmeyer* a partir de un medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña.
- b) Evaluar la producción de biomasa de la levadura *Kluyveromyces marxianus* DSM 11954 en frascos *Erlenmeyer* a partir de un medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña.
- c) Comparar la producción de biomasa de levaduras entre el medio tradicional YPD y el medio alternativo a base de melaza de caña.
- d) Realizar el escalado de la producción de biomasa de levaduras mediante fermentaciones en bioreactor de tanque agitado con medio alternativo a base de melaza de caña y aplicando una estrategia de cultivo *batch* alimentado.

## **2.5. Hipótesis**

A partir de un medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña de azúcar se logrará alcanzar adecuados rendimientos de biomasa de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Kluyveromyces marxianus* DSM 11954.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1. Residuos o subproductos agroindustriales**

##### **3.1.1. Generalidades**

Generalmente los residuos o subproductos que se generan a partir de procesos productivos, usualmente no son de utilidad posterior como materia prima para la cadena de producción, pero pueden ser aprovechados o transformados para obtener otros productos con valor económico, comercial o social.

Los subproductos agroindustriales más utilizados son los provenientes del procesamiento de frutas y vegetales, la industria azucarera (bagazo de caña, cachaza, bagacillo de caña), la molinería del arroz (cascarilla de arroz), el procesamiento del café (pulpa de café) y del maíz (zuro de maíz, rastrojo de maíz, nejayote). Entre otros residuos utilizados están el bagazo de agave, el aserrín de laurel y algarrobo, las semillas del zapote mamey y el polvillo de fique. Asimismo, se aprovechan los efluentes del procesamiento de la palma de aceite, la industria cárnica y la láctea. Los subproductos agroindustriales han sido utilizados en la producción de biocombustibles y bioenergéticos como biodiésel, bioetanol, biogás y biomasa energética. Asimismo, se usan en la producción de abono orgánico, alimentos para animales, ladrillos o bloques, papel y biomateriales y pan integral; Cabe destacar que también pueden ser utilizados para la producción de biomasa de microorganismos de interés (Vargas Corredor, 2018).

El aprovechamiento de subproductos agroindustriales permite la obtención de materia prima para ser utilizada en diferentes procesos o en la elaboración de productos con valor agregado, amigables con el ambiente y similares a los productos obtenidos con materias primas comerciales. También se ha documentado el uso de residuos agroindustriales como bioenergéticos, abono orgánico o compost y alimentos para animales. La mayoría de los subproductos agroindustriales son de naturaleza lignocelulósica, lo que posibilita la extracción de polímeros utilizables como materia prima en diferentes procesos (Vargas Corredor, 2018).

#### **3.2. Caña de azúcar**

##### **3.2.1. Características generales de la caña de azúcar**

La caña de azúcar, cuyo nombre genérico es *Saccharum officinarum*, es una gramínea tropical perteneciente a la familia de las poáceas. En el tallo de esta planta, que contiene el tejido esponjoso y dulce, se sintetiza y acumula un jugo rico en sacarosa que al ser extraído y cristalizado forma el

azúcar (Fajardo y Sarmiento, 2007). Cabe destacar, que la caña de azúcar es de gran importancia en la economía de muchas regiones del mundo, por su versatilidad y capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales.

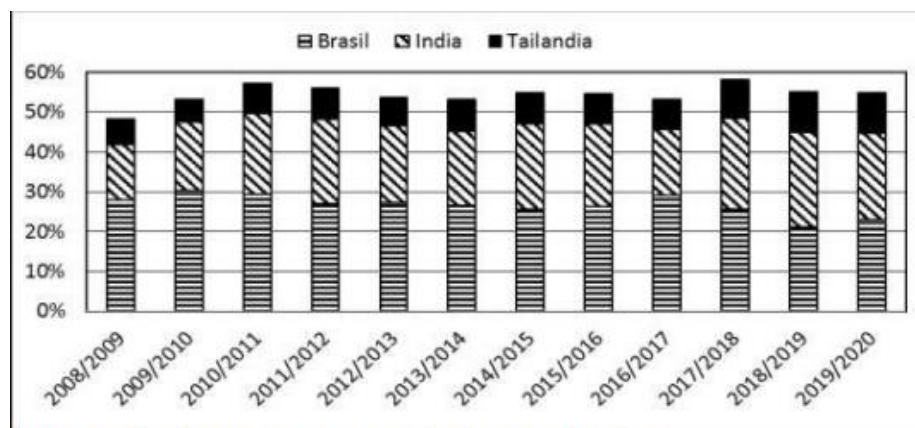
La caña de azúcar es rica en carbohidratos y una fuente energética por excelencia, mientras que su contenido en proteína es bajo (**Figura 1**), no supera el 5 % de la materia seca, dependiendo del estado de madurez, la edad del cultivo, la variedad y el clima.

| Composición química de las fracciones de caña de azúcar |                   |         |        |                 |          |
|---------------------------------------------------------|-------------------|---------|--------|-----------------|----------|
| Factor                                                  | Caña descortezada | Corteza | Puntas | Cogollo + hojas | Integral |
| Materia seca %                                          | 22,2              | 39.1    | 26.9   | 27.0            | 31.4     |
| Proteína cruda %                                        | 1.4               | 3.18    | 2.68   | 4.96            | 1.9-3.0  |
| Extracto etéreo %                                       | 0.19              | 1.04    | 0.84   | 1.74            | 1.22     |
| Cenizas %                                               | 3.1               | 7.87    | 5.28   | 5.9             | 3.1      |
| Fibra cruda %                                           | 17.0              | 22.0    | 39.0   | 40.0            | 29.0     |
| Digestibilidad %                                        | 61.0              | 44.0    | 35.0   | 39.0            | 59.0     |

**Figura 1:** Composición nutricional de la caña de azúcar

### 3.2.2. Producción a nivel mundial

La producción global de azúcar se divide en azúcar de remolacha (21%) y de caña (79%). En el caso del azúcar de remolacha, los principales productores son la UE (47%), Rusia (14%) y EEUU (12%). Por su lado en la **Figura 2** se puede observar que la producción global de caña de azúcar está dominada por Brasil como el principal productor con el 27%, seguido de India con el 20% y Tailandia y China cada uno con el 8% (USDA, 2019) (Enciso, 2019).



Fuente: USDA (2019). Las comas representan miles y los puntos decimales.

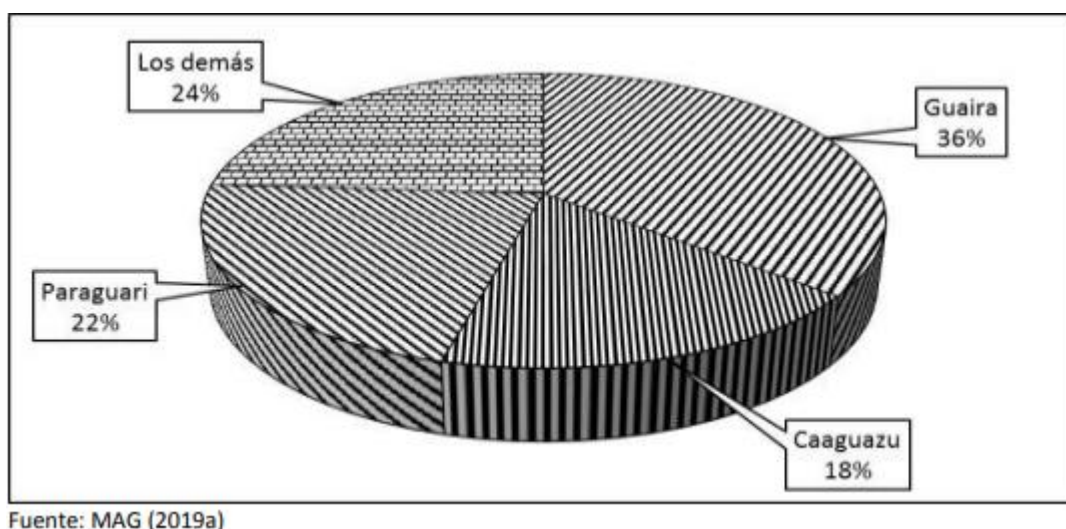
**Figura 2:** Producción de global de azúcar dominada por Brasil, India y Tailandia.

### 3.2.3. Producción en Paraguay

La actividad agrícola para el desarrollo económico del Paraguay y por, sobre todo, el impacto socio económico de este sector en la calidad de vida de los paraguayos, ha sido objeto principal para la promoción y mejoramiento de las condiciones de vida de los productores rurales. La caña de azúcar constituye un rubro de autoconsumo y de renta importante dentro de la agricultura familiar del Paraguay (Duarte & Gonzalez, 2013).

La caña de azúcar es un cultivo de renta importante de los trópicos y subtrópicos. Se cultiva en más de setenta países. Para el Paraguay, la importancia del cultivo de la caña de azúcar radica en que se constituye en uno de los cultivos de mayor importancia social y económica, debido al área de cultivo y a la cantidad de mano de obra que ocupa. Se cultiva principalmente como materia prima para la producción de azúcar, forraje, aguardiente y alcohol carburante, constituyéndose el etanol de caña en fuente alternativa y renovable de energía para el país (Duarte & Gonzalez, 2013)

En la **Figura 3** se pueden observar que los principales departamentos productores de caña de azúcar del Paraguay son Guaira, Paraguari y Caaguazú, responsables del 76% del total cosechado en los últimos cinco años (2015-2019). Específicamente en el 2019/2020 el 36% de la producción correspondió a Guaira, el 23% a Paraguari y el 18% a Caaguazú. Esta distribución relativa se ha mantenido prácticamente constante en el periodo citado (Enciso, 2019).



**Figura 3:** Principales departamentos productores de caña de azúcar del Paraguay.

El rendimiento de caña de azúcar en el 2015 fue de 56 t/ha, que se mantuvo hasta el 2018 cuando subió a 57 t/ha, y permaneció sin cambios en el 2019 (MAG, 2019).

La caña de azúcar se cultiva principalmente con fines industriales, siendo el azúcar y el alcohol los principales productos.

A continuación, se detalla un listado de ingenios azucareros que operan en el país y algunas de sus características (MAG, 2018):

- AZPA: con fábrica en Tebicuary se dedicada a la producción de azúcar, alcohol, melaza y gas carbónico.
- La Felsina: ubicada en la ciudad de Guarambaré, Departamento Central, el ingenio produce anualmente unas 14,000 toneladas de azúcar de las cuales 97% corresponden a azúcar orgánico apto para exportación.
- OTISA: ubicado en Arroyos y Esteros, dedicada a la producción totalmente orgánica de azúcar (White, Golden ligh y Brown), melaza, alcohol y ron.
- INPASA: ubicada en la Ciudad de Nueva Esperanza, Departamento de Canindeyú, producen 750 toneladas de azúcar cristal por día, equivalente a 15.000 bolsas de 50 kg.
- Cooperativa Manduvirá Ltda.: organización líder en la producción y exportación de azúcar orgánico certificado y Comercio Justo en más de 25 países en todo el mundo. Ubicado en el distrito de Arroyos y Esteros, Paraguay, nuclea a más de 1.000 pequeños productores (Enciso, 2019).

### **3.3. Subproductos de la caña de azúcar**

La cantidad y el volumen considerable de subproductos que se pueden aprovechar de la caña de azúcar son potencialmente elevados. Estos pueden ser utilizados como materia prima para la suplementación animal, en diferentes formas de uso y variaciones en la adición de otras sustancias que pueden mejorar la disponibilidad de los nutrientes y, por ende, su digestibilidad, o como materia prima para la elaboración de otras alternativas de alimentación como harinas y bloques

El cultivo de la caña de azúcar genera residuos agrícolas como el cogollo y hojas verdes (8 %), vainas y hojas secas (20 %), y subproductos industriales derivados de la manufactura, no solo de la panela sino también del azúcar tales como: el bagazo, el bagacillo, la cachaza, el melote, la melaza y la vinaza. Estos presentan diferentes características en cuanto a su composición química, como un alto contenido de fracciones de pared celular, alta concentración de sacarosa y otros azúcares solubles, bajos contenidos de proteína y minerales (**Figura 4**).

| Componente  | Cogollo | Bagazo | Cachaza | Melote |
|-------------|---------|--------|---------|--------|
| MS (%)      | 25,0    | 44,6   | 25,5    | 44,8   |
| H (%)       | 75,0    | 55,4   | 74,5    | 55,2   |
| CEN (%)     | 6,4     | 2,3    | 3,4     | 10,7   |
| MO (%)      | 93,6    | 97,7   | 96,6    | 89,4   |
| PC (%)      | 4,9     | 2,2    | 9,9     | 11,1   |
| EE (%)      | 0,7     | 0,4    | 7,6     | 4,9    |
| FC (%)      | 28,3    | 33,3   | 0,5     | 0,2    |
| FDN (%)     | 68,2    | 71,8   | -       | -      |
| FDA (%)     | 44,5    | 40,7   | -       | -      |
| HEMICEL (%) | 23,7    | 31,1   | -       | -      |
| CEL (%)     | 40,3    | 34,1   | -       | -      |
| LIG (%)     | 4,2     | 6,6    | -       | -      |
| N (%)       | 0,7     | 0,5    | 1,8     | 1,1    |
| P (%)       | 0,2     | 0,1    | 0,2     | 0,1    |
| K (%)       | 2,1     | 1,9    | 1,8     | 0,5    |
| Ca (%)      | 0,3     | 0,1    | 0,2     | 0,1    |
| Mg (%)      | 0,2     | 0,1    | 0,1     | 0,1    |
| S (%)       | 0,2     | 0,1    | 0,2     | 0,1    |
| Fe (mg/kg)  | 78,2    | 1241,3 | 1330,0  | 1078,9 |
| Cu (mg/kg)  | <3      | 4,1    | 28,6    | 32,4   |
| Mn (mg/kg)  | 34,1    | 36,1   | 45,2    | 45,1   |
| Zn (mg/kg)  | 26,0    | 11,0   | 93,5    | 59,0   |
| B (mg/kg)   | 1,6     | 1,9    | 2,1     | 4,5    |
| C (mg/kg)   | 45,6    | 47,8   | 56,7    | 58,3   |

MO: materia orgánica; HEMICEL: hemicelulosa; CEL: celulosa; LIG: lignina; N: nitrógeno; P: fósforo; K: potasio; Ca: calcio; Mg: magnesio; S: azufre; Fe: hierro; Cu: cobre; Mn: manganeso; Zn: zinc; B: boro; C: carbono / MO: organic matter; HEMICEL: hemicellulose; CEL: cellulose; LIG: lignin N: nitrogen; P: phosphorus; K: potassium; Ca: calcium; Mg: magnesium; S: sulfur; Fe: iron; Cu: copper; Mn: manganese; Zn: zinc; B: boron; C: carbon.

**Figura 4:** Composición química de distintos subproductos de la caña de azúcar.

### 3.4. Melaza de caña de azúcar

En la industrialización del azúcar orgánico se pueden obtener sub-productos que son comercializados o reutilizados. El más importante es la melaza orgánica que se emplea principalmente como suplemento en la alimentación animal, la producción de etanol (Baiano, 2014; Sguarezi *et al.*, 2009; Valli *et al.*, 2012) y la producción de levadura (El Pueblo de los Estados Unidos de América [USAID], 2010). La melaza es un líquido viscoso y oscuro de la remolacha azucarera (*Beta vulgaris var. Saccharifera*) o de la caña de azúcar (*Saccharum L.*) obtenida como el efluente final del refinamiento del azúcar que contiene componentes rentables como los carbohidratos fermentables (sacarosa, glucosa, fructosa) y considerables materiales orgánicos no azucarados (betaína, otros aminoácidos, minerales y oligoelementos, vitaminas, etc.). Por tales motivos la melaza de caña de azúcar constituye una fuente de carbono muy común y económica en comparación con otras fuentes de azúcar (Joshi *et al.*, 2008). La producción mundial anual de melaza de caña es de aproximadamente 60 millones de toneladas (América, Asia, África, Australia), mientras



que la producción mundial de melaza de remolacha es de aproximadamente 8 millones de toneladas («Molasses», 2017). Cabe destacar que, en Paraguay, se producen aproximadamente 80.000 toneladas por año de melaza de caña (Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria [IPTA], 2017).

El azúcar principal de la melaza de caña es la sacarosa, otros componentes de la melaza incluyen humedad, aminoácidos, ácidos orgánicos, compuestos inorgánicos, vitaminas y oligoelementos (Küçükaşık *et al.*, 2011). Es importante mencionar, que es una fuente de carbono de bajo costo para llevar adelante diferentes fermentaciones microbianas. La sacarosa en la melaza de caña puede hidrolizarse para producir glucosa y fructosa, que son adecuados para el crecimiento celular (Park *et al.*, 2018).

### **3.5. Producción de biomasa de microorganismos**

Los grandes avances en biotecnología industrial ofrecen oportunidades potenciales para la utilización económica de residuos agro-industriales para la producción de biomasa a partir de distintos microorganismos.

La producción de biomasa a partir de diversos microorganismos como algas, bacterias, levaduras y hongos filamentosos, cultivados en condiciones fermentativas adecuadas y con sustratos económicos, compuestos o enriquecidos con carbono, nitrógeno y fósforo parecen ser una alternativa inmediata de fuentes alimentarias para la nutrición animal. En un futuro pueden considerarse para consumo humano, ya que algunos de estos microorganismos son considerados probióticos que podrían destinarse para este fin (Chacón Villalobos, 2004). Diferentes bacterias del género *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, así como levaduras y hongos, entre los cuales figuran *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces carlbergiensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger* son considerados microorganismos probióticos (Hernández, Enrique; Borrell, 1993; Musa, Wu, Zhu, Seri, & Zhu, 2009), siendo estos tres últimos microorganismos fuente de proteína unicelular y probióticos en la alimentación, producción y sanidad animal de rumiantes y aves (Cortés-Sánchez *et al* 1990)

### **3.6. Bioreactores: Generalidades**

En la industria biotecnológica actual, los requerimientos para el diseño de un biorreactor difieren sustancialmente de aquellos de hace 50 años. Hoy en día las nuevas estrategias de cultivo permiten obtener alta densidad celular con altos rendimientos de productos biotecnológicos que

deben cumplir con elevados estándares de calidad y normatividad compleja en su producción (Trujillo Roldan, *et al*).

Durante años, los científicos han utilizado los frascos *Erlenmeyers* para el cultivo celular como centro del desarrollo de procesos a pequeña escala, con volúmenes que oscilan comúnmente entre los 10 mL y 500 mL. Estos cultivos a menudo se encuentran limitados por un control impreciso de la temperatura. Además, presentan otras limitaciones relacionadas con el intercambio gaseoso como la transferencia y consumo de oxígeno u otros gases. Por otra parte, son sensibles a pérdidas por evaporación en cultivos. Todo lo cual modifica la densidad del cultivo y limita operaciones de larga duración (Serrat & Méndez, 2015).

Un biorreactor es un recipiente en el cual existen condiciones controladas que permiten el desarrollo de una reacción mediante organismos vivos o sustancias bioquímicamente activas. La diversidad de procesos hace que haya varios tipos de biorreactores y que se puedan clasificar de distintas maneras.

A continuación, se describen los principales componentes de los biorreactores de escala laboratorio, planta piloto e industrial:

- *Jacket* o camisa térmica para control la temperatura
- Entrada de ácido y base para el control de pH
- Entrada de gases estériles: Estos gases pueden ser aire, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, entre otros
- Entrada aséptica para el inóculo, el medio o nutrientes concretos
- Filtro de ventilación: Suele ser una membrana hidrofóbica de 0.2 µm que permite evitar la contaminación externa y la emisión de células al medioambiente
- Agitador: Hay variabilidad de tipos y el número de paletas según las condiciones del cultivo
- Sondeas para análisis de parámetros (concentración de O<sub>2</sub>, pH, temperatura, etc)
- Entrada aséptica para muestreo y análisis de parámetros

Todos estos componentes tienen como objetivo mantener toda una serie de condiciones críticas en el ambiente del reactor. Estas condiciones son: pH, temperatura, nutrientes, agitación y oxígeno disuelto.

En función de la cinética de crecimiento del microorganismo existen diversos modos de operación o de cultivo en bioreactor, entre los cuales se destacan los siguientes:

- *Batch*: sistema de cultivo por el cual los microorganismos se inoculan en un volumen de medio de cultivo, se consumen progresivamente los nutrientes a la vez que se genera el producto, sin variación del volumen de cultivo.

- *Fed-Batch*: sistema de cultivo en el cual se inoculan los microorganismos y una vez consumida la fuente de carbono se añade la misma con un determinado flujo de alimentación a lo largo del tiempo. Este modo resulta especialmente interesante cuando hay una inhibición por sustrato y se desea aumentar el nivel de biomasa producido.
- Continuo: en este sistema de cultivo se añade medio de cultivo al biorreactor de manera continua, a la vez que se extrae medio con células y producto. Es factible que parte del medio extraído sea reingresado al bioreactor.

### 3.6.1. Tipos de Bioreactores

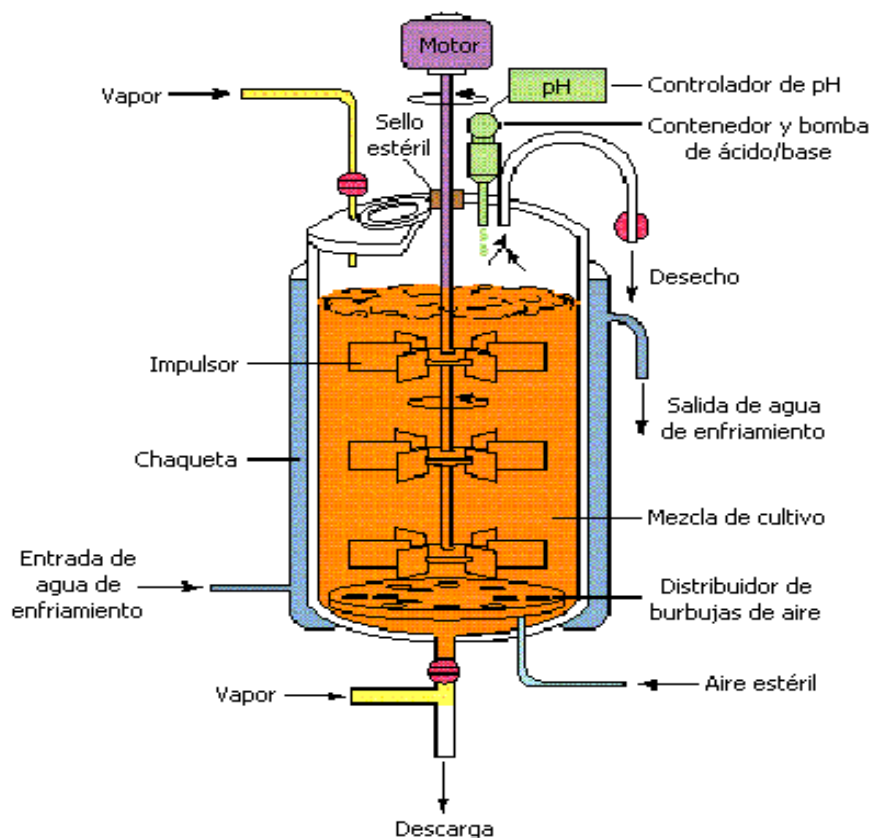
A continuación, se describen los principales tipos de biorreactores:

- Reactor de tanque agitado: puede operar en modo continuo o discontinuo. Está agitado mecánicamente por paletas e, idealmente, las condiciones del cultivo son las mismas en cualquier punto del biorreactor.
- Reactor de columna de burbujeo: este tipo de reactor no cuenta con agitación mecánica. Se consigue la homogeneidad inyectando gas por el fondo mediante un disco perforado o aireador. El gas al moverse por el líquido genera el mezclado del contenido del cultivo.
- Reactor de tipo *air lift*: en este caso tampoco hay agitación mecánica. El reactor tiene dos cilindros concéntricos y una entrada de gas en la parte inferior. El gas inyectado entre los dos cilindros circula generando corrientes ascendentes y descendentes de líquido, y saliendo por la parte superior. El líquido más pesado (sin burbujas de aire) se moverá de forma descendente por la parte exterior de los cilindros. De esta manera, las corrientes o flujo de líquido permiten la homogeneidad del cultivo.
- Reactor de lecho empaquetado: En este tipo de reactor el agente biológico (célula o enzima) se encuentra contenido en un soporte al cual puede llegar el sustrato para permitir así el crecimiento y formación de productos de interés.
- Reactor de lecho fluidizado: el biocatalizador está unido o contenido en algún tipo de soporte, pero en este caso el soporte se encuentra en suspensión en el medio de cultivo. Se requieren elevados flujos para conseguir una buena fluidización de las partículas del biocatalizador.

### 3.6.2. Bioreactor de tanque agitado

Los biorreactores de tanque agitado se han ido perfeccionando en busca del control más preciso para el desarrollo de fermentaciones de microorganismos, como así también de cultivos de células animales, estableciéndose como un estándar en la industria biotecnológica. El empleo de sensores en el interior del vaso, conectados a dispositivos de control automático, permite mantener los valores de temperatura, pH, oxígeno disuelto y otros parámetros de interés, dentro de los límites estrechos necesarios para el éxito de las fermentaciones y cultivos. Por otro lado, el empleo de sistemas eficientes de aireación y agitación garantiza niveles óptimos de transferencia de oxígeno y otros nutrientes. Dentro de estos, los biorreactores de pequeña escala han resultado vitales en procesos de escalado, para la optimización de distintos procesos de producción de bioinsumos de interés.

Tal como se describe en la **Figura 5**, los principales componentes de los biorreactores de tanque agitado son; el sistema de agitación con el *impeler* y las paletas, el sistema de aireación con el *sparger* o aireador y el sensor de oxígeno disuelto, el sistema de control de temperatura con la camisa térmica y el sistema de control de pH con su correspondiente sensor.



**Figura 5:** Partes de un biorreactor de tanque agitado

### 3.7. Generalidades de las levaduras

Las levaduras son organismos eucariotas unicelulares clasificados en el reino de los hongos. Los tamaños de las levaduras varían, dependiendo de la especie y el ambiente, y típicamente miden 3–4  $\mu\text{m}$  de diámetro, aunque algunas levaduras pueden crecer hasta 40  $\mu\text{m}$  de tamaño. Son quimiorganótrofas, ya que utilizan compuestos orgánicos como fuente de energía y no requieren luz solar para crecer.

Las levaduras pueden metabolizar diversos azúcares: hexosas como la glucosa, fructosa, galactosa o manosa, algunas pueden usar pentosas como la xilosa o arabinosa, disacáridos como la maltosa, sacarosa o lactosa; sin embargo, la glucosa y la fructosa son los sustratos preferidos. Las rutas metabólicas de las hexosas y disacáridos comparten las mismas vías, con la gran mayoría de los elementos metabólicos que surgen de los intermediarios de la glucólisis, el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y la ruta de las pentosas fosfato, y difieren sólo en los pasos básicos iniciales del metabolismo. El metabolismo de los azúcares puede ocurrir en un entorno anaeróbico o aeróbico. En el primer caso corresponde a la fermentación y en presencia de oxígeno a la respiración. El proceso más común es la asimilación de glucosa, generalmente conocida como Una de las vías metabólicas característica de las levaduras es la fermentación alcohólica, por la cual se asimila glucosa en condiciones anaeróbicas, generando etanol y  $\text{CO}_2$  como productos finales (Faria-Oliveira *et al.*, 2013).

Hoy en día, las levaduras se han convertido en microorganismos claves para muchos tipos de manufacturas industriales y de procesamiento de alimentos, incluida la producción de cerveza, vino, queso y pan. En particular, su uso en la industria de la panificación es bastante relevante debido al papel central del pan como producto dietético en todo el mundo. Además, las levaduras son consideradas con razonable interés como fuentes de nutrientes tanto para los humanos como para los animales (Faria-Oliveira *et al.*, 2013).

Las levaduras se encuentran en diversos ambientes naturales; colonizando desde ambientes terrestres hasta aéreos y acuáticos. Se pueden encontrar en frutas en descomposición, en los suelos o como patógenos oportunistas en los seres humanos. En general, contribuyen a la descomposición del material orgánico, y la colonización exitosa de las levaduras está íntimamente relacionada con su capacidad de adaptarse fisiológicamente a diversos medios. Hasta ahora, se han descrito aproximadamente 1500 especies. Las levaduras, al ser organismos heterotróficos, tienen la energía y el metabolismo del carbono operando en conjunto, es decir, el anabolismo se combina con el catabolismo. Su energía química, en forma de ATP, resulta de la oxidación de las moléculas

orgánicas y las células la utilizan como recurso energético. Por otro lado, esas moléculas orgánicas también pueden operar como fuentes de carbono para la biosíntesis. La diversidad ambiental de la levadura conduce a una gran complejidad metabólica, debido a la multiplicidad de carbono y las fuentes de energía disponibles en la naturaleza. Esto incluye polioles, alcoholes, ácidos orgánicos y aminoácidos, pero las levaduras metabolizan preferentemente azúcares (Faria-Oliveira *et al.*, 2013)

### 3.7.1. *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *S. cerevisiae* es probablemente uno de los microorganismos más ampliamente utilizados por el ser humano a través del tiempo. Su nombre deriva del vocablo *Saccharo* (azúcar), *myces* (hongo) y *cerevisiae* (cerveza). Es una levadura heterótrofa, que obtiene la energía a partir de la glucosa principalmente y tiene una elevada capacidad fermentativa.

Es una levadura que presenta colonias de color crema o blanca si se cultivan en medio de cultivo rico YPD y muestra una apariencia húmeda y brillante con bordes irregulares. La temperatura óptima de crecimiento varía entre los 25 a 30°C. Sus dimensiones son de 2,5-10 micras de ancho y 4,5-21 micras de largo y en el microscopio se las pueden observar con formas redondas y ovoides, elipsoides, a veces cilíndricas y filamentosas (Fajardo y Sarmiento, 2007).

El uso más extendido es en la panificación y en las industrias de fabricación de cervezas, vinos y alcohol. Esta levadura es una de las especies considerada como microorganismo GRAS, por lo que ha sido aprobada para su uso como aditivo alimentario (Anadón, Martínez-Larrañaga, & Aranzazu Martínez, 2006).

La *S. cerevisiae* fresca consta de aproximadamente 30–33% de materiales secos, 6,5–9,3% de nitrógeno, 40,6–58,0% de proteínas, 35,0–45,0% de carbohidratos, 4,0–6,0% de lípidos, 5,0–7,5% de minerales y diversas cantidades de vitaminas, dependiendo de sus condiciones de crecimiento. Por lo tanto, hoy las levaduras están adquiriendo cada vez más atención para otros usos, además de la producción de bebidas alcohólicas, como por ejemplo la fabricación de alimentos funcionales (para animales, peces y humanos), suplementos alimenticios saludables, incluidos aditivos, acondicionadores y agentes aromatizantes, como productos farmacéuticos, para la producción de medios de cultivo etc. (Faria-Oliveira *et al.*, 2013).

Conocer el comportamiento habitual de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* permite establecer los valores de las variables de proceso que condicionan los parámetros de operación y diseños de equipos. Ciertos efectos como el efecto Pasteur, que es un efecto de inhibición de la fermentación alcohólica debido a la participación de oxígeno, y el efecto Crabtree, que describe el

fenómeno a través del cual la levadura *Saccharomyces cerevisiae* produce etanol en condiciones aerobias y con una gran concentración de glucosa externa en lugar de producir biomasa mediante el ciclo de Krebs, se manifiestan de forma natural en este peculiar microorganismo.

### 3.7.2. *Kluyveromyces marxianus*

El microorganismo *K. marxianus* es una levadura haploide, homotálica, termotolerante (hasta 52°C), hemiascomicética, fermentativo facultativo (van Dijken *et al.* 1993) y de fuerte carácter *Crabtree* negativo, es decir, la concentración elevada de glucosa no afecta su metabolismo respiratorio. Este microorganismo tiene un metabolismo preferencial hacia el ciclo TCA y la generación óptima de energía. Sin embargo, es capaz de llevar a cabo fermentación y respiración simultáneas y el equilibrio preciso entre estas vías es específico de la cepa. Al considerar su metabolismo, es notable que *K. marxianus* tiene una de las tasas de crecimiento más rápidas de cualquier microorganismo eucariota, por ejemplo, un estudio en quimiostato registró la tasa de crecimiento específico ( $\mu_{\text{máx}}$ ) de *K. marxianus* CBS 6566 como 0,6 h<sup>-1</sup> (tiempo de duplicación de 70 min). Además, debido a su asociación larga y segura con los alimentos, es un organismo GRAS (generalmente considerado como seguro) en los EE. UU, y está en la lista QPS (presunción calificada de seguridad) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. (Groeneveld *et al.*, 2009).

Para su aplicación en fermentación, los rasgos más atractivos de *K. marxianus* son la termotolerancia y la capacidad de asimilación de pentosas; y es importante tener en cuenta que esta levadura no puede crecer bajo condiciones estrictamente anaeróbicas y que la producción de etanol está relacionada con la limitación de oxígeno (Visser *et al.*, 1990; van Dijken *et al.*, 1993; Bellaver *et al.*, 2004). La levadura termotolerante *K. marxianus* presenta capacidad de concretar la fermentación de diversos azúcares como la glucosa, manosa, galactosa, xilosa y arabinosa, produciendo etanol a partir de todos estos azúcares, excepto con la arabinosa bajo condición de agitación, pero a partir de azúcares de hexosa bajo condición estática (Rodrussamee *et al.*, 2011). La asimilación de xilosa en *K. marxianus* requiere absolutamente del metabolismo respiratorio y/o fosforilación oxidativa, mientras que la asimilación de la glucosa requiere del metabolismo fermentativo con el cual se genera etanol.

### 3.7.3. Empleo de levaduras como probióticos

Los probióticos son suplementos alimenticios microbianos que afectan beneficiosamente al animal huésped debido a que mejoran su equilibrio microbiano intestinal. Los probióticos son

capaces de mejorar la conversión alimenticia del animal, reducir la morbilidad o mortalidad y aportar beneficios para el consumidor a través de una mejor calidad del producto (Musa *et al.*, 2009). Para la alimentación animal se basan en las propiedades benéficas que se les atribuyen al mejorar la eficiencia de conversión alimenticia, promoción del crecimiento, reducción del número de bacterias coliformes y patógenos intestinales. Además, pueden ser sustitutos de terapias con antibióticos por métodos menos agresivos que con lleven a una mejor salud animal, producción y fuente de alimentos destinados al consumo humano (Rosmini *et al.*, 2004).

El rumen presenta una ecología microbiana compleja, donde los polisacáridos y proteínas ingeridos por los animales rumiantes son degradados por los microorganismos del rumen, lo que resulta en la síntesis de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) y proteínas microbianas, que el huésped utiliza como fuentes de energía y proteínas. Existe un creciente interés internacional en manipular el ecosistema ruminal para aumentar la eficiencia de los procesos de fermentación ruminal para mejorar la productividad animal y reducir los subproductos no deseados, como el metano.

La levadura *S. cerevisiae* es un probiótico de uso común en rumiantes (Chaucheyras-Durand, Walker, & Bach, 2008), que afecta principalmente la dinámica de la población microbiana en el rumen y la descomposición de nutrientes. Las bacterias productoras de ácido láctico son otro grupo importante de probióticos. Además del uso de probióticos en alimentos formulados para animales, las bacterias beneficiosas utilizadas como inoculantes también pueden tener efectos probióticos en el rumen (Weinberg, Muck, Weimer, Chen, & Gamburg, 2004). Sin embargo, este efecto depende de la supervivencia del inoculante en el ensilaje a medida que baja el pH.

El objetivo principal de la suplementación de alimentos para animales con levaduras es tratar de mejorar la utilización de nutrientes que conducen a un mayor crecimiento y productividad animal. Las levaduras presentan la capacidad de mejorar el ecosistema ruminal de dos maneras: mediante la producción directa de enzimas digestivas, y, estimulando el crecimiento y la función beneficiosa de la microbiota. Asimismo, las levaduras presentan la capacidad de producir metabolitos, que estimulan el crecimiento de los acetógenos o bacterias acetogénicas del rumen y los compuestos antimicrobianos que inhiben los posibles patógenos. El impacto probiótico de las levaduras en los animales depende de diferentes factores de interacción, incluida la raza animal, la dosis suplementada, el tipo, la dieta, la cepa, la etapa fisiológica y el sistema de alimentación. En situaciones donde la alimentación tradicional del ganado tiene un alto costo en todo el mundo, las levaduras utilizadas como probióticos ofrecen una estrategia nutricional útil que permite aumentar la



digestibilidad de la dieta y, en consecuencia, mejora el rendimiento en los rumiantes de manera rentable (Ghazanfar, Khalid, Ahmed, & Imran, 2017).

#### **3.7.4. Producción de biomasa de levaduras**

A partir de diversos trabajos se ha optimizado la producción de biomasa de levaduras mediante el crecimiento de distintas especies. Para la generación de biomasa de levaduras es posible el empleo de especies como *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefyr* o *Saccharomyces cerevisiae*. Estas especies presentan una amplia aceptación en la industria tanto para la alimentación animal y humana, lo que resulta en una gran ventaja para su utilización (Liti *et al.* 2001).

La biomasa de levadura *Saccharomyces* es el segundo subproducto principal de la industria cervecera. Puede ser valiosa como materia prima con diferentes usos, sin embargo, en este sentido se la puede utilizar para alimentación de cerdos y rumiantes. Las levaduras poseen diversas propiedades que las hacen sobresalientes para uso industrial y especialmente para la industria cervecera, incluyendo: el crecimiento rápido, la buena capacidad para producir etanol y la tolerancia a estreses ambientales como la alta concentración de etanol y niveles bajos de oxígeno. Su uso aún es limitado, siendo básicamente utilizado más comúnmente como alimento seco para animales. Sin embargo, puede ser valioso como material crudo con diferentes usos. En la actualidad la producción de biomasa de levaduras, especialmente de *Saccharomyces cerevisiae*, es muy utilizada en procesos biotecnológicos, como por ejemplo en procesos fermentativos para la producción de compuestos de valor agregado como el etanol; como sustrato para cultivo de microorganismos, o simplemente materia prima para la extracción de compuestos (Ferreira *et al.*, 2010)

## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1. Cepas y medios de cultivo**

Para llevar a cabo este trabajo se utilizaron las siguientes cepas de levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Kluyveromyces marxianus* DSM 11954. Para el crecimiento de las cepas se utilizó el medio de cultivo rico YPD compuesto por extracto de levadura (10 g/L), peptona de carne (20 g/L) y dextrosa (20 g/L). Asimismo, se utilizó el medio alternativo a base de melaza de caña de azúcar (41,4 mL/L), suplementado con sulfato de amonio (8,25 g/L), cloruro de potasio (2,5 g/L), fosfato de monoamónico (0,85 g/L), sulfato de magnesio (0,3 g/L), hidróxido de amonio (1 mL/L) y ácido fosfórico (2,5 mL/L).

### **4.2. Puesta a punto y validación de los métodos analíticos**

La validación de un método es el proceso para definir un requisito analítico, y la confirmación de que cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas. Para ello, es importante validar los métodos durante los ensayos de laboratorio de tal manera que para obtener un resultado analítico, éste sea apto para su uso; lo suficientemente confiable y pueda ser tomado con un determinado nivel de confianza ya que si el resultado de un análisis no genera confianza, entonces se puede decir que tiene poco valor (Eurolab España, 2016).

La puesta a punto y validación de los métodos de cuantificación de glucosa y de azúcares reductores se realizaron aplicando los ensayos de Linealidad, Precisión y Veracidad que se describen a continuación:

#### **4.2.1. Ensayo de Linealidad**

La Linealidad es la capacidad de un método analítico de obtener resultados proporcionales a la concentración del analito en una muestra dentro de un intervalo determinado (Duffau *et al.*, 2010).

Para este ensayo fueron preparadas por triplicado 5 concentraciones independientes de cada estándar de forma que abarque el rango lineal de absorbancia del espectrofotómetro. Las concentraciones utilizadas para el método de cuantificación de glucosa fueron: 0,25 g/L; 0,5 g/L; 1 g/L; 2 g/L y 4 g/L, utilizando como material de referencia: Dextrosa Anhidra (Anedra, lote: 28910-1). Las concentraciones utilizadas para el método de cuantificación de azúcares reductores fueron:

0,25 g/L; 0,5 g/L; 1 g/L; 2 g/L y 4 g/L utilizando como material de referencia: Dextrosa Anhidra (Anedra, lote: 28910-1).

Las soluciones de los estándares fueron analizadas aplicando el correspondiente método de cuantificación, de tal manera a obtener las curvas de calibración tanto de glucosa como también de azúcares reductores.

#### **4.2.2. Ensayo de Precisión**

Precisión es una medida de cuán cerca están los resultados entre sí, es generalmente dependiente de la concentración del analito, y debe determinarse en una serie de concentraciones a través del intervalo de interés (Eurolab España, 2016).

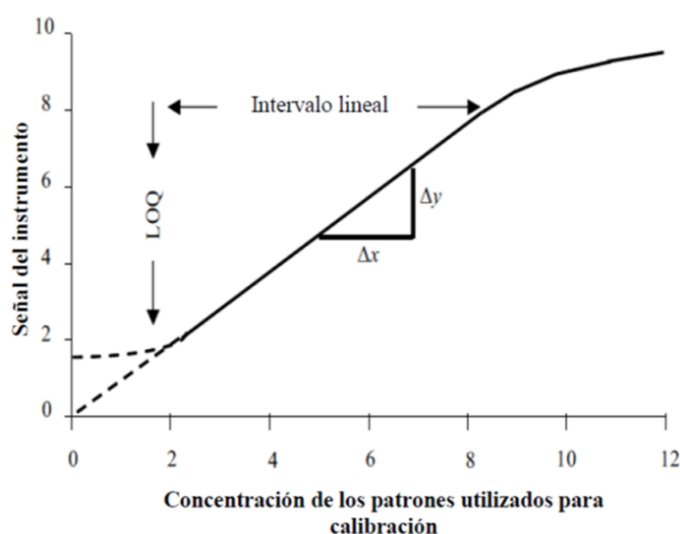
Se prepararon soluciones testigos para ser analizadas con los respectivos métodos de cuantificación. Tanto para el método de cuantificación de glucosa como para la cuantificación de azúcares reductores se utilizó una solución testigo de glucosa (D (+)-Glucosa, Merk, lote: K46890337 541) con una concentración de 1,5 g/L. Fueron analizadas 10 réplicas de cada solución testigo en dos días diferentes, aplicando las correspondientes curvas de calibración realizadas a partir de cada estándar.

#### **4.2.3. Ensayo de Veracidad**

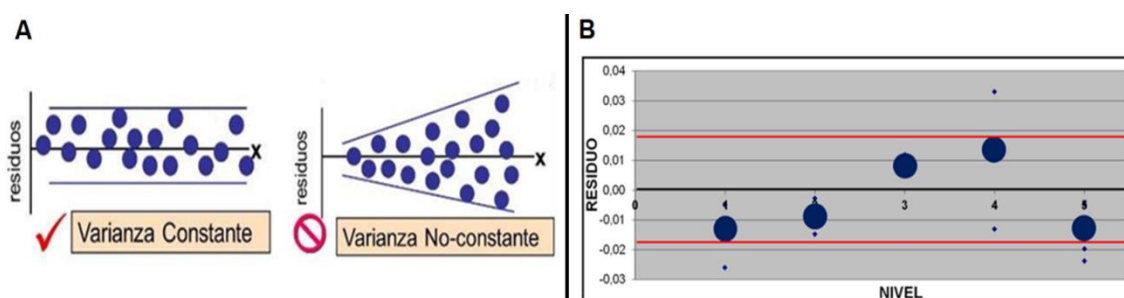
La veracidad es una expresión de la proximidad de la media de un número de resultados (obtenidos por el método) a un valor de referencia, es decir, es útil para describir la calidad de las mediciones (Eurolab España, 2016).

Para el método de cuantificación de glucosa se prepararon por quintuplicado soluciones de concentración conocida del analito (1,5 g/L de dextrosa anhidra, Anedra, lote: 28910-1), empleando como solvente al medio de cultivo (matriz). Luego se analizaron las soluciones con el método de cuantificación correspondiente aplicando la curva de calibración realizada con el respectivo estándar, con el fin de determinar el porcentaje de recuperación del analito. Tanto para la cuantificación de glucosa como para la concentración de azúcares reductores se prepararon soluciones de glucosa de 1,5 g/L de concentración. Las soluciones fueron preparadas en medio YP (extracto de levadura 10 g/L, peptona de carne 20 g/L), utilizando los mismos lotes de reactivos que para el ensayo de Precisión.

Para evaluar los resultados de la validación de los métodos de cuantificación con el ensayo de Linealidad se calculó el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) correspondiente a un modelo de ajuste lineal (Figura 6). Esto permite evaluar el comportamiento lineal del método en el rango de absorbancia de trabajo del espectrofotómetro, tomando como criterio de aceptación un  $R^2$  mayor o igual a 0,995. Además, se analizó la homocedasticidad de los residuos para comprobar la ausencia de tendencia de la absorbancia medida a través del cambio de la concentración evaluada (Figura 7).



**Figura 6: Esquema de un modelo de ajuste lineal.** Los ensayos espectrofotométricos aplican a la ley de Lambert-Beer, es decir que presentan una relación lineal entre la concentración en la muestra y la absorbancia de la misma. El rango lineal se establece entre el límite de cuantificación (LOQ) y la concentración a la cual la absorbancia comienza a saturar.



**Figura 7: Esquema de la distribución de residuos.** (A) Representación esquemática del análisis de la homocedasticidad de los residuos. Con la homocedasticidad se evalúa si la varianza entre el valor predicho y el observado es o no constante a lo largo de las observaciones. (B) Ejemplo de cómo se observaría el resultado de la distribución de residuos para el ensayo de linealidad, en donde las réplicas analizadas se visualizan como un punto promedio.

Asimismo, para el ensayo de Precisión se evaluó la dispersión en condiciones de repetibilidad y/o reproducibilidad, para lo cual se calculó la desviación estándar residual porcentual (RSD%) según la Ecuación 1.

$$\text{Ecuación 1} \quad \text{RSD\%} = (S / \bar{X}) * 100$$

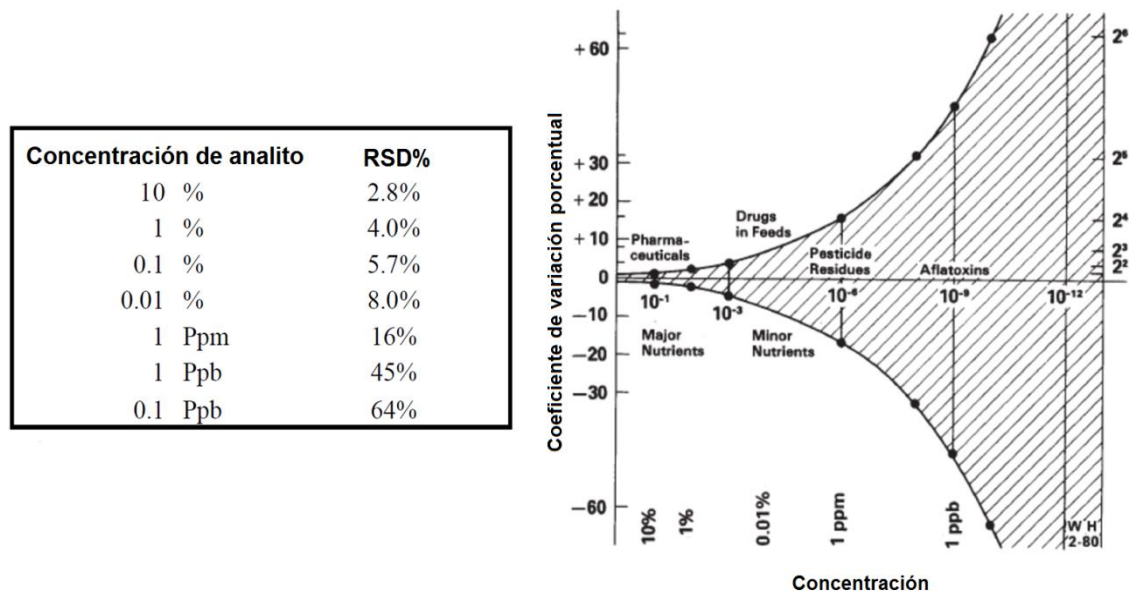
Dónde:

S es la desviación estándar entre las mediciones.

$\bar{X}$  es el promedio de las mediciones.

Según las concentraciones de trabajo (C) utilizadas se estableció un criterio de RSD% menor a 5 % entre las 10 réplicas realizadas (Figura 8), este valor se calculó aplicando la ecuación de Horwitz (Ecuación 2).

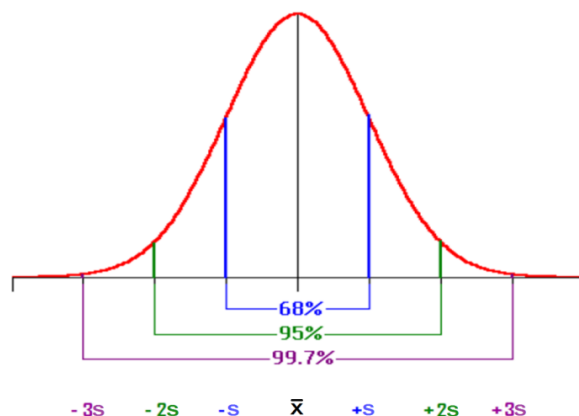
$$\text{Ecuación 2} \quad \text{RSD\%} = 2 (1 - 0,5 * \log C)$$



**Figura 8: Variación esperada según la concentración de analito evaluada.** La tabla muestra valores de desviación estándar residual porcentual obtenidos a partir de la ecuación de Horwitz para diferentes concentraciones de analito. El gráfico corresponde a la curva original de Horwitz Horn la cual muestra la dependencia de la dispersión con la concentración de analito. (Rivera & Rodriguez, 2010).

Además, los resultados obtenidos en el ensayo de Precisión para cada método se utilizaron para construir los gráficos de control de valor medio, determinando para ello el promedio ( $\bar{X}$ ) y la

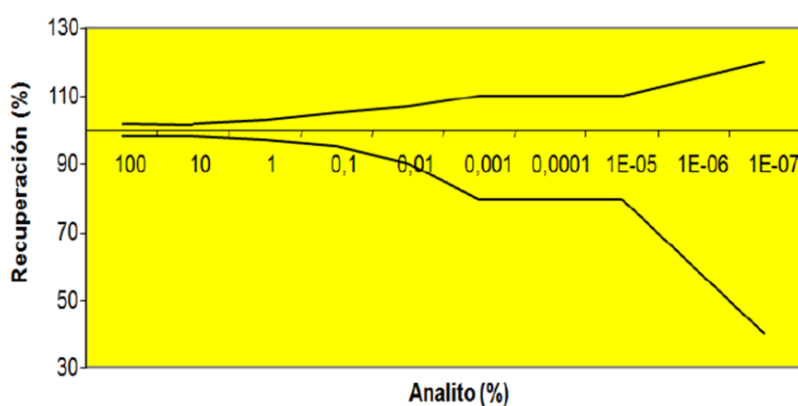
desviación estándar (S) de las 10 determinaciones realizadas. Con estos valores se calcularon los límites de alarma ( $\bar{X} \pm 2S$ ) y los límites de control ( $\bar{X} \pm 3S$ ) correspondiente a una distribución normal (Figura 9).



**Figura 9: Distribución normal de valor medio (Campana de Gauss).** La figura muestra la probabilidad de que un valor ( $X_o$ ) se ubique en los intervalos comprendidos por la desviación estándar (S). En un gráfico de control de valor medio se espera que el 95 % de los resultados se encuentre dentro de los límites de alarma ( $LA = \bar{X} \pm 2S$ ) y el 99,7 % dentro de los límites de control ( $LC = \bar{X} \pm 3S$ ).

Por último, para el ensayo de Veracidad (Figura 10) se calculó la recuperación del analito mediante el cálculo del porcentaje de recuperación de una concentración conocida de analito preparada en la matriz de cultivo (Ecuación 3). Se estableció como valor de aceptación un porcentaje de recuperación entre el 95 % y el 105 % (Duffau *et al.*, 2010).

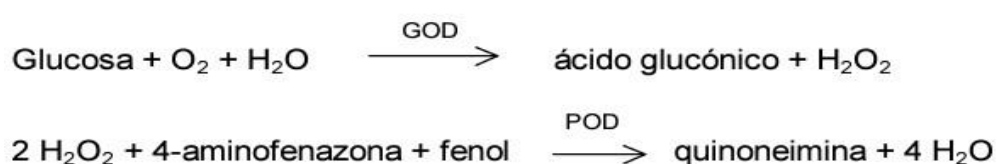
$$\text{Ecuación 3} \quad \% \text{ Recuperación} = (\text{analito medido} / \text{analito esperado}) * 100$$



**Figura 10: Recuperación esperada según la concentración de analito evaluada.** El gráfico muestra la dependencia del porcentaje de recuperación con la concentración de analito analizada (AOAC, 2012).

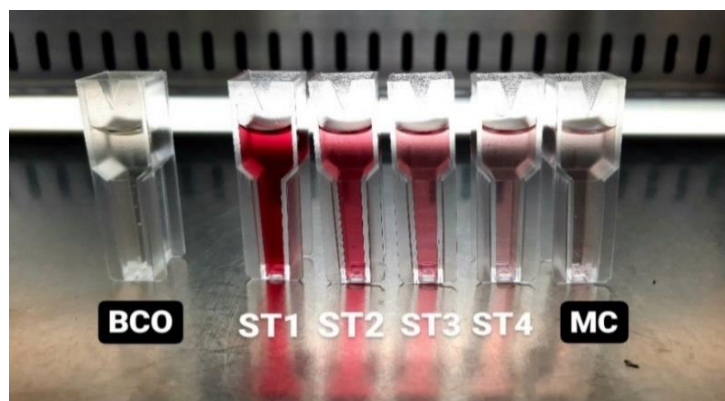
### 4.3. Método de cuantificación de glucosa

La cuantificación de glucosa se realizó utilizando el método enzimático de determinación de glicemia. La glucosa se determina a partir de su oxidación enzimática en presencia de la enzima glucosa oxidasa (GOD). El peróxido de hidrógeno formado reacciona bajo la catálisis de la peroxidasa (POD) con fenol y 4-aminofenazona formando un complejo rojo-violeta, la quinoneimina, el cual se mide a 500 nm (Human Diagnostics Worldwide, n.d.). La Figura 11 detalla las reacciones correspondientes al método enzimático de cuantificación de glucosa.



**Figura 11: Esquema de las reacciones del método de cuantificación de glucosa.** Reacciones indicando cómo se genera, a partir de glucosa, el compuesto final coloreado medible espectrofotométricamente a 500 nm.

Para dicha cuantificación de glucosa se utilizó el reactivo enzimático provisto por el kit comercial de glicemia enzimática de Human. A partir de una solución stock de 4 g/L de glucosa estándar (Dextrosa Anhidra, Anedra, lote: 28910-1) se realizaron diluciones seriadas al medio para obtener los siguientes 4 puntos de calibración: 0,5 g/L, 1 g/L, 2 g/L y 4 g/L de glucosa. Se evaluó una solución testigo de glucosa 1,5 g/L (D (+)-Glucosa, Merk, lote: K46890337 541) como control del ensayo. Asimismo, las muestras a analizar se evaluaron en una dilución tal que su concentración estuviese entre 1 y 2 g/L de glucosa. Además, se preparó un blanco correspondiente a la matriz analizada, sin agregado de glucosa. También se utilizó agua destilada como blanco de reacción de los estándares y del testigo. Para llevar a cabo la reacción de cuantificación, se colocaron en cubetas 20 µL de las soluciones preparadas anteriormente (estándares, muestras, testigo y blancos) y se agregó 2 mL del reactivo provisto por el kit. Seguidamente se incubaron los tubos a 25°C durante 10 min, luego se midió la absorbancia a 500 nm en espectrofotómetro (Thermo scientific, modelo GENESYS 10s UV-VIS). La Figura 12 muestra las soluciones luego de las reacciones de este método para las distintas concentraciones del estándar, testigo (muestra control) y blanco de reacción. La puesta a punto y validación de esta metodología se realizó aplicando los ensayos de Linealidad, Precisión y Veracidad descriptos previamente. Asimismo, para otorgar validez al ensayo, se construyó un gráfico de control de valor medio utilizando los valores obtenidos con el ensayo de Precisión.



La **Figura 12 Soluciones correspondientes al método de cuantificación de glucosa**. Se muestran las soluciones luego de las reacciones a partir de las cuales se genera quinonimina coloreada. BCO, corresponde al blanco de reacción (agua); ST, corresponden a los niveles de calibración (diferentes concentraciones de estándar); MC, corresponde a la muestra control o testigo (solución de glucosa 1,5 g/L).

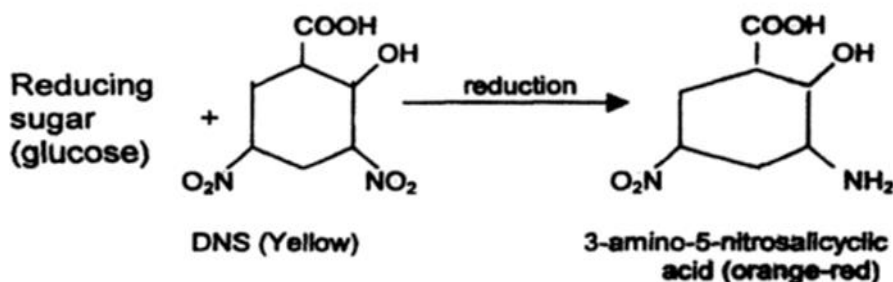
#### 4.4. Método de cuantificación de azúcares reductores

La cuantificación de azúcares reductores se basa en la reacción con el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), donde se produce su reducción a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, resultando en un complejo de color naranja-rojizo cuantificable espectrofotométricamente a 540 nm (Bello Gil *et al* 2006). Para llevar a cabo este ensayo colorimétrico se pesaron 5 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico, 150 g de tartrato de sodio y potasio y 8 g de NaOH. Se disolvió el NaOH en 200 mL de agua destilada y se añadió en agitación el tartrato de sodio y potasio lentamente. Se completó con H<sub>2</sub>O destilada hasta 400 mL y se añadió lentamente el ácido 3,5 dinitrosalicílico. La mezcla se dejó en agitación toda la noche, se enrasó hasta 500 mL y posteriormente fue filtrado.

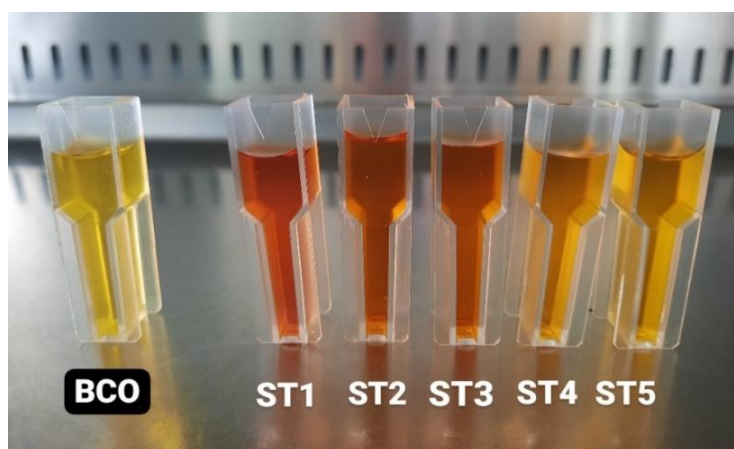
A partir de una solución stock de 4 g/L de glucosa estándar (D (+)-Glucosa, Merk, lote: K46890337 541) se realizaron diluciones seriadas al medio para obtener los siguientes 4 puntos de calibración: 0,5 g/L, 1 g/L, 2 g/L y 4 g/L de glucosa. Una solución testigo de glucosa de 1,5 g/L (Dextrosa Anhidra, Anedra lote: 28910-1) se analizó como control del ensayo. Asimismo, las muestras a analizar se evaluaron en una dilución tal que su concentración estuviese entre 1 y 2 g/L. Para llevar a cabo la reacción de cuantificación, se colocaron en tubos de ensayo 500 µL de las soluciones preparadas anteriormente (estándares, muestras, testigo y blancos). Luego en los tubos se agregó 500 µL del reactivo DNS, se agitaron con vórtex y se incubaron a 100°C en baño termostatzado durante 5 min. Seguidamente, los tubos se enfriaron en baño de agua y se añadieron 5 mL de agua destilada, se transvasó el contenido a cubetas y la absorbancia fue medida a 540 nm en el espectrofotómetro. Las muestras, estándares y el testigo se analizaron por duplicado. La Figura 13 describe la reacción de reducción correspondiente a este método de cuantificación de azúcares



reductores. Asimismo, la Figura 14 muestra las soluciones luego de aplicar este método a las distintas concentraciones del estándar, testigo y blanco de reacción. La puesta a punto y validación de esta metodología se realizó aplicando los ensayos de Linealidad, Precisión y Veracidad descriptos previamente. Para otorgar validez al ensayo, se construyó un gráfico de control de valor medio utilizando los valores obtenidos con el ensayo de Precisión.



**Figura 13: Esquema de la reacción del método de cuantificación de azúcares reductores.** Reacción de reducción del ácido 3,5 dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitro salicílico (compuesto de color naranja-rojizo) en presencia de azúcares reductores. Goel, R. (2007). Laboratory Techniques in Sericulture.



**Figura 14: Soluciones correspondientes al método de cuantificación de azúcares reductores.** Se muestran las soluciones luego de la reacción de reducción a partir de la cual se genera ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (color naranja-rojizo). BCO, corresponde al blanco de reacción; ST, corresponden a los niveles de calibración (diferentes concentraciones de estándar).

#### 4.5. Determinación de la relación entre densidad óptica y peso seco de la biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Kluyveromyces marxianus* DSM 11954

Stocks en glicerol de las levaduras *S. cerevisiae* ATCC 9763 y *K. marxianus* DSM 11954 fueron utilizados para sembrar placas de Petri con YPD agar (extracto de levadura (10 g/L), peptona de carne (20 g/L), glucosa (20 g/L), agar-agar (20 g/L)), incubando las placas a 30°C por 48 h. A

partir de la biomasa crecida en las placas, se inocularon frascos *Erlenmeyer* de 100 mL conteniendo 20 mL de medio complejo YPD (extracto de levadura (10 g/L), peptona de carne (20 g/L), glucosa (20 g/L)). Los frascos *Erlenmeyer* se incubaron en un *shaker* durante 30 h a 28°C y 250 rpm. A partir de la biomasa de los cultivos líquidos se realizaron diluciones seriadas con agua destilada, a las cuales se les determinó la densidad óptica midiendo la absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro. Asimismo, un volumen de 500 µL de cada una de las diluciones fueron centrifugadas en tubos *Eppendorf* a 5000 rpm durante 20 min. Luego, se descartaron los sobrenadantes y los precipitados celulares se llevaron a sequedad total en una estufa a 60°C hasta peso constante. Se determinó el peso seco de la biomasa y se expresó en g/L. A partir de estos valores se construyeron las curvas de calibración entre la densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) y el peso seco de biomasa (g/L) de las cepas de *S. cerevisiae* ATCC 9763 y de *K. marxianus* DSM 11954.

#### **4.6. Evaluación del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Kluyveromyces marxianus* DSM 11954 en medio YPD**

Cultivos de *S. cerevisiae* ATCC 9763 y *K. marxianus* DSM 11954 realizados en frascos *Erlenmeyer* conteniendo medio YPD con 24 h de incubación a 28°C y 250 rpm, fueron utilizados para inocular por duplicado frascos *Erlenmeyer* de 250 mL conteniendo 50 mL de medio YPD (relación volumen frasco/volumen líquido de 5:1, condición aeróbica). Estos frascos se incubaron en *shaker* a 28°C y 250 rpm durante 72 h para ambas cepas de *S. cerevisiae* ATCC 9763 y *K. marxianus* DSM 11954. Se tomaron muestras a distintos tiempos de incubación para medir la densidad óptica a 600 nm y determinar el nivel de biomasa en g/L. Asimismo, a partir de las distintas muestras se determinó la concentración de glucosa y de azúcares reductores mediante los métodos descritos anteriormente. Esta cuantificación se realizó a partir de los sobrenadantes de cultivo obtenidos por centrifugación a 5000 rpm durante 20 min.

A partir de estos cultivos se determinaron los siguientes parámetros cinéticos y estequiométricos de *S. cerevisiae* ATCC 9763 y *K. marxianus* DSM 11954 en YPD: velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), velocidad volumétrica de consumo de glucosa y de azúcares totales ( $r_s$ ), velocidad específica de consumo de glucosa y de azúcares totales ( $q_s$ ), rendimiento de biomasa en función del sustrato consumido ( $Y_{x/s}$ ) y productividad volumétrica de biomasa ( $P_v$ ) y productividad volumétrica máxima de biomasa ( $P_{v_{max}}$ ).

#### **4.7. Adaptación de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Kluyveromyces marxianus* DSM 11954 en medio de cultivo alternativo**

Para efectuar la adaptación de las levaduras *S. cerevisiae* ATCC 9763 y *K. marxianus* DSM 11954 se realizaron cultivos sucesivos en frascos *Erlenmeyer* conteniendo el medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña de azúcar. Los pasajes sucesivos de los cultivos efectuados en pos de conseguir la adaptación de las levaduras se realizaron en medios con la siguiente composición:

1. 100% medio YPD
2. 75% medio YPD, 25% melaza de caña
3. 50% medio YPD, 50% melaza de caña
4. 25% medio YPD, 75% melaza de caña
5. 100% melaza de caña

Los cultivos de los pasajes sucesivos se realizaron en *shaker* a 30°C y 250 RPM de agitación. Se tomaron muestras de los cultivos en los distintos pasajes realizados, en pos de medir la densidad óptica a 600 nm y evaluar de esta manera la adaptación de las levaduras en el medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña.

#### **4.8. Evaluación del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Kluyveromyces marxianus* DSM 11954 en medio de cultivo alternativo**

Luego del proceso de adaptación, se realizaron cultivos en frascos *Erlenmeyer* conteniendo medio de cultivo a base de melaza de caña al 100% bajo condiciones aeróbicas, para evaluar el crecimiento de *S. cerevisiae* ATCC 9763 y *K. marxianus* DSM 11954, comparándolos con el crecimiento en medio YPD.

Para tal fin, cultivos líquidos de ambas levaduras fueron utilizados para inocular por duplicado frascos *Erlenmeyer* de 250 mL conteniendo 50 mL de medio a base de melaza de caña, con una relación volumen frasco/volumen líquido de 5:1 (condición aeróbica). Estos frascos se incubaron en *shaker* a 28°C y 250 rpm durante 72 h, se tomaron muestras a distintos tiempos de incubación para medir la densidad óptica a 600 nm y determinar el nivel de biomasa en g/L. Asimismo, a partir de las muestras se determinó la concentración de glucosa y de azúcares reductores mediante los métodos descriptos anteriormente. Esta cuantificación se realizó a partir de los sobrenadantes de cultivo obtenidos por centrifugación a 5000 rpm durante 20 min. A partir de estos cultivos se determinaron los siguientes parámetros cinéticos y estequiométricos de *S. cerevisiae* ATCC 9763 y *K. marxianus*

DSM 11954 en el medio alternativo: velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), velocidad volumétrica de consumo de glucosa y de azúcares totales ( $r_s$ ), velocidad específica de consumo de glucosa y de azúcares totales ( $q_s$ ), rendimiento de biomasa en función del sustrato consumido ( $Y_{X/S}$ ) y productividad volumétrica de biomasa ( $P_v$ ) y productividad volumétrica máxima de biomasa ( $P_{v_{max}}$ ).

#### 4.9. Fermentaciones en bioreactor de tanque agitado escala laboratorio

La producción de biomasa de las levaduras *S. cerevisiae* ATCC 9763 y *K. marxianus* DSM 11954 mediante fermentaciones en bioreactor de tanque agitado a escala laboratorio se realizó, primeramente, utilizando medio de cultivo YPD. Luego, se procedió a realizar fermentaciones en bioreactor utilizando el medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña. Para tal fin, se utilizaron las cepas de *S. cerevisiae* ATCC 9763 y *K. marxianus* DSM 11954 adaptadas previamente al medio de cultivo a base de melaza de caña. Las fermentaciones se realizaron en un bioreactor de tanque agitado de 2 L (BioFlo 120, Eppendorf, Figura 15), el cual opera en interface con el software *BioCommand®* and *DASware®* SCADA para la adquisición de datos y control de parámetros.



**Figura 15:** Bioreactor de tanque agitado BioFlo 120 de Eppendorf.

Para llevar a cabo las fermentaciones en bioreactor se partió de cultivos de *S. cerevisiae* ATCC 9763 y *K. marxianus* DSM 11954 realizados en *Erlenmeyer* de 1 L conteniendo 80 mL de los medios de cultivos mencionados, es decir YPD y medio a base de melaza de caña. Todos los cultivos fueron incubados en *shaker* durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. Estos cultivos se utilizaron para inocular el bioreactor conteniendo 800 mL de los medios de cultivo y así iniciar las fermentaciones bajo condiciones óptimas. El bioreactor mencionado permite controlar los distintos parámetros del

proceso fermentativo: Oxígeno disuelto, pH, temperatura, agitación, nivel de espuma y alimentación. Así, el sensado de la concentración de oxígeno disuelto se realizó a través de una sonda polarográfica (Mettler-Toledo) y el pH del cultivo fue determinado utilizando un electrodo de pH (Mettler-Toledo). La cantidad de oxígeno disuelto fue regulada mediante agitación mecánica y suministro de aire estéril. Asimismo, el valor de pH se reguló por medio del agregado automático de NaOH (3 M) y HCl (3 M). Además, dicho bioreactor permitió controlar la temperatura y mantener constante su valor óptimo. La formación de espuma se evitó mediante la adición automática de aceite de maíz (3 mL/L) estéril.

Mediante el software *BioCommand®* and *DASware® SCADA* se registraron de modo *on-line* los siguientes parámetros de los procesos fermentativos: agitación (rpm), oxígeno disuelto (% O<sub>2</sub>d), pH, temperatura (°C) y alimentación del sustrato (% bomba C).

La producción de biomasa por medio de las fermentaciones en bioreactor se efectuó mediante un sistema de cultivo alimentado o *fed-batch*. Para tal fin se realizó una primera etapa de cultivo en lote o *batch* y posteriormente una etapa de cultivo *fed-batch*, alimentando el cultivo con un flujo constante (F, L/h) determinado con la siguiente fórmula:  $F = \mu_0 V_0 X_0 / Y_{X/S} C_s$ , donde  $\mu_0$  es la velocidad específica de crecimiento inicial (h<sup>-1</sup>),  $V_0$  es el volumen inicial (L),  $X_0$  es la biomasa inicial (g<sub>x</sub>/L),  $Y_{X/S}$  es el rendimiento de biomasa en base al sustrato consumido (g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub>), y  $C_s$  es la concentración del sustrato en el reservorio de alimentación (g<sub>s</sub>/L) (Nosedá *et al.*, 2013).

A distintos tiempos de fermentación se tomaron muestras de cultivo fermentativo para determinar el nivel de biomasa y cuantificar las concentraciones de glucosa y azúcares reductores mediante los métodos descriptos. Estas cuantificaciones se realizaron a partir de los sobrenadantes de cultivo obtenidos por centrifugación a 5000 rpm durante 20 min.

A partir de las fermentaciones de las levaduras realizadas en bioreactor con sendos medios de cultivo, se determinaron los siguientes parámetros cinéticos y estequiométricos: velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), velocidad volumétrica de consumo de glucosa y de azúcares totales ( $q_s$ ), velocidad específica de consumo de glucosa y de azúcares totales ( $r_s$ ), rendimiento de biomasa en función del sustrato consumido ( $Y_{X/S}$ ), productividad volumétrica de biomasa ( $P_v$ ), productividad volumétrica máxima de biomasa ( $P_{v_{max}}$ ) y productividad total de biomasa ( $P_T$ ). En las Tablas 1 y 2 se resumen las condiciones de operación aplicadas en la etapa *batch* y *fed-batch* de las fermentaciones, respectivamente.

**Tabla 1:** Condiciones de operación en la etapa de cultivo *batch* de las fermentaciones realizadas en biorreactor con medio YPD y medio alternativo.

| Parámetros       | Valores |
|------------------|---------|
| Temperatura (°C) | 30      |
| pH               | 5,5     |
| Agitación (RPM)  | 450     |
| Aireación (LPM)  | 1       |
| Ácido (HCl, M)   | 3       |
| Base (NaOH, M)   | 3       |

**Tabla 2:** Condiciones de operación en la etapa de cultivo *fed-batch* de las fermentaciones realizadas en biorreactor con medio YPD y medio alternativo.

| Parámetros       | Valores |
|------------------|---------|
| Temperatura (°C) | 30      |
| pH               | 5,5     |
| Agitación (RPM)  | 250-900 |
| Aireación (LPM)  | 1       |
| Ácido (HCl, M)   | 3       |
| Base (NaOH, M)   | 3       |

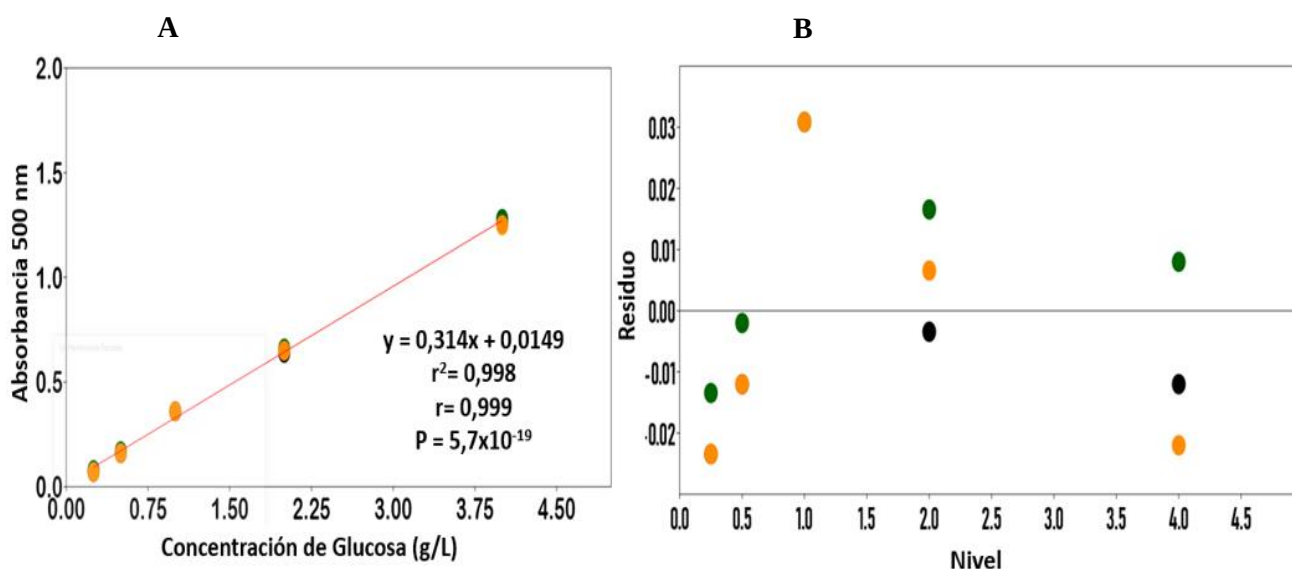
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Puesta a punto y validación de métodos analíticos de cuantificación

A partir de los ensayos de Linealidad, Precisión y Veracidad se llevó a cabo la validación de las metodologías utilizadas para la cuantificación de glucosa y azúcares reductores. A continuación, se describen los resultados obtenidos a partir de esta validación:

### 5.2. Método de cuantificación de glucosa

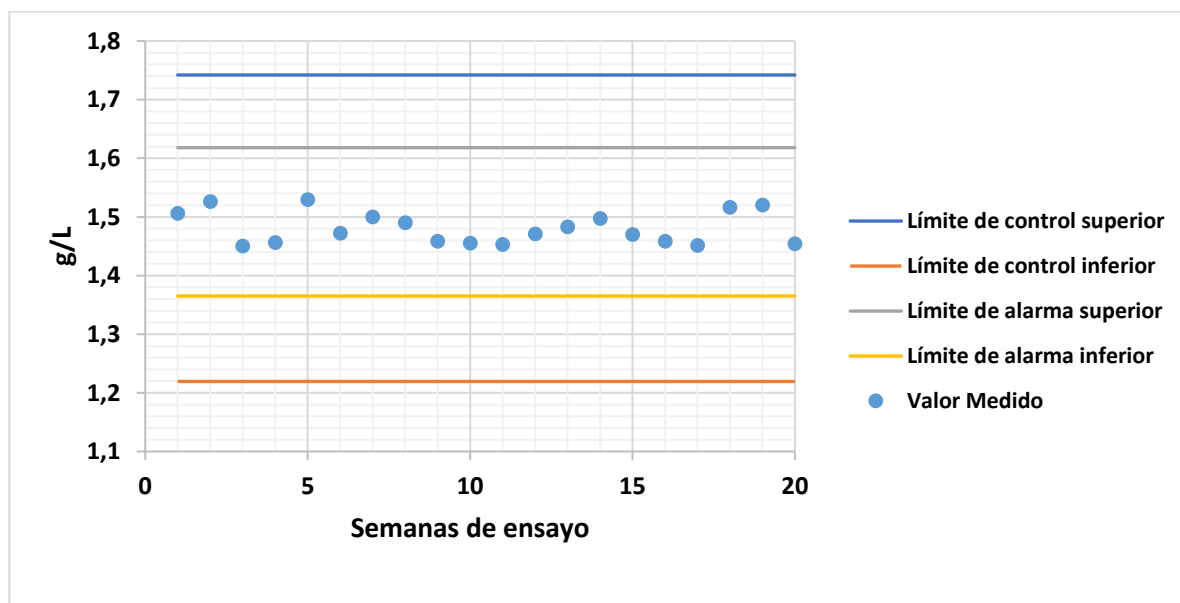
Aplicando el ensayo de linealidad al método de cuantificación de glucosa se obtuvo la curva de calibración a partir de 5 concentraciones diferentes de la solución stock, evaluadas por triplicado (Fig. 16 A). La ecuación de la recta obtenida mediante un ajuste lineal fue  $y = 0,314x + 0,0149$ , con un valor de  $R^2$  igual a 0,998. Asimismo, se calculó para las réplicas de cada nivel medido el valor residual construyendo el gráfico de distribución de residuos (Figura 16 B), en el cual no se observa tendencia de los residuos a través del cambio de la concentración del analito.



**Figura 16: Ensayo de Linealidad aplicado al método de cuantificación de glucosa. A)** Curva de calibración obtenida a partir del ensayo de Linealidad aplicado al método de cuantificación de glucosa. A la curva se le aplicó un ajuste lineal obteniendo la ecuación de la recta  $y = 0,314x + 0,0149$  con un  $R^2$  de 0,998. **B)** Gráfico de distribución de los residuos para las réplicas de cada nivel.

Por otro lado, mediante el ensayo de Precisión se analizaron 10 réplicas de un testigo de glucosa (1,5 g/L), obteniendo como promedio de las mediciones un valor de 1,481 g/L de glucosa con un desvío estándar de 0,028 y un RSD% de 1,89. Con estos resultados se construyó el gráfico de valor medio para otorgar validez a cada ensayo realizado (Figura 17). Como se observa en dicho gráfico, todos los valores obtenidos a lo largo del trabajo se ubicaron dentro de la región normal

esperada, es decir entre el límite de alarma inferior (LAI) y el límite de alarma superior (LAS), lo cual indica que los resultados de los ensayos realizados fueron confiables.



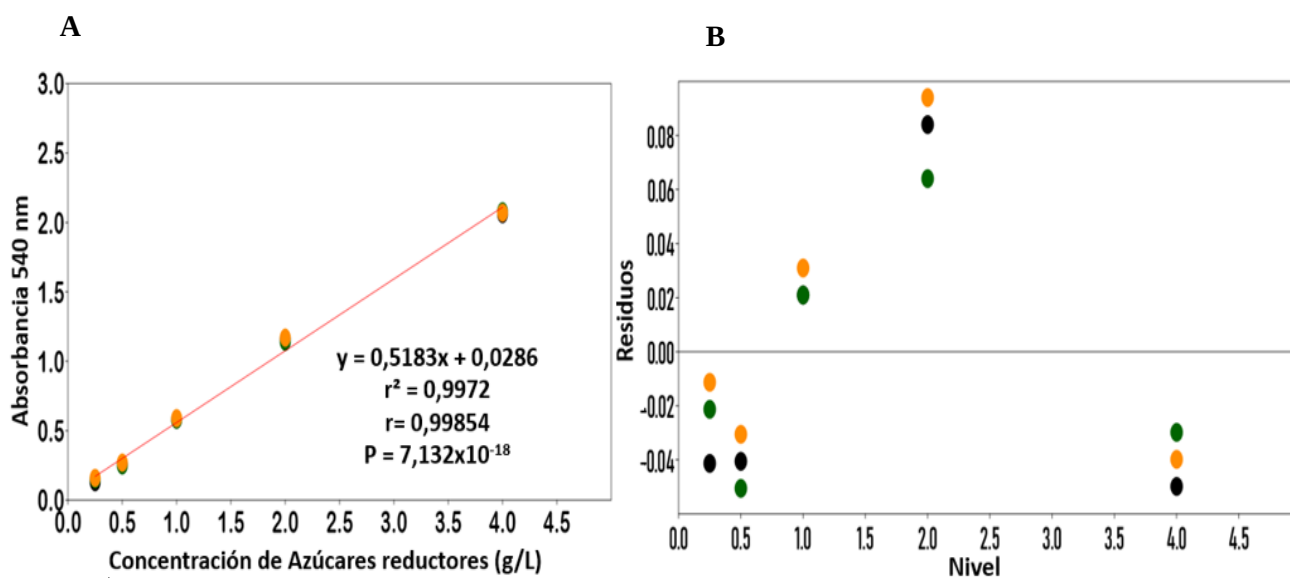
**Figura 17: Gráfico de control de valor medio correspondiente al método de cuantificación de glucosa.** En el gráfico se indican los resultados obtenidos a partir del análisis de la muestra control (solución testigo de glucosa de 1,5 g/L) para cada semana en que se realizó el método de cuantificación de glucosa. LAS, límite de alarma superior; LAI, límite de alarma inferior; LCA, límite de control superior; LCI, límite de control inferior.

Además, aplicando el ensayo de Veracidad se logró determinar que el porcentaje de recuperación del testigo de glucosa preparado en medio YP fue de 101,6% con un RSD% de 4,44%. Así, se obtuvo un valor de recuperación del analito en la matriz dentro del rango esperado, lo que sugiere que el método de cuantificación de glucosa no presenta sesgo significativo.

### 5.3. Método de cuantificación de azúcares reductores

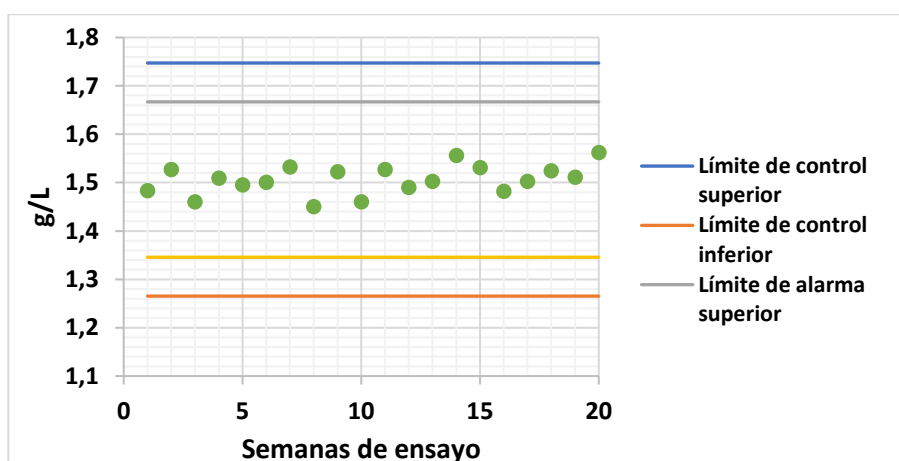
Aplicando el ensayo de Linealidad al método de cuantificación de azúcares reductores se obtuvo la curva de calibración a partir de 5 concentraciones diferentes de la solución *stock*, evaluadas por triplicado. La ecuación de la recta obtenida mediante un ajuste lineal fue  $y = 0,5191x + 0,036$  con un valor de  $R^2$  igual a 0,9964 (**Figura 18 A**). Asimismo, se calculó para las réplicas de cada nivel analizado el valor residual construyendo el gráfico de distribución de residuos (**Figura 18 B**).





**Figura 18: Ensayo de Linealidad aplicado al método de cuantificación de azúcares reductores.** A) Curva de calibración obtenida a partir del ensayo de Linealidad aplicado al método de cuantificación de azúcares reductores. A la curva se le aplicó un ajuste lineal obteniendo la ecuación de la recta  $y = 0,5183x + 0,0286$  con un  $R^2$  de **0,997**. B) Gráfico de distribución de los residuos para las réplicas de cada nivel.

Asimismo, por medio del ensayo de Precisión se analizaron 10 réplicas de un testigo de glucosa (1,5 g/L), obteniendo como promedio de las mediciones un valor de 1,506 g/L de glucosa con un desvío estándar de 0,030 y un RSD% de 1,99. Con estos resultados se construyó el gráfico de control de valor medio para otorgar validez a cada ensayo realizado (**Figura 19**). Como se observa en el gráfico todos los valores obtenidos a lo largo de los ensayos se ubicaron dentro de la región normal esperada, es decir entre el límite de alarma inferior (LAI) y el límite de alarma superior (LAS), lo cual indica que los resultados de los ensayos realizados fueron confiables.



**Figura 19: Gráfico de control de valor medio correspondiente al método de cuantificación de azúcares reductores.** En el gráfico se indican los resultados obtenidos a partir del análisis de la muestra control (solución testigo de glucosa de 1,5 g/L) para cada semana en que se realizó el método de cuantificación de azúcares reductores. LAS, límite de alarma superior; LAI, límite de alarma inferior; LCA, límite de control superior; LCI, límite de control inferior.

Por otro lado, aplicando el ensayo de veracidad se logró determinar que el porcentaje de recuperación del testigo de glucosa preparado en medio complejo YP fue 101,20 con un RSD% de 3,37. Así, se obtuvo un valor de recuperación del analito en la matriz dentro del rango esperado, lo que sugiere que el método de cuantificación de azúcares reductores no presenta sesgo significativo.

En la **Tabla 3** se presenta un resumen de los resultados obtenidos para los ensayos de validación de los métodos de cuantificación de glucosa y azúcares reductores.

**Tabla 3:** Resultados de los ensayos de validación de las metodologías de cuantificación de glucosa y azúcares reductores. Para cada ensayo de validación se indica el criterio de aceptación.

| ENSAYO                                       | Cuantificación de Glucosa | Cuantificación de Azúcares Reductores |
|----------------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| Linealidad<br>( $R^2 \geq 0,995$ )           | 0,998                     | 0,996                                 |
| Precisión<br>(RSD% < 5 %)                    | 1,89 %                    | 1,99 %                                |
| Veracidad<br>(95 % < % recuperación < 105 %) | 101,6 %                   | 101,2 %                               |

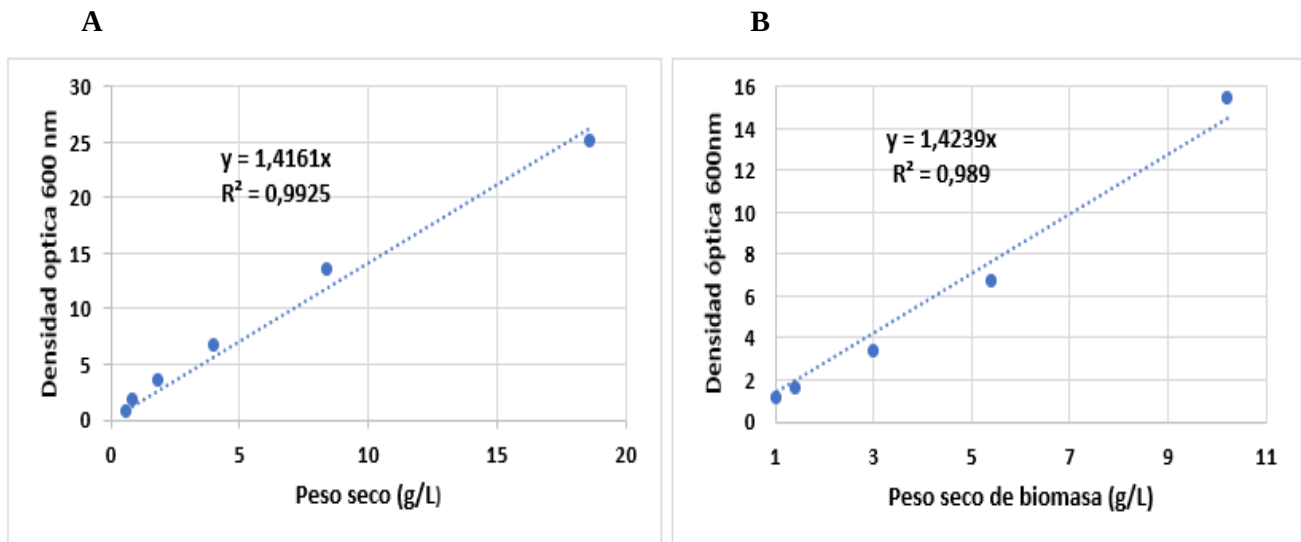
Debido a que los tres métodos de cuantificación presentaron una adecuada precisión y veracidad, se puede asegurar que dichas metodologías poseen una apropiada exactitud. Estos resultados sumados a los obtenidos a partir de los ensayos de Linealidad permitieron establecer que las metodologías de cuantificación de glucosa y azúcares reductores fueron aptas para su aplicación.

Con las metodologías de cuantificación puestas a punto y validadas, se dispuso de herramientas confiables para el análisis del proceso de obtención de biomasa a partir de cultivos con *S. cerevisiae* ATCC 9763 y *K. marxianus* DSM 11954. Además, se pudieron realizar controles de los resultados aplicando los gráficos de control de valor medio para cada método.

#### **5.4. Determinación de la relación entre densidad óptica y peso seco de la biomasa de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Kluyveromyces marxianus* DSM 11954**

Con el objetivo de establecer una relación entre la densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) y el peso seco (g/L) de las levaduras *S. cerevisiae* ATCC 9763 y *K. marxianus* DSM 11954, se realizaron diluciones seriadas a partir de cultivos de ambas cepas con valores de  $DO_{600}$  cercanos a 22. A las distintas diluciones se les determinó la  $DO_{600}$  en el espectrofotómetro y seguidamente se centrifugaron a 5000 rpm durante 30 min. Luego de descartar los sobrenadantes, los precipitados celulares se llevaron a sequedad total hasta obtener un peso constante. Se cuantificó el peso de los

precipitados secos y se graficó la curva de calibración entre DO<sub>600</sub> y el peso seco de biomasa (g/L) (**Figura 20**). A partir del ajuste lineal de las curvas de calibración se obtuvieron las ecuaciones de la recta  $y = 1,4161x$  y con un  $R^2$  de 0,9925;  $y = 1,4239x$  y con un  $R^2$  de 0,989 para *S. cerevisiae* ATCC 9763 y *K. marxianus* DSM 11954, respectivamente. De este modo se logró relacionar la densidad óptica celular con el peso seco de biomasa de ambas cepas.



**Figura 20: A) Curva de calibración entre la densidad óptica medida a 600 nm y el peso seco de biomasa (g/L) de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763.** A la curva se le aplicó un ajuste lineal obteniendo la ecuación de la recta  $y = 1,4161x$  y un  $R^2$  de 0,9925. **B) Curva de calibración entre la densidad óptica medida a 600 nm y el peso seco de biomasa (g/L) de *Kluyveromyces marxianus* DSM 11954.** A la curva se le aplicó un ajuste lineal obteniendo la ecuación de la recta  $y = 1,4239x$  y un  $R^2$  de 0,989.

La Ecuación 4, derivada de la ecuación de la recta  $y = 1.4161x$  y la Ecuación 5, derivada de la ecuación de la recta  $y = 1.4239x$ , se utilizaron para determinar los valores de peso seco de biomasa en g/L a partir de valores de densidad óptica medidos a 600 nm de cultivos de *S. cerevisiae* ATCC 9763 y *K. marxianus* DSM 11954, respectivamente.

**Ecuación 4:**  $x = \frac{y}{1,4161}$

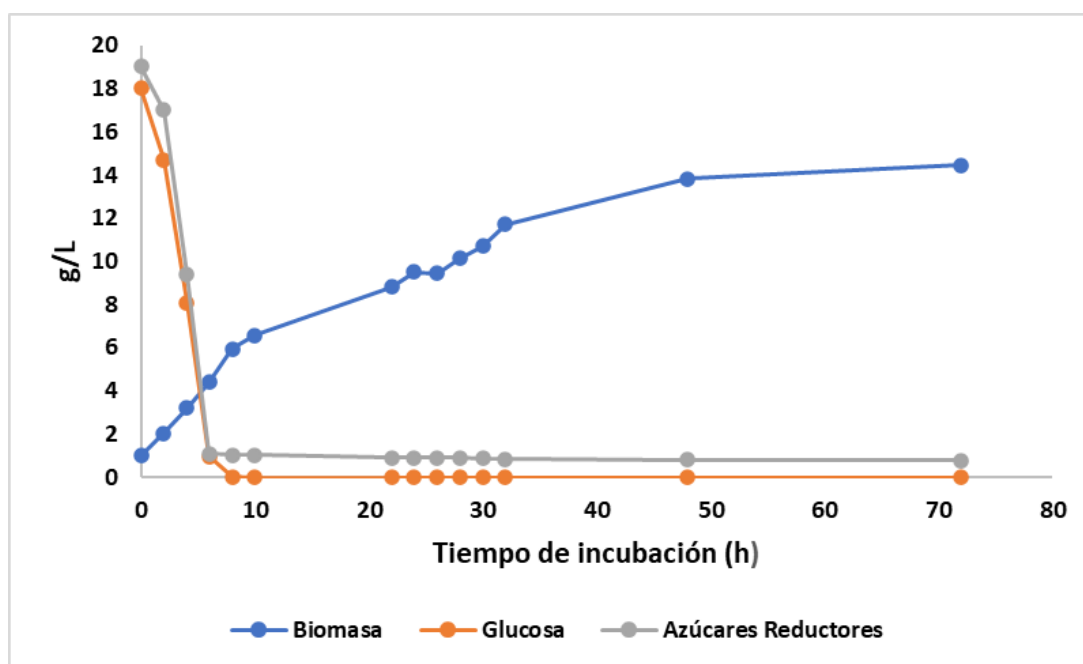
**Ecuación 5:**  $x = \frac{y}{1,4239}$

Donde:  $x$  = peso seco de biomasa expresada en g/L.  
 $y$  = densidad óptica a 600 nm.

### 5.5. Evaluación del crecimiento de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Kluyveromyces marxianus* DSM 11954 en medio complejo YPD

A partir de los cultivos de *S. cerevisiae* ATCC 9763 y *K. marxianus* DSM 11954 en medio complejo YPD con condiciones aeróbicas se evaluaron los siguientes parámetros cinéticos y estequiométricos de crecimiento de cada cepa: velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), velocidad específica de consumo de sustrato (glucosa y azúcares reductores) ( $q_s$ ), rendimiento de biomasa en función del sustrato (glucosa) consumido ( $Y_{x/s}$ ) y productividad volumétrica ( $P_v$ ).

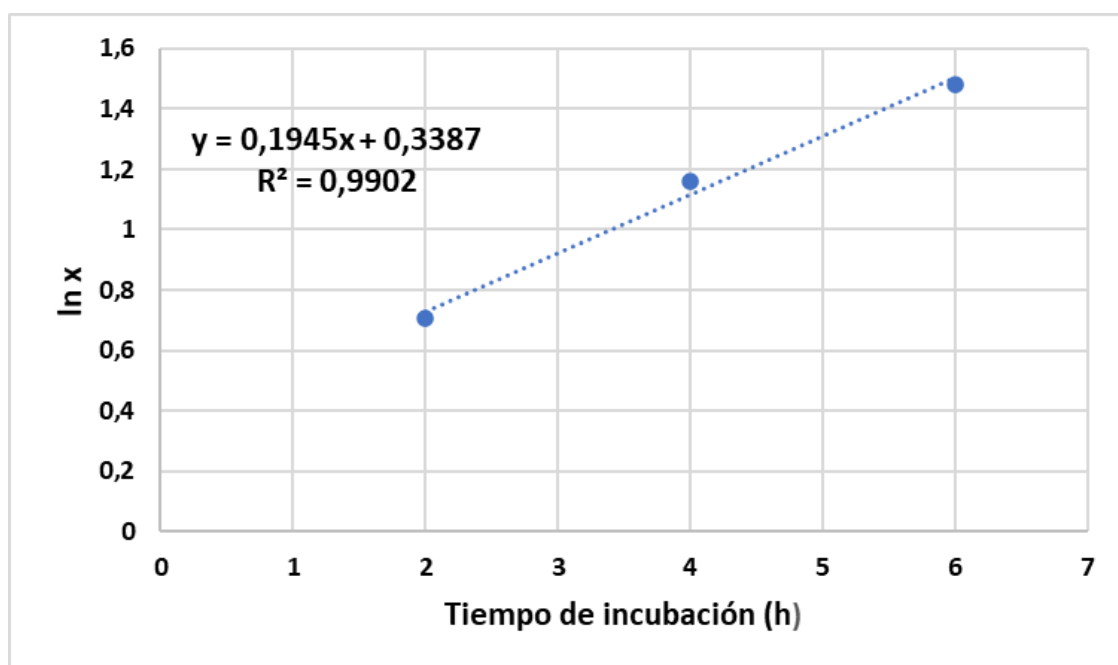
En la **Figura 21** se puede observar el aumento del nivel de biomasa (peso seco, g<sub>x</sub>/L), y el consumo de glucosa (g<sub>s</sub>/L) y azúcares reductores (g/L) de *S. cerevisiae* ATCC 9763 en función del tiempo de incubación. Una vez que se consumió la totalidad de glucosa (18,02 g<sub>s</sub>/L) se alcanzó un nivel de biomasa de 5,94 g<sub>x</sub>/L, lo cual indica que el rendimiento de biomasa en función de la glucosa consumida ( $Y_{x/s}$ ) fue 0,36 g<sub>x</sub>/g<sub>Glucosa</sub>.



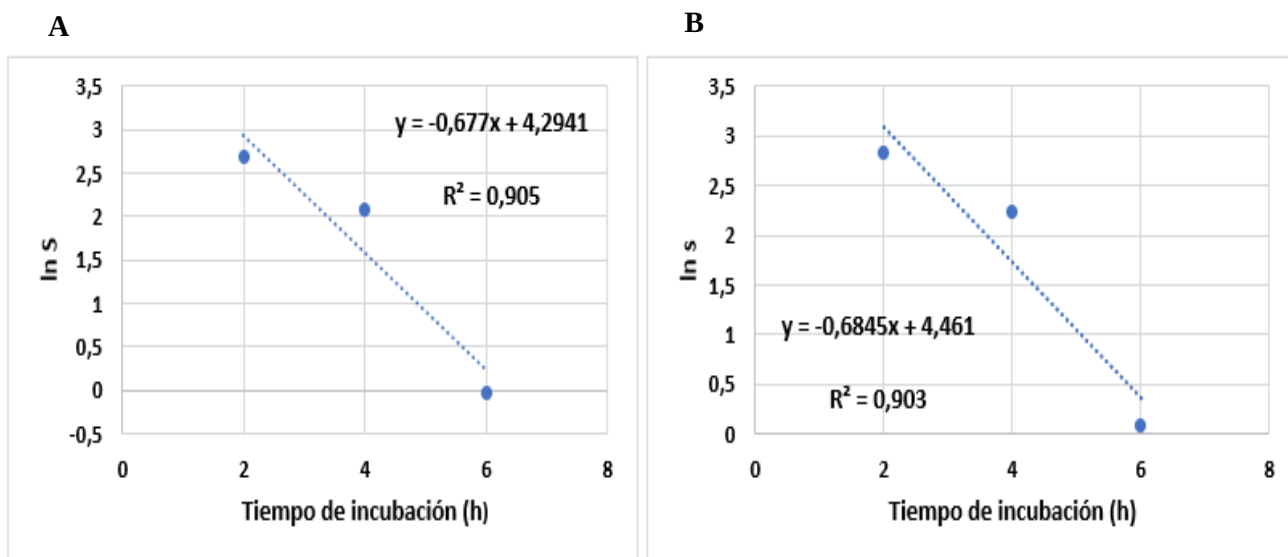
**Figura 21: Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 en medio complejo YPD.** La línea azul corresponde a la variación de biomasa (peso seco, g/L), la línea naranja corresponde al consumo de glucosa y la línea gris corresponde al consumo de azúcares reductores (g/L), en función del tiempo de incubación.

Aplicando el logaritmo natural se linealizó la fase exponencial de la curva de crecimiento hasta el consumo total de glucosa, para calcular la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_m$ ) a través de la pendiente de la ecuación de la recta. De este modo se determinó que la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_m$ ) presenta un valor de 0,19 h<sup>-1</sup>, con glucosa como fuente de carbono (**Figura 22**). El tiempo de duplicación ( $T_d$ ) correspondiente a dicha velocidad de crecimiento fue de 3,5 h. Asimismo, se calculó la velocidad específica de consumo de glucosa aplicando logaritmo natural a la

curva de consumo de glucosa en función del tiempo de incubación. La pendiente de la ecuación de la recta obtenida mediante dicha linealización corresponde a la velocidad volumétrica de consumo de glucosa ( $r_s$ ) siendo igual a 0,67 g<sub>s</sub>/Lh, mientras que la velocidad volumétrica de consumo de azúcares reductores ( $r_s$ ) fue igual a 0,68 g<sub>s</sub>/Lh (**Figura 23**). Al dividir el valor de  $r_s$  por la biomasa producida en ese lapso de tiempo se obtiene la velocidad específica de consumo de sustrato ( $q_s$ ) siendo igual a 0,113 g<sub>s</sub>/g<sub>x</sub> h, mientras que la velocidad específica de consumo de azúcares reductores fue 0,115 g<sub>s</sub>/g<sub>x</sub> h. El nivel máximo de biomasa alcanzado fue 14,45 g/L, a las 72 h de incubación. La productividad volumétrica de biomasa ( $P_v$ ) alcanzada al final del cultivo fue 0,2 g/Lh. Mientras que la productividad volumétrica máxima ( $P_{vMax}$ ) de biomasa fue 0,8 g/Lh a las 4 horas de cultivo.

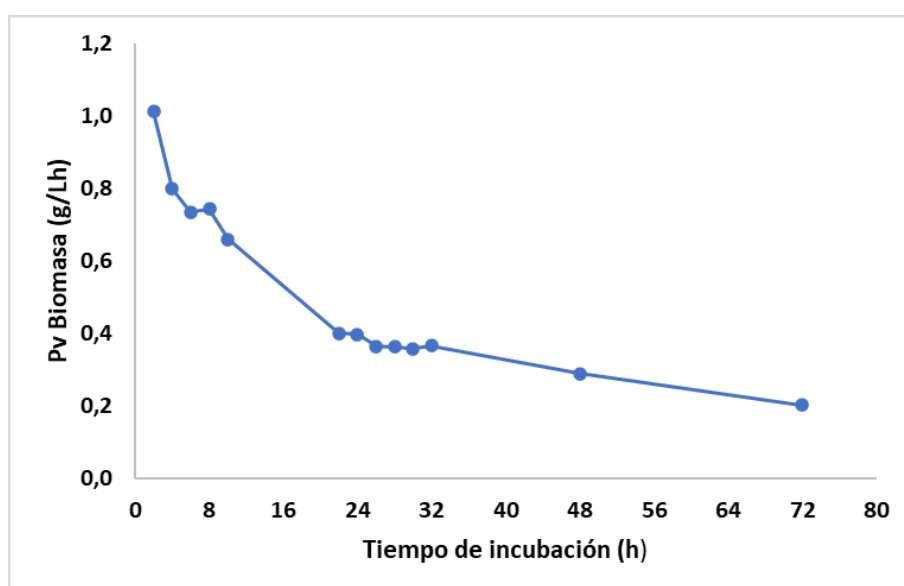


**Figura 22: Linealización de la fase exponencial de la curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 aplicando logaritmo natural.** La pendiente de la ecuación de la recta obtenida  $y = 0,1945x + 0,3387$  ( $R^2 = 0,9902$ ) corresponde al valor de la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_m$ ).



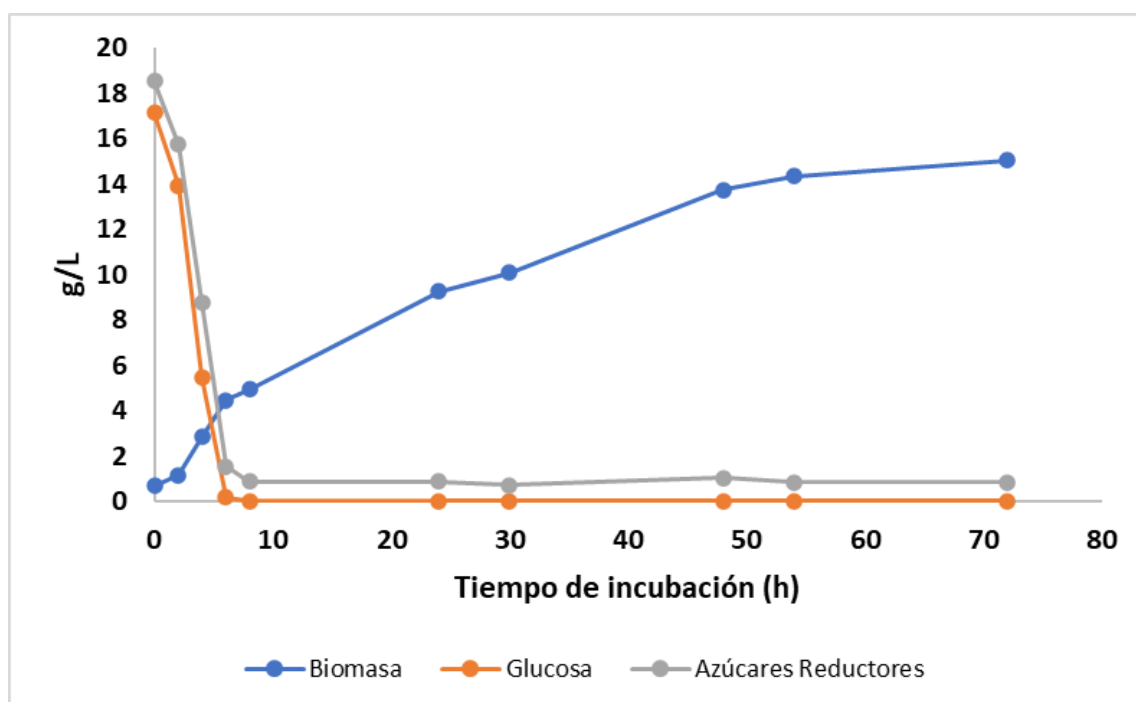
**Figura 23: A) Linealización aplicando logaritmo natural a la curva de consumo de glucosa en función del tiempo de incubación de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763.** La pendiente de la ecuación de la recta obtenida  $y = -0,677x + 4,2941$  ( $R^2 = 0,9057$ ) corresponde al valor de la velocidad volumétrica de consumo de glucosa ( $r_s$ ). **B) Linealización aplicando logaritmo natural a la curva de consumo de azúcares reductores en función del tiempo de incubación de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763.** La pendiente de la ecuación de la recta obtenida  $y = -0,6845x + 4,461$  ( $R^2 = 0,9032$ ) corresponde al valor de la velocidad volumétrica de consumo de azúcares reductores ( $r_s$ ).

En la Figura 24 se muestra la variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 en medio YPD. Así se puede observar que la productividad volumétrica máxima ( $P_{vMax}$ ) de biomasa fue 1,01 g/Lh, y se consiguió a las 2 h de incubación. Mientras que la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa al final del cultivo fue 0,2 g/Lh.



**Figura 24:** Variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 en medio YPD.

El mismo procedimiento se realizó para la levadura *K. marxianus* DSM 11954. En la **Figura 25** se observa el aumento del nivel de biomasa (peso seco, g<sub>x</sub>/L), el consumo de glucosa (g<sub>s</sub>/L) y el consumo de azúcares reductores (g<sub>s</sub>/L) de *K. marxianus* DSM 11954 en función del tiempo de incubación. Una vez consumida la totalidad de la glucosa (17,12 g<sub>s</sub>/L) se alcanzó un nivel de biomasa de 4,92 g<sub>x</sub>/L, lo cual indica que el rendimiento de biomasa en función de la glucosa consumida ( $Y_{x/s}$ ) fue 0,28 g<sub>x</sub>/g<sub>Glucosa</sub>.



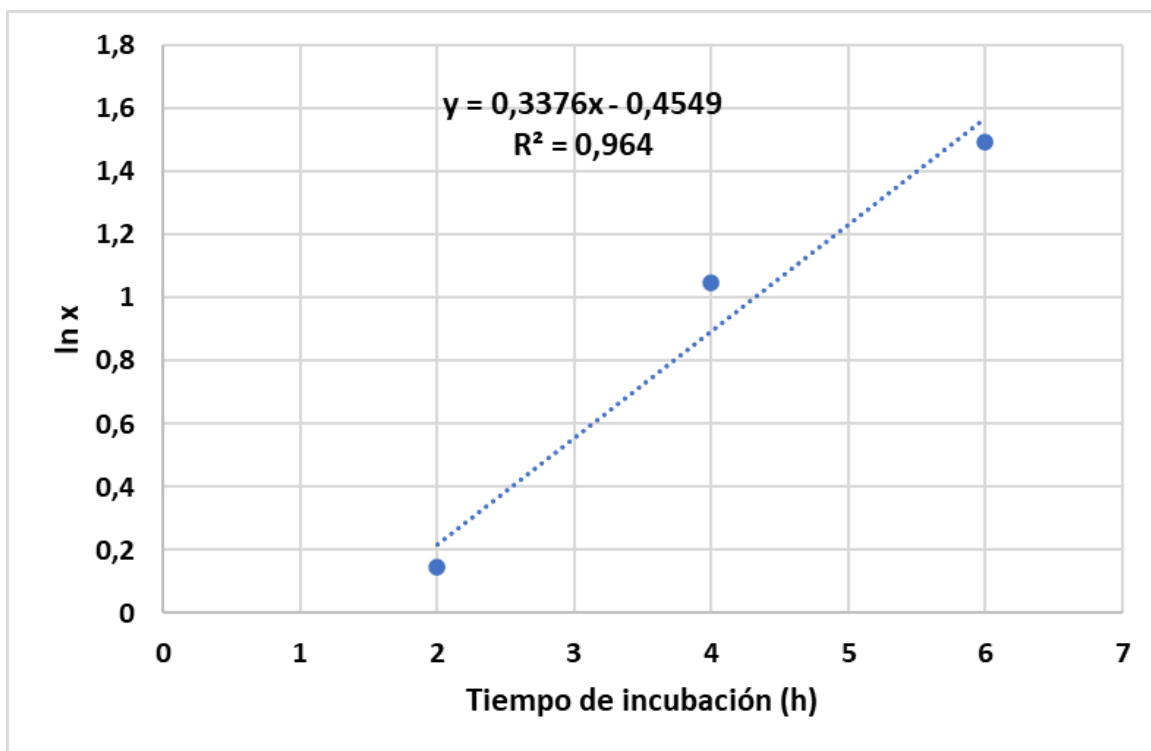
**Figura 25: Cultivo de *Kluyveromyces marxianus* DSM 11954 en medio complejo YPD.** La línea azul corresponde a la variación de biomasa (peso seco, g/L), la línea naranja corresponde al consumo de glucosa y la línea gris corresponde al consumo de azúcares reductores (g/L), en función del tiempo de incubación.

Aplicando el logaritmo natural se linealizó la fase exponencial de la curva de crecimiento hasta el consumo total de glucosa, para calcular la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_m$ ) a través de la pendiente de la ecuación de la recta. De este modo se determinó que la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_m$ ) presenta un valor de  $0,33 \text{ h}^{-1}$ , con glucosa como fuente de carbono (**Figura 26**).

El tiempo de duplicación ( $T_d$ ) correspondiente a dicha velocidad de crecimiento fue 2,05 h. Asimismo, se calculó la velocidad específica de consumo de glucosa aplicando logaritmo natural a la curva de consumo de glucosa en función del tiempo de incubación. La pendiente de la ecuación de la

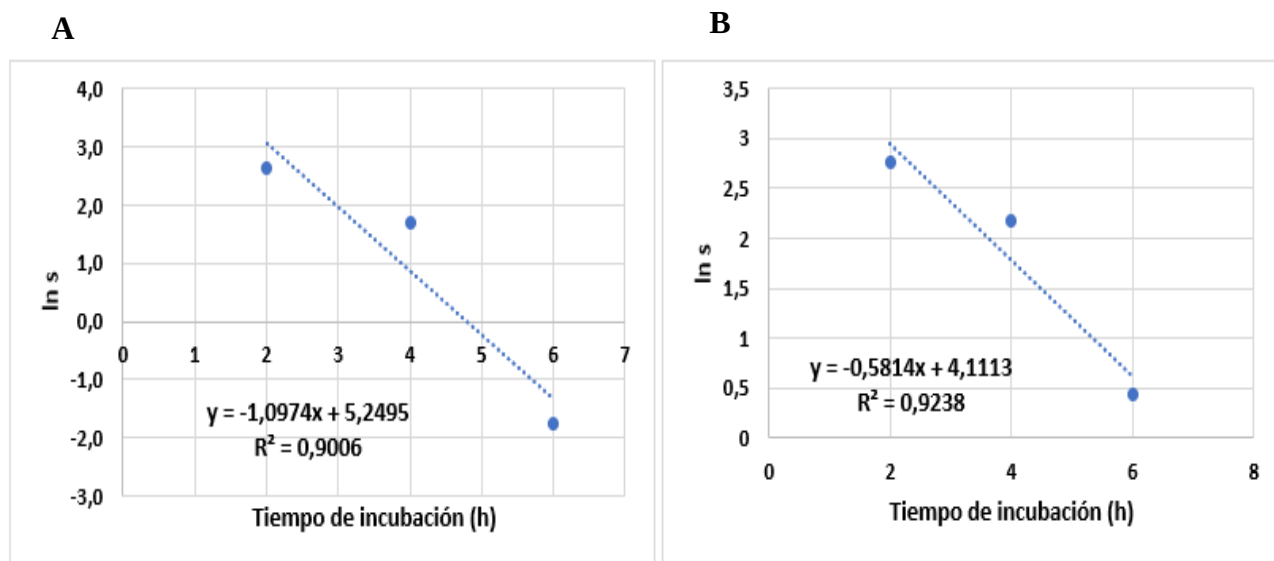
recta obtenida mediante la linealización corresponde a la velocidad volumétrica de consumo de glucosa ( $r_s$ ) equivalente a 1,097 g/L h, y la velocidad volumétrica de consumo de azúcares reductores ( $r_s$ ) fue de 0,581 g/L h (**Figura 27**). Al dividir el valor de  $r_s$  por la biomasa producida en ese lapso de tiempo se obtiene la velocidad específica de consumo de sustrato ( $q_s$ ), siendo igual a 0,222 g/g<sub>x</sub> h, mientras que la velocidad específica de consumo de azúcares reductores fue 0,118 g/g<sub>x</sub> h.

El nivel máximo de biomasa alcanzado fue 15,04 g/L, a las 72 hs de incubación. La productividad volumétrica de biomasa ( $P_v$ ) alcanzada al final del cultivo fue 0,21 g/Lh., mientras que la productividad volumétrica máxima ( $P_{vMax}$ ) de biomasa fue 0,74 g/Lh a las 6 horas de cultivo.



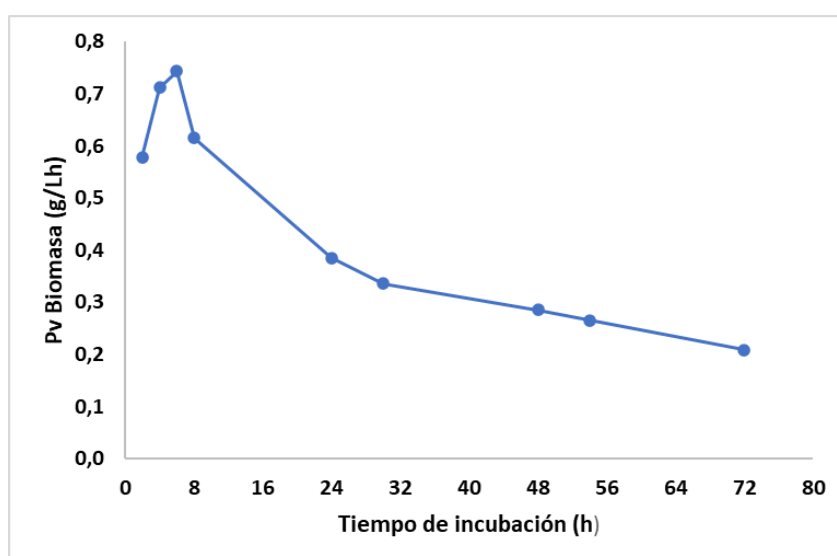
**Figura 26: Linealización de la fase exponencial de la curva de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* DSM 11954 aplicando logaritmo natural.** La pendiente de la ecuación de la recta obtenida  $y = 0,3376x - 0,4549$  ( $R^2 = 0,964$ ) corresponde al valor de la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_m$ ).





**Figura 27: A) Linealización aplicando logaritmo natural a la curva de consumo de glucosa en función del tiempo de incubación de *Kluyveromyces marxianus* DSM 11954.** La pendiente de la ecuación de la recta obtenida  $y = -1,097x + 5,2495$  ( $R^2 = 0,9006$ ) corresponde al valor de la velocidad volumétrica de consumo de sustrato ( $r_s$ ). **B) Linealización aplicando logaritmo natural a la curva de consumo de azúcares reductores en función del tiempo de incubación de *Kluyveromyces marxianus* DSM 11954.** La pendiente de la ecuación de la recta obtenida  $y = -0,581x + 4,111$  ( $R^2 = 0,9238$ ) corresponde al valor de la velocidad volumétrica de consumo de sustrato ( $r_s$ ).

En la Figura 28 se muestra la variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* DSM 11954 en medio YPD. Así se puede observar que la productividad volumétrica máxima ( $P_{vMax}$ ) de biomasa fue 0,74 g/Lh, y se consiguió a las 6 h de incubación. Mientras que la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa al final del cultivo fue 0,21 g/Lh.



**Figura 28:** Variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de cultivo de *Kluyveromyces marxianus* DSM 11954 en medio YPD.

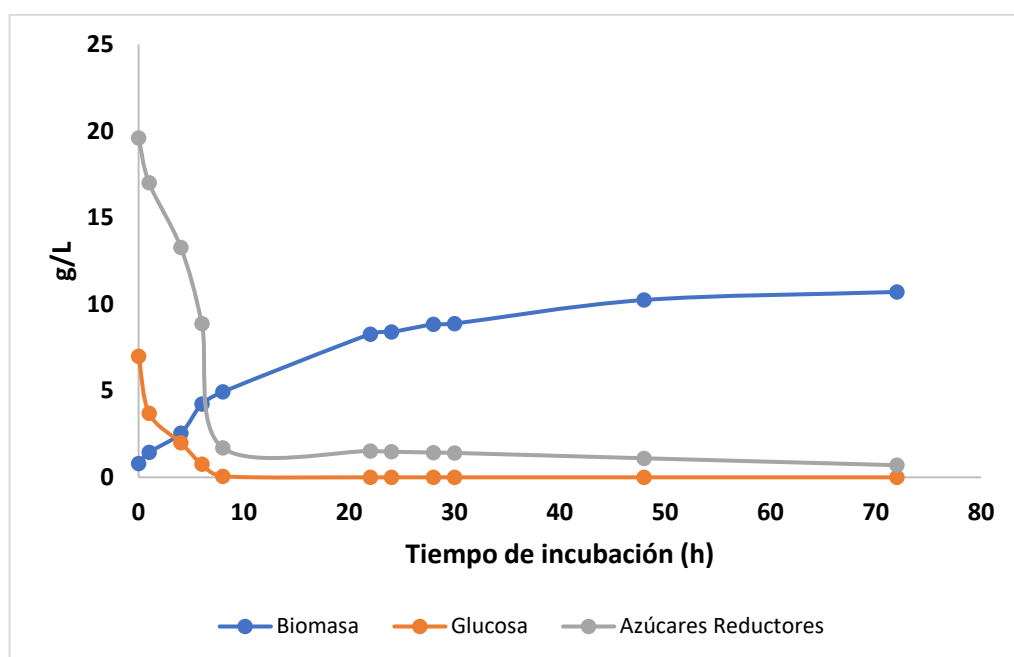
En la Tabla 4, se muestran los valores de los parámetros cinéticos de acuerdo a los resultados obtenidos en medio YPD:

|                                                   | Medio complejo YPD                |                                  |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
|                                                   | <i>S. cerevisiae</i><br>ATCC 9763 | <i>K. marxianus</i><br>DSM 11954 |
| $\mu_x$ (h <sup>-1</sup> )                        | 0,19                              | 0,33                             |
| $Y_{x/s}$ (g <sub>x</sub> /g <sub>Glucosa</sub> ) | 0,36                              | 0,28                             |
| Tiempo de duplicación (h)                         | 3,5                               | 2,05                             |
| Nivel Máximo de biomasa (g <sub>x</sub> /L)       | 14,45                             | 15,04                            |
| $P_v$ final (g/Lh)                                | 0,2                               | 0,21                             |
| $P_{v \text{ Max}}$ (g/h)                         | 0,8                               | 0,74                             |

#### 5.6. Evaluación del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Kluyveromyces marxianus* DSM 11954 en medio de cultivo alternativo con melaza de caña

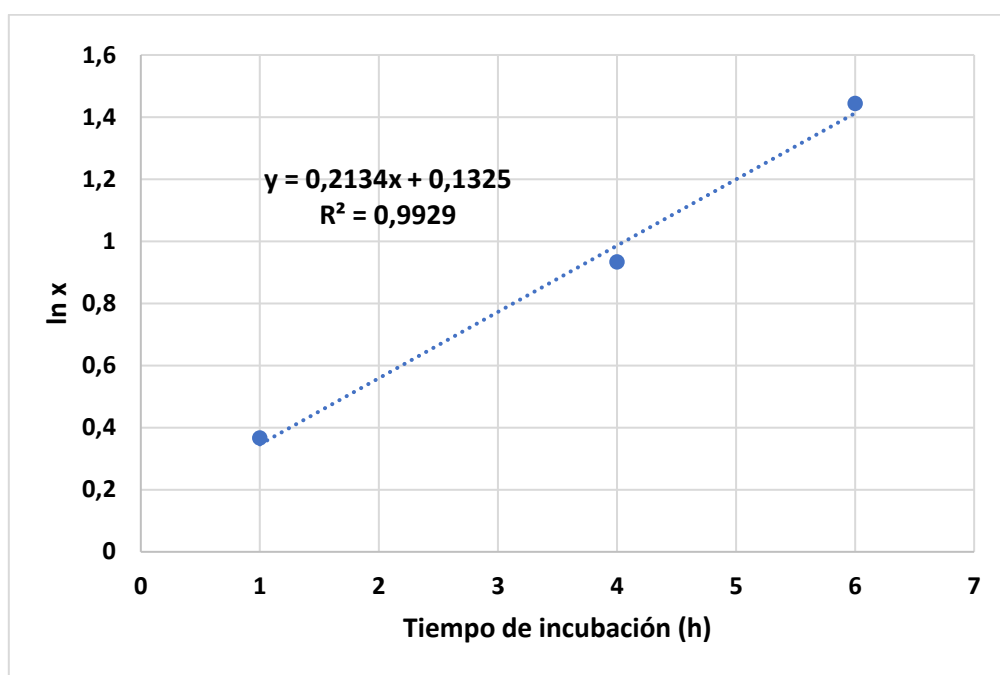
Los cultivos de *S. cerevisiae* ATCC 9763 y *K. marxianus* DSM crecidos en Erlenmeyer con medio YPD de, fueron utilizados como referencia para evaluar el crecimiento en el medio de cultivo alternativo con melaza de caña de azúcar bajo condiciones aeróbicas. Así, se evaluaron los siguientes parámetros cinéticos y estequiométricos de crecimiento: velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), velocidad específica de consumo de sustrato (glucosa) ( $q_s$ ), rendimiento de biomasa en función del sustrato glucosa y azúcares reductores consumidos ( $Y_{x/s}$ ), y productividad volumétrica ( $P_v$ ).

En la **Figura 29** se puede observar el aumento del nivel de biomasa (peso seco, g<sub>x</sub>/L), el consumo de glucosa (g<sub>s</sub>/L) y azúcares reductores (g<sub>s</sub>/L) de *S. cerevisiae* ATCC 9763 en función del tiempo de incubación. Una vez consumida la totalidad de la glucosa (6,99 g<sub>s</sub>/L) se alcanzó un nivel de biomasa de 4,94 g<sub>x</sub>/L, lo cual indica que el rendimiento de biomasa en función de la glucosa consumida ( $Y_{x/s}$ ) fue de 0,59 (g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub>). El nivel máximo de biomasa alcanzado fue 10,71 g/L, a las 72 hs de incubación. Por lo tanto, el rendimiento total de biomasa en función de los azucares reductores consumidos ( $Y_{x/s}$ ) fue 0,21 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub>.

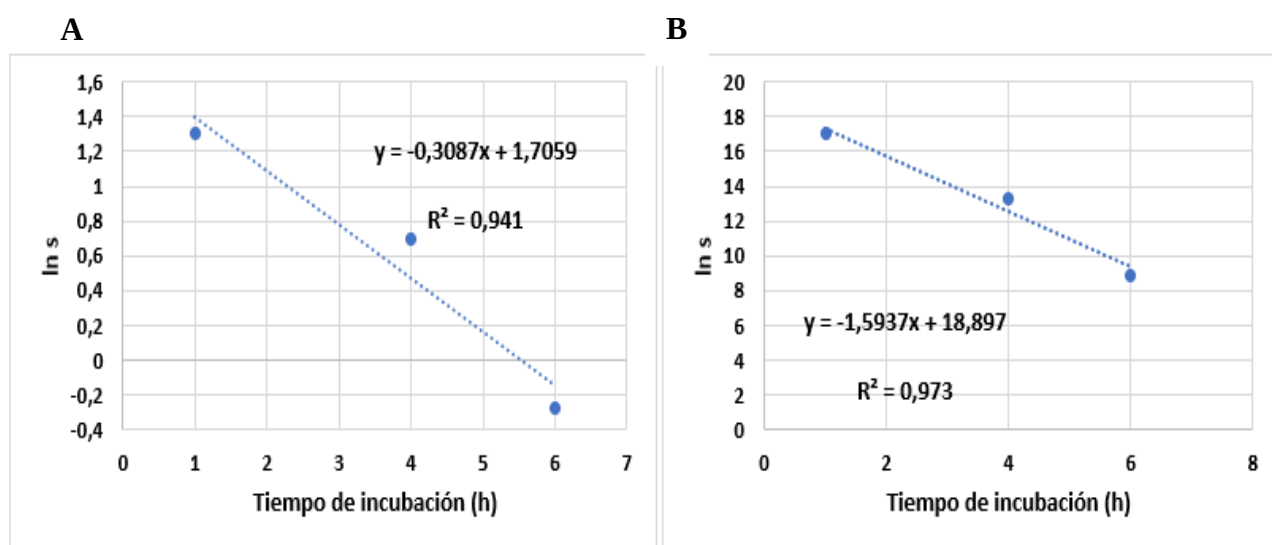


**Figura 29: Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 en medio con melaza de caña.** La línea azul corresponde a la variación de biomasa (peso seco, g/L), la línea naranja corresponde al consumo de glucosa y la línea gris corresponde al consumo de azúcares reductores (g/L), todas en función del tiempo de incubación.

Aplicando el logaritmo natural se linealizó la fase exponencial de la curva de crecimiento hasta el consumo total de glucosa, para calcular la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_m$ ) a través de la pendiente de la ecuación de la recta. De este modo se determinó que la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_m$ ) presenta un valor de  $0,21 \text{ h}^{-1}$ , con glucosa como fuente de carbono (**Figura 30**). El tiempo de duplicación ( $T_d$ ) correspondiente a dicha velocidad de crecimiento fue 3,2 h. Asimismo, se calculó la velocidad específica de consumo de glucosa aplicando logaritmo natural a la curva de consumo de glucosa en función del tiempo de incubación. La pendiente de la ecuación de la recta obtenida mediante la linealización corresponde a la velocidad volumétrica de consumo de glucosa ( $r_s$ ) equivalente a  $0,308 \text{ g}_s/\text{L h}$ , en tanto la velocidad volumétrica de consumo de azúcares reductores ( $r_s$ ) dio un valor de  $1,593 \text{ g}_s/\text{L h}$  (**Figura 31**). Al dividir el valor de  $r_s$  por la biomasa producida en ese lapso de tiempo se obtiene la velocidad específica de consumo de sustrato ( $q_s$ ) siendo igual a  $0,062 \text{ g}_s/\text{g}_x \text{ h}$ , mientras que la velocidad específica de consumo de azúcares reductores fue  $0,322 \text{ g}_s/\text{g}_x \text{ h}$ . La productividad volumétrica de biomasa ( $P_v$ ) alcanzada al final del cultivo fue  $0,15 \text{ g/Lh}$ , mientras que la productividad volumétrica máxima ( $P_{v\text{Max}}$ ) de biomasa fue  $0,71 \text{ g/Lh}$  a las 6 horas de cultivo.



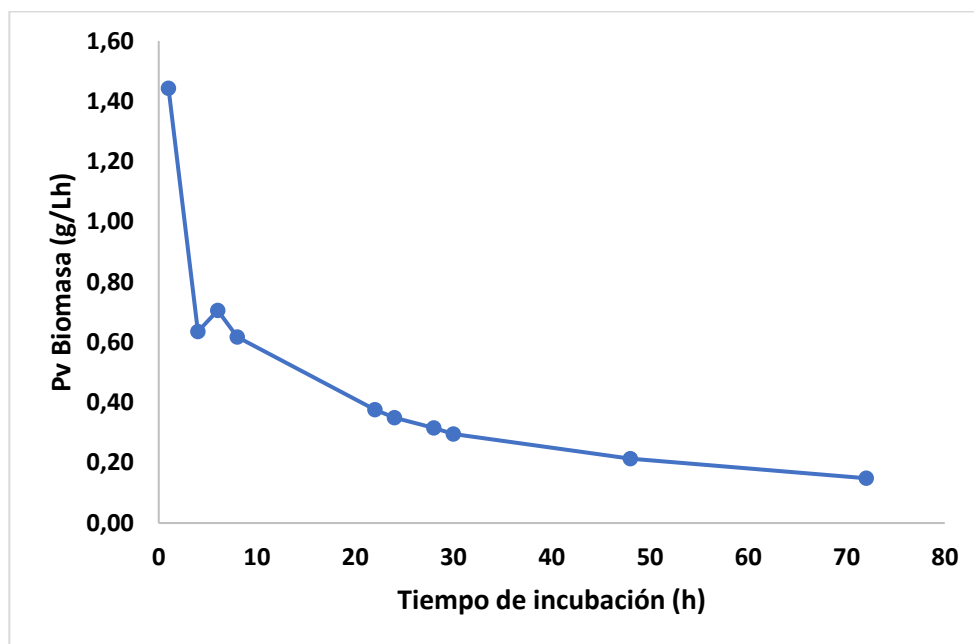
**Figura 30: Linealización de la fase exponencial de la curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 aplicando logaritmo natural.** La pendiente de la ecuación de la recta obtenida  $y = 0,2134x + 0,1325$  ( $R^2 = 0,9929$ ) corresponde al valor de la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_m$ ).



**Figura 31: A) Linealización aplicando logaritmo natural a la curva de consumo de glucosa en función del tiempo de incubación de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763.** La pendiente de la ecuación de la recta obtenida  $y = -0,3087x + 1,7059$  ( $R^2 = 0,9415$ ) corresponde al valor de la velocidad volumétrica de consumo de sustrato ( $r_s$ ). **B) Linealización aplicando logaritmo natural a la curva de consumo de azúcares reductores en función del tiempo de incubación de *S. cerevisiae* ATCC 9763.** La pendiente de la ecuación de la recta obtenida  $y = -1,5937x + 18,89$  ( $R^2 = 0,9736$ ) corresponde al valor de la velocidad volumétrica de consumo de sustrato ( $r_s$ ).

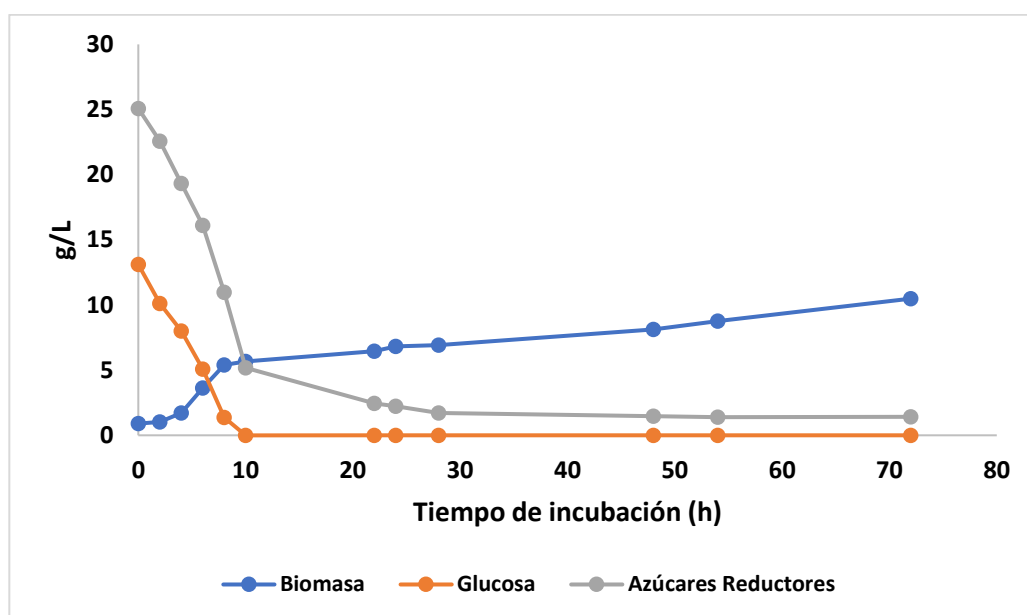
En la Figura 32 se muestra la variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 en medio con melaza

de caña. Así se puede observar que la productividad volumétrica máxima ( $P_{vMax}$ ) de biomasa fue 1,44 g/Lh, y se consiguió a las 1 h de incubación. Mientras que la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa al final del cultivo fue 0,15 g/Lh.



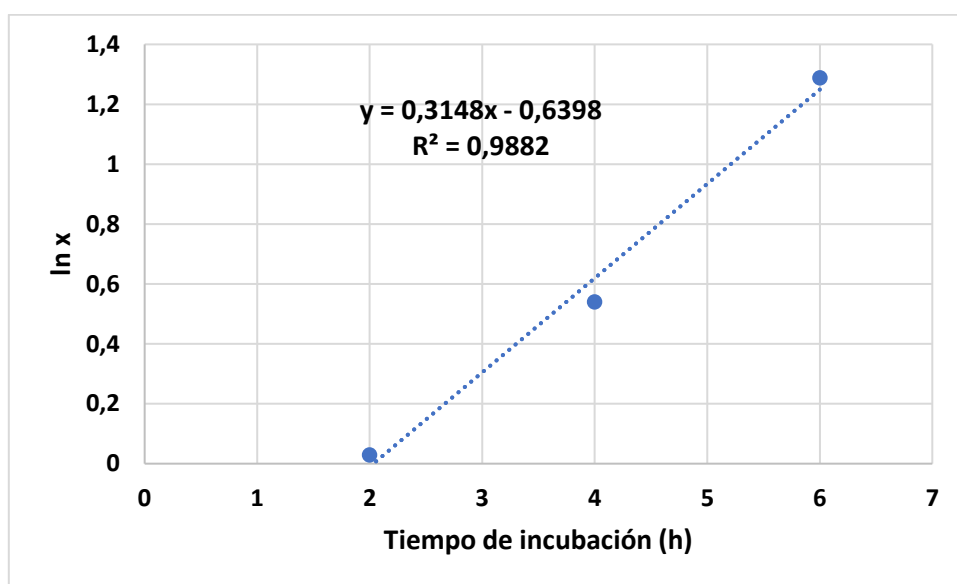
**Figura 32:** Variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 en medio con melaza de caña.

El mismo procedimiento, se realizó con la levadura *K. marxianus* DSM 11954. En la **Figura 33** se observa el aumento del nivel de biomasa (peso seco, g<sub>x</sub>/L), consumo de glucosa (g<sub>s</sub>/L) y el consumo de azúcares reductores (g<sub>s</sub>/L) de *K. marxianus* DSM 11954 en función del tiempo de incubación. Una vez consumida la totalidad de la glucosa (13,11 g<sub>s</sub>/L) se alcanzó un nivel de biomasa de 5,7 g<sub>x</sub>/L, lo cual indica que el rendimiento de biomasa en función de la glucosa consumida ( $Y_{x/s}$ ) fue 0,43 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub>. El nivel máximo de biomasa alcanzado fue de 10,5 g/L, a las 72 h de incubación. Por lo tanto, el rendimiento total de biomasa en función de los azúcares reductores consumidos ( $Y_{x/s}$ ) fue 0,2 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub>.

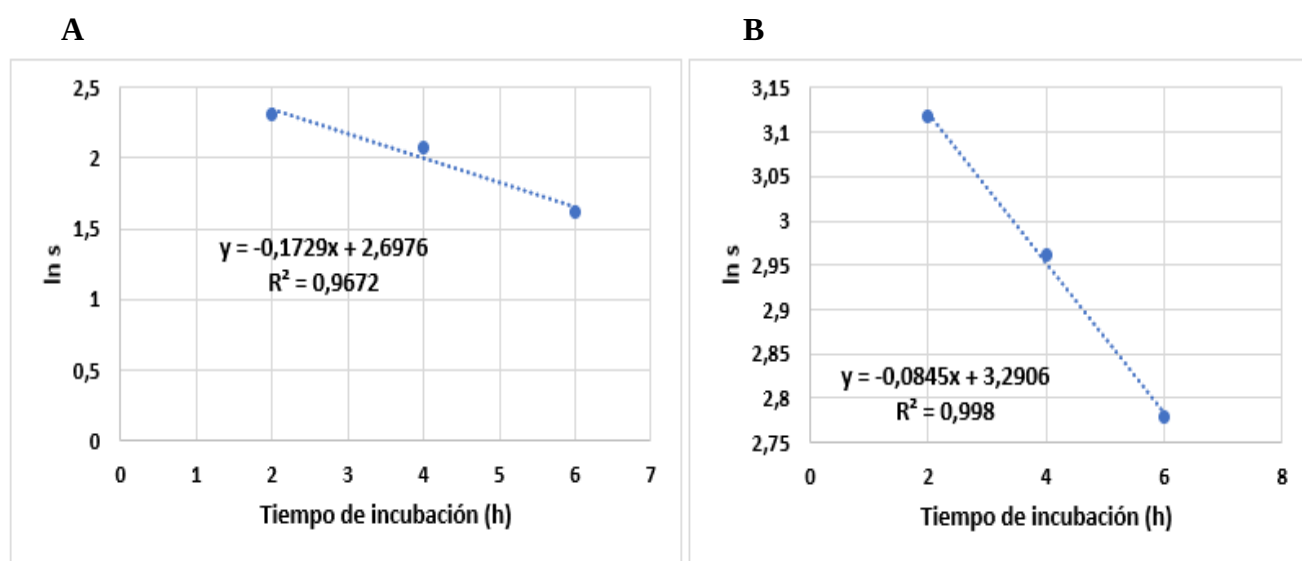


**Figura 33: Cultivo de *Kluyveromyces marxianus* DSM 11954 en medio con melaza de caña.** La línea azul corresponde a la variación de biomasa (peso seco, g/L), la línea naranja corresponde al consumo de glucosa y la línea gris corresponde al consumo de azúcares reductores (g/L), todas en función del tiempo de incubación.

Aplicando el logaritmo natural se linealizó la fase exponencial de la curva de crecimiento hasta el consumo total de glucosa, para calcular la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_m$ ) a través de la pendiente de la ecuación de la recta. De este modo se determinó que la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_m$ ) presenta un valor de  $0,31 \text{ h}^{-1}$ , con glucosa como fuente de carbono (**Figura 34**). El tiempo de duplicación ( $T_d$ ) correspondiente a dicha velocidad de crecimiento fue 2,2 h. Asimismo, se calculó la velocidad específica de consumo de glucosa aplicando logaritmo natural a la curva de consumo de glucosa en función del tiempo de incubación. La pendiente de la ecuación de la recta obtenida mediante la linealización corresponde a la velocidad volumétrica de consumo de glucosa ( $r_s$ ) equivalente a  $0,172 \text{ g/Lh}$  Mientras que la velocidad volumétrica de consumo de azúcares reductores ( $r_s$ ) fue equivalente a  $0,084 \text{ g/Lh}$  (**Figura 35**). Al dividir el valor de  $r_s$  por la biomasa producida en ese lapso de tiempo se obtiene la velocidad específica de consumo de sustrato ( $q_s$ ) siendo igual a  $0,030 \text{ g/g}_x\text{h}$ , mientras que la velocidad específica de consumo de azúcares reductores fue  $0,014 \text{ g/g}_x \text{ h}$ . La productividad volumétrica de biomasa ( $P_v$ ) alcanzada al final del cultivo fue  $0,14 \text{ g/Lh}$ , mientras que la productividad volumétrica máxima ( $P_{v\text{Max}}$ ) de biomasa fue  $0,68 \text{ g/Lh}$  a las 8 h de cultivo.



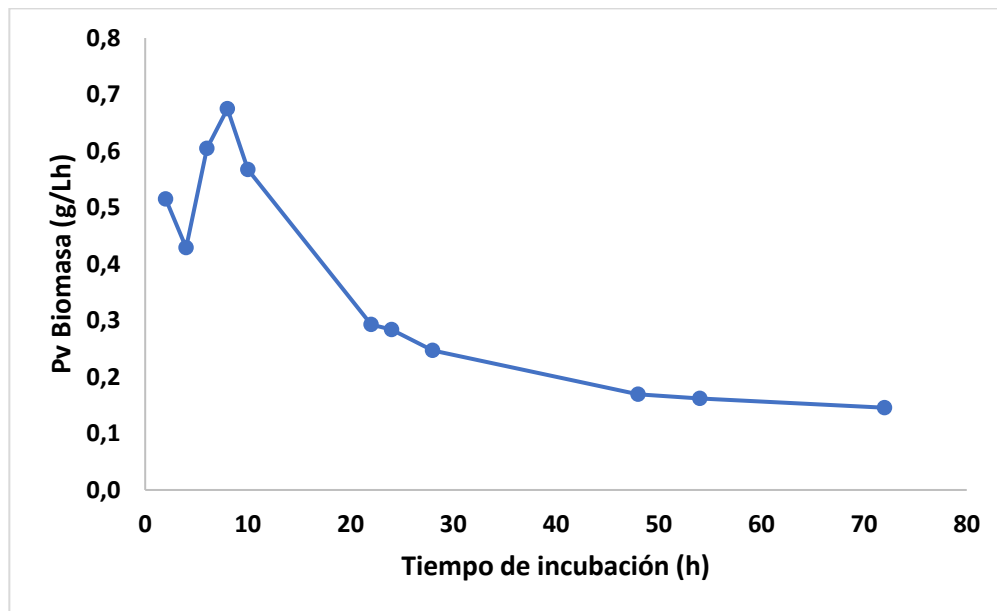
**Figura 34:** Linealización de la fase exponencial de la curva de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* DSM 11954 aplicando logaritmo natural. La pendiente de la ecuación de la recta obtenida  $y = 0,3148x - 0,6398$  ( $R^2 = 0,9882$ ) corresponde al valor de la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_m$ ).



**Figura 35:** A) Linealización aplicando logaritmo natural a la curva de consumo de glucosa en función del tiempo de incubación de *Kluyveromyces marxianus* DSM 11954. La pendiente de la ecuación de la recta obtenida  $y = -0,1729x + 2,6976$  ( $R^2 = 0,9672$ ) corresponde al valor de la velocidad volumétrica de consumo de sustrato ( $r_s$ ). B) Linealización aplicando logaritmo natural a la curva de consumo de azúcares reductores en función del tiempo de incubación de *K. marxianus* DSM 11954. La pendiente de la ecuación de la recta obtenida  $y = -0,0845x + 3,290$  ( $R^2 = 0,998$ ) corresponde al valor de la velocidad volumétrica de consumo de sustrato ( $r_s$ ).

En la Figura 36 se muestra la variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de crecimiento de *K. marxianus* DSM 11954 en medio con melaza de caña. Así se puede observar que la productividad volumétrica máxima ( $P_{vMax}$ ) de biomasa fue 0,67 g/Lh, y se

consiguió a las 8 h de incubación. Mientras que la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa al final del cultivo fue 0,15 g/Lh.



**Figura 36:** Variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de cultivo de *K. marxianus* DSM 11954 en medio con melaza de caña.

En la siguiente **Tabla 5**, se muestran los valores de los parámetros cinéticos de acuerdo a los resultados obtenidos:

**Tabla 5:** Valores de los parámetros cinéticos y de producción de los cultivos en frascos *Erlenmeyer*

|                                              | Medio alternativo con melaza de caña |                                  |
|----------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
|                                              | <i>S. cerevisiae</i><br>ATCC 9763    | <i>K. marxianus</i><br>DSM 11954 |
| $\mu_x$ ( $h^{-1}$ )                         | 0,2134                               | 0,3148                           |
| $Y_{x/s}$ (g/L)                              | 0,82                                 | 0,43                             |
| Tiempo de duplicación<br>(h)                 | 3,2                                  | 2,2                              |
| Nivel Máx. de biomasa<br>(g <sub>x</sub> /L) | 10,71                                | 10,48                            |
| $P_v$ (g/Lh)                                 | 0,15                                 | 0,15                             |
| $P_{v \text{ Max}}$ (g/h)                    | 0,71                                 | 0,68                             |



## 5.7. Escalado de la producción de biomasa de levaduras mediante fermentaciones en biorreactor de tanque agitado

### 5.8. Fermentaciones en bioreactor de tanque agitado escala laboratorio

A partir de los resultados obtenidos en *Erlenmeyer* se decidió realizar fermentaciones de *S. cerevisiae* ATCC 9763 y *K. marxianus* DSM 11954 en bioreactor de tanque agitado con el fin de lograr obtener mayores niveles de biomasa de dichas levaduras. Las fermentaciones consistieron en una primera etapa de cultivo *batch* hasta el consumo total de glucosa, para luego proceder a una etapa de cultivo *fed-batch* alimentando el cultivo con: glucosa concentrada para el medio YPD y con melaza de caña concentrada para el medio alternativo con melaza de caña. Así, se realizaron fermentaciones en bioreactor agitado y, a través del software *Biocommand* se registraron los siguientes parámetros de las fermentaciones: agitación (rpm), oxígeno disuelto (% O<sub>2</sub>d), pH, temperatura (°C) y alimentación con soluciones concentradas de glucosa o melaza de caña.

La alimentación con soluciones concentradas de glucosa o melaza de caña, se realizó aplicando la siguiente fórmula de flujo constante de alimentación.

$$F : \frac{V \cdot \mu \cdot X}{Y_{x/s} \cdot S_r}$$

Siendo:

F: flujo de alimentación (L/h)

$\mu$ : velocidad específica máxima de crecimiento (h<sup>-1</sup>)

X: concentración de biomasa (g/L)

V: volumen de cultivo (L)

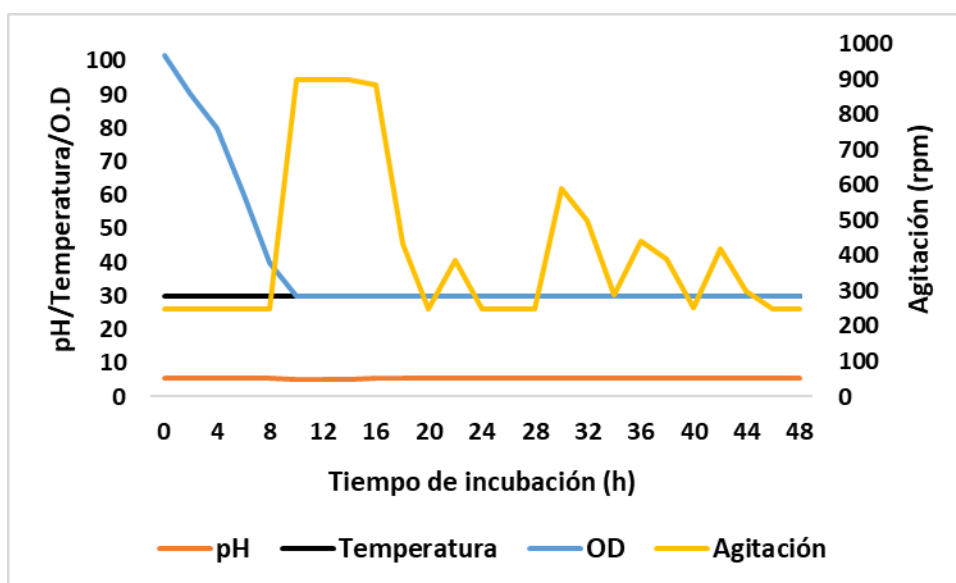
$Y_{x/s}$ : rendimiento de biomasa en función del sustrato consumido (g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub>)

$S_r$ : concentración de la fuente de carbono en el reservorio de alimentación (g/L).

#### 5.8.1. Producción de biomasa de *S. cerevisiae* ATCC 9763 mediante fermentación en bioreactor con medio YPD

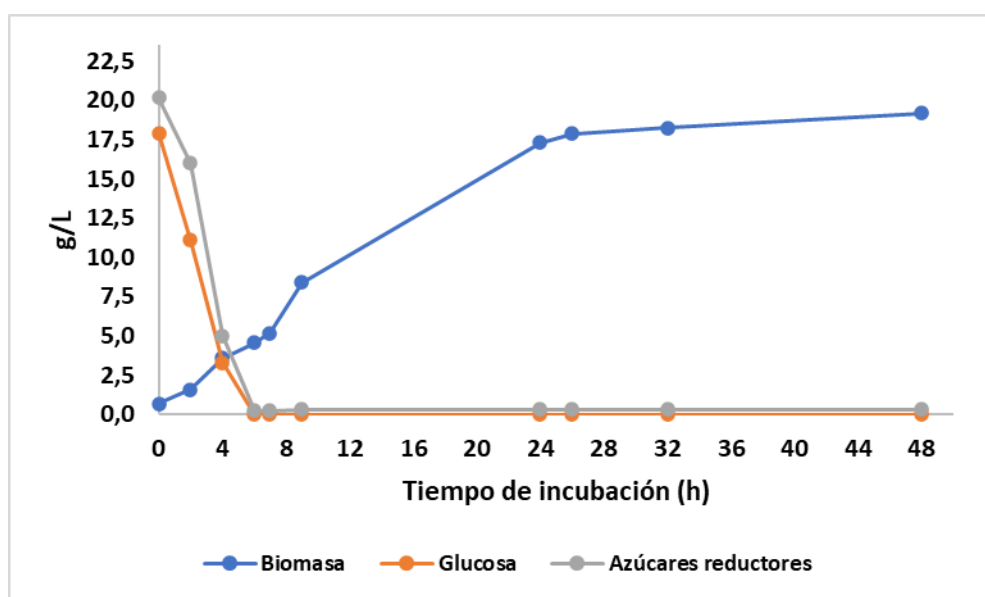
La primera fermentación de *S. cerevisiae* ATCC 9763 en biorreactor de tanque agitado se realizó en medio complejo YPD con un pH constante de 5,5, una temperatura de 30°C. A las 7 h de cultivo *batch* se consumió totalmente la glucosa y por ende se inició la etapa *fed-batch* de alimentación con glucosa concentrada (200 g/L) aplicando un flujo constante de 22 mL/h. Mediante esta alimentación se agregó un total de 902 ml de solución de glucosa concentrada.

En la **Figura 37** se muestra el registro de los parámetros del proceso; agitación, oxígeno disuelto ( $O_2d$ ), pH y temperatura durante las 48 h de fermentación, donde se observa que la temperatura y el pH se mantuvieron constantes a lo largo del proceso de acuerdo a los valores pre-establecidos. Asimismo, se observa que el oxígeno disuelto disminuyó rápidamente en las primeras horas debido al rápido metabolismo y crecimiento que presenta esta levadura con glucosa como fuente de carbono. Luego, el  $O_2d$  se mantuvo en un valor cercano a 30 % en cascada con la agitación, la cual varió en un rango de 250-900 rpm durante la etapa *fed-batch*.



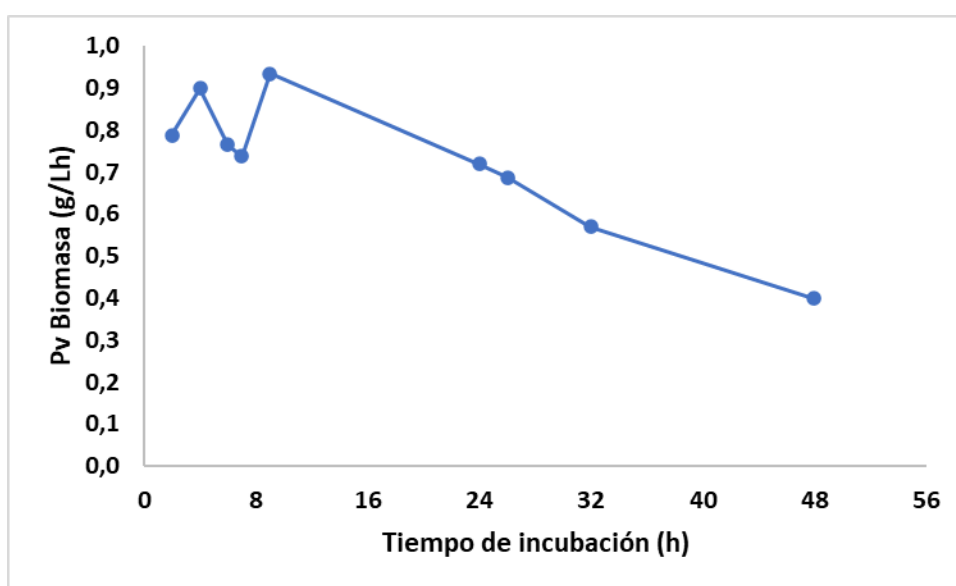
**Figura 37: Registro de parámetros de la fermentación de *S. cerevisiae* en biorreactor con medio YPD.** Línea negra: Temperatura (°C); línea amarilla: agitación (rpm); línea celeste: oxígeno disuelto (%) y línea naranja: pH, en función del tiempo de fermentación (h).

La **Figura 38** muestra los resultados de la fermentación durante las 48 h de proceso, donde se observa que el consumo total de glucosa (17,9 g<sub>s</sub>/L) ocurrió a las 7 h de fermentación de la etapa *batch*. Donde se alcanzó un nivel de biomasa de 5,2 g<sub>x</sub>/L, con un rendimiento de biomasa en función de la glucosa consumida ( $Y_{x/s}$ ) igual a 0,3 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub>, y el rendimiento de biomasa en función de los azúcares reductores consumidos ( $Y_{x/s}$ ) fue de 0,26 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub>. En ese momento se inició la alimentación con glucosa (200 g/L) aplicando flujo constante. A las 48 h de fermentación se consiguió el máximo nivel de biomasa (19,16 g<sub>x</sub>/L). A dicho tiempo la productividad volumétrica de biomasa ( $P_v$ ) fue 0,4 g<sub>p</sub>/L h, mientras que la productividad volumétrica máxima ( $P_{vMax}$ ) de biomasa fue 0,93 g/Lh la cual se consiguió a las 9 h de cultivo.



**Figura 38: Fermentación de *S. cerevisiae* en biorreactor con medio de cultivo YPD.** La línea azul corresponde a la variación de biomasa (peso seco, g/L), la línea naranja corresponde al consumo de glucosa (g/L), y la línea gris corresponde al consumo de azúcares reductores (g/L), en función del tiempo de incubación (h).

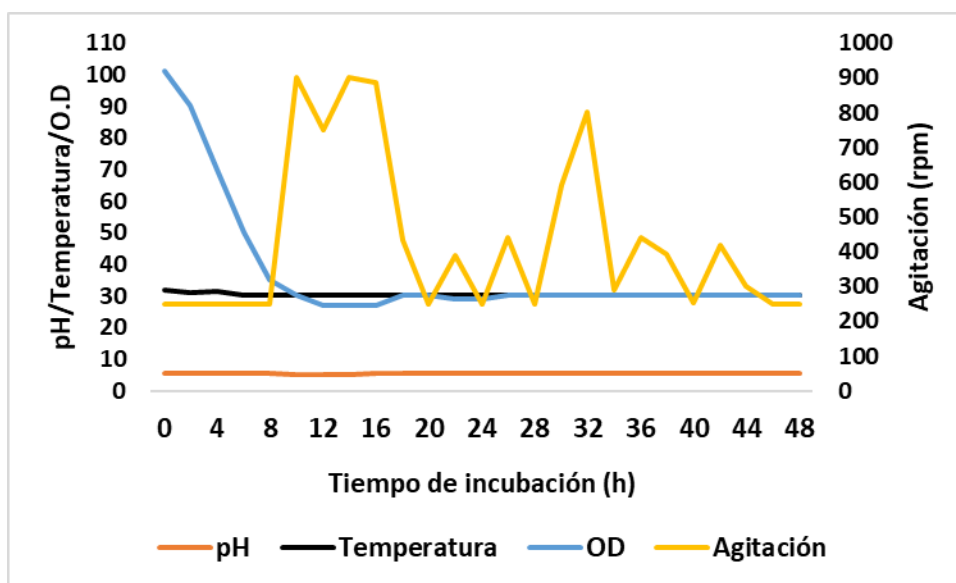
En la **Figura 39** se muestra la variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 en medio YPD. Así se puede observar que la productividad volumétrica máxima ( $P_{vMax}$ ) de biomasa fue 0,93 g/Lh, y se consiguió a las 9 h de incubación. Mientras que la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa al final de la fermentación fue 0,4 g/Lh.



**Figura 39: Variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 en medio YPD.**

### 5.8.2. Producción de biomasa de *K. marxianus* DSM 11954 mediante fermentación en bioreactor con medio YPD

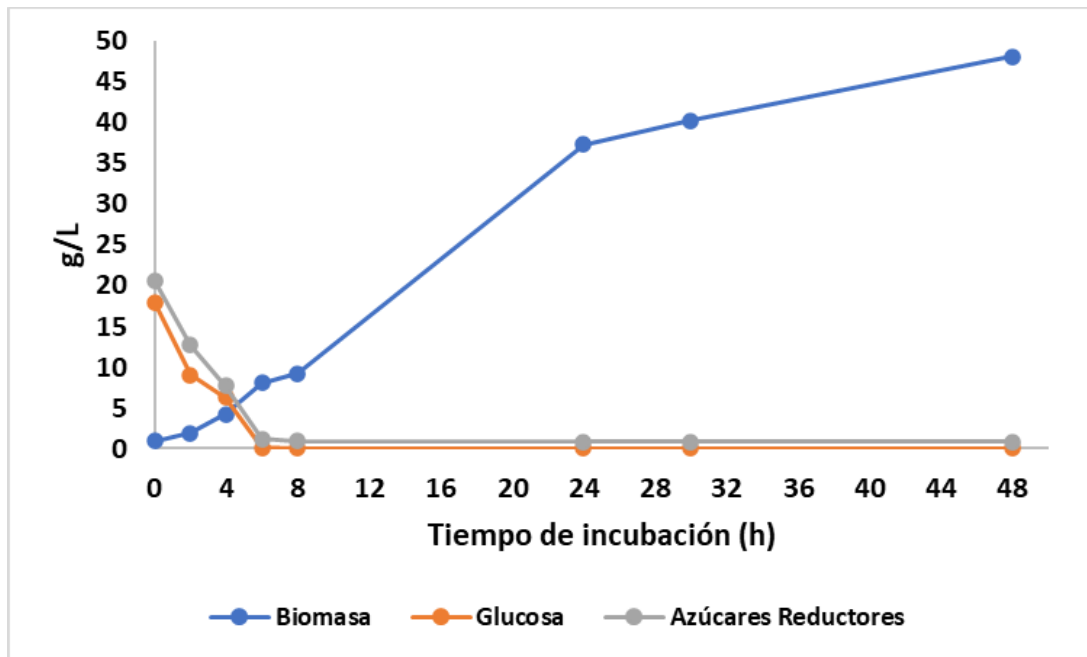
La segunda fermentación fue de la levadura de *K. marxianus* DSM 11954 en biorreactor de tanque agitado, se realizó en medio YPD con un pH constante de 5,5, y una temperatura de 30°C. Luego de 8 h de cultivo *batch*, se consumió totalmente la glucosa y se inició la etapa *fed-batch* de alimentación con glucosa concentrada (200 g/L) aplicando un flujo constante de 29,5 mL/h, mediante el cual se agregaron 1180 ml de solución concentrada de glucosa. En la **Figura 40** se muestra el registro de los parámetros del proceso; agitación, oxígeno disuelto ( $O_2d$ ), pH y temperatura durante las 48 h de fermentación, donde se observa que la temperatura y el pH se mantuvieron constantes a lo largo del proceso de acuerdo a los valores pre-establecidos. Asimismo, se observa que el oxígeno disuelto disminuyó rápidamente en las primeras horas debido al rápido metabolismo y crecimiento que presenta esta levadura con glucosa como fuente de carbono. Luego, el  $O_2d$  se mantuvo en un valor cercano a 30 % en cascada con la agitación, la cual varió en un rango de 250-900 rpm durante la etapa *fed-batch*.



**Figura 40: Registro de parámetros de la fermentación de *K. marxianus* en biorreactor con medio YPD.** Línea negra: Temperatura (°C); línea amarilla: agitación (rpm); línea celeste: oxígeno disuelto (%) y línea naranja: pH, en función del tiempo de fermentación (h).

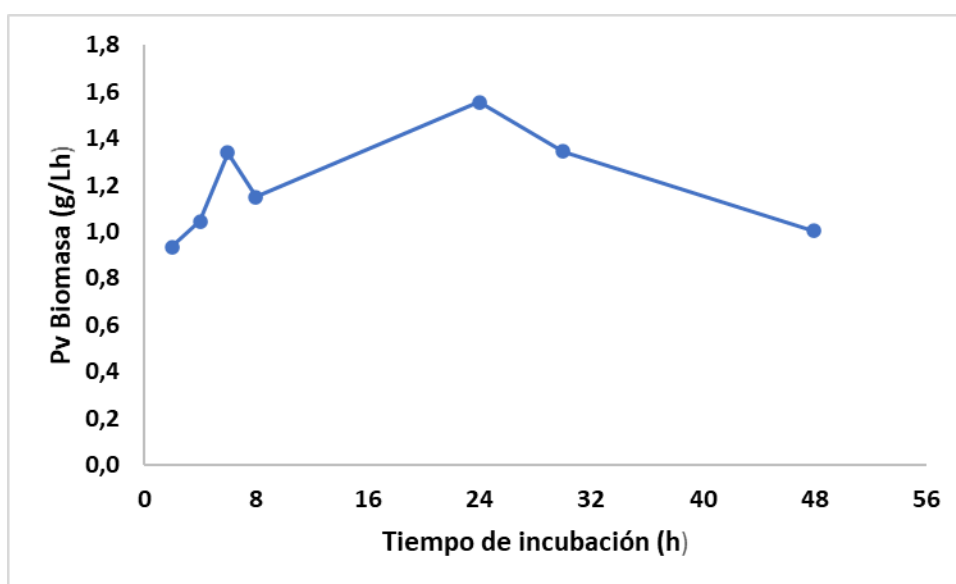
La **Figura 41** muestra los resultados de la fermentación durante 48 h de proceso, donde se observa que el consumo total de glucosa (17,99 g<sub>s</sub>/L) ocurrió a las 8 h de fermentación de la etapa *batch*. El nivel de biomasa fue igual a 9,2 g<sub>x</sub>/L, con un rendimiento de biomasa en función de la glucosa consumida ( $Y_{x/s}$ ) igual a 0,46 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub>, y el rendimiento de biomasa en función de los azúcares

reductores consumidos ( $Y_{x/s}$ ) fue de 0,4  $g_x/g_s$ . En ese momento se inició el alimentado con glucosa con un flujo constante. A las 48 h de fermentación se consiguió el máximo nivel de biomasa (48,11  $g_x/L$ ). A dicho tiempo la productividad volumétrica de biomasa ( $P_v$ ) fue 1,002  $g_p/L$  h. En tanto la productividad volumétrica máxima ( $P_{vMax}$ ) de biomasa fue 1,55  $g/Lh$ , a las 24 horas de cultivo.



**Figura 41: Fermentación de *K. marxianus* DSM 11954 en biorreactor con medio de cultivo YPD.** La línea azul corresponde a la variación de biomasa (peso seco, g/L), la línea naranja corresponde al consumo de glucosa (g/L), y la línea gris corresponde al consumo de azúcares reductores (g/L), en función del tiempo de incubación (h).

En la **Figura 42** se muestra la variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de fermentación de *K. marxianus* DSM 11954 en medio YPD. Así se puede observar que la productividad volumétrica máxima ( $P_{vMax}$ ) de biomasa fue 1,55  $g/Lh$ , y se consiguió a las 24 h de incubación. Mientras que la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa al final de la fermentación fue 1  $g/Lh$ .

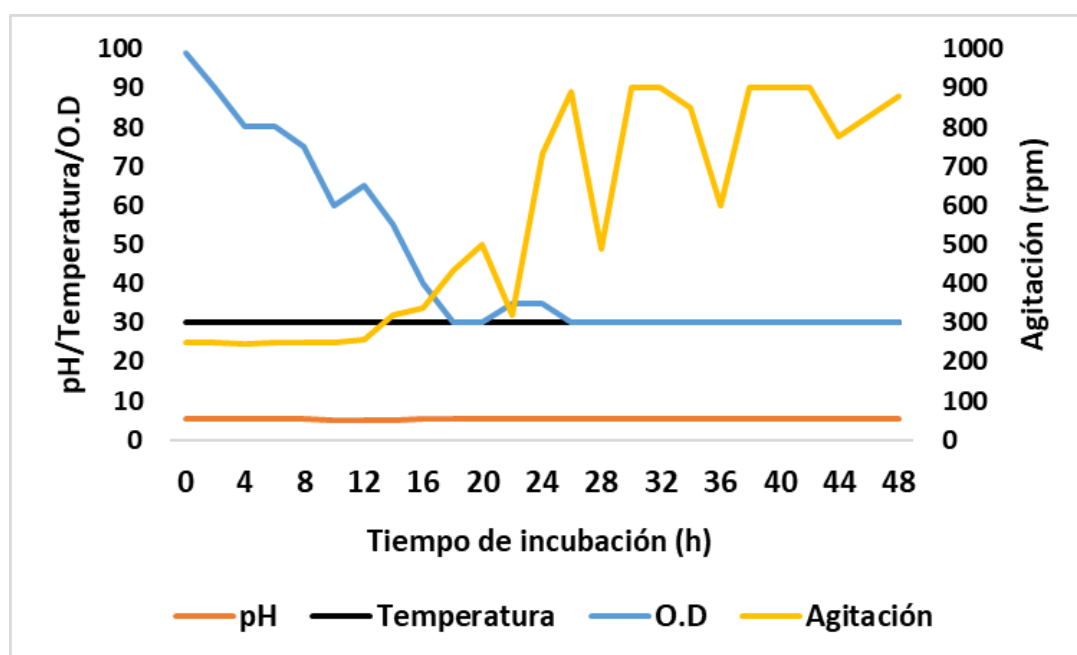


**Figura 42:** Variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de fermentación de *K. marxianus* DSM 11954 en medio YPD.

### 5.8.3. Producción de biomasa de *S. cerevisiae* ATCC 9763 mediante fermentación en bioreactor con medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña

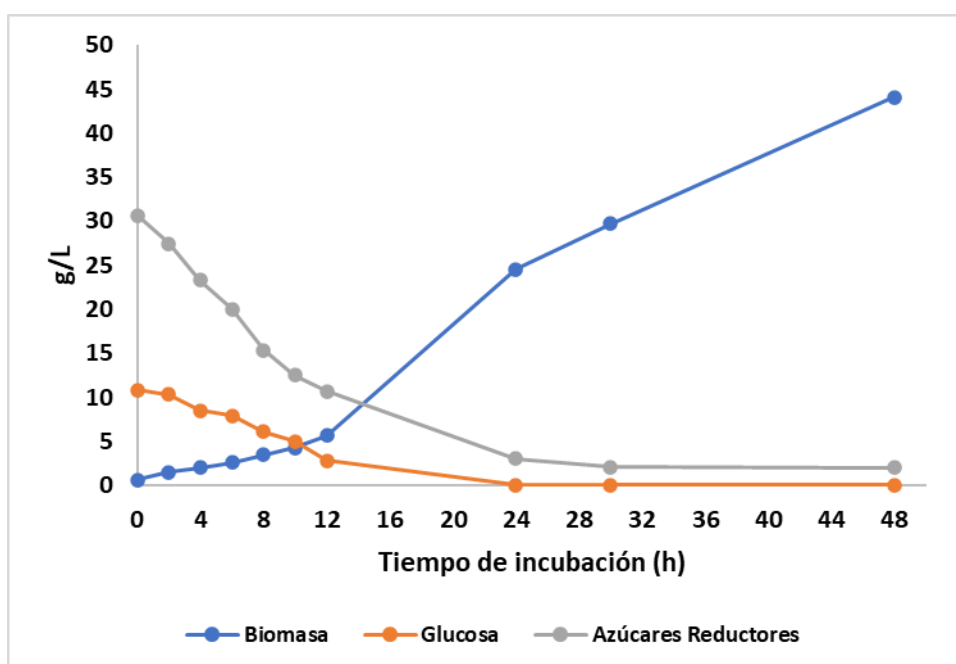
La siguiente fermentación de *S. cerevisiae* ATCC 9763 en biorreactor de tanque agitado se realizó en medio alternativo con melaza de caña, a un pH constante de 5,5, y una temperatura de 30°C. Luego de 12 h (tiempo en el cual se consumió casi totalmente la glucosa) de cultivo *batch* se inició la etapa *fed-batch* de alimentación con glucosa concentrada a flujo constante de 3,21 mL/h, en la cual se agregó un total de 118,8 ml de una solución de melaza concentrada 400 g/L.

En la **Figura 43** se muestra el registro de los parámetros del proceso; agitación, oxígeno disuelto ( $O_2d$ ), pH y temperatura durante las 48 h de fermentación, donde se observa que la temperatura y el pH se mantuvieron constantes a lo largo del proceso de acuerdo a los valores pre-establecidos. Luego, el  $O_2d$  se mantuvo en un valor cercano a 30 % en cascada con la agitación, la cual varió en un rango de 250-900 rpm durante la etapa *fed-batch*.



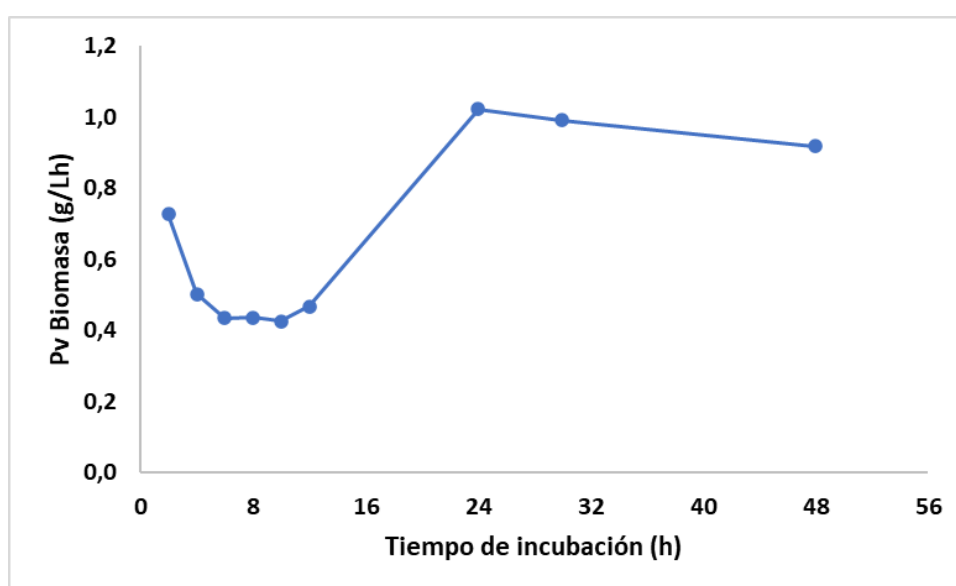
**Figura 43: Registro de parámetros de la fermentación de *S. cerevisiae* en biorreactor con medio alternativo con melaza de caña.** Línea negra: Temperatura (°C); línea amarilla: agitación (rpm); línea celeste: oxígeno disuelto (%) y línea naranja: pH, en función del tiempo de fermentación (h).

La **Figura 44** muestra los resultados de la fermentación durante 48 h de proceso, donde se observa que se consumió la totalidad de la glucosa (10,83 g/L), agotándose casi completamente a las 12 h de fermentación de la etapa *batch*. Se alcanzó un nivel de biomasa igual a 5,62 g<sub>x</sub>/L, con un rendimiento de biomasa en función de la glucosa consumida ( $Y_{x/s}$ ) igual a 0,51 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub>, y el rendimiento de biomasa en función de los azúcares reductores consumidos ( $Y_{x/s}$ ) fue de 0,18 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub>. En ese momento se inició el alimentado con melaza con un flujo constante. A las 48 h de fermentación se consiguió el máximo nivel de biomasa (44,06 g<sub>x</sub>/L). A dicho tiempo la productividad volumétrica de biomasa ( $P_v$ ) fue 0,91 g<sub>p</sub>/Lh y la productividad volumétrica máxima ( $P_{vMax}$ ) de biomasa fue 1,02 g/Lh, a las 24 h de cultivo.



**Figura 44:** Fermentación de *S. cerevisiae* en biorreactor con medio de cultivo alternativo con melaza de caña. La línea azul corresponde a la variación de biomasa (peso seco, g/L), la línea naranja corresponde al consumo de glucosa (g/L), y la línea gris corresponde al consumo de azúcares reductores (g/L), en función del tiempo de incubación (h).

En la **Figura 45** se muestra la variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 en medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña. Así se puede observar que la productividad volumétrica máxima ( $P_{vMax}$ ) de biomasa fue 1,02 g/Lh, y se consiguió a las 24 h de incubación. Mientras que la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa al final de la fermentación fue 0,92 g/Lh.



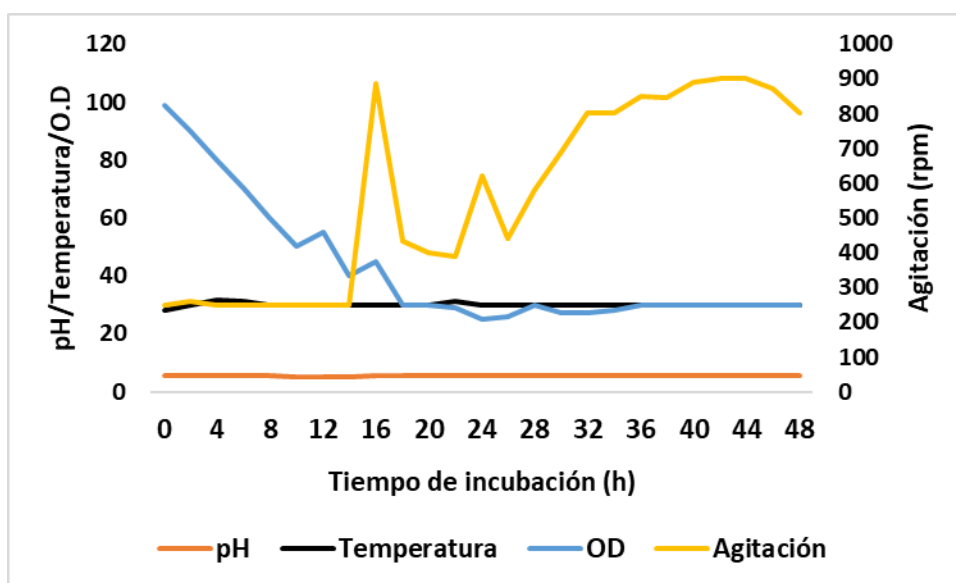
**Figura 45:** Variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 en medio a base de melaza de caña.



#### 5.8.4. Producción de biomasa de *K. marxianus* DSM 11954 mediante fermentación en bioreactor con medio alternativo a base de melaza de caña

La última fermentación de *K. marxianus* DSM 11954 en biorreactor de tanque agitado se realizó en medio alternativo con melaza de caña, a un pH constante de 5,5, y una temperatura constante de 30°C. Luego de 12 h (tiempo en el cual se consumió casi totalmente la glucosa) de cultivo *batch* se inició la etapa *fed-batch* de alimentación con glucosa concentrada a flujo constante de 2,5 mL/h, en la cual se agregó un total de 90 ml de una solución de melaza concentrada 400 g/L.

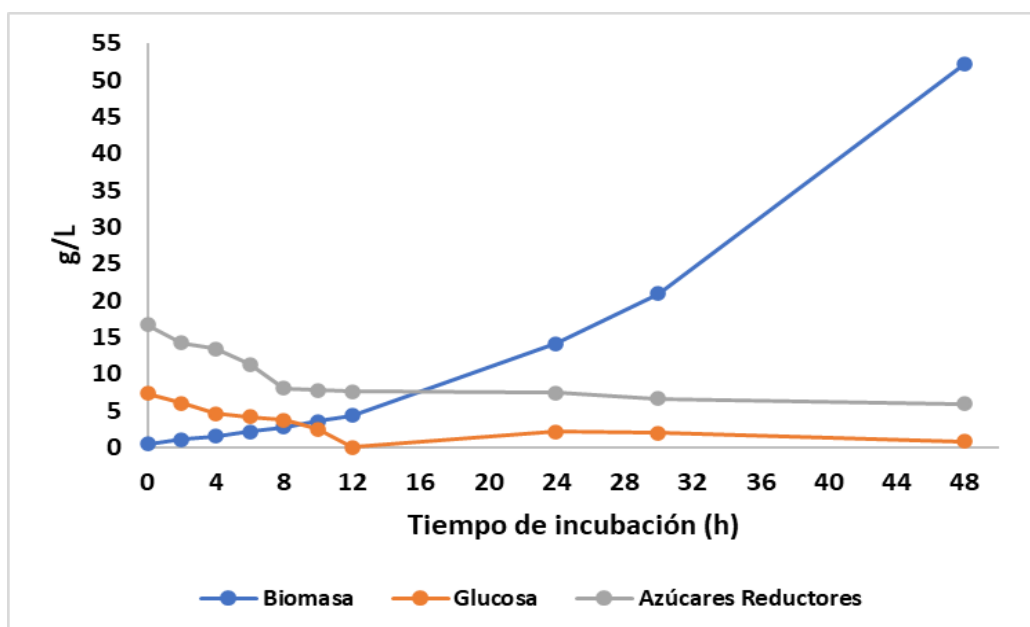
En la **Figura 46** se muestra el registro de los parámetros del proceso; agitación, oxígeno disuelto ( $O_2d$ ), pH y temperatura durante las 48 h de fermentación, donde se observa que la temperatura y el pH se mantuvieron constantes a lo largo del proceso de acuerdo a los valores pre-establecidos. Luego, el  $O_2d$  se mantuvo en un valor cercano a 30 % en cascada con la agitación, la cual varió en un rango de 250-900 rpm durante la etapa *fed-batch*.



**Figura 46: Registro de parámetros de la fermentación de *K. marxianus* en biorreactor con medio alternativo con melaza de caña.** Línea negra: Temperatura (°C); línea amarilla: agitación (rpm); línea celeste: oxígeno disuelto (%) y línea naranja: pH, en función del tiempo de fermentación (h).

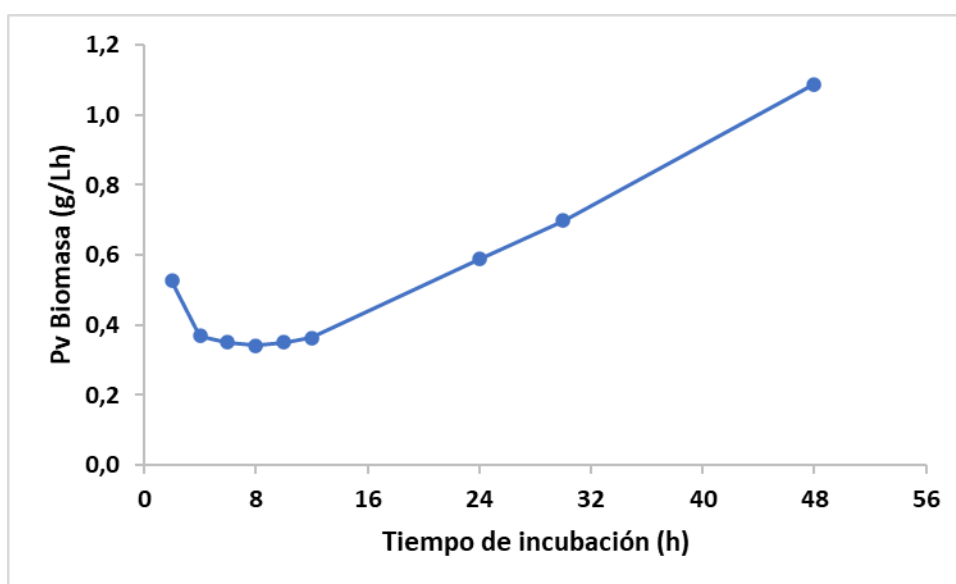
La **Figura 47** muestra los resultados de la fermentación durante 48 h de proceso, donde se observa que el consumo total de glucosa (7,34 g<sub>s</sub>/L) ocurrió a las 12 h de fermentación de la etapa *batch*. La biomasa alcanzó un nivel igual a 4,35 g<sub>x</sub>/L, con un rendimiento de biomasa en función de la glucosa consumida ( $Y_{x/s}$ ) igual a 0,53 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub>, y el rendimiento de biomasa en función de los azúcares reductores consumidos ( $Y_{x/s}$ ) fue de 0,26 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub>. En ese momento se inició el alimentado con melaza con un flujo constante. A las 48 h de fermentación se consiguió el máximo nivel de biomasa (52,18

$g_x/L$ ). A ese tiempo la productividad volumétrica de biomasa ( $P_v$ ) fue 1,08  $g_p/Lh$ . Mientras que la productividad volumétrica máxima ( $P_{vMax}$ ) de biomasa fue 1,08  $g/Lh$ , a las 48 horas de cultivo.



**Figura 47: Fermentación de *K. marxianus* en biorreactor con medio de cultivo alternativo melaza de caña.** La línea azul corresponde a la variación de biomasa (peso seco, g/L), la línea naranja corresponde al consumo de glucosa (g/L), y la línea gris corresponde al consumo de azúcares reductores (g/L), en función del tiempo de incubación (h).

En la **Figura 48** se muestra la variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de fermentación de *K. marxianus* DSM 1195 en medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña. Así se puede observar que la productividad volumétrica máxima ( $P_{vMax}$ ) de biomasa fue 1,09  $g/Lh$ , y se consiguió a las 48 h de incubación. Mientras que la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa al final de la fermentación fue 1,09  $g/Lh$ .



**Figura 48:** Variación de la productividad volumétrica ( $P_v$ ) de biomasa en función del tiempo de fermentación de *K. marxianus* DSM 1195 en medio a base de melaza de caña.

En la **Tabla 6** se resumen los valores correspondientes a los distintos parámetros estequiométricos y productivos de las fermentaciones realizadas en bioreactor de tanque agitado.

**Tabla 6:** Parámetros de las fermentaciones de *S. cerevisiae* ATCC 9763 y *K. marxianus* DSM 11954 realizadas en biorreactor de tanque agitado con medio YPD y medio alternativo con de melaza de caña.

|                                                                                                                                                 | <i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763 |                                | <i>K. marxianus</i> DSM 11954 |                                |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
|                                                                                                                                                 | Medio YPD                      | Medio a base de melaza de caña | Medio YPD                     | Medio a base de melaza de caña |
| <b>Rendimiento de biomasa en función de glucosa consumida (<math>Y_{x/s}</math>, g<sub>x</sub>/g<sub>glucosa</sub>)</b>                         | 0,28                           | 0,51                           | 0,51                          | 0,6                            |
| <b>Rendimiento de biomasa en función de azúcares reductores consumido (<math>Y_{x/s}</math>, g<sub>x</sub>/g<sub>azúcares reductores</sub>)</b> | 0,22                           | 0,18                           | 0,44                          | 0,26                           |
| <b>Nivel máximo de biomasa (g/L)</b>                                                                                                            | 19,16                          | 44,06                          | 48,11                         | 52,18                          |
| <b>Productividad volumétrica de biomasa final (g<sub>x</sub>/Lh)</b>                                                                            | 0,4                            | 0,91                           | 1,00                          | 1,08                           |
| <b>Productividad volumétrica máxima de biomasa (g<sub>x</sub>/Lh)</b>                                                                           | 0,93                           | 1,02                           | 1,55                          | 1,09                           |

## 6. CONCLUSIONES

Por medio de los ensayos realizados de la puesta a punto y validación de las metodologías de cuantificación de glucosa y azúcares reductores, se logró determinar que estos métodos permiten alcanzar una buena repetibilidad. Asimismo, a partir de la utilización de estas metodologías y junto con los gráficos de control se consiguió obtener resultados confiables.

Los parámetros cinéticos y estequiométricos del crecimiento de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Kluyveromyces marxianus* DSM 11554, fueron obtenidos mediante cultivos en frascos *Erlenmeyer* conteniendo el medio tradicional YPD. Dichos parámetros fueron utilizados *a posteriori* como referencia para la evaluación del crecimiento de las mencionadas cepas en el medio alternativo con melaza de caña de azúcar, en pos de conseguir una adecuada producción de biomasa de levaduras. De este modo, se determinó que la cepa ATCC 9763 de *S. cerevisiae* alcanzó un nivel máximo de biomasa de 14,45 g<sub>x</sub>/L en medio YPD y 10,71g<sub>x</sub>/L en medio con melaza de caña. Por otra parte, la cepa DSM 11554 de *K. marxianus* presentó un nivel máximo de biomasa igual a 15,04 g<sub>x</sub>/L en medio YPD y 10,48g<sub>x</sub>/L en melaza de caña.

Luego, de la evaluación del crecimiento de *S. cerevisiae* ATCC 9763 y *K. marxianus* DSM 11554 en *Erlenmeyer* con medio YPD y medio alternativo con melaza de caña, se realizó el escalado de la producción de biomasa de estas levaduras a bioreactor. Para tal fin se aplicó una estrategia conformada por una primera etapa de fermentación en lote o *batch* hasta el consumo total de glucosa, y luego se efectuó una etapa *fed-batch* de alimentación con glucosa concentrada para el medio YPD y con melaza de caña concentrada para el medio alternativo. Estas fermentaciones se realizaron en bioreactor de tanque agitado escala laboratorio, controlando a lo largo del proceso, distintos parámetros como el pH, el oxígeno disuelto y la temperatura, y aplicando un flujo de alimentación constante.

A partir de la fermentación con la levadura *S. cerevisiae* ATCC 9763 en medio complejo YPD se obtuvo un rendimiento en función de los azúcares reductores consumidos de 0,22 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub> y una productividad máxima de 0,93 g<sub>x</sub>/L h. En la fermentación realizada con medio a base de melaza de caña, el rendimiento conseguido fue 0,51 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub> y la productividad volumétrica máxima de biomasa fue 1,02 g<sub>x</sub>/Lh. Sin embargo, el máximo nivel de biomasa obtenido en medio de cultivo a base de melaza de caña (44,06 g/L) fue mucho mayor en comparación al obtenido en medio YPD (19,16 g/L), esto debido al mayor contenido de azúcares reductores en el medio con melaza de caña. Por otra parte, a partir de la fermentación de *K. marxianus* DSM 11554 realizada en el medio YPD se consiguió un rendimiento en función de los azúcares reductores consumidos de 0,44 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub> y una

productividad volumétrica máxima de biomasa de 1,55 g<sub>x</sub>/Lh. Mientras que, a partir de la fermentación realizada con el medio a base de melaza de caña, los valores de rendimiento y productividad volumétrica máxima de biomasa de *K. marxianus* DSM 11554 fueron 0,26 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub> y 1,08 g<sub>x</sub>/Lh, respectivamente. Estos resultados fueron menores que los obtenidos con el medio YPD. Asimismo, el máximo nivel de biomasa alcanzado en medio a base de melaza de caña (52,18 g/L) fue mayor que obtenido en medio YPD (48,11 g/L)

Se ha reportado que las levaduras pueden utilizar fructosa, glucosa, maltosa, sacarosa, maltotriosa y maltotetraosa. Generalmente la levadura remueve los azúcares del medio en un orden estricto: la sacarosa es hidrolizada extracelularmente por la enzima invertasa y es la primera en ser consumida, seguida de la glucosa y fructosa, y finalmente maltosa, maltotriosa y maltotetraosa (Hammond, 2002). La concentración de carbohidratos en el medio de cultivo alternativo a base de melaza fue adecuada, lo cual sugiere que la disponibilidad de azúcares no fue limitante para la obtención de biomasa de levaduras.

En conclusión, en este trabajo de Tesis se ha realizado la puesta a punto y validación de las metodologías de cuantificación de sustratos para el proceso de producción de biomasa de las levaduras ya mencionadas. Por otra parte, cabe remarcar que mediante los procesos fermentativos realizados en biorreactor de tanque agitado se consiguió obtener una mayor producción de biomasa de las levaduras *S. cerevisiae* ATCC 9763 y *K. marxianus* DSM 11554 en el medio alternativo con melaza de caña, en comparación a los obtenidos en el medio de cultivo YPD. Asimismo, mediante el escalado en biorreactor de tanque agitado, se logró también optimizar las condiciones de crecimiento de ambas cepas y así lograr mejores resultados de producción de biomasa respecto a las fermentaciones realizadas en frascos *Erlenmeyer*.

En definitiva a partir de este trabajo se consiguió optimizar la producción de biomasa de levaduras mediante fermentaciones en bioreactor de tanque agitado utilizando un medio alternativo y económico a base de melaza de caña y aplicando un sistema de cultivo alimentado. Mediante este proceso biotecnológico será factible la producción rentable de biomasa de levaduras *S. cerevisiae* y *K. marxianus*, en pos de remplazar un medio de cultivo sumamente costoso como es el medio YPD y conseguir utilizar biomasa de levaduras, producida mediante fermentaciones rentables, para alimentación animal.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., & Aranzazu Martínez, M. (2006). Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology : RTP*, 45(1), 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2006.02.004>
- AOAC. (2012). Official Methods of Analysis of AOAC international. In *Association of Official Analytical Chemists, Inc* (19th ed., Vol. 1, Issue Volume 1). <https://doi.org/10.32741/fihb.3.honey>
- Arce, L. (2012). *La Industria Cárnica en Paraguay*.
- ARP. (2017). *Paraguay y su Sector Cárnico*. [www.arp.org.py](http://www.arp.org.py)
- Bello GIL, Daniel; Carrera B., Emilia; Diaz M., Y. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *Icidca*, 40, 45–50.
- Bonekamp, F. J., & Oosterom, J. (1994). On the safety of *Kluyveromyces lactis* - a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(1), 1–3. <https://doi.org/10.1007/BF00166072>
- Bravo VP, R Ellison SL, F. G. EL. (n.d.). (PDF) *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: " Aspectos generales sobre la validación de métodos "* | Adrian Ortega Dlc - Academia.edu. Retrieved February 16, 2020, from [https://www.academia.edu/24922817/Validación\\_de\\_métodos\\_y\\_determinación\\_de\\_la\\_incertidumbre\\_de\\_la\\_medición\\_Aspectos\\_generales\\_sobre\\_la\\_validación\\_de\\_métodos\\_](https://www.academia.edu/24922817/Validación_de_métodos_y_determinación_de_la_incertidumbre_de_la_medición_Aspectos_generales_sobre_la_validación_de_métodos_)
- Chacón Villalobos, A. (2004). Perspectivas actuales de la proteína unicelular (SCP) en la agricultura y la industria. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 1–15. <http://www.redalyc.org/html/437/43717210/>
- Cibils, Ricardo; Fernández, Enrique; Acosta, Y. (2002). *Suplementación estratégica de la recría vacuna*. 1–5.
- Cortés-Sánchez, Alejandro De Jesús; Guadarrama, Luis Manuel; Díaz-Ramírez, M. (2014). *Producción de biomasa a partir de Aspergillus oryzae en cultivo sumergido*. 11–16.
- Dlc, A. O. (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: " Aspectos generales sobre la validación de métodos "*
- Duarte, O., & Gonzalez, J. (2013). Guía técnica del cultivo de la Caña de Azúcar. In *Proyecto Paquetes Tecnológicos* (Vol. 1). <http://www.agr.una.py/fca/index.php/libros/catalog/view/326/27/353-1>
- Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., Soto, M., Aguilera, M., & Soraya, S. (2010, December). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos*. 1, 70.

- Elizalde, J. C. (2003). *Suplementación en condiciones de pastoreo*. 17–28.
- Enciso, V. (2019). *Producción y comercialización de caña de azúcar y azúcar*.
- Eurolab España. (2016). *Guía Eurachem La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos Primera Edición Española Agradecimientos Grupo del proyecto*. Eurachem. <https://doi.org/ST/NAR/41>
- F Pachón, G Tovar, N Urbina, N. M. (2005). Uso De Subproductos De Caña Panelera Como Suplemento Alimenticio Para Ganado Bovino Y Para Evitar La Contaminación Ambiental. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 52(1), 79–90.
- Fajardo y Sarmiento, 2007. (2007). *Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae*
- FAO. (2019). Producción animal. *FAO Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La Agricultura*. <http://www.fao.org/animal-production/es/>
- Faria-Oliveira, F., Puga, S., & Ferreir, C. (2013). Yeast: World's Finest Chef. In *Food Industry*. <https://doi.org/10.5772/53156>
- Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O., Vieira, E., & Tavarella, J. G. (2010). Brewer's Saccharomyces yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends in Food Science and Technology*, 21(2), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.10.008>
- Ghazanfar, S., Khalid, N., Ahmed, I., & Imran, M. (2017). Probiotic Yeast: Mode of Action and Its Effects on Ruminant Nutrition. In *Yeast - Industrial Applications*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70778>
- Grau, R. (2015). *Buenas Prácticas para Producción de Carne Natural*.
- Gurdo, N., Calafat, M., Nosedá, D. G., & Gigli, I. (2018). Production of selenium-enriched yeast (*Kluyveromyces marxianus*) biomass in a whey-based culture medium. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 14(2), 175–182. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2018.175.182>
- Hernández, Enrique; Borrell, J. (1993). Probióticos en avicultura. In *Selecciones avícolas*.
- Human Diagnostics Worldwide. (n.d.). *Prueba enzimática colorimétrica por glucosa*. Retrieved March 21, 2020, from <http://www.bganalizadores.com.ar/img/inserto60.pdf>
- Leeson, S. y Summers, J. (2000). Nutrición comercial de aves de corral - S. Leeson, JD Summers - Google Libros. In *Nutrición comercial de aves de corral* (p. 395). [https://books.google.com.py/books?hl=es&lr=&id=H7WxAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=leeson+summers+commercial+poultry+nutrition&ots=4iWU1AziFF&sig=sZSKCg6bPFn8HZgPpa3IHuT\\_-Bc#v=onepage&q=leeson summers commercial poultry nutrition&f=false](https://books.google.com.py/books?hl=es&lr=&id=H7WxAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=leeson+summers+commercial+poultry+nutrition&ots=4iWU1AziFF&sig=sZSKCg6bPFn8HZgPpa3IHuT_-Bc#v=onepage&q=leeson%20summers%20commercial%20poultry%20nutrition&f=false)
- Marova, I., Carnecka, M., Halienova, A., Certik, M., Dvorakova, T., & Haronikova, A. (2012). Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *Journal of Environmental Management*, 95(SUPPL.), S338–S342. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.06.018>

- Martin, S. A., & Nisbet, D. J. (1990). Effects of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on fermentation of amino acids, bermudagrass and starch by mixed ruminal microorganisms in vitro. *Journal of Animal Science*, 68(7), 2142–2149. <https://doi.org/10.2527/1990.6872142x>
- Mejías-Brizuela, N. Y.; Galan, Nestor Daniel; Orozco Guillén, E. E. (2016, December). Aprovechamiento de los residuos agroindustriales y su contribución al desarrollo sostenible de México. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*, March 2018, 27–41.
- Musa, H. H., Wu, S. L., Zhu, C. H., Seri, H. I., & Zhu, G. Q. (2009). The Potential Benefits of Probiotics in Animal Production and Health. *MEDWELL Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(2), 313–321.
- Noseda, D. G., Recúpero, M. N., Blasco, M., Ortiz, G. E., & Galvagno, M. A. (2013). Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine chymosin B in *Pichia* (*Komagataella*) *pastoris* under AOX1 promoter. *Protein Expression and Purification*, 92(2), 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.08.018>
- Oller, A. F. (2014, September 30). Materias Primas Alternativas (I). *NutriNews Nutrición animal*.Info. <https://nutricionanimal.info/materias-primas-alternativas/>
- Pallarez, M. (2016, April 29). Alternativas modernas y tradicionales para la alimentación del ganado. *CONtextoganadero Una Lectura Rural de La Realidad Colombiana*. <https://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/alternativas-modernas-y-tradicionales-para-la-alimentacion-del-ganado>
- Pedretti, R. (2004). *Trazabilidad de carne bovina en paraguay*.
- Peralta, J., Feltes, F., & Branda, L. (2013). Ganancia de peso en vacas suplementadas con expeller de pulpa de coco (*Acrocomia totai*. Mart) sobre pastura cultivada. *Compendio de Ciencias Veterinarias*, 3(1), 11–14. <http://scielo.iics.una.py/pdf/ccv/v3n1/v3n1a03.pdf>
- Rivera, C., & Rodriguez, R. (2010). Horwitz equation as quality benchmark in ISO/IEC 17025 testing laboratory. *IIE Annual Conference and Expo 2010 Proceedings*.
- Riveros, M. (2012). Aprovechamiento de subproductos de la caña panelera en la alimentación animal. *Fedepanela*, 20. <http://www.fedepanela.org.co/publicaciones/cartillas/Subproductos.pdf>
- Rosmini, M. R., Sequeira, G. J., Guerrero-Legarreta, I., Martí, L. E., Dalla-Santina, R., Frizzo, L., & Bonazza, J. C. (2004). PRODUCCION DE PROBIOTICOS PARA ANIMALES DE ABASTO: IMPORTANCIA DEL USO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL INDIGENA PROBIOTIC PRODUCTION FOR MEAT ANIMALS: IMPORTANCE OF USING INDIGENOUS INTESTINAL MICROBIOTA. In *REVISTA MEXICANA DE INGENIERIA QUIMICA* (Vol. 3).
- Salamanca, A. (2010). Suplementacion de minerales en la produccion bovina – Mineral supplementation for cattle production. *Redvet*, XI(7).
- Serrat, M., & Méndez, A. (2015). Construcción y Validación Experimental de un Biorreactor Artesanal Tipo Tanque Agitado para Fermentaciones Sumergidas a Escala de Laboratorio



Construction and Experimental Validation of a Homemade Stirred Tank Bioreactor for Lab-scale Submerged. *Tecnología Química*, 31(2), 362–375.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2224-61852015000300010%0Ahttp://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2224-61852011000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es%0Ahttp://scielo.sld.cu/pdf/rtq/v35n3/rtq10315.pdf](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852015000300010%0Ahttp://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852011000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es%0Ahttp://scielo.sld.cu/pdf/rtq/v35n3/rtq10315.pdf)

Trujillo-Roldán, Mauricio A., & Valdez-Cruz, N. A. (2009). El uso de Bioreactores desechables en la industria biofarmacéutica y sus implicaciones en la ingeniería. *Dyna (Medellín)*, 76(158), 275–283. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49612069027>

UNA. (2017, September 1). PARAGUAY: GANADERÍA Y SU CRECIMIENTO. *Universidad Nacional de Asunción Facultad de Ciencias Agrarias*. <http://cifca.agr.una.py/novedades/52-paraguay-ganaderia-y-su-crecimiento.html>

Vargas Corredor, Y. A. P. P. L. I. (2018). *Aprovechamiento De Residuos Agroindustriales En El Mejoramiento De La Calidad Del Ambiente*. 14(1), 59–72. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3108>

Velásquez, R. (2006). Selectividad animal de forrajes herbáceos y leñosos en pasturas naturalizadas en función de épocas, manejo y condición de paisaje en Muy Muy, Nicaragua. *Orton.Catie.Ac.Cr*, 1–103. <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A2242E/A2242E.PDF>

Velásquez Vélez, R. A. (2005). *Selectividad animal de forrajes herbáceos y leñosos en pasturas naturalizadas en función de épocas, manejo y condición de paisaje en Muy Muy, Nicaragua* *Animal selectivity of woody and herbaceous forages in naturalized pastures as a function of seasons, management and landscape conditions in Muy Muy, Nicaragua*. CATIE.